



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΚΑΔΗΜΙΑ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

Χρήση των PDXs ως οργανισμούς μοντέλα για τη μελέτη της ανθεκτικότητας
στο Cisplatin, που εμφανίζεται στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

Λορένα Γ. Χοτζαλάρι

Επιβλέπων καθηγητής:

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής, ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2024

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

Χρήση των PDXs ως οργανισμούς μοντέλα για τη μελέτη της ανθεκτικότητας
στο Cisplatin, που εμφανίζεται στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

“PDXs as a model for studying the Cisplatin Resistance in HNSCC”

Λορένα Γ. Χοτζαλάρι

Εξεταστική επιτροπή:

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής, ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ράμπιας Θεόδωρος, Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ

Κλινάκης Απόστολος, Ερευνητής Α', ΙΙΒΕΑΑ

Χρήση των PDXs ως οργανισμούς μοντέλα για τη μελέτη της ανθεκτικότητας στο Cisplatin, που εμφανίζεται στο καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων

Τμήμα Βιοτεχνολογίας / Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών / Ακαδημία Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα όγκων που περιλαμβάνει κακοήθειες εξ ορμώμενες από τη στοματική κοιλότητα, το στοματοφάρυγγα, τον υποφάρυγγα, το λάρυγγα και το ρινοφάρυγγα. Το HNSCC αποτελεί τον έκτο πιο κοινό καρκίνο παγκοσμίως, με 890.000 ασθενείς και 450.000 θανάτους. Σε πρώιμο στάδιο, η πρόγνωση των ασθενών είναι αρκετά καλή και αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση και /ή ακτινοβολία. Ωστόσο, το 66% των ασθενών παρουσιάζουν προχωρημένη νόσο και μόνο το 30 % αυτών θεραπεύονται. Λίγα φάρμακα έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικά στον HNSCC. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, χορηγείται θεραπεία με βάση το Cisplatin (CT) και ακτινοθεραπεία.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας συσχετίζεται με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και με την ετερογένεια του όγκου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των παραγόντων δημιουργούν έναν συνδυασμό γενετικών μεταβολών και, κατά συνέπεια, η ευαισθησία και η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των ατόμων. Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες προσπαθούν να εντοπίσουν τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα στα χημικοθεραπευτικά σχήματα στο HNSCC. Αξιόπιστα προκλινικά μοντέλα είναι επομένως ζωτικής σημασίας για την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στη θεραπεία του HNSCC και εξέλιξης και για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών στρατηγικών. Τα μοντέλα ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (Patient Derived Xenografts, PDXs), χρησιμοποιούνται αρκετά για την μελέτη του καρκίνου.

Ένα ισχυρό πλεονέκτημα αυτού του μοντέλου είναι ότι σε ιστολογικό επίπεδο, οι όγκοι PDX αναπαριστούν με ακρίβεια το ετερογενές και πολύπλοκο μικροπεριβάλλον του όγκου HNSCC, διατηρώντας τη μορφολογία των κυττάρων, την αρχιτεκτονική του στρώματος και των αγγείων, καθώς και τις άφθονες περιοχές κερατινοειδών κυττάρων και αντίστοιχους βαθμούς διαφοροποίησης με τον μητρικό όγκο.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας, είναι ο έλεγχος της ικανότητας των PDXs να αποτελέσουν ένα αξιόπιστο εργαλείο για την μελέτη της ανθεκτικότητας στο Cisplatin στο HNSCC. Για τον σκοπό αυτό 16 ιστοτεμάχια από όγκους ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα, μεταμοσχεύθηκαν σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια *IL2rg^{null}* (NSG). Το 50% των όγκων αναπτύχθηκε επιτυχώς στα ποντίκια. Ακολούθησε χαρακτηρισμός των όγκων με τεχνικές ανοσοιστοχημείας και η μεταμόσχευση των PDX πλέον όγκων σε μεγαλύτερο αριθμό ποντικών για την χορήγηση θεραπείας με Cisplatin. Το 25% των

δειγμάτων εμφάνισε ανθεκτικότητα στο Cisplatin, όπως φάνηκε από τις μετρήσεις των όγκων. Επομένως τα PDXs φαίνεται να είναι ένα μοντέλο ικανό για την μελέτη της ανθεκτικότητας στο Cisplatin στο HNSC.

Επιστημονική περιοχή: Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, Οργανισμοί Μοντέλα

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, Οργανισμοί Μοντέλα, Ανθεκτικότητα στο Cisplatin

PDXs as a model for studying the Cisplatin Resistance in HNSCC

MSc Systems Biology

Department of Biotechnology / Agricultural University of Athens

Institute for Biomedical Research / Academy of Athens

ABSTRACT

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) constitutes a heterogeneous group of tumors arising from various parts of the head and neck, including the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, larynx, and nasopharynx. HNSCC ranks as the sixth most common cancer worldwide, with 890,000 new cases and 450,000 deaths annually. In early stages, patients have a relatively good prognosis and are treated with surgery and/or radiation. However, 66% of patients present with advanced disease, and only 30% of these are cured. Few drugs have been proven effective in HNSCC. For patients with advanced disease, treatment typically involves cisplatin-based therapy and radiation. The effectiveness of treatment is correlated with patient characteristics and tumor heterogeneity.

Interactions between these factors create a combination of genetic variations, leading to variability in cancer cell sensitivity and resistance to therapy among individuals. In recent years, many studies have sought to identify the mechanisms responsible for chemotherapy resistance in HNSCC. Reliable preclinical models are therefore crucial for better understanding the molecular mechanisms involved in HNSCC therapy resistance and progression, and for developing more effective therapeutic strategies. Patient-Derived Xenografts (PDXs) are widely used preclinical models for cancer research.

A significant advantage of this model is that, at the histological level, PDX tumors accurately represent the heterogeneous and complex microenvironment of the HNSCC tumor, maintaining cell morphology, architectural layering, vascularity, as well as abundant keratinized cell areas and corresponding degrees of differentiation as in the primary tumor. The purpose of this study is to evaluate the ability of PDXs to serve as a reliable tool for studying cisplatin resistance in HNSCC.

Sixteen tumor specimens from patients with laryngeal cancer were transplanted into immunodeficient IL2r^{gnull} (NSG) mice. Fifty percent (8 out of 16) of the tumors were successfully engrafted in the mice. Tumors were then characterized using immunohistochemistry techniques, and PDX-derived tumors were transplanted into a larger number of mice for cisplatin treatment. Twenty-five percent (2 out of 8) of the samples exhibited resistance to cisplatin, as evidenced by tumor volume measurements. Therefore, PDXs appear to be a model capable of studying cisplatin resistance in HNSCC.

Scientific area: Head and neck squamous cell carcinoma, Organism model

Keywords: HNSCC, PDXs, Cisplatin Resistance

*Στους αγαπημένους ανθρώπους που έχω στη ζωή μου
και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα, στους καθηγητές μου
και τους συναδέλφους μου για την επιστημονική
καθοδήγηση και την υποστήριξη.*

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό
ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	8
1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HNSCC.....	8
1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	9
1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ / ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HNSCC	12
1.4 ^α Σχηματισμός, εξέλιξη, κύτταρα προέλευσης	12
Γονιδιωματικές αλλοιώσεις και βασικά μονοπάτια στο HNSCC	12
1.5 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ HNSCC	14
1.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΡΑΜΑΚΑ ΣΤΟ HNSCC.....	15
(Drug Resistance).....	15
1.6 ^α Μειωμένη συγκέντρωση των αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα... 17	
1.6 ^β Αύξηση της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA	19
Μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων (NER)/ με εκτομή βάσεων (BER)	19
1.6 ^γ Αύξηση της επιβίωσης του όγκου και τρόποι μετανάστευσης σε άλλους ιστούς... 20	
TP53	20
Fas/FasL	21
Σύστημα Συμπληρώματος.....	21
1.7 ΠΡΟΚΛΙΝΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΛΑ HNSCC ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΕ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ.....	24
Μοντέλα ξενομοσχευμάτων από όγκους ασθενών	26
(Patient Derived Xenografts (PDXs))	26
Μοντέλα οργανοειδών (Organoids).....	28
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ – ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ	30
PDXs.....	30
Λήψη ιστοτεμαχίου	30
Εμφύτευση όγκων	31
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ / ΣΧΗΜΑ.....	33
ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ	34
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	34

Ψηφιακή απεικόνιση - επεξεργασία	35
Στατιστική ανάλυση.....	35
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....	36
Ψηφιακή απεικόνιση - επεξεργασία	36
Στατιστική ανάλυση.....	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (baseline).....	38
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ (Cispaltin)	40
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (baseline & Cisplatin Treated)	42
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

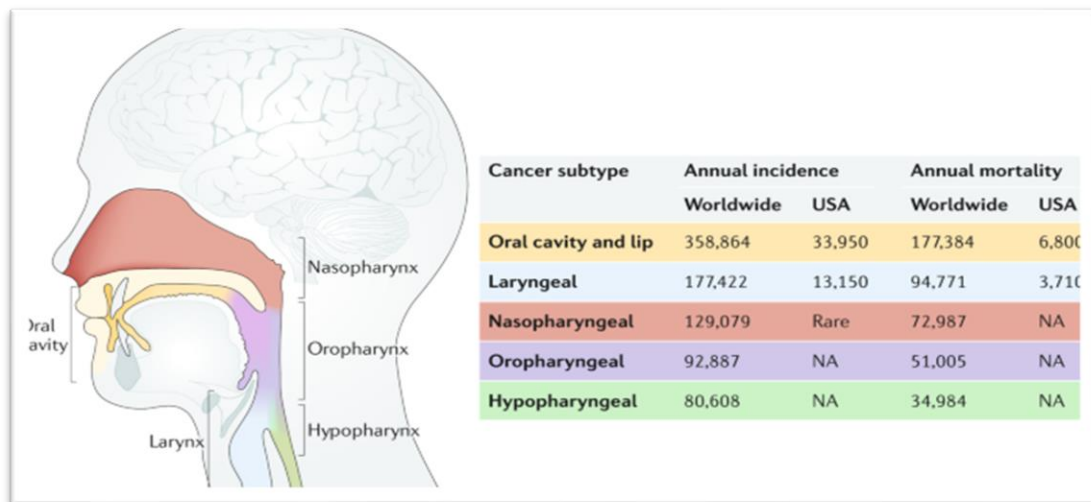
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα όγκων που περιλαμβάνει κακοήθειες εξ ορμώμενες από τη στοματική κοιλότητα, το στοματοφάρυγγα, τον υποφάρυγγα, το λάρυγγα και το ρινοφάρυγγα (Εικόνα 1.). Περίπου το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου είναι πλακώδες καρκίνωμα.

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HNSCC

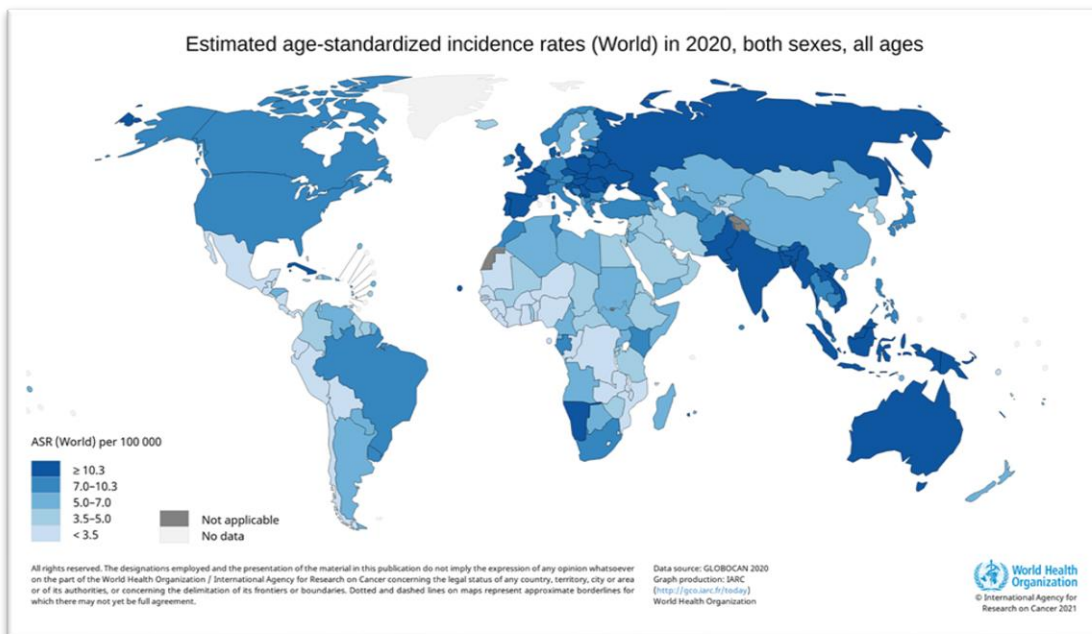
Το HNSCC αποτελεί τον έκτο πιο κοινό καρκίνο παγκοσμίως, με 890.000 ασθενείς και 450.000 θανάτους(Εικόνα 1). Η συχνότητα εμφάνισης του HNSCC συνεχίζει να αυξάνεται και αναμένεται αύξηση κατά 30% παγκοσμίως (δηλαδή, 1,08 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ετησίως) έως το 2030 (Εικόνα 2) (GLOBOCAN; gco.iarc.fr/today).



Εικόνα 1.1 Ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας για ασθενείς με HNSCC.

Εμφανίζονται αποτελέσματα παγκόσμιων και αμερικανικών ερευνών για την επιδημιολογία HNSCC. Οι εθνικές βάσεις δεδομένων ομαδοποιούν συχνά διαφορετικούς τύπους (για παράδειγμα, καρκίνοι του στόματος και καρκίνος του φάρυγγα). Για το λόγο αυτό, ορισμένοι στοματοφαρυγγικοί καρκίνοι της βάσης της γλώσσας μπορούν να ταξινομηθούν εσφαλμένα ως καρκίνοι της στοματικής κοιλότητας. Επιπλέον, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του στοματοφάρυγγα που σχετίζεται με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων προσδιορίζεται γεωγραφικά: ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων ευθύνεται για το 70% των καρκίνων του στοματοφάρυγγα στις ΗΠΑ και για το 10% σε χώρες χαμηλού εισοδήματος και μεσαίου εισοδήματος. Η επίπτωση του ρινοφαρυγγικού καρκίνου περιλαμβάνεται καθώς επηρεάζει σημαντικά το παγκόσμιο φορτίο του HNSCC, ιδιαίτερα στη Νοτιοανατολική Ασία, αν και η επίπτωση είναι χαμηλή στις ΗΠΑ.

Όπου NA, not applicable [1]



Εικόνα 1.2 Map was generated using the GLOBOCAN website mapping tool (<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>) by selecting the ‘hypopharynx’, ‘larynx’, ‘lip, oral cavity’, ‘nasopharynx’ and ‘oropharynx’ cancer sites. 2020

1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

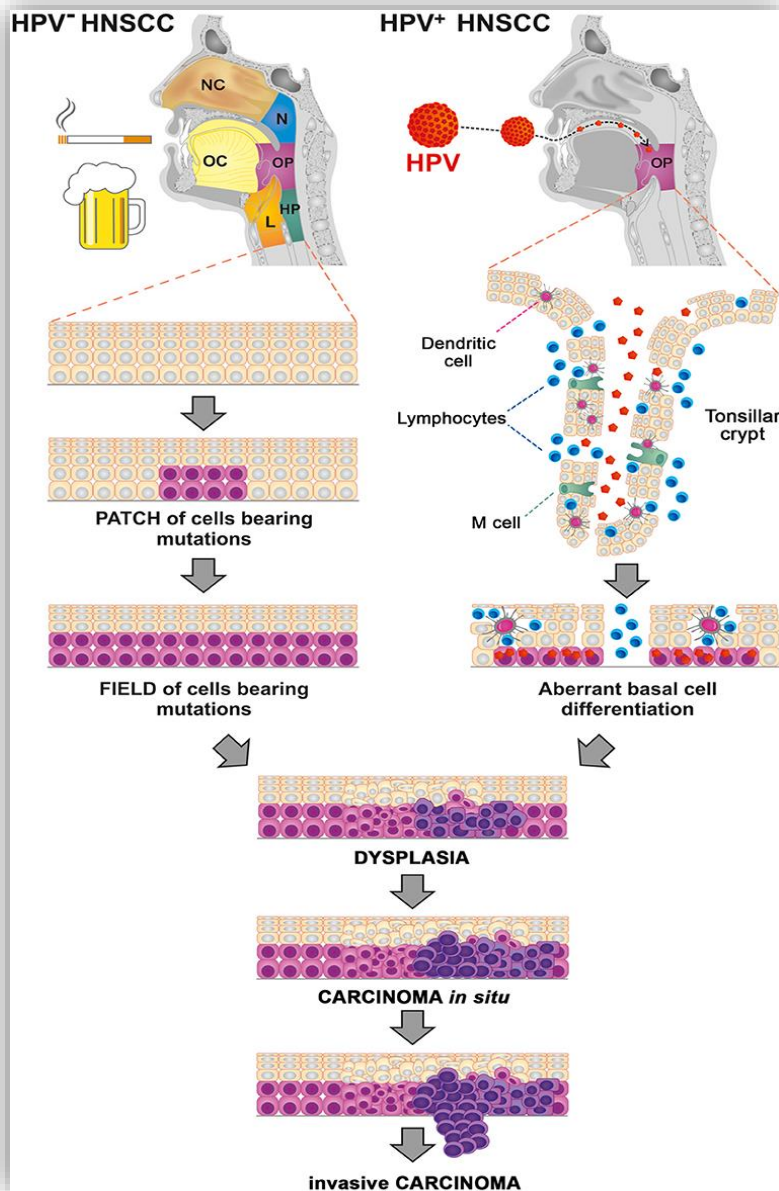
Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα ευρύ φάσμα παραγόντων κινδύνου για το HNSCC, όπως ταξινομήθηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), το HNSCC μπορεί να διαχωριστεί σε δύο υποομάδες με βάση τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV)(Εικόνα 3).

HPV αρνητικό HNSCC: Το κάπνισμα είναι ο πρωταρχικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη HPV αρνητικού HNSCC. Ο καπνός αποτελείται από πάνω από 5.000 διαφορετικές χημικές ουσίες, εκ των οποίων δεκάδες έχουν αποδειχθεί ότι έχουν καρκινογόνο δράση. Το κάπνισμα σχετίζεται επίσης με φλεγμονή στους εκτεθειμένους ιστούς. Η φλεγμονή προάγει την τοπική παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων που μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην προώθηση του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και, τελικά, της καρκινογένεσης.[5] Σε ορισμένες Ασιατικές χώρες, ο συνδυασμός καπνού και betel συνδέθηκε με τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας. Ακόμα και η χρήση betel από μόνη της, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στόματος.[6] Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ είναι ένας άλλος βασικός παράγοντας κινδύνου για HPV αρνητικό HNSCC και είναι γνωστό ότι συνεργάζεται με το κάπνισμα για την προώθηση της καρκινογένεσης. Το αλκοόλ μπορεί να χρησιμεύσει ως διαλύτης για τις καρκινογόνες ουσίες, ενισχύοντας την έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων στις ουσίες αυτές. Επιπλέον, το αλκοόλ μεταβολίζεται σε ακεταλδεΐδη, η οποία είναι γνωστό ότι

προκαλεί βλάβες στο DNA.[7] Οι ασθενείς με HPV αρνητικό HNSCC , έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς HPV αρνητικούς HNSCC. [2]

HPV Θετικό HNSCC: Η μόλυνση από τον HPV είναι ένας όλο και πιο κοινός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του HNSCC. Η λοίμωξη από τον HPV σχετίζεται με το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου του στοματοφάρυγγα (> 70%) και μια μικρή μειοψηφία καρκίνων σε άλλες ανατομικές περιοχές κεφαλής και τραχήλου.[8, 9]

Το HPV θετικό HNSCC παρουσιάζει διαφορές από το HPV-αρνητικό HNSCC στην έκφραση γονιδίων, στα μεταλλακτικά και ανοσολογικά προφίλ, υπογραμμίζοντας τη μοναδική βιολογία αυτής της ασθένειας. Ο HPV-16 είναι ο βασικός τύπος του ιού που ευθύνεται για το HNSCC, αν και άλλοι HPV τύποι υψηλού κινδύνου, συμπεριλαμβανομένων των HPV-18, HPV-31, HPV-33 και HPV-52, εντοπίζονται σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών.[10]



Εικόνα 1.3. Διαδικασίες καρκινογένεσης HNSCC HPV αρνητικό και σε HNSCC σχετιζόμενο με τον HPV.

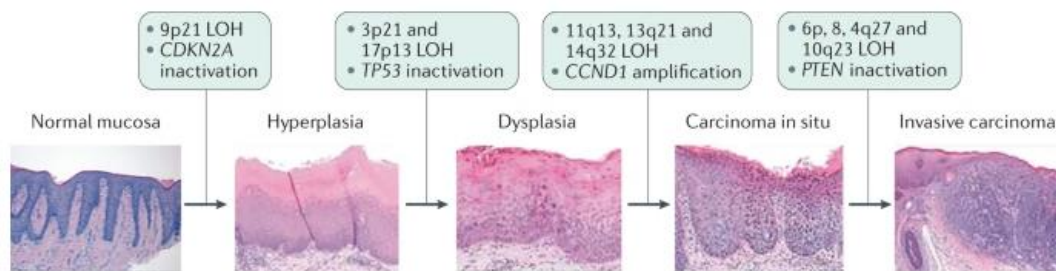
Τα μεταλλαξιογόνα που σχετίζονται με τον καπνό και το αλκοόλ προκαλούν μεταλλάξεις στα κύτταρα που σχηματίζουν το στρωματοποιημένο επιθηλιο πλακωδών κυττάρων του ανώτερου αερο-πεπτικού σωλήνα, συμπεριλαμβανομένης της ρινικής κοιλότητας, της στοματικής κοιλότητας, του ρινοφάρυγγα, του στοματοφάρυγγα, του υποφάρυγγα και του λάρυγγα. Ο HPV μολύνει κατά προτίμηση τη βασική κυτταρική στιβάδα του επιθηλίου των αμυγδαλών, προωθώντας έτσι τον κακοήγη μετασχηματισμό επιθηλιακών κυττάρων εντός της στοματοφαρυγγικής περιοχής.[2]

1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ / ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HNSCC

1.4^α Σχηματισμός, εξέλιξη, κύτταρα προέλευσης

Το HNSCC προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου που καλύπτουν την στοματική κοιλότητα, τον φάρυγγα, τον λάρυγγα και τους παραρρινίους κόλπους. Ιστολογικά, η μετάβαση σε διηθητικό HNSCC ακολουθεί μια σειρά βημάτων που ξεκινούν με υπερπλασία επιθηλιακών κυττάρων, ακολουθούμενη από δυσπλασία (ήπια, μέτρια και σοβαρή), καρκίνωμα *in situ* και τελικά, διηθητικό καρκίνωμα (Εικόνα 5).

Ωστόσο, οι περισσότεροι ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με HNSCC δεν έχουν ιστορικό προγενέστερης προ-καρκινικής αλλοίωσης. Δεδομένης της ετερογενούς φύσης του HNSCC, τα κύτταρα προέλευσης εξαρτώνται από την ανατομική θέση και τους αιτιολογικούς παράγοντες. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση, τα φυσιολογικά ενήλικα βλαστικά ή προγονικά κύτταρα είναι πιθανώς υποψήφια ως κύτταρα προέλευσης, τα οποία μετατρέπονται, μετά από ογκογονικό μετασχηματισμό, σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs) με ιδιότητες αυτοανανέωσης και πολυδυναμίας. Τα CSCs αντιπροσωπεύουν ελκυστικούς στόχους για νέους παράγοντες στόχευσης. [2]



ΕΙΚΟΝΑ 1.4. Το βλεννογόνο επιθήλιο που καλύπτει την στοματική κοιλότητα, φάρυγγα, λάρυγγα και τους παραρρινίους κόλπους είναι η θέση προέλευσης του Πλακώδους Καρκίνου Κεφαλής και Τραχήλου (HNSCC). Σε ένα μοντέλο ταξινομημένης ιστολογικής εξέλιξης του HNSCC, η υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου ακολουθείται από δυσπλασία και το καρκίνωμα *in situ* προηγείται της ανάπτυξης του διηθητικού καρκινώματος. Έχει διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένα γενετικά γεγονότα εμπλουτίζονται σε κάθε στάδιο εξέλιξης και ενδείκνυνται. Σε αντίθεση με τους περισσότερους καρκίνους στους οποίους οι ογκογονικές μεταλλάξεις συνήθως οδηγούν σε ογκογένεση, ο σχηματισμός HNSCC συνήθως περιλαμβάνει την απενεργοποίηση γονιδίων καταστολής όγκου, όπως CDKN2A και TP53 (κωδικοποίηση p16INK4A και p53, αντίστοιχα) σε αρχικά στάδια και PTEN (κωδικοποίηση φωσφατάσης και ομόλογου τανσίνης (PTEN)) σε μεταγενέστερα στάδια. Απώλεια ετεροζυγωτικότητας (loss of heterozygosity, LOH) [2]

Γονιδιωματικές αλλοιώσεις και βασικά μονοπάτια στο HNSCC

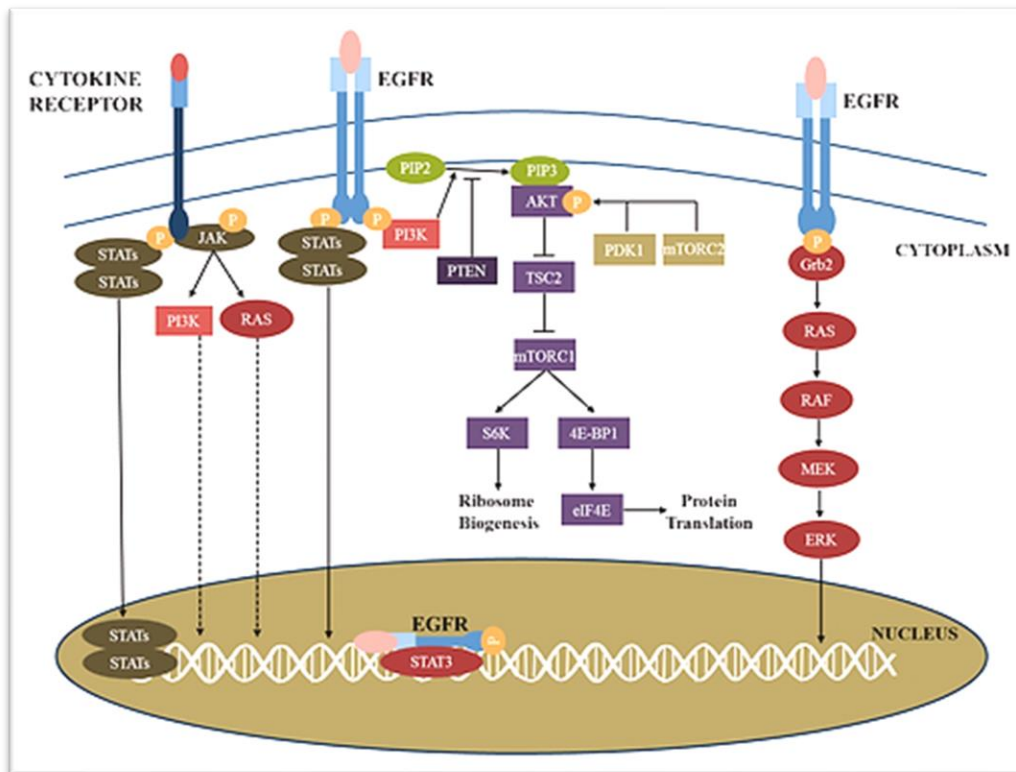
Υπάρχει μια τεράστια ανάγκη για τον εντοπισμό μοριακών βιοδεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση του HNSCC, καθώς επίσης για την εύρεση νέων στόχων για θεραπεία και την πρόβλεψη απόκρισης στους θεραπευτικούς παράγοντες. Η αναζήτηση βιοδεικτών επικεντρώνεται στον καθορισμό των μοριακών ανωμαλιών που χαρακτηρίζουν το HNSCC.

In silico αναλύσεις παρέχουν γνώσεις εις βάθος σχετικά με τις ποικίλες μεταλλάξεις σε κάθε δείγμα καρκίνου, επιτρέποντας τη λειτουργική κατανόηση των «οδηγών» πίσω από τις απορρυθμισμένες ογκογονικές οδούς και τους βιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εξέλιξη του όγκου. Είναι σημαντικό ότι αυτές οι προσεγγίσεις αξιοποιούνται για να αναπτυχθούν κατάλληλες θεραπευτικές αγωγές, προσαρμοσμένες στη στόχευση βασικών ογκογόνων οδηγών με βάση το προφίλ των μεταλλάξεων σε κάθε ασθενή. Σε αυτή τη βάση, το Cancer Genome Atlas (TCGA) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για έναν ολοκληρωμένο γονιδιωματικό χαρακτηρισμό του HNSCC, όπου αρκετές αναφορές έχουν εντοπίσει εκατοντάδες μεταλλάξεις σε κάθε υποτύπο του καρκίνου.[11-13]

Οι αυξητικοί παράγοντες, οι υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, οι ενδοκυττάριοι μεταβιβαστές σημάτων και οι πρωτεΐνες της μεταγραφής στον πυρήνα του κυττάρου, συντονίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες μέσω της ρύθμισης της διακυτταρικής και ενδοκυτταρικής επικοινωνίας. Κατά το στάδιο της ανάπτυξης δρουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια και είναι υπεύθυνα για την κυτταρική επικοινωνία. Τα μόρια αυτών των μονοπατιών εκκρίνονται από ένα κύτταρο και ειδοποιούν ένα γειτονικό κύτταρο με την πρόσδεση σε ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης, κινητοποιώντας μεταγωγείς σημάτων και μεταγραφικούς παράγοντες. Ακολουθώντας αυστηρά αυτή την διαδικασία, ρυθμίζουν διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η διαφοροποίηση. Στην ανάπτυξη του καρκίνου αυτή η πολύ αυστηρή διαδικασία, διαταράσσεται, λαμβάνουν χώρα μεταλλάξεις σε πρωτεϊνικά μόρια και προάγουν την ανάπτυξη όγκου. Πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένων σημειακών μεταλλάξεων, απαλοιφών, μεθυλίωσης υποκινητών και ενίσχυσης ογκογόνων πρωτεϊνών, προκαλούνται έντονα από χρόνια έκθεση στους κύριους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη HNSCC. Μερικά από τα μεταλλαγμένα γονίδια που σχετίζονται συχνά με το HNSCC είναι τα **TP53, CDKN2A, FAT1, NOTCH1, EGFR, HRAS και PI3KCA** και οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια αναγνωρίζονται ως οδηγοί ανάπτυξης και εξέλιξης του όγκου.[14-16]

Στο HNSCC, τρία είναι τα μονοπάτια σηματοδότησης, εκτός από το EGFR, που είναι γνωστός στόχος, και φαίνεται να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην εξέλιξη και την πορεία της νόσου (Εικόνα 5). Στην συγκεκριμένη εικόνα απεικονίζεται η σηματοδότηση στο HNSCC και φαίνεται ότι τα μονοπάτια EGFR, PI3K και JAK - STAT πρωταγωνιστούν. Η δέσμευση συνδέτη με EGFR προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα και ενεργοποιεί το μονοπάτι RAS/RAF/MEK και ERK. Το EGFR μπορεί επίσης να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να ξεκινήσει μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό που μεσολαβεί από τον παράγοντα μεταγραφής STAT3. Η διαδρομή PI3K λειτουργεί επίσης κάτω από το EGFR. Το PTEN είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού PI3K. Το ενεργοποιημένο PI3K μετατρέπει το PIP2 σε PIP3.

Τα φωσφορυλιωμένα PIP3 AKT παρουσιάζουν ένα μονοπάτι σηματοδότησης που τελειώνει με τη φωσφορυλίωση των S6K και 4E-BP1, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E. Οι Janus κινάσες (JAK) ενεργοποιούνται με σύνδεση σε υποδοχείς κυτοκίνης. Η δέσμευση των JAK έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη και τον διμερισμό των STAT μέσω της φωσφορυλίωσης. Τα ενεργοποιημένα STAT μπορούν στη συνέχεια να μετατοπιστούν στον πυρήνα για να ξεκινήσουν μεταγραφή γονιδίων στόχων. Οι διαδρομές RAS και PI3K ενεργοποιούνται επίσης από τα JAKs.[3]



Εικόνα 1.5. Μονοπάτια σηματοδότησης στο HNSCC[3]

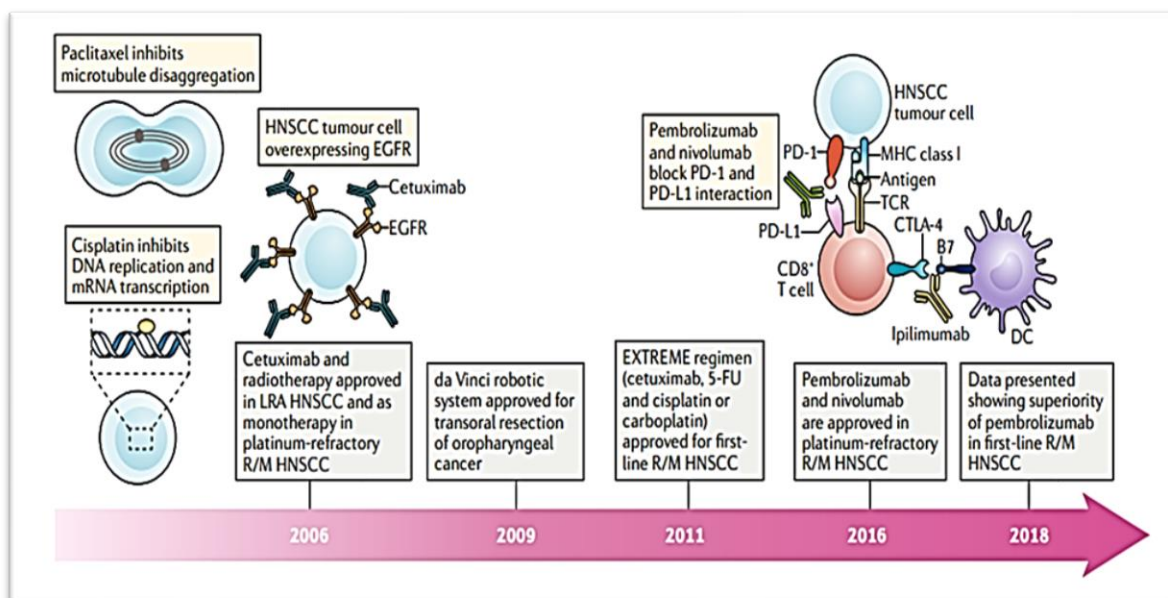
1.5 ANTIMETΩΠΙΣΗ ΤΟΥ HNSCC

Σε πρώιμο στάδιο, η πρόγνωση των ασθενών είναι αρκετά καλή και αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση και /ή ακτινοβολία. Ωστόσο, το 66% των ασθενών παρουσιάζουν προχωρημένη νόσο και μόνο το 30 % αυτών θεραπεύονται. Λίγα φάρμακα έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικά στον HNSCC. Η θεραπεία πρώτης γραμμής αποτελείται από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα και ο συνδιασμός με 5-FU και Cetuximab (anti -EGFR αντίσωμα) έχει αποδειχθεί ότι επεκτείνει την συνολική επιβίωση στο μεταστατικό HNSCC.[17, 18] Δυστυχώς όμως, η βελτίωση του ποσοστού της συνολικής επιβίωσης των ασθενών που έλαβαν το Cetuximab βελτιώθηκε 10%-20%, πολύ μικρό ποσοστό σε σχέση με αυτό που αναμένονταν, λόγω των υψηλών ποσοστών υπερέκφρασης του EGFR στο HNSCC. [17, 19] Αρκετές μελέτες

έχουν εντοπίσει μηχανισμούς αντοχής στο cetuximab. Το Cetuximab αποτελούσε την μοναδική *στοχευμένη θεραπεία* με μονοκλωνικά αντισώματα στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου μέχρι την άφηση των anti- PD-1 αντισωμάτων το 2016, όπου τα ειδικά αντισώματα έναντι των ανοσολογικών σημείων ελέγχου δρουν επαναρρυθμίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να στραφεί εκ νέου κατά των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο όμως, η συγκεκριμένη θεραπεία είναι αποτελεσματική σε μικρό αριθμό ασθενών (<15%-20%).^[1, 20]

Ο λεπτομερής μοριακός χαρακτηρισμός καθώς και το ανοσολογικό προφίλ του HNSCC υποδηλώνουν ότι η ενσωμάτωση προγνωστικών βιοδεικτών στην κλινική διαχείριση μπορεί να ξεπεράσει τα εμπόδια στις στοχευμένες θεραπείες και να επιτρέψει την παρατεταμένη επιβίωση.

1.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΡΑΜΑΚΑ ΣΤΟ HNSCC (Drug Resistance)

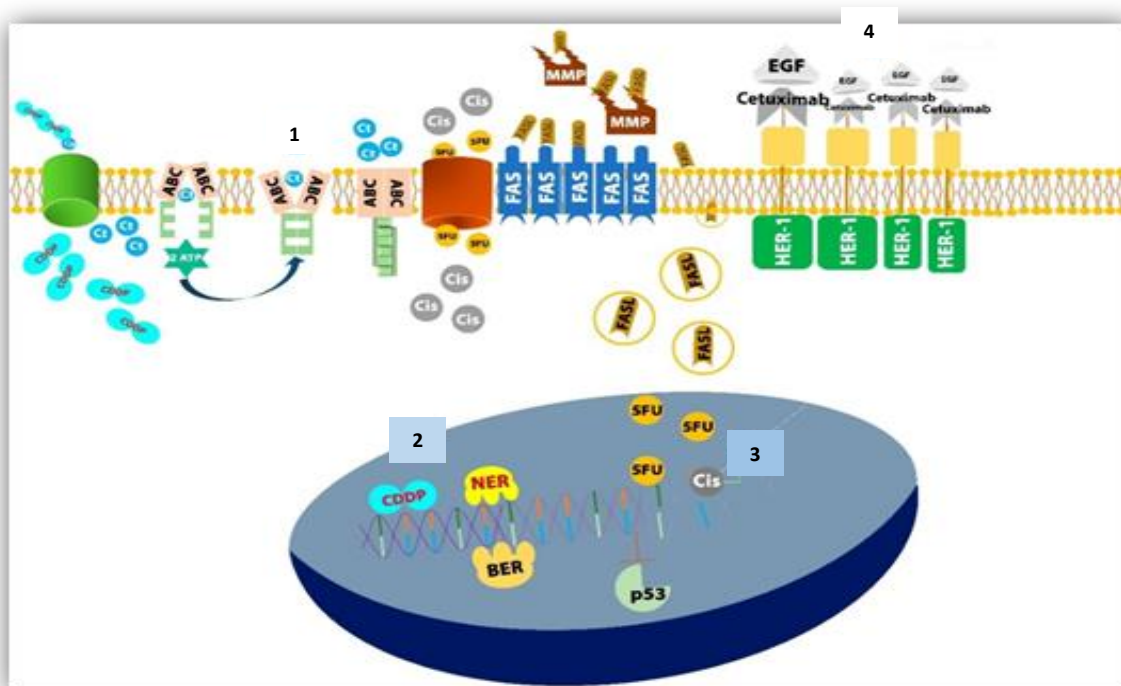


Εικόνα 1.6. Ιστορική αναδρομή της θεραπευτικής αντιμετώπισης του HNSCC.^[1]

Στο HNSCC το συνολικό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης παραμένει στο 50% περίπου, ακόμη και με τις θεραπευτικές εξελίξεις. Η έκβαση των ασθενών με HNSCC συνδέεται στενά με το στάδιο του όγκου. Οι ασθενείς με όγκους σε πρώιμο στάδιο (I και II) έχουν 60-95% πιθανότητα επιτυχούς θεραπείας- ωστόσο, όταν διαγιγνώσκονται, τα 2/3 των ασθενών παρουσιάζουν ήδη νόσο σε προχωρημένο στάδιο (III και IV). Η υποτροπή του όγκου και οι μεταστάσεις οδηγούν σε κακή πρόγνωση και ποιότητα ζωής, ενώ το ποσοστό υποτροπής σε ασθενείς με HNSCC είναι περίπου 50% κατά τα πρώτα 2 έτη μετά τη διάγνωση του πρωτοπαθούς όγκου. Οι ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται

στην θεραπεία πρώτης γραμμής έχουν διάμεση συνολική επιβίωση μικρότερη από 1 έτος. [21]

Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, χορηγείται θεραπεία με βάση το Cisplatin (CT) και ακτινοθεραπεία. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας συσχετίζεται με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και με την ετερογένεια του όγκου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των παραγόντων δημιουργούν έναν συνδυασμό γενετικών μεταβολών και, κατά συνέπεια, η ευαισθησία και η αντίσταση των νεοπλαστικών κυττάρων στη θεραπεία μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των ατόμων. [22] Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες προσπαθούν να εντοπίσουν τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα στα χημειοθεραπευτικά σχήματα στο HNSCC. (Πίνακας 1.) Οι μηχανισμοί αντοχής στα φάρμακα ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες: **(1)** μειωμένη συγκέντρωση αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα, **(2)** αύξηση της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA, **(3)** αύξηση της επιβίωσης του όγκου και τρόποι μετανάστευσης σε άλλους ιστούς, και **(4)** απενεργοποίηση της δράσης του αντικαρκινικού φαρμάκου. (Εικόνα 7) [23]



Εικόνα 1.7. Οι κύριοι μοριακοί δείκτες σύμφωνα με τις 4 ομάδες μηχανισμών αντοχής

(1) Μειωμένη συγκέντρωση αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα: Η οικογένεια της κασέτας δέσμευσης ATP (ATP-binding cassette, ABC) μεταφορέων περιλαμβάνει κυρίως τις γλυκοπρωτεΐνες P (P-gp), οι οποίες ενδοκυτταρικά συνδέονται με κυτταροστατικούς παράγοντες και προάγουν την εξωκυττάρωσή τους μέσω υδρόλυσης ATP και διαμορφωτικών αλλαγών στην πρωτεΐνη. Εξωκυτταρικά, οι αλλαγές στις πρωτεΐνες της μεμβράνης του πλάσματος μπορεί επίσης να μειώσουν τη διαπερατότητα του φαρμάκου. Η έκφραση ή η υπερέκφραση των γονιδίων ABC που κωδικοποιούν MDR1, MRP1, MRP2 και BCRP εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στον καρκίνο του στόματος (OSCC).

(2) Αύξηση της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA : Αύξηση της ανοχής στη βλάβη του DNA λόγω των πολύ αποδοτικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να προκληθεί από τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συστατικά των συμπλοκών. Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων (NER) και επιδιόρθωση με εκτομή βάσεων (BER). Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη ευνοϊκών κλινικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς με HNSCC.

(3) Αύξηση της επιβίωσης του όγκου και τρόποι μετανάστευσης σε άλλους ιστούς : Το FasL ρυθμίζεται προς τα πάνω σε κύτταρα που υποβάλλονται σε θεραπεία με Cisplatin και 5-FU, τα οποία προκαλούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπερέκφραση της p53, η οποία έχει συσχετιστεί με την επιβίωση, τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και την αντοχή στα φάρμακα.

(4) Απενεργοποίηση της δράσης του αντικαρκινικού φαρμάκου: Απο αρκετές μελέτες υποστηρίζεται ότι οι προσδέτες του EGFR, επηρεάζουν την απόκριση στη θεραπεία με Cetuximab (anti-EGFR αντίσωμα) και μπορεί να είναι χρήσιμοι ως προγνωστικοί βιοδείκτες. Η αυτοκρινή παραγωγή αυξητικών παραγόντων ίσως λειτουργεί ανταγωνιστικά, παρεμποδίζοντας τα αντισώματα να προσδεθούν στο EGFR και έτσι να μειώνεται η δραστηριότητα του Cetuximab.

1.6^α Μειωμένη συγκέντρωση των αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα
 Οι παρηγορητικές θεραπείες, όπως η ακτινοθεραπείες (RT), επικεντρώνονται στη μείωση της τοπικής συμπτωματολογίας και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.[24] Η CT θεραπεία συνδυαζόμενη με πολλαπλούς κυτταροστατικούς παράγοντες και την RT μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα του όγκου στη χημειοθεραπεία ή πολλαπλή ανθεκτικότητα φαρμάκων (Multiple Drug Resistance, MDR), ανάλογα με τον τύπο της θεραπείας.[25] Η MDR μπορεί να γίνει κατανοητή μέσω διάφορων βιολογικών παραγόντων και συχνά συνδέεται με την εκροή φαρμάκων. Όλο και περισσότερα στοιχεία συσχετίζουν τη MDR με την ρύθμιση

πρωτεϊνών μεταφορέων που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνα για την μεταφορά των φαρμάκων στο εξωκυττάριο περιβάλλον.

Η οικογένεια ATP-Binding Cassette (ABC) περιλαμβάνει μεταφορείς που μπορούν να οδηγήσουν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στο εξωτερικό του κυττάρου για να αντισταθούν στις κυτταροτοξικές επιδράσεις τους. Επιπλέον, οι μεταφορείς ABC παίζουν σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή και εξαγωγή θρεπτικών συστατικών και μορίων, αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα σημαντικό εμπόδιο στις ογκολογικές θεραπείες.

Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (Ρ-gr), προϊόν του γονιδίου ABCB1 (MDR1), είναι μεταφορέας ABC που σχετίζεται με την MDR και έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αντοχή σε πολλαπλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. [26] Το γονίδιο MDR1 κωδικοποιεί ένα διαμεμβρανικό τμήμα της Ρ-gr που χρησιμοποιείται για την εκκένωση διάφορων φαρμάκων. Ο μηχανισμός ξεκινά όταν το μόριο του φαρμάκου συνδέεται με την κυτταροπλασματική περιοχή Ρ-gr, τότε, η πρωτεΐνη χρησιμοποιεί την υδρόλυση ATP για να βγει στον εξωκυττάριο χώρο και να εκκενώσει το μόριο του φαρμάκου. [27] Η υπερέκφραση του Ρ-gr μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση 100 φορές υψηλότερη από εκείνη ενός φυσιολογικού κυττάρου.[28] Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η έκφραση Ρ-gr εμπλέκεται στο MDR του HNSCC [29-32], αν και η διαδικασία που ενεργοποιεί την έκφραση της Ρ-gr δεν είναι σαφής. Διαφορές στην έκφραση Ρ-gr μπορεί να συμβούν σε κύτταρα του ίδιου όγκου (κυτταρική ετερογένεια), καθώς η ενεργοποιημένη παραγωγή Ρ-gr μπορεί να είναι είτε κληρονομική είτε επίκτητη. [29, 33, 34] Ωστόσο, η σχέση της παραγωγής Ρ-gr με τον φαινότυπο MDR δεν είναι πλήρως κατανοητή και η MDR μπορεί να είναι το αποτέλεσμα και της εγγενούς και της επίκτητης αντίστασης. [35, 36]

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί τις τελευταίες δεκαετίες ότι η μεταφορά της Ρ-gr στο κύτταρο γίνεται μέσω μικροσωματιδίων (MVs). Σε κακοήθεις όγκους υπάρχει αυξημένος αριθμός και μεταφορά διαφόρων τύπων MVs που σχετίζονται με τις διαδικασίες εξέλιξης του όγκου και την καρκινογένεση που σχετίζεται με έναν αναπτυξιακό παράγοντα της MDR. [37] Αν και αυτό έχει αποδειχθεί σε διαφορετικούς όγκους, δεν υπάρχει πρόσφατη απόδειξη αυτών των γεγονότων σε όγκους κεφαλής και τραχήλου.

Ο Friedrich et al. ανέλυσε την έκφραση των μεταφορέων που σχετίζονται με την MDR, MDR1, MRP1 και BCRP σε πρωτογενή πλακώδη καρκινώματα (SCC) και παρατήρησε ότι τα MDR1 και MRP1 συν-εκφράστηκαν. Παρόλο που η έκφραση της BCRP βρέθηκε να μην εξαρτάται από την MDR1 και δεν επηρεάστηκε υπο συνθήκες φυσιολογικών επιπέδων έκφρασης της MRP1. Ορισμένοι όγκοι έδειξαν παρόμοια πρότυπα έκφρασης των MDR1 και BCRP, υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση του BCRP σχετίζεται με την MDR1 και ότι η επιβίωση των ασθενών μπορεί να επηρεαστεί από την τροποποιημένη έκφραση τουλάχιστον ενός από τα δυο γονίδια που εμπλέκονται στη χημειοθεραπευτική αντίσταση.[38] Ο Nakamura και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ευαίσθητες και ανθεκτικές κυτταρικές σειρές (H-1 και H-1R) στη

CDDP, παρατήρησαν ότι τα ανθεκτικά κύτταρα είχαν υψηλή έκφραση MDR1 και χαμηλή MRP1. Έτσι, το αντίθετο πρότυπο έκφρασης MDR1 και MRP1 θα μπορούσε να σχετίζεται με την αντίσταση CDDP σε κυτταρικές καλλιέργειες.[39] Ο Suzuki και οι συνεργάτες του, παρατήρησε ότι η MDR1 και το ERCC1, δεν εκφράστηκαν σε κανέναν κλώνο κυττάρων από τους πρωτογενείς όγκους SCC, ενώ τα MRP1 και MRP2 εκφράστηκαν σε όλα τα δείγματα. [22]

1.6^β Αύξηση της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ασθενείς με προχωρημένη νόσο, λαβάνουν χημειοθεραπεία με βάση το Cisplatin και ακτινοθεραπείες. Το Cisplatin προσδένεται στο DNA, σχηματίζοντας και εγκαθιστώντας ενδοκυτταρική συσσώρευση ελεύθερων ριζών. Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση διαφόρων πολυμορφισμών μονο-νουκλεοτιδίων (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) σχετίζεται με την τοξικότητα του φαρμάκου. Στο HNSCC, υπάρχουν αλλοιώσεις που σχετίζονται με πρωτεΐνες του μηχανισμού διόρθωσης του DNA (mismatch repair system, MMR) που μπορεί να ενισχύσουν δευτερογενή αποτελέσματα στην απόκριση στο Cisplatin και στην RT. Είναι πιθανό αυτές οι αλλοιώσεις να σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στη χημειοθεραπεία, οδηγώντας στην ανάγκη για τροποποίηση των θεραπευτικών διαδικασιών σε αυτούς τους τύπους καρκινωμάτων.[40]

Μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων (NER)/ με εκτομή βάσεων (BER)
Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης DNA έχει τη σημαντική λειτουργία της προστασίας του DNA από την εμφάνιση οποιονδήποτε μεταλλάξεων έτσι ώστε να διατηρεί τη συνολική του ακεραιότητα. Το Nucleotide Excision Repair (NER) είναι μια οδός αποκατάστασης του DNA και ο μηχανισμός δράσης του επιτυγχάνεται με την αφαίρεση του DNA (νουκλεοτίδια) που έχει υποστεί βλάβη, κυρίως από χημικές καρκινογόνες ουσίες. Τα περισσότερα από τα γονίδια του NER φέρουν πολυμορφισμούς και υπάρχουν αναφορές που δείχνουν μια σχέση μεταξύ διακριτών πολυμορφισμών των γονιδίων του NER και των παραγόντων κινδύνου του καπνού που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, της κεφαλής και τραχήλου και του μαστού.[41] Το Base Excision Repair (BER) επιδιορθώνει βάσεις DNA που έχουν υποστεί βλάβη από διαδικασίες μεταλλαξογένεσης και τοξικότητας, τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην αιτιολογία και τη θεραπεία του καρκίνου αφού οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες προκαλούν γονοτοξικές βλάβες στις βάσεις του DNA, και ο μηχανισμός BER προκαλεί αποκατάσταση βλάβης του DNA, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Ο μηχανισμός BER, επίσης, επηρεάζει την κυτταρική απόκριση στην ιονίζουσα ακτινοβολία, όπου η ακτινοβολία τροποποιεί τη δομή του DNA και στη συνέχεια ο μηχανισμός BER αναγνωρίζει τη ζημιά που χρειάζεται αποκατάσταση και επεμβαίνει. Επιπλέον, ο BER εμπλέκεται στην κυτταροτοξικότητα του 5-FU, ενός φαρμάκου του

οποίου οι μεταβολίτες είναι ενσωματωμένοι τόσο στο DNA όσο και στο RNA. Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα απασχολούν την επιστήμη μέχρι και σήμερα[42]. Γενικά, έχει προταθεί ότι η μείωση της έκφρασης του ERCC1 μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην θεραπεία με CT&RT και βελτιωμένο κλινικό αποτέλεσμα. Έτσι, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι το ERCC1 είναι ένας συχνά αξιολογούμενος δείκτης στα HNSCC.[43, 44] Ήδη από το 1998, ο D. W. Melton και οι συνεργάτες του, σε ποντίκια που ανέστειλαν την έκφραση του ERCC1, παρατήρησαν υπερευαισθησία στο Cisplatin λόγω της μειωμένης ικανότητάς τους να επιδιορθώνουν τα προϊόντα προσθήκης cisplatin / DNA.[45] Ενώ λίγο νωρίτερα ο K. B. Lee με την ομάδα του, παρατήρησαν ότι σε κύτταρα CHO (Chinese hamster ovary) τα οποία έχουν ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη ERCC1 (ERCC1-/-) όταν διαμολύνθηκαν με ανθρικό ERCC1 παρουσίασαν 5 φορές υψηλότερη αντίσταση στο Cisplatin από τα κύτταρα με ERCC1 +/-.[46] Γενικά, στη βιβλιογραφία τα επίπεδα έκφρασης του ERCC1 και η ανθεκτικότητα στο Cisplatin, φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένα σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του HNSCC. [47-49]

Δύο πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (SNPs) σε XPD/ERCC2 (Asp312Asn και Lys751Gln) και ένας σε XRCC1 (Arg399Gln) έχουν συσχετιστεί με την μη επαρκή ικανότητα αποκατάστασης του DNA. Ωστόσο, σε αντίθεση με την περίπτωση με το ERCC1, ο Quintela και οι συνεργάτες του, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όλες οι πολυμορφικές παραλλαγές των XPD και XRCC1 παρέχουν καλύτερη πρόγνωση και ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και κάθε πολυμορφική παραλλαγή παρέχει 2,1-3 φορές αύξηση της πιθανότητας επίτευξης πλήρους ανταπόκρισης στη θεραπεία.[50]

1.6^γ Αύξηση της επιβίωσης του όγκου και τρόποι μετανάστευσης σε άλλους ιστούς

Το Cisplatin και το 5-FU είναι κυτταροτοξικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα κύτταρα των HNSCCs, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός Taxotere-Cisplatin-5-FU (TPF) προκαλεί απόπτωση και νέκρωση στα καρκινικά κύτταρα και προκαλεί την μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων που έχουν στοχευθεί με Ki67 και Bcl-2.[51, 52]

TP53

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 κωδικοποιεί έναν πυρηνικό παράγοντα μεταγραφής γνωστό ως p53, ο οποίος δρα ως καταστολέας όγκου. Το p53 ρυθμίζει τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA αλλά συχνά σχετίζεται με απόπτωση. Επιπλέον, συμμετέχει στη διαδικασία επισκευής ως απάντηση σε επιβλαβείς παράγοντες, όπως χημικά, ακτινοβολία και υπεριώδεις ακτίνες από το φως του ήλιου. Εάν το DNA έχει μεταλλαχθεί ή καταστραφεί και δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, το p53 μεταδίδει ένα σήμα που προκαλεί κυτταρική απόπτωση και εμποδίζει τα κύτταρα να διαιρεθούν και να αναπτυχθούν σε όγκους. Η

απώλεια ετεροζυγωτικότητας και μεταλλάξεων εξονίων του TP53 και η παρουσία αντισωμάτων αντι-p53 στο πλάσμα θεωρούνται ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες χαμηλής ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία με 5-FU/Cisplatin. [53] Οι όγκοι που δείχνουν υπερέκφραση του p53 είναι ανθεκτικοί στις θεραπείες CT και RT, προκαλώντας μείωση των ποσοστών επιβίωσης, πιθανώς λόγω της σχέσης του με την επαγωγή και την εξέλιξη του όγκου, καθώς σχετίζεται με γονιδιακές μεταλλάξεις και μεταβολές των κυτταρικών λειτουργιών. [54]

Fas/FasL

Το μονοπάτι απόπτωσης μέσω της εξωκυτταρικής οδού TNFRSF6/TNFSF6 (Fas/Fas ligand (FasL)) προκαλεί απόπτωση παρουσία γονιδιοτοξικών προσβολών. [55] Το FasL και οι υποδοχείς του (Fas, CD95) ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων των παραγόντων νέκρωσης όγκων (TNFs), οι οποίοι συμμετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα ως σημαντικοί ρυθμιστές. Η αλληλεπίδραση μεταξύ FasL και Fas οδηγεί σε απόπτωση. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η υπερέκφραση του Fas στα T-κύτταρα αποδεικνύει ότι είναι ένας μηχανισμός που περιορίζει την ανοσοαπόκριση, συμμετέχοντας στην ανοσολογική και περιφερική ομοιόσταση και εξαλείφοντας τα κλωνικά ενεργοποιημένα T-κύτταρα. [56] Είναι γνωστό ότι η εξωτερική απόπτωση ενεργοποιείται από τα ένζυμα της οικογένειας TNF, συμπεριλαμβανομένων των Fas/FasL. Το FasL εκφράζεται στους περισσότερους όγκους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του στόματος, και σχετίζεται με την αντίσταση στην επαγωγή της απόπτωσης. Οι περισσότεροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες δρουν ως επαγωγείς απόπτωσης στο HNSCC, στους οποίους η οδός σηματοδότησης Fas/FasL μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη χημειοαντίσταση μέσω της εξωκυτταρικής μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP7, επειδή φάρμακα όπως η δοξορουμπικίνη και η οξαλιπλατίνη μπορεί να οδηγήσουν σε υπερρύθμιση της MMP7. Έτσι, η MMP7 προκαλεί τη δημιουργία διαλυτού FasL (sFasL). [57] Λίγες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυμορφισμοί σε ορισμένες MMPs είναι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αντοχής στη χημειοθεραπεία. Ο Blons και οι συνεργάτες του, παρατήρησαν μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού MMP3 και της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία σε Γάλλους ασθενείς με HNSCCs. Διαπίστωσαν ότι άτομα με ανεπαρκώς μεταγραμμένο αλληλόμορφο 6A έδειξαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία 5-FU-Cisplatin. [58]

Σύστημα Συμπληρώματος

Στην κυτταρική επιφάνεια υπάρχουν οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συστήματος συμπληρώματος - CD46, CD55 και CD59 - οι οποίες ελέγχουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τις διαφορετικές οδούς του. Το CD55 είναι ένα ρυθμιστικό μόριο του συστήματος συμπληρώματος που, μαζί με το CD59 και το CD46, αποτρέπει την εγγενή επίθεση της C3 μετατροπάσης, του βασικού ενζύμου που είναι υπεύθυνο για

την πρόκληση «επίθεσης στη μεμβράνη» και την κυτταρική αποσύνθεση.[59] Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται κυτταρικός θάνατος με συμπλήρωμα και θεωρείται μια ανεξάρτητη διαδικασία ενεργοποίησης της κασπάσης που σχετίζεται με το σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). [60] Η υπερέκφραση των αναφερόμενων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συστήματος συμπληρώματος σχετίζεται με την πρόληψη της εξαρτώμενης από συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση του CD55 μπορεί να προωθήσει την έναρξη του όγκου με την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων φυσικών δολοφόνων (NK). Επιπλέον, αυτό μπορεί να συμβάλει στην υπορύθμιση της δραστηριότητας του συστήματος συμπληρώματος, διευκολύνοντας την εξέλιξη του όγκου. Όταν το CD55 συνδέεται με το CD97, διεγείρει τη μετανάστευση, την εισβολή και τη μετάσταση, αν και ο ρόλος του στο HNSCCs, χρήζει περαιτέρω διερεύνηση. [61] Ο Nakamura ανέπτυξε μια δοκιμασία για την ανάλυση μικροσυστοιχιών, στην οποία συμπεριέλαβε γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση, για τη μελέτη ενός εναλλακτικού μηχανισμού MDR. Μεταξύ των γονιδίων που εκφράστηκαν διαφορετικά είτε στις ευαίσθητες είτε στις ανθεκτικές αποικίες, το CD55 εκφάστηκε υπερβολικά στην αποικία H-1R.[39]

Πίνακας 1. . Η έκφραση διάφορων βιοδεικτών και η συμμετοχή τους στο MDR.

Author	Year	Genes	Methodology	Conclusions
Reduced concentration of antineoplastic drugs in cancerous cells.				
Friedrich	2004	<i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> and <i>BCRP</i>	Gene expression in primary SCC using IH and PCR.	<i>MDR1</i> and <i>MRP1</i> are co-expressed; <i>MDR1</i> and <i>BCRP</i> are not co-dependent. Patient survival can be influenced by the altered expression of at least one of the genes implicated in chemotherapeutic resistance.
Nakamura	2005	<i>MDR1</i> , <i>MRP1</i>	Expression levels in CDDP-resistant/sensitive cell lines using in-house cDNA microarray (2021 genes originated from normal oral tissue, primary oral cancer, and oral cancer cell lines) and PCR.	Resistant cells have high <i>MDR1</i> and low <i>MRP1</i> expression.
Suzuki	2010	<i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> and <i>MRP2</i>	Gene expression analysis of single cell clones dissociated from primary tumors using PCR.	<i>MDR1</i> was not expressed in any single cell clone from primary SCC tumor, although <i>MRP1</i> and <i>MRP2</i> were expressed.
Genes involved in DNA repair				
Quintela	2006	<i>XPD</i> , <i>ERCC1</i> and <i>XRCC1</i>	SNP detected using RFLP in DNA from peripheral lymphocytes of HNSCC patients.	The accumulation of polymorphic variants increases the probability of achieving a complete response.
Ameri	2016	<i>ERCC1</i>	Expression status determined using PCR in tumor samples.	Tumor samples with high <i>ERCC1</i> expression showed no response to induction chemotherapy.
Enhanced tumor survival and routes of dissemination				
Cabelguenne	2000	<i>TP53</i>	Gene status (mutations, allele loss) detected using PCR amplification in tumor samples.	P53 status may be a useful indicator of responding to neoadjuvant chemotherapy in HNSCC.
Blons	2004	<i>MMP3</i>	<i>MMP1</i> , <i>MMP3</i> , and <i>MMP7</i> polymorphisms detected using PCR in tumor samples and blood.	A significant correlation between <i>MMP3</i> polymorphism and response to chemotherapy.
Nakamura	2005	<i>CD55</i>	Expression levels in CDDP-resistant/sensitive cell lines using in-house cDNA microarray (2021 genes originated from normal oral tissue, primary oral cancer, and oral cancer cell lines) and PCR.	<i>CD55</i> was overexpressed in the H-1R colony.
Inactivation of antineoplastic drugs				
Ansell	2016	<i>AR</i> , <i>EPR</i> and <i>EGF</i>	Response was evaluated by adding recombinant human proteins or siRNA-mediated downregulation of endogenous ligand production.	The amount of EGF strongly influences the tumor cell proliferation rate and response to cetuximab treatment. Proposed EGF as a potential predictive biomarker
Pickhard	2014	<i>AurkA</i> and <i>AurkB</i>	IH in tissue samples.	Provide evidence that AurkA genotypically homozygous HNSCC cells respond to cetuximab monotherapy, whereas heterozygous cells do not.

MDR1: Multidrug resistance 1; *MRP1*: Multidrug resistance protein 1; *BCRP*: Breast cancer related protein; CDDP: Cisplatin and platinol; SCC: Squamous cell carcinoma; IH: Immunohistochemistry; PCR: Polymerase chain reaction; *XPD*: Xeroderma pigmentosum protein; *ERCC1*: Excision repair cross-complementing group 1; *XRCC1*: X-ray repair cross-complementing protein 1; SNP: Single nucleotide polymorphism; RFLP: Restriction fragment length polymorphism; HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma; *MMP 1, 2 and 7*: Matrix metalloproteinase 1, 2 and 7; H-1R: CDDP-resistant cell line.

[23]

1.7 ΠΡΟΚΛΙΝΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ HNSCC ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΕ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

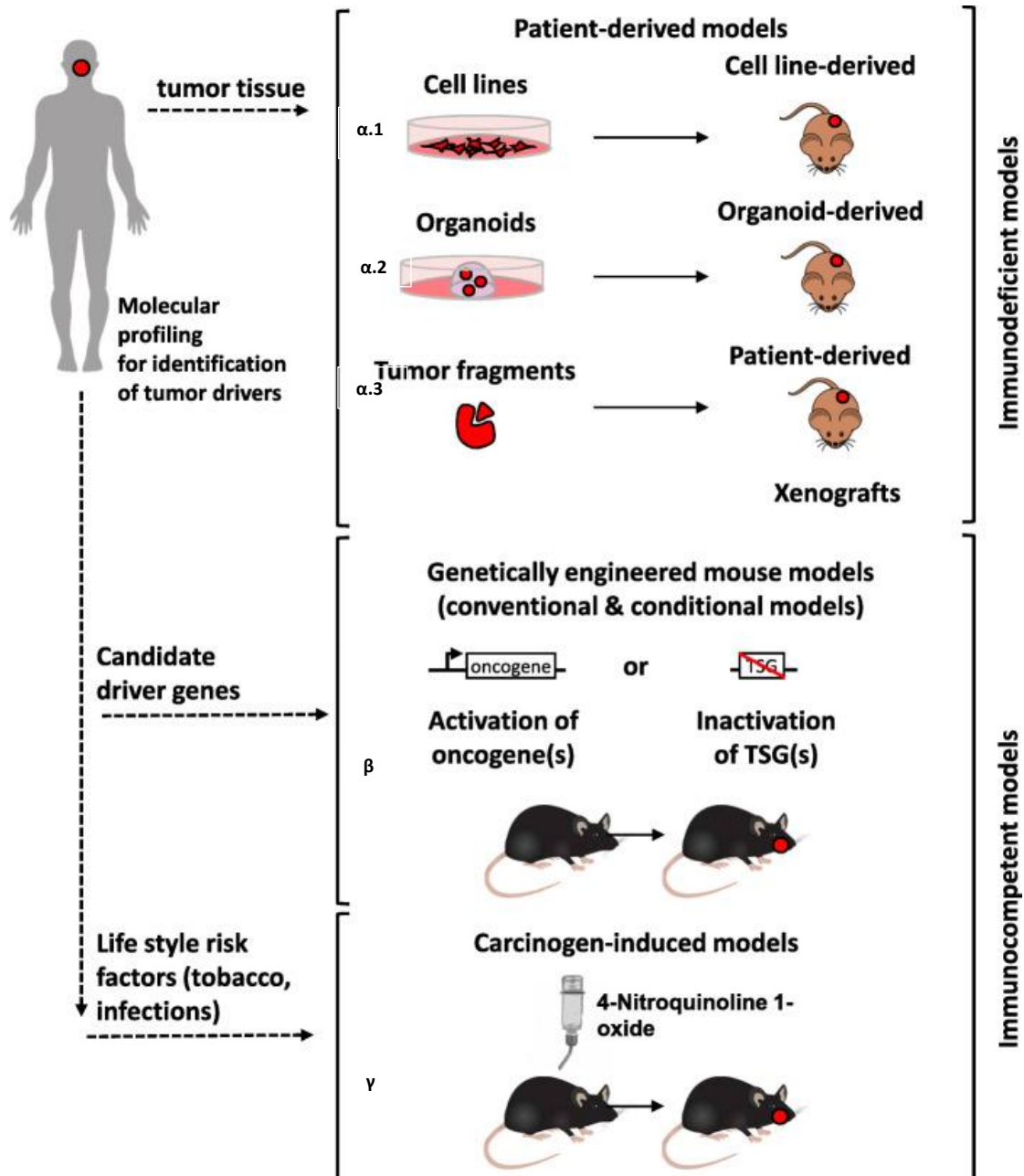
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο HNSCC, η αντοχή στα φάρμακα και η τοξικότητα περιορίζουν την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών σχημάτων που ακολουθούνται. Η εισαγωγή στοχευμένων παραγόντων όπως το cetuximab, το nivolumab ή το pembrolizumab βελτίωσε το αποτέλεσμα αλλά δεν ξεπέρασε το πρόβλημα της πρωτογενούς ή επίκτητης θεραπευτικής αντοχής στην πλειονότητα των ασθενών. [4, 17, 62, 63] Μόνο πολύ λίγοι βιοδείκτες επί του παρόντος χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική ή έχουν πράγματι προχωρήσει προς την επικύρωσή τους για την χρήση τους ως θεραπευτικοί παράγοντες στους ασθενείς με HNSCC.[64] Αξιόπιστα προκλινικά μοντέλα είναι επομένως ζωτικής σημασίας για την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στη θεραπεία του HNSCC και για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών στρατηγικών.

Οι κυτταρικές σειρές HNSCC, αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για την ανάλυση της ανθεκτικότητας στη θεραπεία. Η εξέταση φαρμάκων σε καλλιέργειες μονοστρωματικών κυττάρων παραμένει η συνήθης προσέγγιση για τον εντοπισμό νέων θεραπευτικών παραγόντων. Ωστόσο, οι τρισδιάστατες (3D) καλλιέργειες που είναι πιο αντιπροσωπευτικές ως προς την αρχιτεκτονική του όγκου και το κυτταρικό περιβάλλον, ενδέχεται να είναι ανώτερες για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων στους ασθενείς. Πράγματι, μεγάλες διακυμάνσεις έχουν αποδειχθεί στην ευαισθησία στην ακτινοβολία και τα φάρμακα σε μελέτες που χρησιμοποιούν τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες, παρόμοιες με εκείνες που διαπιστώνονται σε in vivo όγκους. Ακόμη και αν οι τρισδιάστατες καλλιέργειες είναι χρήσιμες για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών, δεν αναπαράγουν πλήρως την πολυπλοκότητα του HNSCC. Έτσι, η ανάπτυξη νέων θεραπειών φαίνεται τελικά να απαιτεί ζωικά μοντέλα HNSCC που να αντιπροσωπεύουν με ακρίβεια τις κυτταρικές και μοριακές αλλαγές που σχετίζονται με την έναρξη και την εξέλιξη του ανθρώπινου καρκίνου.

Σήμερα στον τομέα της επιστήμης, για την μελέτη του καρκίνου και του HNSCC, αντίστοιχα, έχουν αναπτυχθεί ζωικά μοντέλα όπως, τα ζωικά μοντέλα HNSCC όπου προκαλείται ο καρκίνος με έκθεση σε γνωστούς καρκινογόνους παράγοντες, τα διαγονιδιακά ζώα και τα Μοντέλα ξενομοσχευμάτων **1)** από όγκους ασθενών (Patient Derived Xenograft's (PDXs)) **2)** από καρκινικές κυτταρικές σειρές (Cell-line Derived Xenograft's (CDXs)) και **3)** οργανοειδών μοντέλων (Organoids).[4] (Εικόνα 8)

Στη συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθούμε στα Μοντέλα ξενομοσχευμάτων. Τα μοντέλα ξενομοσχεύματος όγκου που προέρχονται από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μοντελοποίηση του HNSCC, με περισσότερες από 300 κυτταρικές σειρές HNSCC να περιγράφονται στη βιβλιογραφία, αν και η συντριπτική πλειονότητα αυτών είναι αρνητικές στον HPV. [65] Πολλές από αυτές τις κυτταρικές σειρές μπορούν να αντιπροσωπεύουν επαρκώς τις κοινές γονιδιακές μεταλλάξεις που παρατηρούνται στους όγκους HNSCC. [66-68] Ωστόσο, οι κυτταρικές σειρές συνήθως υφίστανται εκτεταμένη προσαρμογή υπό υπερ-φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και,

ως ξενομοσχεύματα, συχνά χάνουν τη δομική, γενετική και φαινοτυπική ετερογένεια του μικροπεριβάλλοντος του ανθρώπινου όγκου, με αποτέλεσμα να μην μοντελοποιούν επαρκώς την κλινική ανταπόκριση. [69-71] Τα τελευταία χρόνια, τα ζωικά μοντέλα του HNSCC που προέρχονται από όγκους ασθενών, συμπεριλαμβανομένων των μοντέλων ξενομοσχεύματος (PDX) και των οργανοειδών μοντέλων, έχουν διαδοθεί περισσότερο στις προκλινικές μελέτες για τη μοντελοποίηση του καρκίνου και του HNSCC, αντίστοιχα. [72]



Εικόνα 1.8. Σχηματική επισκόπηση των προσεγγίσεων για τη δημιουργία προκλινικών μοντέλων στο HNSCC

α. Τα μοντέλα που προέρχονται από ασθενείς παράγονται κυρίως από χειρουργικό δείγμα κατά την αφαίρεση του όγκου. **α.1& α.2:** Μετά από μηχανική και ενζυμική διάσπαση, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται in vitro ως μονοστρωματικά κύτταρα 2D σε πλαστικό (cell line-derived) ή ως τρισδιάστατες σφαιροειδείς δομές σε εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix,ECM)(organoid-derived). **α.3:** Για τη δημιουργία ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX), τμήματα όγκου μεταμοσχεύονται υποδόρια σε ποντίκια με μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κλασικά μοντέλα που προέρχονται από ασθενείς χαρακτηρίζονται από την απουσία ανθρώπινων ανοσοποιητικών και στρωματικών κυττάρων.

β.: Γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών για πλακώδες καρκίνωμα του στόματος μπορούν να δημιουργηθούν με επιλεκτική ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή αδρανοποίηση γονιδίων καταστολής όγκων (TSGs) σε επιθηλιακά κύτταρα.

γ.: Η χορήγηση 1-οξειδίου 4-νιτροκινολίνης στο πόσιμο νερό των ποντικών για αρκετές εβδομάδες επάγει την από του στόματος καρκινογένεση της κοιλότητας σε υψηλή συχνότητα [4]

Μοντέλα ξενομοσχευμάτων από όγκους ασθενών

(Patient Derived Xenografts (PDXs))

Τα μοντέλα PDX του HNSCC δημιουργούνται μέσω της άμεσης εμφύτευσης ιστού από ανθρώπινους όγκους σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια είτε υποδόρια είτε ορθοτοπικά σε ανατομικά παρόμοιες περιοχές, όπως ο πυθμένας του στόματος ή η βάση της γλώσσας.[73] Αρχικά για τα μοντέλα PDX του HNSCC χρησιμοποιήσαν αθυμικά ποντίκια ως ξενιστές, αλλά έχουν παρατηρηθεί υψηλότερες αποδόσεις εμφύτευσης με στελέχη ποντικών με μεγαλύτερη ανοσοανεπάρκεια, όπως τα NOD scid gamma (NSG). Τα μοντέλα PDX του HNSCC έχουν δημιουργηθεί από διάφορες ακαδημαϊκές ερευνητικές ομάδες που αναφέρουν ένα εύρος αποτελεσματικότητας εμφύτευσης, στις περισσότερες περιπτώσεις γύρω στο 60%. Παράδειγμα αποτελεί η μεγαλύτερη αναφερόμενη βιοτράπεζα HNSCC PDX με 161 HPV αρνητικά μοντέλα στο Princess Margaret Cancer Centre στο Τορόντο με αποτελεσματικότητα εμφύτευσης 66%. [72] Το ποσοστό εμφύτευσης είναι συχνά υψηλότερο για PDX από ασθενείς με προχωρημένες λεμφαδενικές μεταστάσεις[74-76] και περινευρική διήθηση [77], αλλά είναι ανεξάρτητο από την ηλικία, το φύλο ή το στάδιο του όγκου του ασθενούς.[72] Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν στα PDXs γρήγορα, εντός οκτώ εβδομάδων, συσχετίστηκαν με χειρότερη έκβαση των ασθενών.[75]

Σε ιστολογικό επίπεδο, οι όγκοι PDX αναπαριστούν με ακρίβεια το ετερογενές και πολύπλοκο μικροπεριβάλλον του όγκου HNSCC, διατηρώντας τη μορφολογία των κυττάρων, την αρχιτεκτονική του στρώματος και των αγγείων, και τις άφθονες περιοχές κερατινοειδών κυττάρων και αντίστοιχους βαθμούς διαφοροποίησης με τον μητρικό όγκο. Παρόλο που η μορφολογία των ιστών μοιάζει πολύ με τον κλινικό ιστό στα πρώτα περάσματα των όγκων PDX, στις επόμενες γενιές, τείνουν να χάνουν το στρώμα και να γίνονται πιο ομοιογενείς, γεγονός που μπορεί να μεταβάλλει τους ρυθμούς ανάπτυξης του όγκου, αν και η διαφοροποίηση παραμένει σταθερή. Πολλαπλές μελέτες έχουν χαρακτηρίσει γενετικά τους όγκους PDX του HNSCC και έχουν συγκρίνει τη γονιδιακή έκφραση, την κατάσταση γονιδιακών μεταλλάξεων και τον αριθμό αντιγράφων DNA με τα δεδομένα του κλινικού δείγματος του δότη ή του πληθυσμού HNSCC από το The Cancer Genome Atlas. Όλες οι μελέτες αναφέρουν υψηλή συμφωνία στα επίπεδα έκφρασης, στη συχνότητα μετάλλαξης και στα προφίλ του αριθμού αντιγράφων μεταξύ των μοντέλων PDX και των όγκων HNSCC σε ολόκληρο το γονιδίωμα ή για συγκεκριμένες ογκογονικές παραλλαγές. Παρόλο που παρατηρήθηκαν ασυμφωνίες σε ορισμένα γονίδια, τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης ήταν πιο παρόμοια με τους όγκους των ασθενών για τους όγκους PDX από ό,τι για τις κυτταρικές σειρές HNSCC. Ομοίως, η πλειονότητα των πρωτεϊνών διατηρείται στους όγκους PDX, αν και ορισμένες διαφορές από τους όγκους των ασθενών προκύπτουν από την αντικατάσταση των ανθρώπινων στρωματικών κυττάρων και την επιλογή πρωτεϊνών που σχετίζονται με την σηματοδότηση για τον πολλαπλασιασμό.[72]

Περιστασιακές αναφορές για μοντέλα PDX HNSCC που προβλέπουν την κλινική ανταπόκριση του ασθενούς-δότη έχουν αναφερθεί σε τέσσερις μελέτες. Λόγω του μικρού αριθμού των συμμετεχόντων και της πιθανότητας σφάλματος αναφοράς, όπου δεν αναφέρονται παρόμοιες μελέτες που δεν δείχνουν συσχετίσεις μεταξύ της ανταπόκρισης του ασθενούς και του PDX, οι ευνοϊκές κλινικές προβλέψεις σε αυτές τις μελέτες πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών σε άλλους τύπους καρκίνου ότι τα PDX μπορούν να

αναπαράγουν την ανταπόκριση των ασθενών-δοτών στα φάρμακα[78-80] και μπορούν να αποτελέσουν μια χρήσιμη πλατφόρμα για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης του πληθυσμού σε PDX δοκιμές.[81]

Υπάρχουν διάφοροι περιορισμοί που σχετίζονται με τη χρήση των μοντέλων PDX. Συνήθως υπάρχει μεγάλη χρονική υστέρηση μεταξύ της αρχικής εμφύτευσης και της ανάπτυξης των PDX όγκων σε μεγάλες ομάδες ποντικών για την αξιολόγηση της ευαισθησίας στα φάρμακα, γεγονός που μαζί με το κόστος ανάπτυξης αυτών των μοντέλων μπορεί να περιορίσει τη χρησιμότητά τους. Η απαίτηση για ανοσοανεπαρκή ποντίκια ώστε να είναι δυνατή η επιτυχής εμφύτευση αποκλείει ένα λειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα στον ξενιστή ποντίκι. Οι αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων και αποτελούν στόχο για ανοσοθεραπείες.[82, 83] Η συν-μεταμόσχευση ανθρώπινων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και δειγμάτων όγκου σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια (π.χ. NSG, NSG-SGM3, MISTRG) μπορεί να δημιουργήσει εξανθρωπισμένα μοντέλα PDX, ώστε να είναι δυνατή η αλληλεπίδραση μεταξύ των PDX όγκων και των ανθρώπινων κυττάρων του ανοσοποιητικού, και έτσι να ενσωματωθεί ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην εξέλιξη του όγκου για την ακριβέστερη αναπαράσταση του ανθρώπινου μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την αξιολόγηση των ανοσοθεραπειών.[84] Παραδείγματα εξανθρωπισμένων PDX μοντέλων HNSCC (HactMice) αντικατοπτρίζουν μεγαλύτερη κλινική συνάφεια, παρουσιάζοντας διήθηση ανθρώπινων ανοσοκυττάρων στον όγκο, τροποποιημένη έκφραση κυτταροκινών και γονιδίων του όγκου και αυξημένη λεμφαγγειογένεση.[85] Ένας περαιτέρω περιορισμός των PDX είναι η ικανότητά τους να μοντελοποιούν τη σημαντική ετερογένεια του όγκου του δότη. Ένα μικρό τμήμα όγκου είναι απίθανο να αντιπροσωπεύει τη χωρική ετερογένεια ολόκληρου του όγκου του ασθενούς και η εμφύτευσή του σε ποντίκια μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός υποκλώνου PDX με διαφορετική δυναμική και ανταπόκριση στη θεραπεία από τον κύριο όγκο του πρωτοπαθούς όγκου. [86, 87] Επιπλέον, η πλειονότητα των PDX όγκων του HNSCC εμφυτεύονται υποδόρια στο πλευρό των ποντικών, γεγονός που συνήθως οδηγεί σε εντοπισμένο φαινότυπο σε αντίθεση με τη συχνά ιδιαίτερα επιθετική και μεταστατική συμπεριφορά των όγκων του HNSCC. Η ορθοτοπική εμφύτευση στη γλώσσα, το έδαφος του στόματος ή τον βλεννογόνο μπορεί να προάγει τη μετάσταση, αλλά συνεπάγεται επιπτώσεις στην καλή διαβίωση των ζώων όσον αφορά τη σίτιση και στη μέτρηση του μεγέθους του όγκου. [88] Τέλος, η απόκτηση αλλοιώσεων του αριθμού αντιγράφων (CNA) σε επόμενες γενιές των όγκων PDX έχει οδηγήσει σε ερωτήματα σχετικά με την αξιοπιστία των PDX ως προς τη μοντελοποίηση του όγκου του δότη.[89, 90] Ωστόσο, μια ανάλυση του CNA σε 1451 μοντέλα PDX, συμπεριλαμβανομένων των μοντέλων HNSCC, με τη χρήση πέντε διαφορετικών προσεγγίσεων που βασίζονται σε RNA και DNA για την εκτίμηση του αριθμού αντιγράφων, αντί της εξαγωγής συμπερασμάτων του CNA από δεδομένα μικροσυστοιχιών γονιδιακής έκφρασης, αμφισβήτησε αυτούς τους ισχυρισμούς. Παρατηρήθηκε ισχυρή διατήρηση του CNA από τους πρωτογενείς όγκους και τα PDXs προχωρημένων γενιών, με τυχαίες διαφορές στον CNA συγκρίσιμες με τη χωρική διακύμανση εντός των όγκων των ασθενών, και χωρίς συστηματική επιλογή για τον CNA σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο ή τη θεραπεία κατά την εμφύτευση ή με τις γενιές των PDXs[91]. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το PDX ποντίκι-ξενιστής δεν οδηγεί τη συστηματική εξέλιξη του όγκου.

Μοντέλα οργανοειδών (Organoids)

Τα μοντέλα 3D καλλιέργειας που προέρχονται από όγκους ασθενών προσφέρουν μια εναλλακτική προσέγγιση των μοντέλων PDX χωρίς το κόστος, τους περιορισμούς της ηθικής και του χρόνου των μοντέλων PDX. Πολυκυτταρικά σφαιροειδή μοντέλα πρώιμων κυτταρικών σειρών HNSCC είναι γνωστά εργαλεία [92-95], αλλά ενώ αυτά τα τρισδιάστατα μοντέλα μιμούνται το οξυγόνο και τις πολλαπλασιαστικές βαθμίδες των ανθρώπινων όγκων, παρουσιάζουν περιορισμένη ιστολογική πιστότητα στον όγκο του δότη, όπως και οι κυτταρικές σειρές που αναπτύσσονται μονοστρωματικά, που προκύπτουν από την επιλογή ανθεκτικών κλώνων στην καλλιέργεια. [96] Η In vitro ανάπτυξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων από πρωτοπαθείς όγκους HNSCC που καλλιεργούνται σε μέσα χωρίς ορό οδηγεί στην ανάπτυξη σφαιροειδών που προέρχονται από όγκο. Αυτά τα μοντέλα είναι συνήθως εμπλουτισμένα με καρκινικά βλαστικά κύτταρα όπως αποδεικνύεται από την υψηλή έκφραση των δεικτών βλαστικών κυττάρων και την ανάπτυξη όγκων in vivo, αλλά η απουσία ορού αποκλείει την επιβίωση των μη καρκινικών κυττάρων που αποτελούν ουσιώδες συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του ανθρώπινου όγκου, ενώ το ποσοστό επιτυχίας του σχηματισμού σφαιροειδών που προέρχονται από τον όγκο μπορεί να είναι χαμηλό. [72] Οι εξελίξεις στην τεχνολογία της 3D καλλιέργειας οδήγησαν στην ανάπτυξη οργανοειδών ιστών, όπου 3D μίνι-όργανα μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια μέσα σε πηκτή μεμβράνης είτε από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (PSCs) είτε από ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs). [97-99] Στην συγκεκριμένη καλλιέργεια ενσωματώνονται καρκινικά κύτταρα που απομονώνονται από εκτομές όγκων ή βιοψίες ασθενών, τα οποία αναπτύσσονται με υψηλή αποτελεσματικότητα σε τρισδιάστατη καλλιέργεια ως καρκινικά οργανοειδή. Έχουν αναφερθεί πολλαπλά μοντέλα οργανοειδών για διάφορους τύπους καρκίνου [100-105], συμπεριλαμβανομένου του HNSCC με υψηλά ποσοστά επιτυχίας. [106, 107] Τα καρκινικά οργανοειδή διατηρούν τις σημαντικές δομικές και φαινοτυπικές ιδιότητες του καρκινικού ιστού από τον οποίο προέρχονται, προσφέροντας σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές 2D κυτταρικές καλλιέργειες και τα 3D πολυκυτταρικά σφαιροειδή. Αυτά τα πλεονεκτήματα, τα οποία έχουν επίσης παρατηρηθεί στα οργανοειδή όγκων του HNSCC, υποστηρίζουν ότι αναπαριστούν περισσότερο την τρισδιάστατη οργάνωση του όγκου του ασθενούς και ότι μπορούν να αναπτυχθούν μακροπρόθεσμα χωρίς γενετικές ή λειτουργικές αλλαγές. [97, 108] Τα καρκινικά οργανοειδή είναι κατάλληλα και για τη μοντελοποίηση των HPV-θετικών όγκων, είτε μέσω καλλιέργειας ενός HPV-θετικού δείγματος όγκου [107], είτε μέσω μόλυνσης των οργανοειδών με HPV [106], και είναι κατάλληλα και για γενετική τροποποίηση. [109] Τα καρκινικά οργανοειδή μπορούν επίσης να αναπτυχθούν με υψηλή αποτελεσματικότητα από ιστό ασθενούς που έχει καλλιεργηθεί σε ποντίκια ως PDX και έχουν παρόμοια μορφολογία και ευαισθησία στα φάρμακα με τα μοντέλα PDX από τα οποία προήλθαν.[72] Όπως και με τα PDX, δημιουργούνται μεγάλες βιοτράπεζες οργανοειδών. Τα οργανοειδή αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανακάλυψη φαρμάκων ως συνδέτης μεταξύ των 2D κυτταρικών καλλιεργειών και των ζωικών μοντέλων για τον έλεγχο ενώσεων και την ταυτοποίηση προγνωστικών βιοδεικτών για την ιατρική ακριβείας με υψηλότερη απόδοση, χαμηλότερο κόστος και μικρότερο χρονικό διάστημα από τα μοντέλα PDX. [109] Σε πολλούς τύπους όγκων, έχει αποδειχθεί ότι τα οργανοειδή όγκων έχουν παρόμοια ανταπόκριση στις θεραπείες με τους ασθενείς από τους οποίους προέρχονται [72],

αν και, όπως και στα μοντέλα PDX, η μεροληψία αναφοράς παραμένει μια πιθανή ανησυχία. Τα μοντέλα οργανοειδών HNSCC παρουσιάζουν ετερογενή ευαισθησία στις συνήθεις θεραπείες [106, 107], όπως θα ήταν αναμενόμενο κλινικά, ενώ σε μια ομάδα επτά ασθενών, η ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία στα οργανοειδή συσχετίστηκε με την κλινική έκβαση στα περισσότερα σενάρια. [106] Λόγω των μικρών αριθμών που εμπλέκονται σε αυτές τις μελέτες, οι δοκιμές σε μεγάλο αριθμό ασθενών εξακολουθούν να απαιτούνται για να επιβεβαιωθεί η ικανότητα των οργανοειδών HNSCC να προβλέπουν κλινική ανταπόκριση. Μια τέτοια μελέτη επικύρωσης βρίσκεται σε εξέλιξη στην Ολλανδία για τη σύγκριση της απόκρισης των οργανοειδών με την έκβαση των ασθενών στις συνήθεις θεραπείες πρώτης γραμμής σε περίπου 80 ασθενείς με HNSCC (ONCODE-P2018-0003). [72] Όπως συμβαίνει με όλα τα προκλινικά μοντέλα, υπάρχουν περιορισμοί που σχετίζονται με τα οργανοειδή όγκων. Αν και μοντελοποιούν με ακρίβεια τα επιθηλιακά κύτταρα, δεν διαθέτουν μεσεγχυματικό και ανοσολογικό στοιχείο. Έχουν αναφερθεί συγκαλλιέργειες συστημάτων οργανοειδών όγκων με μεσεγχυματικά και/ή ανοσοποιητικά κύτταρα [110-113], αλλά τα μοντέλα αυτά δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί και η πλήρωση της ποικιλομορφίας των ανθρώπινων ανοσοποιητικών κυττάρων παραμένει πρόκληση. Ένα ακόμη μειονέκτημα των οργανοειδή όγκων αποτελεί το γεγονός ότι τα δείγματα όγκων των ασθενών μπορεί να αναμειχθούν με μη καρκινικά κύτταρα και όταν καλλιεργηθούν ως οργανοειδή, μπορεί να ανταγωνίζονται τα καρκινικά κύτταρα και να περιορίζουν την αποτελεσματικότητα των οργανοειδών στη μοντελοποίηση του ανθρώπινου καρκίνου. [114]

Συμπερασματικά, τα στοιχεία που περιγράφονται παραπάνω υποδεικνύουν ότι τόσο τα μοντέλα PDX όσο και τα οργανοειδή μοντέλα του HNSCC είναι σε θέση να αναπαραστήσουν την ετερογένεια του HNSCC, παρουσιάζοντας ιστολογική, γενετική και πρωτεομική πιστότητα σε πολλαπλές μελέτες. Αυτά τα μοντέλα φαίνεται να έχουν αυξημένη κλινική συνάφεια σε σχέση με τα μοντέλα ξενομοσχεύματος κυτταρικών σειρών ή τις μονοστρωματικές καλλιέργειες κυτταρικών σειρών, αλλά παραμένουν ερωτήματα σχετικά με το πόσο κατάλληλα είναι για την αξιολόγηση νέων υποψήφιων φαρμάκων και την ταυτοποίηση προγνωστικών βιοδεικτών για την υποστήριξη της ιατρικής ακριβείας στο HNSCC.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στην συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθούμε στην ανάπτυξη μοντέλων PDXs από όγκους ασθενών HNSCC και πιο συγκεκριμένα με καρκίνο του λάρυγγα. Θα διερευνήσουμε την χρησιμότητα των PDXs ως μοντέλα για την μελέτη της ανθεκτικότητας στη θεραπεία με βάση το Cisplatin στο HNSCC.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ – ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ

Όλα τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στεγάστηκαν σε αυτόνομα εξαεριζόμενους κλωβούς σε συνθήκες ελεύθερες ειδικών παθογόνων (Specific Pathogen Free, SPF) σε πλήρη συμμόρφωση με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Εταιρειών Ζώων Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA), στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA, Ελλάδα). Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος διατηρούνταν σταθερές και η εναλλαγή ημέρας και νύχτας ήταν προγραμματισμένη ανά 12 ώρες. Η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη.

PDXs

Τα PDXs, αποτελούν ζωικά μοντέλα στα οποία λαμβάνει χώρα η εμφύτευση όγκων του ανθρώπου σε ποντικούς. Αποτελούν πρότυπους οργανισμούς με ανοσοανεπάρκεια, ώστε να δέχονται το μόσχευμα και προσομοιάζουν τις συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου του ασθενούς. Διαφορετικές γονιδιακές μεταλλάξεις προκαλούν διαφορετικούς βαθμούς ανοσοανεπάρκειας στα τέσσερα είδη ποντικών που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των PDXs.[\[115\]](#) Συγκρίσεις από διάφορους ερευνητές έχουν αποκαλύψει ότι τα ποντίκια με τις υψηλότερες δυνατότητες επιτυχούς εμφύτευσης και μελέτης του καρκίνου είναι κατά φθίνουσα σειρά αποτελεσματικότητας, τα ανοσοανεπαρκή ποντίκια *IL2rg^{null}* (NSG), τα ποντίκια NOD-SCID, τα ποντίκια SCID και τα γυμνά αθυμικά ποντίκια.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ανοσοανεπαρκή ποντίκια *IL2rg^{null}* (NSG) για την ανάπτυξη των PDXs από όγκους ασθενών με καρκίνο στον λάρυγγα. Το συγκεκριμένο είδος ποντικίου στερείται T, B και NK λεμφοκύτταρα και έχουν εξασθενημένα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και μακροφάγα.

Λήψη ιστοτεμαχίου

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), υψηλής περιεκτικότητα σε γλυκόζη, 10%FBS, 1% Pen/Strep
- Falcon 50 mL

Μέθοδος

Για την in vivo μελέτη όγκων HNSCC, λήφθηκε ιστοτεμάχιο, κατά την χειρουργική αφαίρεση όγκων ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα στην Β' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΩΡΛ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΤΤΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.

Αμέσως, το ιστοτεμάχιο τοποθετήθηκε σε Falcon το οποίο περιείχε 5 mL DMEM.

Η παραλαβή των δειγμάτων έγινε εντός 2 ωρών.

Όλοι οι ασθενείς είχαν ενημερωθεί από τον γιατρό και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης.

Εμφύτευση όγκων

Υλικά

- **1x PBS**(αποστειρωμένο)
- **10x Trypsin**(αποστειρωμένο)
- **Cell culture dish 35mm**(αποστειρωμένο)
- **Χειρουργικό ψαλίδι** (αποστειρωμένο)
- **Χειρουργικές λαβίδες** (αποστειρωμένο)
- **Ράμματα** (αποστειρωμένο)
- **Αναισθητικό** (Για 10mL ketamine 100 mg/mL and xylazine 100 mg/mL προσθέτουμε: 1.75mL ketamine (100 mg/mL) + 0.25 mL xylazine (100 mg/mL) σε 8 mL water for injection)
- **Νυστέρια** (αποστειρωμένο)
- **INSULIN SYRINGE STANDARD 1mL**(αποστειρωμένο)
- **Θερμαινόμενη πλάκα**
- **Hood**

Μέθοδος (Εικόνα 1.3)

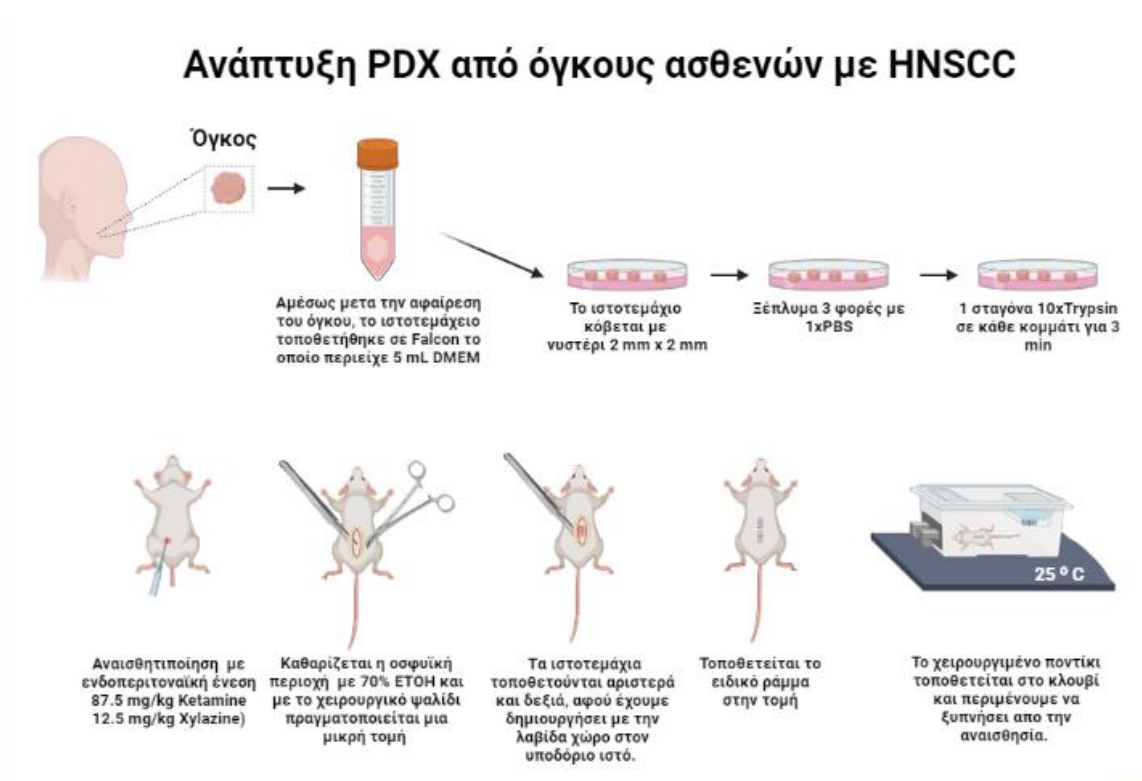
Όλα τα χειρουργικά εργαλεία είναι αποστειρωμένα και η διαδικασία της επέμβασης πραγματοποιείται σε Hood.

1. Μόλις γίνει η παραλαβή του δείγματος, επιλέγονται τα ποντίκια που θα υποδεχτούν το μόσχευμα, ηλικίας 4-5 εβδομάδων. Ανάλογα με το φύλο του ασθενούς που προέρχεται το δείγμα, επιλέγεται και το φύλο των ποντικών που θα υποδεχτούν το μόσχευμα.
(Παρατηρήθηκε ότι οι όγκοι αναπτύσσονταν καλύτερα όταν μεταμοσχεύονταν στο αντίστοιχο φύλο του ασθενούς.)
2. Το ιστοτεμάχιο τοποθετείται σε Cell culture dish 35mm και ξεπλένεται 3 φορές με 1xPBS.
3. Το ιστοτεμάχιο κόβεται με νυστέρι σε μικρότερα κομμάτια περίπου 2 mm x 2 mm
4. Αφαιρείται το 1xPBS και προστίθεται 1 σταγόνα 10xTrypsin σε κάθε κομμάτι. (Δοκιμαστική η μη χρήση της Τρυψίνης, ωστόσο φάνηκε ότι η επώαση των ιστοτεμαχίων με Τρυψίνη, βοηθάει στην ενσωμάτωση και την ανάπτυξη του όγκου στο PDX.)
5. Ρυθμίζεται η θερμαινόμενη πλάκα στους 25 ° C και τοποθετείται πάνω το

άδειο κλουβί που θα φιλοξενήσει τα χειρουργημένα ποντίκια.

6. Ανάλογα με τον αριθμό των ιστοτεμαχίων που προέκυψαν, επιλέγεται και ο αριθμός των ποντικών για την επέμβαση, ηλικίας 4 εβδομάδων. Αντιστοιχούν 2 κομμάτια των 2 mm x 2 mm σε κάθε ποντίκι. Τα συγκεκριμένα ποντίκια αναισθητοποιούνται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (Intraperitoneal injection), με την αντίστοιχη δόση αναισθητικού, που είναι ανάλογη με το βάρος τους (87.5 mg/kg Ketamine 12.5 mg/kg Xylazine).
7. Αφού επιτευχθεί η αναισθησία, καθαρίζεται η οσφυϊκή περιοχή με 70% ETOH και με το χειρουργικό ψαλίδι πραγματοποιείται μια μικρή τομή. Τοποθετούμε τα ιστοτεμάχια, αριστερά και δεξιά, αφού έχουμε δημιουργήσει με την λαβίδα χώρο στον υποδόριο ιστό, στα πλευρά του ποντικιού.
8. Τοποθετούμε το ειδικό ράμμα στην τομή.
9. Βάζουμε το ποντίκι στο κλουβί, ρυθμίζουμε την πλάκα στους 25°C και περιμένουμε να ξυπνήσει από την αναισθησία.
10. 4-10 εβδομάδες για την ανάπτυξη του όγκου.

Όταν αναπτύχθηκαν οι όγκοι που εμφυτεύτηκαν στο ποντίκι, τότε το ποντίκι θυσιάστηκε και λήφθηκαν οι όγκοι, με επέμβαση. Ένα κομμάτι των όγκων χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση και χαρακτηρισμό και το υπόλοιπο εμφυτεύθηκε εκ νέου σε ποντίκια, για θεραπεία.



Εικόνα 3.1 Μέθοδος εμφύτευσης ιστοτεμαχίων από όγκους ασθενών σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια *IL2rg^{null}* (NSG). Η εικόνα παράχθηκε στην εφαρμογή [BioRender.com](https://www.biorender.com)

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ / ΣΧΗΜΑ

Υλικά

- Cisplatin, 100mg/100mL
- INSULIN SYRINGE STANDARD 1ML
- 70% ΕΤΗΟΗ
- Distilled water
- hood

Μέθοδος (Εικόνα 2.3)

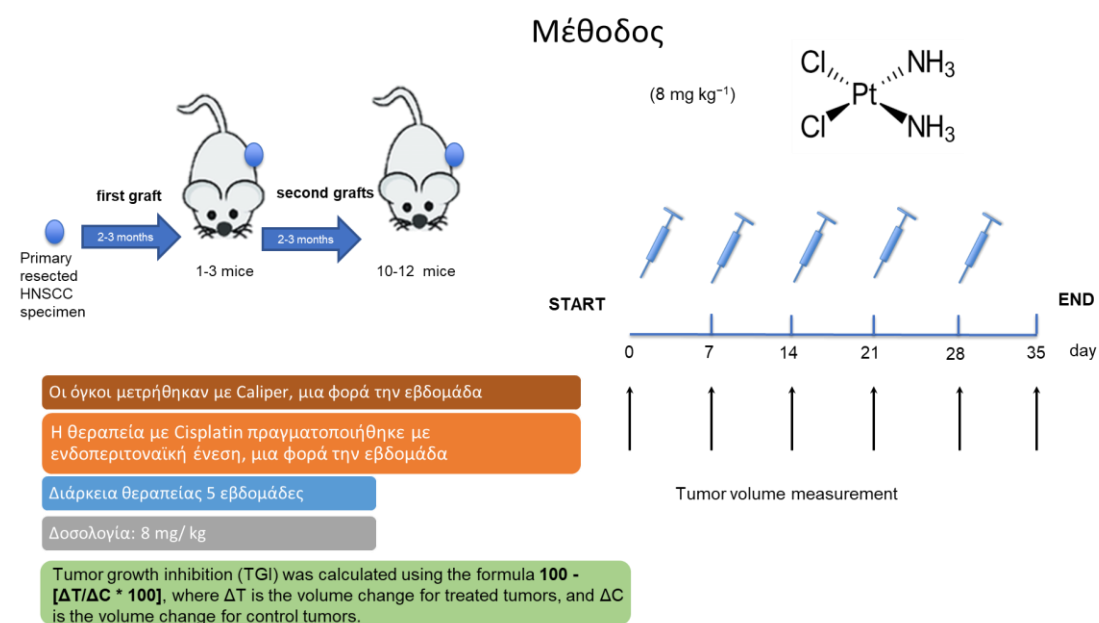
Cisplatin Therapy

Τα PDXs για κάθε δείγμα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Τα Vehicle και τα Treated. Κάθε ομάδα περιλάμβανε 6-8 ποντίκια. Οι όγκοι μετρήθηκαν με Caliper, μια φορά την εβδομάδα.

Η θεραπεία με Cisplatin πραγματοποιήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση, μια φορά την εβδομάδα. Διάρκεια θεραπείας 5 εβδομάδες.

Δοσολογία: 8 mg/ kg

Όταν ολοκληρώθηκε η θεραπεία τα ποντίκια θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν οι όγκοι, οι οποίοι μονιμοποιήθηκαν σε 10 % φορμαλίνη για περεταίρω ανάλυση.



Εικόνα 3.2. Μέθοδος χορήγησης θεραπείας με Cisplatin. Η εικόνα παράχθηκε στην εφαρμογή [BioRender.com](https://www.biorender.com)

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ

Προκειμένου να μονιμοποιηθούν, οι όγκοι μετά την αφαίρεση τους από τα ποντίκια εκπλήθηκαν με 1x PBS και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε 10% φορμαλίνη ολονύκτια στους 4 °C. Την επόμενη μέρα εκπλήθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για 10 min και τοποθετήθηκαν σε κασέτες έγκλεισης (embedding cassettes). Οι κασέτες με τα ιστοτεμάχια εμβαπτίστηκαν σε ποτήρι ζέσεως με 70% EtOH ολονύκτια στους 4 °C. Την επόμενη μέρα ακολούθησαν τα στάδια της αφυδάτωσης με διαδοχικές συγκεντρώσεις αλκοόλης (70%, 95%, 100%) της διαύγασης με ξυλόλη και της παραφίνωσης με παραφίνη σε μηχανήμα ιστοκινέτας (Automatic Tissue Processor Leica TP1020). Μετά από αυτά τα στάδια πραγματοποιήθηκε η έγκλειση σε παραφίνη σε μηχανήμα σκίνωσης (Tissue embedding system Sakura Tec5 Tissue Tek). Οι κύβοι παραφίνης τοποθετήθηκαν στους -20 °C προκειμένου να γίνει αργότερα λήψη τομών.

Λήψη τομών παραφίνης

Για την απόκτηση τομών παραφίνης οι κύβοι τοποθετήθηκαν σε μικροτόμο (Microtome Leica RM 2125) και λήφθηκαν τομές πάχους 5 μm που στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες (slides) επικαλυμμένες με πολυλυσίνη (Thermo Scientific).

Η μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων, η έγκλειση και η λήψη τομών πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Ιστοχημείας του ΙΙΒΕΑΑ.

ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Οι τομές παραφίνης παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου ολονύκτια και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση που περιλάμβανε:

- Τοποθέτηση των slides με τις τομές παραφίνης σε θερμαινόμενη πλάκα στους 56 οC για 7 min.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 10 min.
- Εμβάπτιση σε δεύτερη ξυλόλη για 10 min.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 5 min.
- Εμβάπτιση σε 95% EtOH για 2 min.
- Εμβάπτιση σε 85% EtOH για 2 min.
- Εμβάπτιση σε 80% EtOH για 2 min.
- Έκπλυση με νερό βρύσης (x3).

Μετά το στάδιο της αποπαραφίνωσης, τα slides τοποθετήθηκαν σε δοχείο με antigen retrieval, όπου για την παρασκευή του προστέθηκαν 2.94 gr tri-sodium citrate dehydrate (Fisher) και 990 ml dH₂O και αναδεύτηκαν με τη χρήση μαγνήτη. Το pH=6 ρυθμίστηκε με την προσθήκη 1N HCL (Acros) και ακόμα προστέθηκαν 0,5 ml Tween 20 (Applichem) και dH₂O έως ότου το διάλυμα αποκτήσει τελικό όγκο 1 L. Το δοχείο με τα slides στο antigen retrieval τοποθετήθηκε σε χύτρα ταχύτητας για 10 min. Στη συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν δύο φορές με 1x PBS και έπειτα προστέθηκε σε αυτές

blocking buffer για 30min. Το blocking buffer παρασκευάστηκε με 1x PBS, 10% FBS και 1% BSA (Applichem).

Μετά την απομάκρυνση του blocking buffer προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα, με αραιώση που προτείνεται από την αντίστοιχη εταιρία, σε Ab buffer (1x PBS, 1% BSA) και επώαστηκε ολονύκτια στους 4 °C. Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το αντίσωμα και προστέθηκε στις τομές wash buffer που αποτελούσαν από 1x PBS και 0.025% Triton x 100 (Sigma-Aldrich) για 3 min. Μετά την απομάκρυνση του wash buffer, προστέθηκε στις τομές το δευτερογενές αντίσωμα και επώαστηκε σε RT για 2h. Το δευτερογενές αντίσωμα συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα. Το σύστημα ανίχνευσης βασίζεται στο δευτερογενές αντίσωμα. Η σύγχρονη χρωμογενής ανίχνευση χρησιμοποιεί ένζυμα όπως το Horseradish Peroxidase (HRP) που είναι συζευγμένα (ενωμένα) με το αντίσωμα. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το δευτερογενές αντίσωμα και προστέθηκε στις τομές wash buffer για 3 min. Μετά την έκπλυση με wash buffer, προστέθηκε χρωμογόνο DAB (5ml dH₂O, 30 μl buffer pH 7.5 stock solution, 60 μl DAB stock solution, 30μl hydrogen peroxide solution) (DAB peroxidase substrate kit, Vector), με παράλληλη παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Μετά την παρατήρηση της χρωμογόνου επίδρασης του DAB ακολούθησε έκπλυση με νερό βρύσης. Έπειτα, τα slides με τις τομές εμβαπτίστηκαν σε αιματοξυλίνη (Harris) για 7 sec και εκπλήθηκαν με νερό βρύσης (x3). Στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο της αφυδάτωσης:

- Εμβάπτιση σε 80% EtOH για 30 sec.
- Εμβάπτιση σε 95% EtOH για 30 sec.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 1min.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 1 min.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 3 min.
- Εμβάπτιση σε δεύτερη ξυλόλη για 3 min.

Στη συνέχεια ακολούθησε επικάλυψη με DPX και καλυπτρίδα.

Ψηφιακή απεικόνιση- επεξεργασία

Μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ανοσοϊστοχημείας, τα slides παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (brightfield microscope) και λήφθηκαν φωτογραφίες με φακό 40x. Η ψηφιακή απεικόνιση πραγματοποιήθηκε στη μονάδα βιοαπεικόνισης του IIBEAA.

Για την καταμέτρηση των θετικών στη χρώση κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Fiji-ImageJ software.

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση και τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε το GraphPad Prism software.

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Είναι η εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος με ειδικό αντίσωμα σεσημασμένο με φθοριοχρώμα. Φθοριοχρώματα είναι ουσίες που εκπέμπουν ορατό φως μεγαλύτερου μήκους κύματος, όταν ακτινοβοληθούν με μικρού μήκους κύματος φως, π.χ. αόρατη υπεριώδης ακτινοβολία.

Οι τομές παραφίνης παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου ολονύκτια και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση που περιελάμβανε:

- Τοποθέτηση των slides με τις τομές παραφίνης σε θερμαινόμενη πλάκα στους 56 οC για 7 min.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 10 min.
- Εμβάπτιση σε δεύτερη ξυλόλη για 10 min.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 5 min.
- Εμβάπτιση σε 95% EtOH για 2 min.
- Εμβάπτιση σε 85% EtOH για 2 min.
- Εμβάπτιση σε 80% EtOH για 2 min.
- Έκπλυση με νερό βρύσης (x3).

Μετά το στάδιο της αποπαραφίνωσης, τα slides τοποθετήθηκαν σε δοχείο με antigen retrieval, όπου για την παρασκευή του προστέθηκαν 2.94 gr tri-sodium citrate dehydrate (Fisher) και 990 ml dH₂O και αναδεύτηκαν με τη χρήση μαγνήτη. Το pH=6 ρυθμίστηκε με την προσθήκη 1N HCL (Acros) και ακόμα προστέθηκαν 0,5 ml Tween 20 (Appllichem) και dH₂O έως ότου το διάλυμα αποκτήσει τελικό όγκο 1 L. Το δοχείο με τα slides στο antigen retrieval τοποθετήθηκε σε χύτρα ταχύτητας για 10 min. Στη συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν δύο φορές με 1x PBS και έπειτα προστέθηκε σε αυτές blocking buffer για 30min. Το blocking buffer παρασκευάστηκε με 1x PBS, 10% FBS και 1% BSA (Appllichem).

Μετά την απομάκρυνση του blocking buffer προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα, με αραιώση που προτείνεται από την αντίστοιχη εταιρία, σε Ab buffer (1x PBS, 1% BSA) και επώαστηκε ολονύκτια στους 4 οC. Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το αντίσωμα και προστέθηκε στις τομές wash buffer που αποτελούσαν από 1x PBS και 0.025% Triton x 100 (Sigma-Aldrich) για 3 min. Μετά την απομάκρυνση του wash buffer, προστέθηκε στις τομές το δευτερογενές αντίσωμα και επώαστηκε σε RT, στο σκοτάδι, για 2h. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το δευτερογενές αντίσωμα και προστέθηκε στις τομές wash buffer για 3 min. Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με Vectashield with DAPI και καλυπτρίδα.

Ψηφιακή απεικόνιση- επεξεργασία

Μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Ανοσοφθορισμού, τα slides παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (microscope) και λήφθηκαν φωτογραφίες με φακό 40x. Η ψηφιακή απεικόνιση πραγματοποιήθηκε στη μονάδα βιοαπεικόνισης του IIBEAA.

Για την καταμέτρηση των θετικών στη χρώση κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Fiji-ImageJ software.

Στατιστική ανάλυση

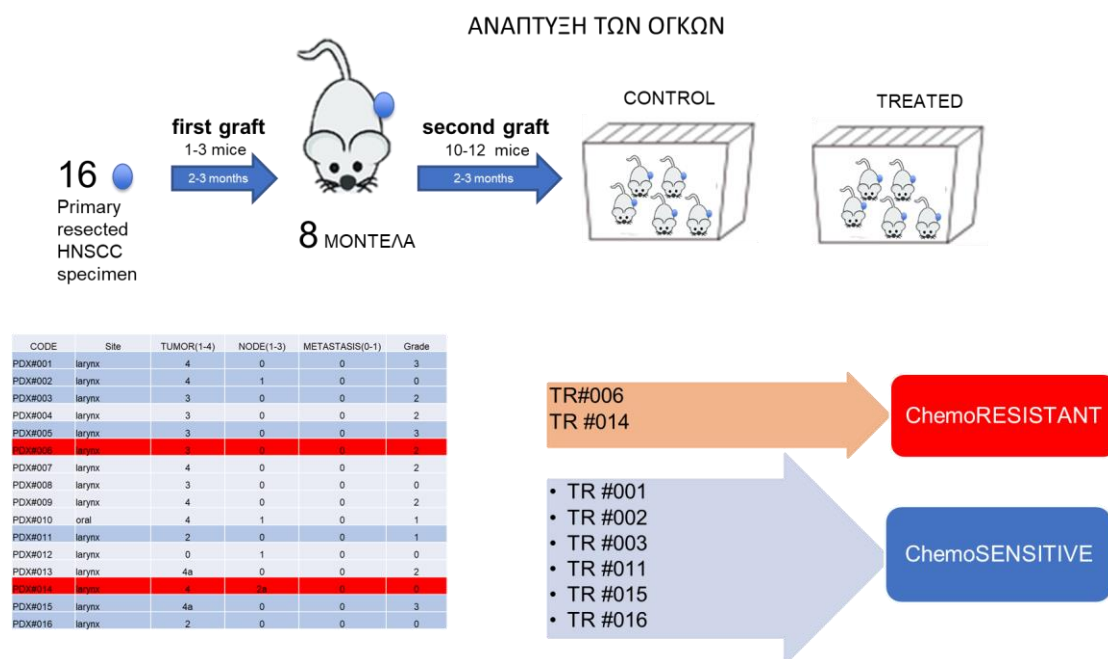
Για την στατιστική ανάλυση και τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε το GraphPad Prism software

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία είναι:

- 1) Pan-Keratin (C11) Mouse mAb#4545
- 2) Cytokeratin-17 (Cat# 606-540)
- 3) Ki-67 (D3B5) Rabbit mAb #9129
- 4) Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb #9718

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

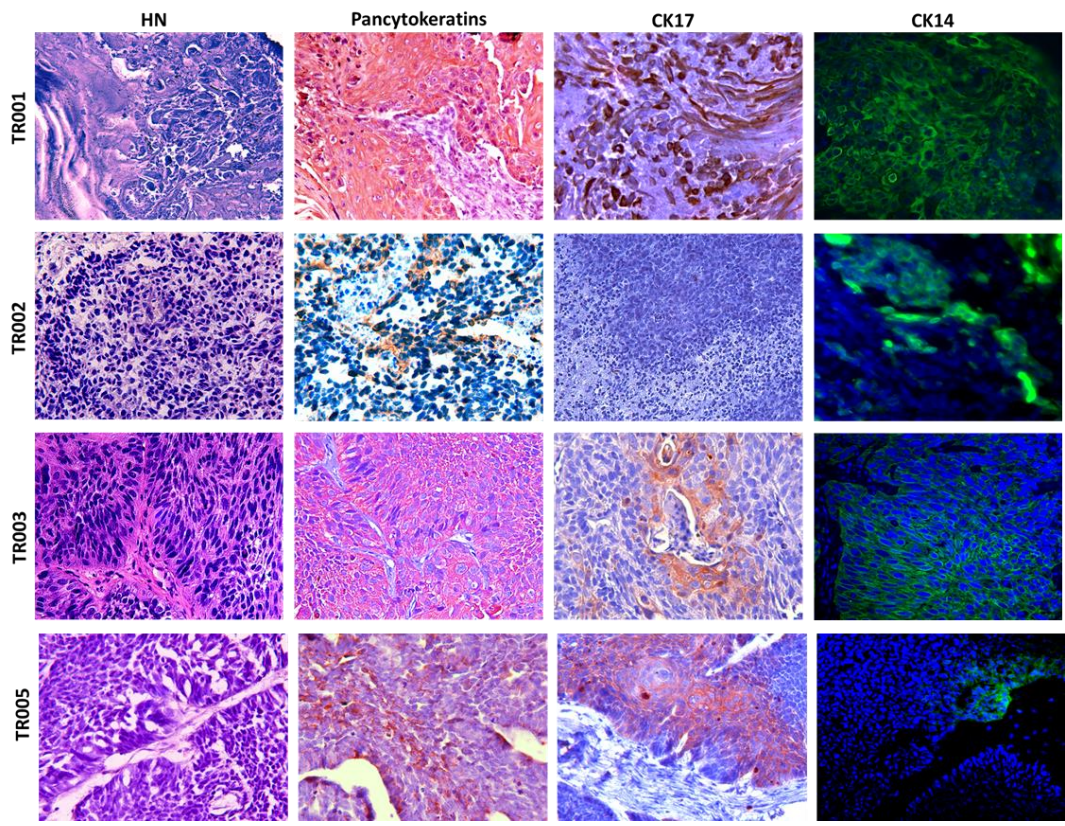
Από τα δείγματα ασθενών με καρκίνο στο λάρυγγα που παρελήφθησαν (16), το 50% (8) αναπτύχθηκε επιτυχώς στα ανοσοανεπαρκή ποντίκια *IL2rg^{null}* (NSG) σε χρονικό διάστημα 4-8 εβδομάδων. Μόλις αναπτύχθηκαν με επιτυχία οι όγκοι για πρώτη φορά στο ποντίκι και έφτασαν σε μέγεθος περίπου 0,5x0,5 mm, το ποντίκι θυσιάστηκε, ένα κομμάτι του όγκου μεταμοσχεύθηκε σε περισσότερα ποντίκια, για να απαντηθεί το ερώτημα εάν τα PDXs είναι ικανά μοντέλα για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στο Cisplatin, στο HNSCC. Επίσης, ένα κομμάτι των όγκων μονιμοποιήθηκε και έγινε έγκλιση σε παραφίνη ώστε να χαρακτηριστεί ιστολογικά.



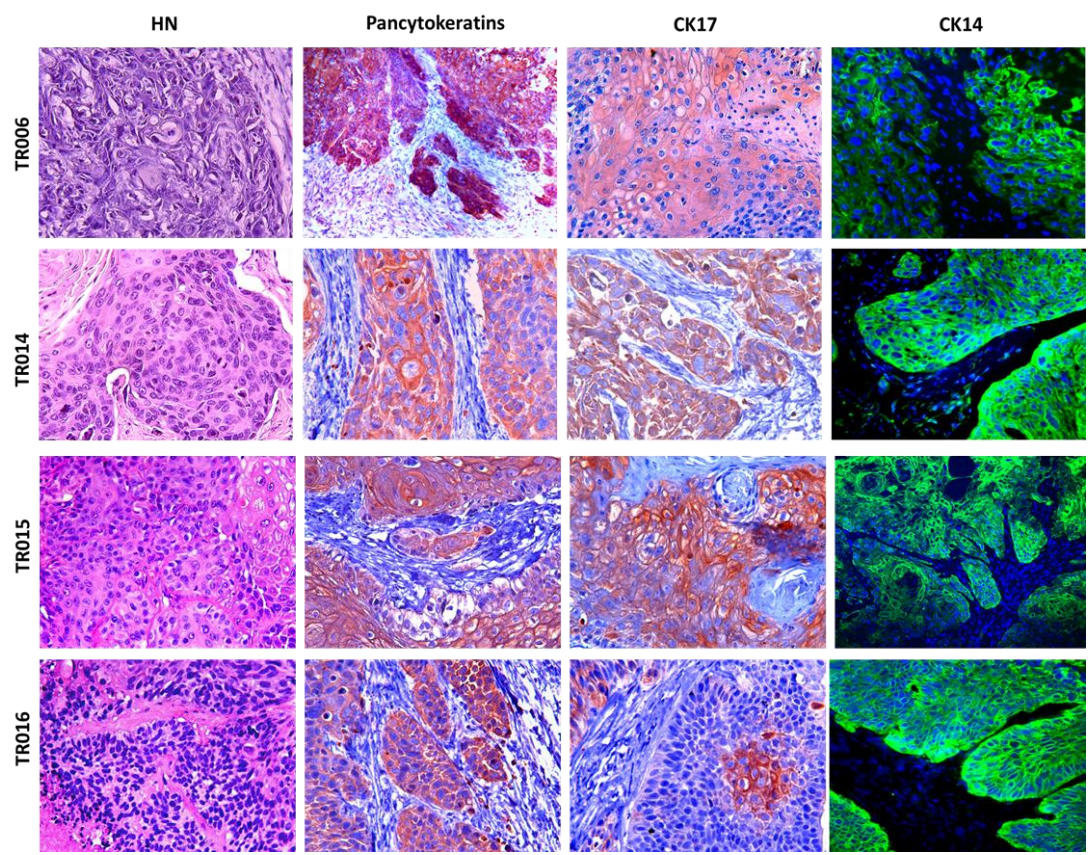
Εικόνα 4.1 Αποτελέσματα. Η εικόνα παράχθηκε στην εφαρμογή [BioRender.com](https://www.biorender.com)

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (baseline)

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων πριν την χορήγηση θεραπείας, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοιστοχημείας και του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 1 & Table 1). Σε όλους τους ιστούς έγινε χρώση αιματοξυλίνης - Ιωσίνης για την γενική εκτίμηση της μορφολογίας τους. Στη συνέχεια, οι όγκοι χαρακτηρίστηκαν ως προς την έκφρασή τους σε **Κυτταροκερατίνες** (cytokeratins, CKs). Οι κυτταροκερατίνες που επιλέχθηκαν είναι οι Pankeratins, CK17 και CK14. **Από τις εικόνες 2.4A&2.4B, συμπεραίνουμε ότι οι ιστοί TR001, TR006, TR014 και TR015 εμφανίζουν έντονη κερατινοποίηση (Πίνακας 1).**



Εικόνα 4.2 Α. Έκφραση Κερατινών



Εικόνα 4.2 Β. Έκφραση Κερατινών

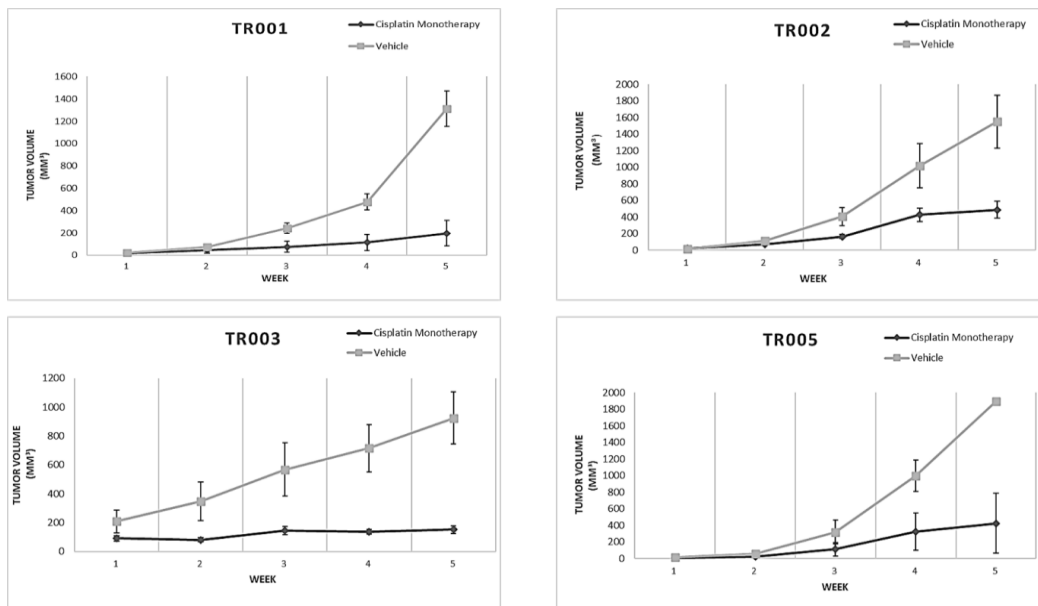
Πίνακας 1. Έκφραση Κερατινών

	TR001	TR002	TR003	TR005	TR006	TR014	TR015	TR016
PANCYTOKERATINS	****	*	***	**	****	****	****	****
CK17	**	-	*	*	****	****	****	*
CK14	****	*	*	*	****	****	****	****

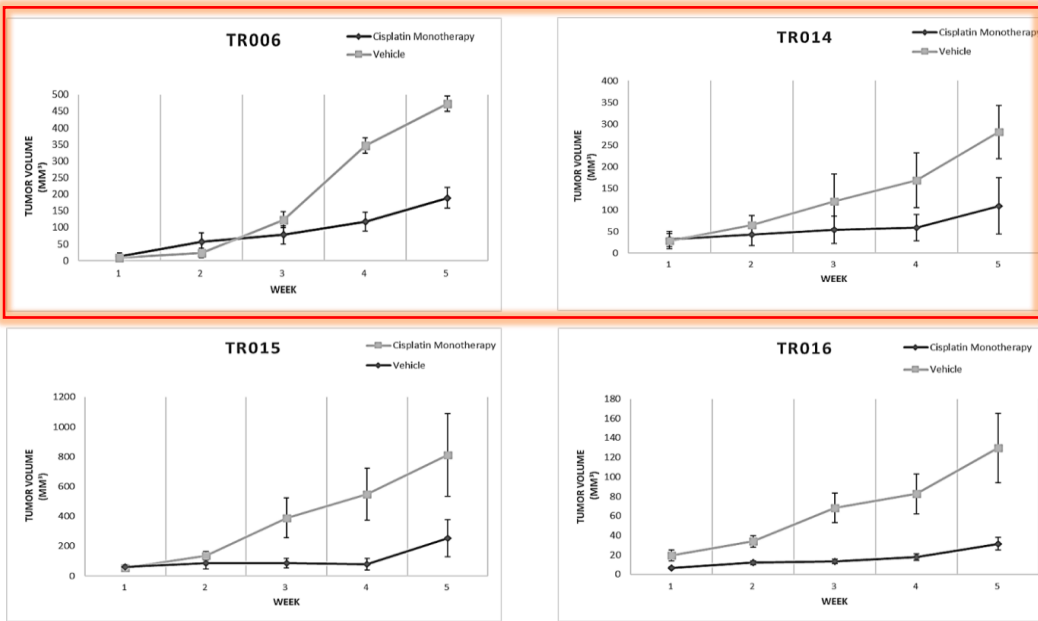
όπου * χαμηλή έκφραση **μέτρια έκφραση **** υψηλή έκφραση

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ (Cisplatin)

Αφού αναπτύχθηκαν οι όγκοι στα ποντίκια, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (n=8), Vehicle (δεν έλαβαν θεραπεία) και Treated (έλαβαν θεραπεία). Το φάρμακο που τους χορηγήθηκε είναι το Cisplatin, σύμφωνα με το σχήμα που αναφέρεται παραπάνω (Εικόνα 2.2). Οι όγκοι μετρήθηκαν 1 φορά την εβδομάδα με Caliper και χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $\text{Volume} = (A) \cdot (B^2) / 2$, being B side < A side, για τον υπολογισμό των όγκων (Εικόνα 2.3A & 2.3B). Στα διαγράμματα έγινε σύγκριση του μεγέθους των όγκων ποντικών που είχαν λάβει τη θεραπεία και ποντικών που δεν είχαν λάβει τη θεραπεία τη δεδομένη χρονική στιγμή. Στις εικόνες 3.4A & 3.4B φαίνεται ότι οι όγκοι TR006 και TR014 εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο Cisplatin, σε αντίθεση με τους TR001, TR002, TR003, TR005, TR015 & TR016, που φαίνεται να είναι ευαίσθητοι (Πίνακας 2).



Εικόνα 4.3Α. Σύγκριση της ανάπτυξης των όγκων σε Treated και Untreated



Εικόνα 4.3Β. Σύγκριση της ανάπτυξης των όγκων σε Treated και Untreated

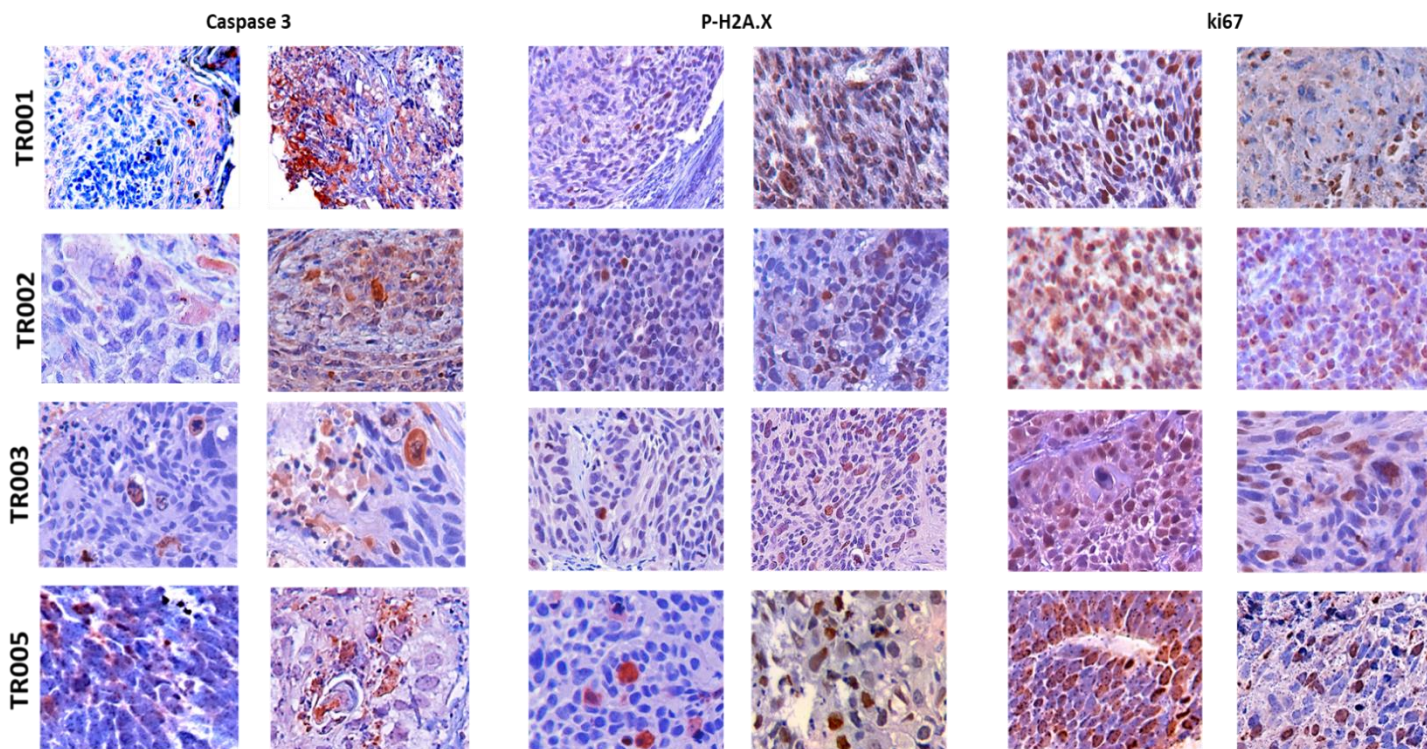
Πίνακας 2. Ανθεκτικότητα στο Cisplatin

TR001	TR002	TR003	TR005	TR006	TR014	TR015	TR016
S	S	S	S	R	R	S	S

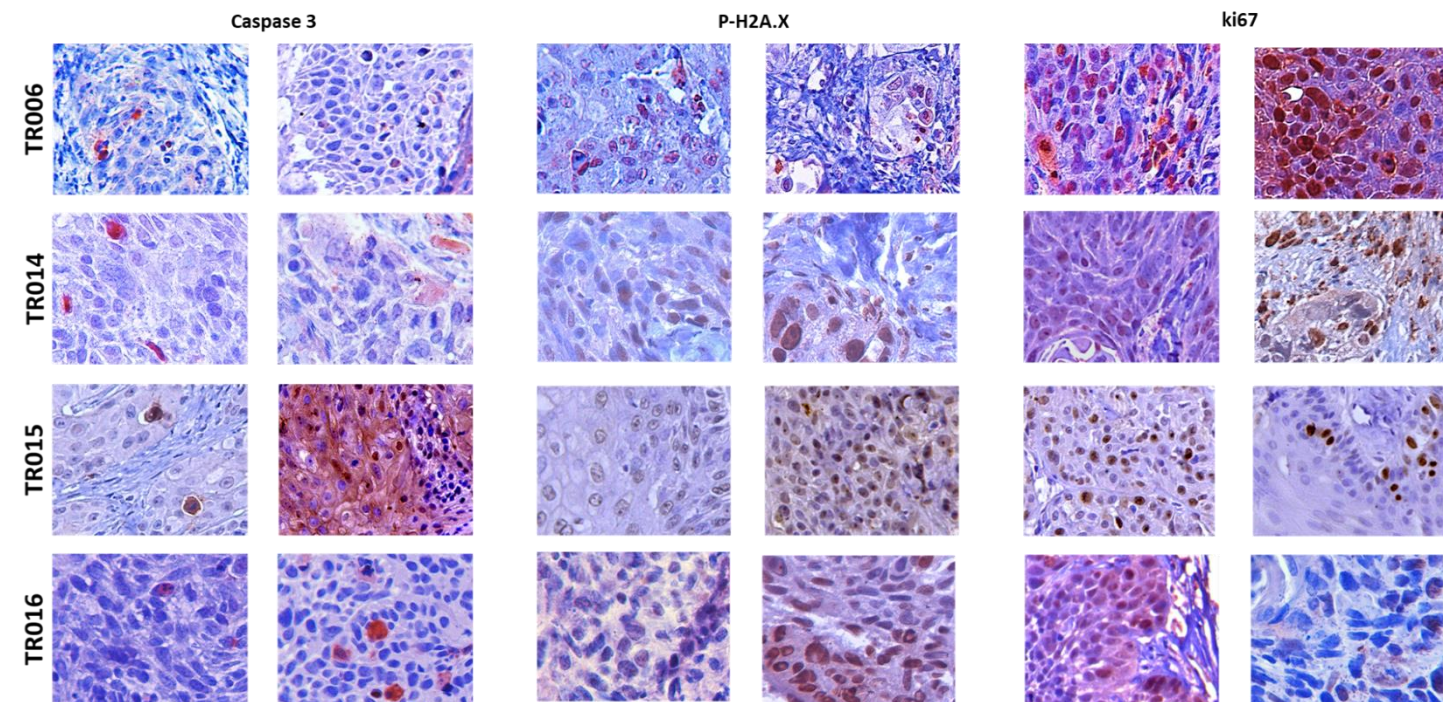
όπου S= Sensitive, ευαίσθητο & R=Resistant, ανθεκτικό

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (baseline & Cisplatin Treated)

Όταν ολοκληρώθηκε η θεραπεία τα ποντίκια θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν οι όγκοι, οι οποίοι μονιμοποιήθηκαν σε 10 % φορμαλίνη για περεταίρω ανάλυση. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων μετά την χορήγηση θεραπείας Cisplatin, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοιστοχημείας και του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 4.4A&4.4B). Ο κάθε όγκος χαρακτηρίστηκε ιστολογικά πριν και μετά τη θεραπεία ως προς την έκφραση σε : **Caspase 3**, η οποία αποτελεί έναν γνωστό δείκτη των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση. [116] **Phospho- H2AX**, η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX στην σερίνη 139 (γH2AX), είναι μια άμεση αντίδραση του κυττάρου στις δίκλωνες θραύσεις του DNA.[117] Το **Ki67**, αποτελεί δείκτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και χρησιμοποιείται ευρέως στον καρκίνο.[118] Στην Εικόνα 4.4A & 4.4B, τα δείγματα TR001, TR002, TR005, TR015 & TR016 εμφανίζουν αύξηση στη έκφραση σε Caspase 3, Phospho-H2AX μετά την θεραπεία σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων δεικτών πριν την χορήγηση της θεραπείας, ενώ το ki67, που είναι δείκτης πολλαπλασιασμού των κυττάρων ελαττώνεται, μετά την χορήγηση της θεραπείας. Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της εικόνας 2.3A&2.3B και ενισχύουν την πεποίθηση ότι οι συγκεκριμένοι όγκοι είναι ευαίσθητοι στην θεραπεία με Cisplatin. Ωστόσο τα δείγματα TR006 και TR014, φαίνεται να διατηρούν τα ίδια επίπεδα έκφρασης, πριν και μετά την χορήγηση της θεραπείας, και στους τρεις δείκτες. Οπότε επιβεβαιώνεται η ανθεκτικότητα στο Cisplatin, που φάνηκε να εμφανίζουν τα συγκεκριμένα δείγματα στα διαγράμματα της εικόνας 2.3A&2.3B. Επιπροσθέτως, με την χρήση του λογισμικού image j, ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση δύο ευαίσθητων όγκων (TR003 & TR016) στην χημειοθεραπεία και των δύο ανθεκτικών όγκων (TR006 & TR014) για το ki67 και την Caspase 3 (Εικόνα 5.4A & 5.4B). Από τα συγκεκριμένα διαγράμματα επιβεβαιώνεται ότι στους όγκους που χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητοι στη χημειοθεραπεία, η έκφραση στο ki67 ελαττώνεται εμφανώς με σημαντική στατιστική διαφορά, μεταξύ των treated και untreated όγκων. Ενώ οι όγκοι που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί, φαίνεται να μην έχουν καμία στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των treated και untreated όγκων.

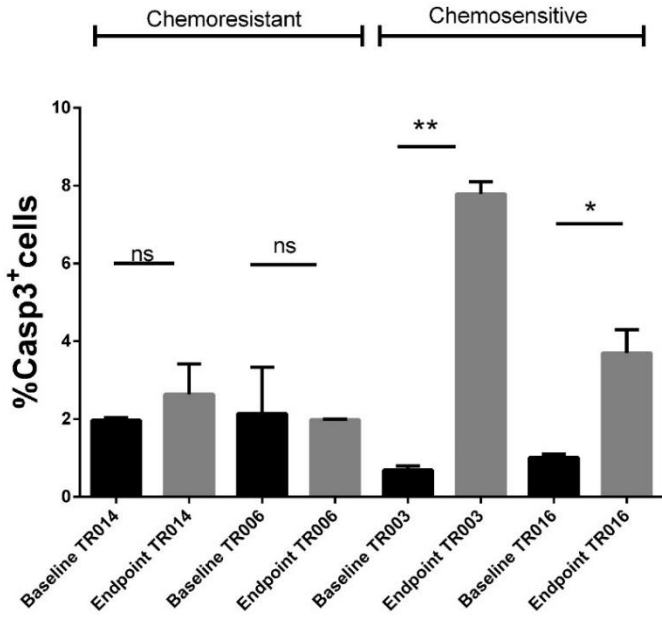


Εικόνα 4.4Α. Ιστολογικός χαρακτηρισμός των όγκων πριν και μετά τη χημειοθεραπεία



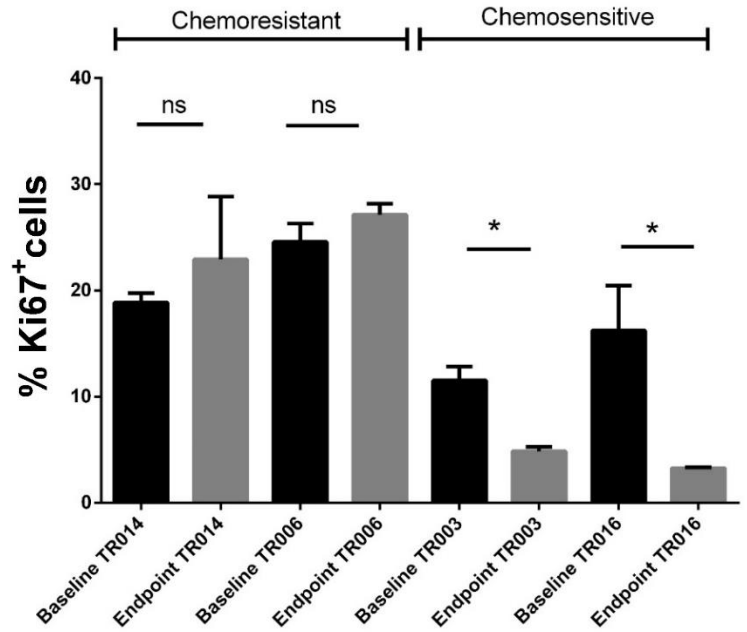
Εικόνα 4.4Β. Ιστολογικός χαρακτηρισμός των όγκων πριν και μετά τη χημειοθεραπεία

**Caspase 3 Analysis
Cisplatin treatment**



Εικόνα 4.5Α. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης σε Caspase 3 πριν και μετά τη χορήγηση Cisplatin των ανθεκτικών όγκων (TR0014 & TR006) και δύο ευαίσθητων όγκων (TR003 & TR016), με την χρήση του λογισμικού image j.

**Ki67 Analysis
Cisplatin treatment**



Εικόνα 4.5Β. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης σε ki67 πριν και μετά τη χορήγηση Cisplatin των ανθεκτικών όγκων (TR0014 & TR006) και δύο ευαίσθητων όγκων (TR003 & TR016), με την χρήση του λογισμικού image j.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η χρησιμότητα των PDXs ως μοντέλα για τον έλεγχο της ανταπόκρισης του καρκίνου του λάρυγγα στη θεραπεία με βάση το Cisplatin, που αποτελεί την πρώτη γραμμή θεραπείας στη συγκεκριμένη νόσο. Τα αποτελέσματα μας έρχονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία, καθώς το 50% (8 απο τα 16 συνολικά) των δειγμάτων που παραλάβαμε κατάφερε να αναπτυχθεί με επιτυχία στα ανοσοανεπαρκή ποντίκια *IL2rg^{null}* (NSG). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το ποσοστό επιτυχίας κυμαίνεται στο 40-60%. Σε συνέχεια της μελέτης μας, οι όγκοι που αναπτύχθηκαν με επιτυχία στα PDXs, μεταμοσχεύθηκαν σε μεγαλύτερο αριθμό ποντικών, αναπτύχθηκαν και διατήρησαν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τους, στις επόμενες γενιές των PDXs. Γεγονός που επιβεβαιώνει την πιστή διατήρηση του μοριακού προφίλ του όγκου και σε προχωρημένες γενιές PDXs, όπως αναγράφεται και στη βιβλιογραφία. [72] Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε γενιά PDX που παράχθηκε στην συγκεκριμένη εργασία, γινόταν ιστολογική αξιολόγηση του ιστού με χρώση αιματοξηλίνης- ιωσίνης. Όσον αφορά το ερώτημα για την ικανότητα των PDXs να χρησιμοποιηθούν ως οργανισμός μοντέλο για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας του καρκίνου του λάρυγγα στο Cisplatin, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, το 25% των δειγμάτων που μελετήθηκαν (2 απο τα 8 δείγματα ασθενών) εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο φάρμακο (Εικόνα 4.4A&4.4B). Σε περαιτέρω έλεγχο, οι όγκοι των PDXs που τους χορηγήθηκε το Cisplatin μελετήθηκαν ως προς την έκφραση τους σε γνωστούς δείκτες απόπτωσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συγκρίνοντας την έκφραση των treated όγκων με την έκφραση των untreated, επιβεβαιώσαμε ότι οι όγκοι που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο Cisplatin, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων δεικτών, πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, σε αντίθεση με τους όγκους που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι. Οπότε τα PDXs μοντέλα που αναπτύχθηκαν ήταν ικανά να παράξουν και να αναδείξουν την ανθεκτικότητα στο Cisplatin που εμφανίζεται στον καρκίνο του λάρυγγα. Μεγάλος αριθμός μελετών προσπαθεί να μοντελοποιήσει τον μηχανισμό των όγκων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο Cisplatin και φαίνεται ότι τα PDXs αποτελούν ένα έμπιστο εργαλείο για τον σκοπό αυτό. [75] Ισχυρό πλεονεκτήματα της χρήσης των PDXs για τον συγκεκριμένο σκοπό αποτελεί το γεγονός ότι είναι σε θέση να αναπαραστήσουν την ετερογένεια των HNSCC όγκων, παρουσιάζοντας ιστοπαθολογοανατομική, γενετική και πρωτεομική πιστότητα σε πολλαπλές μελέτες. Ωστόσο η μεγάλη χρονική υστέρηση μεταξύ της αρχικής εμφύτευσης και της ανάπτυξης των όγκων σε μεγάλες ομάδες ποντικών για την αξιολόγηση της ευαισθησίας στα φάρμακα, μαζί με το κόστος ανάπτυξης αυτών των μοντέλων μπορεί να περιορίσει τη χρησιμότητά τους. Επιπλέον, η απαίτηση για ανοσοανεπαρκή ποντίκια ώστε να είναι δυνατή η επιτυχής εμφύτευση αποκλείει ένα λειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα στον ξενιστή ποντίκι. Οι αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των

καρκινικών κυττάρων και αποτελούν στόχο για ανοσοθεραπείες. Η συν-μεταμόσχευση ανθρώπινων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και δειγμάτων όγκου σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια (π.χ. NSG, NSG-SGM3, MISTRG) μπορεί να δημιουργήσει εξανθρωπισμένα μοντέλα PDX, ώστε να είναι δυνατή η αλληλεπίδραση μεταξύ των PDX όγκων και των ανθρώπινων κυττάρων του ανοσοποιητικού, και έτσι να ενσωματωθεί ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην εξέλιξη του όγκου για την ακριβέστερη αναπαράσταση του ανθρώπινου μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την αξιολόγηση των ανοσοθεραπειών. [85] Ένας περαιτέρω περιορισμός των PDX είναι η ικανότητά τους να μοντελοποιούν τη σημαντική ετερογένεια του όγκου του δότη. Ένα μικρό τμήμα όγκου είναι απίθανο να αντιπροσωπεύει την ετερογένεια ολόκληρου του όγκου του ασθενούς και η εμφύτευσή του σε ποντίκια μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός υποκλώνου καρκινικών κυττάρων με διαφορετική δυναμική και ανταπόκριση στη θεραπεία από τον πρωτοπαθή όγκο. [74] Τέλος, η πλειονότητα των PDXs όγκων του HNSCC εμφυτεύονται υποδόρια στα πλευρά των ποντικών, γεγονός που συνήθως οδηγεί σε εντοπισμένο φαινότυπο σε αντίθεση με τη συχνά ιδιαίτερα επιθετική και μεταστατική συμπεριφορά των όγκων του HNSCC. Η ορθοτοπική εμφύτευση στη γλώσσα, το έδαφος του στόματος ή τον βλεννογόνο μπορεί να προάγει τη μετάσταση, αλλά συνεπάγεται επιπτώσεις στην καλή διαβίωση των ζώων όσον αφορά τη σίτιση και στη μέτρηση του μεγέθους του όγκου. (αναφορά) Συμπερασματικά τα PDXs αποτελούν ένα ικανοποιητικό εργαλείο ως μοντέλα για την μελέτη μηχανισμών ανθεκτικότητας στο Cisplatin, ωστόσο η βελτιστοποίηση τους ώστε να ξεπεραστούν ορισμένα εμπόδια είναι επιτακτική.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cramer, J.D., et al., *The changing therapeutic landscape of head and neck cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2019. **16**(11): p. 669-683.
2. Johnson, D.E., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2020. **6**(1): p. 92.
3. Bose, P., N.T. Brockton, and J.C. Dort, *Head and neck cancer: from anatomy to biology*. Int J Cancer, 2013. **133**(9): p. 2013-23.
4. Tinhofer, I., D. Braunholz, and K. Klinghammer, *Preclinical models of head and neck squamous cell carcinoma for a basic understanding of cancer biology and its translation into efficient therapies*. Cancers Head Neck, 2020. **5**: p. 9.
5. Jethwa, A.R. and S.S. Khariwala, *Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(3): p. 411-423.
6. Warnakulasuriya, S. and K. Straif, *Carcinogenicity of smokeless tobacco: Evidence from studies in humans & experimental animals*. Indian J Med Res, 2018. **148**(6): p. 681-686.
7. Talamini, R., et al., *Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study*. Cancer Causes Control, 2002. **13**(10): p. 957-64.
8. Stein, A.P., et al., *Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review*. Cancer J, 2015. **21**(3): p. 138-46.
9. Isayeva, T., et al., *Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review*. Head Neck Pathol, 2012. **6 Suppl 1**: p. S104-20.
10. Michaud, D.S., et al., *High-risk HPV types and head and neck cancer*. Int J Cancer, 2014. **135**(7): p. 1653-61.
11. Pickering, C.R., et al., *Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers*. Cancer Discov, 2013. **3**(7): p. 770-81.
12. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas*. Nature, 2015. **517**(7536): p. 576-82.
13. Lui, V.W., et al., *Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers*. Cancer Discov, 2013. **3**(7): p. 761-9.
14. Zhang, H., et al., *Identification of Key Genes and Pathways in Tongue Squamous Cell Carcinoma Using Bioinformatics Analysis*. Med Sci Monit, 2017. **23**: p. 5924-5932.
15. Lin, S.C., et al., *FAT1 somatic mutations in head and neck carcinoma are associated with tumor progression and survival*. Carcinogenesis, 2018. **39**(11): p. 1320-1330.
16. Lee, S.H., et al., *Notch1 signaling contributes to stemness in head and neck squamous cell carcinoma*. Lab Invest, 2016. **96**(5): p. 508-16.
17. Vermorken, J.B., et al., *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1116-27.
18. de Mello, R.A., et al., *Cetuximab plus platinum-based chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective study in a single comprehensive European cancer institution*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e86697.

19. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 567-78.
20. Chow, L.Q.M., et al., *Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort*. J Clin Oncol, 2016. **34**(32): p. 3838-3845.
21. Ribeiro, I.P., et al., *Genomic predictive model for recurrence and metastasis development in head and neck squamous cell carcinoma patients*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13897.
22. Suzuki, M., et al., *Heterogeneity of anticancer drug sensitivity in squamous cell carcinoma of the tongue*. Hum Cell, 2011. **24**(1): p. 21-9.
23. Lopez-Verdin, S., et al., *Molecular Markers of Anticancer Drug Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Literature Review*. Cancers (Basel), 2018. **10**(10).
24. Rai, N.P., et al., *Outcome of Palliative and Radical Radiotherapy in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma - a Retrospective Study*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(16): p. 6919-22.
25. Tobias, J.S., *Has chemotherapy proved itself in head and neck cancer?* Br J Cancer, 1990. **61**(5): p. 649-51.
26. Becker, M. and D. Levy, *Modeling the Transfer of Drug Resistance in Solid Tumors*. Bull Math Biol, 2017. **79**(10): p. 2394-2412.
27. Weinberg, R.A., *The Rational Treatment of Cancer in the Biology of Cancer, 2nd ed.; Weinberg, R., Ed.;*
28. *Garland Science: New York, NY, USA, 2013; pp. 833–834. 2nd ed. 2013, New York, NY, USA.*
28. Breier, A., et al., *New insight into p-glycoprotein as a drug target*. Anticancer Agents Med Chem, 2013. **13**(1): p. 159-70.
29. Chen, K.G., et al., *Prevalence of multidrug resistance related to activation of the *mdr1* gene in human sarcoma mutants derived by single-step doxorubicin selection*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4980-7.
30. Ng, I.O., et al., *Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma*. Cancer, 1998. **83**(5): p. 851-7.
31. Rabkin, D., et al., *P-glycoprotein expression in the squamous cell carcinoma of the tongue base*. Laryngoscope, 1995. **105**(12 Pt 1): p. 1294-9.
32. Jain, V., et al., *Differential expression of multidrug resistance gene product, P-glycoprotein, in normal, dysplastic and malignant oral mucosa in India*. Int J Cancer, 1997. **74**(1): p. 128-33.
33. Chaudhary, P.M. and I.B. Roninson, *Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(8): p. 632-9.
34. Brock, I., et al., *Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and *mdr1* and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells*. Cancer Res, 1995. **55**(3): p. 459-62.
35. Abe, Y., et al., *P-glycoprotein-mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo*. Br J Cancer, 1996. **74**(12): p. 1929-34.

36. Hu, X.F., et al., *Rapid up-regulation of mdr1 expression by anthracyclines in a classical multidrug-resistant cell line*. Br J Cancer, 1995. **71**(5): p. 931-6.
37. Stavrovskaya, A.A. and E.Y. Rybalkina, *Recent Advances in the Studies of Molecular Mechanisms Regulating Multidrug Resistance in Cancer Cells*. Biochemistry (Mosc), 2018. **83**(7): p. 779-786.
38. Friedrich, R.E., C. Punke, and A. Reymann, *Expression of multi-drug resistance genes (mdr1, mrp1, bcrp) in primary oral squamous cell carcinoma*. In Vivo, 2004. **18**(2): p. 133-47.
39. Nakamura, M., et al., *Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line, H-1R*. Oncol Rep, 2005. **14**(5): p. 1281-6.
40. Nogueira, G.A.S., et al., *Polymorphisms in DNA mismatch repair pathway genes predict toxicity and response to cisplatin chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma patients*. Oncotarget, 2018. **9**(51): p. 29538-29547.
41. Wang, Y., et al., *Nucleotide excision repair pathway genes and oral premalignant lesions*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(12): p. 3753-8.
42. Visnes, T., et al., *Targeting BER enzymes in cancer therapy*. DNA Repair (Amst), 2018. **71**: p. 118-126.
43. Vaezi, A., C.H. Feldman, and L.J. Niedernhofer, *ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer*. Pharmgenomics Pers Med, 2011. **4**: p. 47-63.
44. Ameri, A., et al., *ERCC1 Expression Can Predict Response to Platinum-Based Induction Chemotherapy in Head and Neck Cancer Cases*. Asian Pac J Cancer Prev, 2016. **17**(S3): p. 87-91.
45. Melton, D.W., et al., *Cells from ERCC1-deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 3): p. 395-404.
46. Lee, K.B., et al., *Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3*. Carcinogenesis, 1993. **14**(10): p. 2177-80.
47. Du, P., et al., *High ERCC1 expression is associated with platinum-resistance, but not survival in patients with epithelial ovarian cancer*. Oncol Lett, 2016. **12**(2): p. 857-862.
48. Jun, H.J., et al., *ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation*. Br J Cancer, 2008. **99**(1): p. 167-72.
49. Olausson, K.A., et al., *DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy*. N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 983-91.
50. Quintela-Fandino, M., et al., *DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy*. J Clin Oncol, 2006. **24**(26): p. 4333-9.
51. Bozec, A., et al., *Antitumor activity of cetuximab associated with the taxotere-cisplatin-fluorouracil (TPF) combination on an orthotopic head and neck cancer model*. Oral Oncol, 2011. **47**(10): p. 940-5.

52. Elias, S.T., et al., *Combined paclitaxel, cisplatin and fluorouracil therapy enhances ionizing radiation effects, inhibits migration and induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral carcinoma cell lines*. *Oncol Lett*, 2015. **10**(3): p. 1721-1727.
53. Cabelguenne, A., et al., *p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(7): p. 1465-73.
54. Cutilli, T., et al., *Evaluation of p53 protein as a prognostic factor for oral cancer surgery*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013. **51**(8): p. 922-7.
55. Poulaki, V., C.S. Mitsiades, and N. Mitsiades, *The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy*. *Drug Resist Updat*, 2001. **4**(4): p. 233-42.
56. Fang, L., et al., *Effects of FasL expression in oral squamous cell cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **14**(1): p. 281-5.
57. Chien, M.H., et al., *A Fas Ligand (FasL)-Fused Humanized Antibody Against Tumor-Associated Glycoprotein 72 Selectively Exhibits the Cytotoxic Effect Against Oral Cancer Cells with a Low FasL/Fas Ratio*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(6): p. 1102-1113.
58. Blons, H., et al., *Matrix metalloproteinase 3 polymorphism: a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(8): p. 2594-9.
59. Thielen, A.J.F., et al., *CRISPR/Cas9 generated human CD46, CD55 and CD59 knockout cell lines as a tool for complement research*. *J Immunol Methods*, 2018. **456**: p. 15-22.
60. Bellosillo, B., et al., *Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2771-7.
61. Dho, S.H., J.C. Lim, and L.K. Kim, *Beyond the Role of CD55 as a Complement Component*. *Immune Netw*, 2018. **18**(1): p. e11.
62. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(19): p. 1856-1867.
63. Seiwert, T.Y., et al., *Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(7): p. 956-965.
64. Budach, V. and I. Tinhofer, *Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review*. *Lancet Oncol*, 2019. **20**(6): p. e313-e326.
65. Lin, C.J., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection*. *Head Neck*, 2007. **29**(2): p. 163-88.
66. Li, H., et al., *Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection*. *Mol Cancer Res*, 2014. **12**(4): p. 571-82.
67. Lepikhova, T., et al., *Drug-Sensitivity Screening and Genomic Characterization of 45 HPV-Negative Head and Neck Carcinoma Cell Lines for Novel Biomarkers of Drug Efficacy*. *Mol Cancer Ther*, 2018. **17**(9): p. 2060-2071.

68. Cheng, H., et al., *Genomic and Transcriptomic Characterization Links Cell Lines with Aggressive Head and Neck Cancers*. Cell Rep, 2018. **25**(5): p. 1332-1345 e5.
69. Choi, S.Y., et al., *Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **79-80**: p. 222-37.
70. Daniel, V.C., et al., *A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3364-73.
71. Johnson, J.I., et al., *Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials*. Br J Cancer, 2001. **84**(10): p. 1424-31.
72. Lee, T.W., et al., *Patient-Derived Xenograft and Organoid Models for Precision Medicine Targeting of the Tumour Microenvironment in Head and Neck Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(12).
73. Bais, M.V., M. Kukuruzinska, and P.C. Trackman, *Orthotopic non-metastatic and metastatic oral cancer mouse models*. Oral Oncol, 2015. **51**(5): p. 476-82.
74. Peng, S., et al., *Tumor grafts derived from patients with head and neck squamous carcinoma authentically maintain the molecular and histologic characteristics of human cancers*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 198.
75. Karamboulas, C., et al., *Patient-Derived Xenografts for Prognostication and Personalized Treatment for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Cell Rep, 2018. **25**(5): p. 1318-1331 e4.
76. Kang, H.N., et al., *Establishment and characterization of patient-derived xenografts as preclinical models for head and neck cancer*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 316.
77. Facompre, N.D., et al., *Barriers to generating PDX models of HPV-related head and neck cancer*. Laryngoscope, 2017. **127**(12): p. 2777-2783.
78. Lilja-Fischer, J.K., et al., *Characterization and radiosensitivity of HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma patient-derived xenografts*. Acta Oncol, 2019. **58**(10): p. 1489-1494.
79. Hidalgo, M., et al., *Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research*. Cancer Discov, 2014. **4**(9): p. 998-1013.
80. Stebbing, J., et al., *Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma*. Cancer, 2014. **120**(13): p. 2006-15.
81. Ruicci, K.M., et al., *A controlled trial of HNSCC patient-derived xenografts reveals broad efficacy of PI3Kalpha inhibition in controlling tumor growth*. Int J Cancer, 2019. **145**(8): p. 2100-2106.
82. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1014-22.
83. Hinshaw, D.C. and L.A. Shevde, *The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression*. Cancer Res, 2019. **79**(18): p. 4557-4566.
84. Byrne, A.T., et al., *Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(4): p. 254-268.
85. Morton, J.J., et al., *XactMice: humanizing mouse bone marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xenograft model of head and neck cancer*. Oncogene, 2016. **35**(3): p. 290-300.

86. Eirew, P., et al., *Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 422-6.
87. Ding, L., et al., *Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 999-1005.
88. Coper, P.F., et al., *Patient Derived Models to Study Head and Neck Cancer Radiation Response*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
89. Ben-David, U., et al., *Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution*. Nat Genet, 2017. **49**(11): p. 1567-1575.
90. Ben-David, U., R. Beroukhi, and T.R. Golub, *Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(2): p. 97-109.
91. Woo, X.Y., et al., *Conservation of copy number profiles during engraftment and passaging of patient-derived cancer xenografts*. Nat Genet, 2021. **53**(1): p. 86-99.
92. Melissaridou, S., et al., *The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer*. Cancer Cell Int, 2019. **19**: p. 16.
93. Azharuddin, M., et al., *Dissecting multi drug resistance in head and neck cancer cells using multicellular tumor spheroids*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 20066.
94. Schmidt, M., et al., *Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer*. Oncol Rep, 2016. **35**(4): p. 2431-40.
95. Braunholz, D., et al., *Spheroid Culture of Head and Neck Cancer Cells Reveals an Important Role of EGFR Signalling in Anchorage Independent Survival*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163149.
96. Ishiguro, T., et al., *Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications*. Cancer Sci, 2017. **108**(3): p. 283-289.
97. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-5.
98. Kretzschmar, K. and H. Clevers, *Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish*. Dev Cell, 2016. **38**(6): p. 590-600.
99. Eiraku, M., et al., *Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(5): p. 519-32.
100. van de Wetering, M., et al., *Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients*. Cell, 2015. **161**(4): p. 933-45.
101. Boj, S.F., et al., *Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer*. Cell, 2015. **160**(1-2): p. 324-38.
102. Gao, D., et al., *Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer*. Cell, 2014. **159**(1): p. 176-187.
103. Sachs, N., et al., *A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 373-386 e10.
104. Yan, H.H.N., et al., *A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening*. Cell Stem Cell, 2018. **23**(6): p. 882-897 e11.
105. Broutier, L., et al., *Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening*. Nat Med, 2017. **23**(12): p. 1424-1435.

106. Driehuis, E., et al., *Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy*. *Cancer Discov*, 2019. **9**(7): p. 852-871.
107. Tanaka, N., et al., *Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity*. *Oral Oncol*, 2018. **87**: p. 49-57.
108. Fatehullah, A., S.H. Tan, and N. Barker, *Organoids as an in vitro model of human development and disease*. *Nat Cell Biol*, 2016. **18**(3): p. 246-54.
109. Tuveson, D. and H. Clevers, *Cancer modeling meets human organoid technology*. *Science*, 2019. **364**(6444): p. 952-955.
110. Neal, J.T., et al., *Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment*. *Cell*, 2018. **175**(7): p. 1972-1988 e16.
111. Dijkstra, K.K., et al., *Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids*. *Cell*, 2018. **174**(6): p. 1586-1598 e12.
112. Lee, J.H., et al., *Anatomically and Functionally Distinct Lung Mesenchymal Populations Marked by Lgr5 and Lgr6*. *Cell*, 2017. **170**(6): p. 1149-1163 e12.
113. Leeman, K.T., et al., *Mesenchymal Stem Cells Increase Alveolar Differentiation in Lung Progenitor Organoid Cultures*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 6479.
114. Dijkstra, K.K., et al., *Challenges in Establishing Pure Lung Cancer Organoids Limit Their Utility for Personalized Medicine*. *Cell Rep*, 2020. **31**(5): p. 107588.
115. Fujii, E., et al., *Establishment and characterization of in vivo human tumor models in the NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse*. *Pathol Int*, 2008. **58**(9): p. 559-67.
116. Crowley, L.C. and N.J. Waterhouse, *Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016. **2016**(11).
117. Rybak, P., et al., *Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (gammaH2AX) is not associated with DNA double-strand breaks*. *Oncotarget*, 2016. **7**(31): p. 49574-49587.
118. Sun, X. and P.D. Kaufman, *Ki-67: more than a proliferation marker*. *Chromosoma*, 2018. **127**(2): p. 175-186.