



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Κέντρο Βιοτρόπεζας Καρκίνου
Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**«Προσδιορισμός κυκλοφορούντων oncomiRs και angiomiRs
στο αίμα ασθενών με καρκίνο και διερεύνηση της διαγνωστικής,
προγνωστικής και προβλεπτικής τους ικανότητας»**

Μαρία Ιγγλέζου
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Κέντρο Βιοτρόπεζας Καρκίνου
Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**«Προσδιορισμός κυκλοφορούντων oncomiRs και angiomiRs
στο αίμα ασθενών με καρκίνο και διερεύνηση της διαγνωστικής,
προγνωστικής και προβλεπτικής τους ικανότητας»**

Μαρία Ιγγλέζου
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ιγγλέζου Μαρίας: 31-1-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 705^α/8-2-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπριασούλης Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Γεωργάτος Σπυρίδων, Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τράγκα Θεώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-4-2011

«Προσδιορισμός κυκλοφορούντων oncoproteins και angioproteins στο αίμα ασθενών με καρκίνο και διερεύνηση της διαγνωστικής, προγνωστικής και προβλεπτικής ικανότητας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 782^α/13-11-2015

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Μπριασούλης Ευάγγελος	Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Στεφάνου Δημήτριος	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Τράγκα Θεώνη	Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Καραβασίλης Βασίλειος	Καραβασίλης Βασίλειος Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας – Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.
Καψάλη Ελένη	Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Χατζημιχαήλ Ελευθερία	MD/PhD, Visiting Scientist, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia. USA.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-12-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο-ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του επιχειρησιακού προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Αφιερώνεται στη μνήμη του

Παππού μου Κώστα

Πρόλογος

Η επιστήμη και η τέχνη ανήκουν σε όλο τον κόσμο και μπροστά τους εξαφανίζονται
όλα τα σύνορα. (Γκαίτε)

Ο ελληνογενής όρος βιολογία χαρακτηριζόμενη ως η επιστήμη της ζωής αποτελεί
ένα πολυμορφικό πεδίο βασικών γνώσεων και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την
ιατρική επιστήμη.

Στο πλαίσιο της ευρύτερης ερευνητικής δραστηριότητας του Κέντρου Βιοτράπεζας
Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανίχνευση εξειδικευμένων μοριακών
στόχων και βιοδεικτών στο καρκίνο, ανέλαβα ως αντικείμενο Διδακτορικής
Διατριβής το παρόν ερευνητικό έργο, που εστιάζει στον έλεγχο έκφρασης, στο αίμα
ασθενών με καρκίνο, microRNAs που σχετίζονται με την ογκογένεση (oncomirs) και
την αγγειογένεση (angiomiirs) και στην διερεύνηση πιθανής κλινικής τους σημασίας
ως βιοδείκτες.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στον
επιβλέποντα, μέντορα και πατέρα μου στην επιστήμη της Ιατρικής έρευνας,
καθηγητή Ευάγγελο Μπριασούλη για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος,
την απεριόριστη υποστήριξη, τη συνεχή ενθάρρυνση και την έμπειρη καθοδήγηση σε
κάθε στάδιο της μελέτης. Δυσκολίες υπήρξαν πολλές αλλά με την αμέριστη βοήθεια
του υπήρχε πάντα μία λύση. Το πάθος του για την έρευνα και την συνεχιζόμενη
εκπαίδευση εμφυσήθηκαν μέσα από το καθημερινό βίωμα της έρευνας. Η συμβολή
του στην ιατρική και επιστημονική κατάρτιση και σταδιοδρομία μου υπήρξε
καθοριστική, ενώ η αγάπη του για την έρευνα αποτελεί πηγή έμπνευσης για
μελλοντική ερευνητική δραστηριότητα. Ειλικρινείς ευχαριστίες από τα βάθη της
καρδιάς μου για όλα τα παραπάνω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τους συν-επιβλέποντες καθηγητές κ Σπύρο
Γεωργάτο και κ Θεώνη Τράγκα για τις σοφές συμβουλές τους, την κατανόηση τους
και την πολύτιμη καθοδήγηση τους.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά, τον συνεργάτη και φίλο Δρ Ιωάννη Σαΐνη, για τις πολύτιμες συμβολές του, για την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, την συμπαράσταση του όλα αυτά τα χρόνια και την προθυμία να με βοηθήσει με τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις του, στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Επίσης πολλές ευχαριστίες οφείλω στον χειρουργό Δρ Γεώργιο Γεωργίου για τη συλλογή του βιολογικού υλικού, μα κυρίως για την μεγάλη του προθυμία να απαντήσει σε κάθε μου απορία και για τη λήψη του ιστορικού κάθε ασθενούς.

Την Δρ Αγγελική Δασούλα για τις πολύτιμες συμβουλές πάνω σε ερευνητικά θέματα καθώς επίσης και την αξιόλογη συνεργασία που είχαμε στο αντικείμενο έρευνας που αφορά στον έλεγχο *microRNAs* σε βλάστες ασθενών με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.

Την Αιματολόγο Δρ Ελευθερία Χατζημιχαήλ ευχαριστώ θερμά για τις εποικοδομητικές συζητήσεις πάνω στην λειτουργία των *microRNAs* και την εισαγωγή και την εξήγηση λειτουργίας του προγράμματος RNA22 που αφορά στην πρόβλεψη των *microRNA* στόχων.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, Δημήτρης Στεφάνου, Ελένη Καψάλη, Βασίλη Καραβασίλη για την προθυμία τους να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής αφιερώνοντας μέρος από τον πολύτιμο χρόνο τους.

Την φίλη μου και συνάδελφο βιολόγο κ. Αναστασία Τούκα οφείλω θερμές ευχαριστίες για βοήθεια και αμέριστη συμπαράσταση της τόσο σε προσωπικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο και για το γεγονός ότι μοιράστηκε μαζί μου όλες τις προκλήσεις, τις απογοητεύσεις μα κυρίως τις ευχάριστες στιγμές αυτής της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου και όλους τους συναδέλφους για τη βοήθεια τους και το ομαδικό πνεύμα καθοριστικής σημασίας για την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου

Θα ήταν μεγάλη μου παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον αγαπημένο μου Βαγγέλη Αναστασίου, που με απεριόριστη υποστήριξη και αγάπη στάθηκε στο πλευρό μου,

μοιράστηκε τα άγχη και τους φόβους μου και ταξίδεψε μαζί μου δίνοντας φτερά στα όνειρα μου.

Ο ακρογωνιαίος λίθος των όσων έχω καταφέρει ήταν και θα είναι η οικογένεια μου, Γιώργος, Ευφροσύνη και η αδερφή μου Βασιλεία. Τους ευχαριστώ λοιπόν για τις θυσίες που έκαναν για να μου δώσουν την ευκαιρία να σπουδάσω, γιατί στάθηκαν δίπλα μου, μοιράστηκαν τις αγωνίες μου και γιατί πάντα με συμβούλευαν με σοφία και αγάπη. Ελπίζω να είναι υπερήφανοι για την κόρη τους όπως εγώ για εκείνους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Γενικά.....	- 10 -
2. Βιοδείκτες Καρκίνου – miRNAs	- 11 -
2.1 Βιοδείκτες Καρκίνου.....	- 11 -
2.2 microRNAs	- 12 -
2.2.1 Βιογένεση των miRNAs.....	- 13 -
2.2.2 Εναλλακτικά μονοπάτια βιογένεσης.....	- 15 -
2.2.3 Στόχευση miRNA.....	- 16 -
2.2.3 Λειτουργία και Σταθερότητα των miRNAs	- 17 -
2.3 miRNA και καρκίνος	- 17 -
3. Καρκίνος του Μαστού	- 18 -
3.1 miRNAs και Καρκίνος του Μαστού	- 20 -
4. Καρκίνος του Στομάχου.....	- 20 -
4.1 miRNAs και Καρκίνος του Στομάχου	- 22 -
5. Ο Καρκίνος του παχέος εντέρου	- 22 -
5.1 miRNAs και καρκίνος του παχέος εντέρου	- 23 -
6. Αγγειογένεση και χειρουργείο	- 24 -
7. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	- 26 -

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπος της μελέτης.....	-29-
1.Επιλογή ασθενών	- 32 -
1.1 Ασθενείς με καρκίνο του Μαστού	- 33 -
1.1.1. Στοιχεία επέμβασης/ μαστεκτομής	- 34 -
1.1.2 Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	- 35 -
1.2. Ασθενείς με καρκίνο του στομάχου.....	- 36 -
1.2.1. Στοιχεία Επέμβασης/ Γαστρεκτομής.....	- 37 -

1.2.2 Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του στομάχου.....	- 38 -
1.3 Ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.....	- 38 -
1.3.1 Στοιχεία Επέμβασης.....	- 39 -
1.3.2. Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του εντέρου.....	- 40 -
1.4 Ασθενείς με Οξεία Μυελογενής λευχαιμία (Ο.Μ.Λ.).....	- 41 -
2. Βιολογικό υλικό	- 42 -
2.1 Συλλογή αίματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, στομάχου και εντέρου.....	- 42 -
2.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων και Αποθήκευση.....	- 43 -
3. Επεξεργασία βιολογικού υλικού	- 45 -
3.1 Απομόνωση ολικού RNA από αίμα ασθενών με συμπαγείς όγκους	- 45 -
3.2 Απομόνωση miRNA από αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου και εντέρου.....	- 50 -
3.3 Απομόνωση CD34+ κύτταρων και miRNA/mRNA/DNA από μονοπύρηνια κύτταρα ασθενών με Ο.Μ.Λ.	- 53 -
3.4 Ποσοτικός και Ποιοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου RNA και miRNA.....	- 59 -
3.5 Πολυαδενυλίωση, Αντίστροφη Μεταγραφή και σύνθεση cDNA.....	- 60 -
3.6 Real Time PCR	- 63 -
3.7 Σχετική Ποσοτικοποίηση Real Time PCR: μέθοδος ανάλυσης $\Delta\Delta C_T$	- 68 -
3.8 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	- 70 -
3.9 Αλληλούχιση- Sequencing.....	- 71 -
3.10 Πρόβλεψη σχετικά με την απόπτωση microRNA στόχων.....	-69-

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Έκφραση microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.....	- 74 -
1.1 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του απομονωθέντος RNA	- 74 -
1.2 Περιεγχειρητική κινητική κυκλοφορούντων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού	- 76 -
2. Έκφραση microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου.....	- 83 -
2.1 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του απομονωθέντος RNA	- 83 -

2.2 Περιεγχειρητική κινητική κυκλοφορούντων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου	- 84 -
3. Έκφραση microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου	- 94 -
3.1 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του απομονωθέντος RNA	- 94 -
3.2 Περιεγχειρητική κινητική κυκλοφορούντων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.....	- 95 -
4. Αλληλούχιση-Sequencing	- 105 -
5. Έκφραση των ρυθμιστικών της απόπτωσης microRNAs σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία	- 105 -

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Αξιολόγηση της έκφρασης τριών microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.....	- 110 -
2. Αξιολόγηση της έκφρασης τεσσάρων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου	- 112 -
3. Αξιολόγηση της έκφρασης τεσσάρων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.....	- 115 -
4 Έκφραση των ρυθμιστικών της απόπτωσης microRNAs σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία με τη μέθοδο PCR arrays	- 117 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	- 119 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 121 -
ABSTRACT	- 123 -
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 125 -

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Γενικά

Ο καρκίνος θεωρείται ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας στις αναπτυγμένες χώρες. Στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του στομάχου, Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρία για το έτος 2015 προβλέπονται 1.658.370 νέες διαγνώσεις και 589.430 θάνατοι από καρκίνο ¹.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία του Ο.Ο.Σ.Α (Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης), η θνησιμότητα από καρκίνο παραμένει γενικά χαμηλότερη απ' ό τι στις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες (OECD 2007). Μεταξύ των 34 χωρών μελών του Ο.Ο.Σ.Α, η Ελλάδα κατατάσσεται το 2004 στη 19η θέση ως προς τη θνησιμότητα στους άνδρες και στην 23η στις γυναίκες. Όμως, η ευνοϊκή θέση της χώρας είναι σε κάποιο βαθμό πλασματική λόγω της έλλειψης εθνικού αρχείου νεοπλασιών.

Η προέλευση της λέξης Καρκίνος, αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, που έμεινε στην ιστορία ως «πατέρας της ιατρικής». Ο όρος «καρκίνος» αποδίδεται σε ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Ο εμπλουτισμός των γνώσεων μας γύρω από τους μηχανισμούς ρύθμισης και απορρύθμισης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, θα μας επιτρέψει να αναπτύξουμε νέες προγνωστικές, διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις και να βελτιώσουμε τις παλαιότερες, με στόχο την καλύτερη αντιμετώπιση των ασθενών.

Η σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη των microRNAs έφερε μια νέα αντίληψη στη μελέτη της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στην ογκογένεση. Υπάρχουν σημαντικές αναφορές για την εμπλεκόμενη δράση των microRNAs στον καρκίνο σε όλα τα στάδια της νόσου. Συγκεκριμένα microRNAs (angiomirs) έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, η οποία αποτελεί κλειδί για την ανάπτυξη του όγκου. Ορισμένα microRNAs (oncomirs) έχει βρεθεί ότι λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και άλλα ως ογκογονίδια.

2. Βιοδείκτες Καρκίνου – miRNAs

2.1 Βιοδείκτες Καρκίνου

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ, «βιοδείκτης είναι ένα μετρήσιμο βιολογικό μόριο που βρίσκεται στο αίμα, σε άλλα σωματικά υγρά ή ιστούς που αποτελεί ένδειξη μιας κανονικής ή ανώμαλης διαδικασίας, ή μιας κατάστασης ή ασθένειας». Η ύπαρξη αξιόπιστων βιοδεικτών είτε ως προγνωστικοί παράγοντες εξέλιξης της νόσου, είτε ως προβλεπτικοί παράγοντες ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι πρόδηλα χρήσιμη στην κλινική εφαρμογή. Για αυτόν το λόγο και αποτελούν σημαντικούς στόχους της συνεχιζόμενης κλινικής έρευνας².

Ο βιοδείκτης εξ ορισμού μπορεί να μετρηθεί και να αξιολογηθεί οποιοδήποτε βιομόριο σε ένα βιολογικό σύστημα (βιολογικά υγρά/ιστούς), του οποίου οι διαφορές στη συγκέντρωση αντανακλούν διαταραχές στη φυσιολογική λειτουργία του συστήματος. Ο τέλειος βιοδείκτης θα πρέπει να ξεπεράσει περιορισμούς όπως η επαναληψιμότητα, η ανεπαρκής ευαισθησία και ειδικότητα και η χαμηλή προβλεπτική ισχύς. Επιπλέον θα πρέπει να διαθέτει μη επεμβατική προσβασιμότητα, να μετράται σε βιολογικά υγρά και να σχετίζεται άμεσα με κλινικές παραμέτρους. Ένας ιδανικός βιοδείκτης καρκίνου θα πρέπει να επιτρέπει την παρακολούθηση της κλινικής εξέλιξης συγκεκριμένων νεοπλασιών και να προβλέπει την απόκριση του ασθενούς σε συγκεκριμένη αντικαρκινική θεραπεία³.

Λόγω έλλειψης αξιόπιστων δεικτών για έγκαιρη ανίχνευση και ταξινόμηση των καρκίνων, η αναζήτηση είναι σε εξέλιξη. Τα microRNAs έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικά σε εξωτερικές επιδράσεις, όπως ενζυματική αποικοδόμηση, κατάψυξη και απόψυξη ή διακύμανση του pH των υγρών. Ένα ακόμη πλεονέκτημά τους αφορά στο γεγονός ότι είναι δυνητικά ανιχνεύσιμα σε όλα σχεδόν τα υγρά και εκκρίσεις του σώματος (ούρα, κόπρανα, σάλιο, αίμα), κάτι που θα μπορούσε να προσφέρει μια νέα σειρά διαγνωστικών εργαλείων για ποικιλία ασθενειών.

Το αίμα έχει αυξημένα επίπεδα RNAσών που αποικοδομούν εξωγενώς το mRNA μέσα σε δευτερόλεπτα, υποδεικνύοντας ότι τα mRNAs είναι απίθανο να υπάρχουν σε μια ελεύθερη, χωρίς προστασία κατάσταση. Σε αντίθεση, τα ώριμα miRNAs παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα στο κυκλοφορικό σύστημα: Ακόμη και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα μέχρι 24 ώρες, τα miR-15b, miR-16 και miR-24, ήταν ανιχνεύσιμα στον ορό χωρίς καμία προφανή υποβάθμιση.

Επιπλέον, απομονωμένα miRNAs δεν επηρεάζονται από διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης (-20 °C και -80 °C). Ακόμη και κάτω από ακραίες συνθήκες διατηρούν την αυξημένη τους σταθερότητα καθώς παράγοντες όπως οι RNAses και πολλαπλοί κύκλοι ψύξης-απόψυξης, δεν βλάπτουν τη δομή τους⁴.

Η ιδέα χρησιμοποίησης των miRNAs ως βιοδείκτες στον ορό, βασίζεται στην επιλεκτικά αυξημένη σταθερότητά τους, όπως αναφέρεται παραπάνω. Ωστόσο, θα πρέπει να προσδιοριστεί η χρησιμότητα των κυκλοφορούντων miRNA ως βιοδείκτες για έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, δηλαδή κατά πόσο είναι σημαντικοί πολύ νωρίς, όταν ο καρκίνος είναι στα πρώιμα στάδια ή ίσως ακόμα και πριν ο όγκος να έχει αναπτυχθεί πλήρως. Ένα ακόμη σημαντικό κλινικό ζήτημα είναι το κατά πόσο οι miRNA βιοδείκτες μπορούν να προβλέψουν την εξέλιξη της νεοπλασματικής νόσου³.

Γενετικοί, επιγενετικοί και πρωτεωμικοί βιοδείκτες μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τον επιδημιολογικό έλεγχο του καρκίνου και διάφορων άλλων νοσημάτων. Πληθώρα βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη σήμερα αποτελούν: AFP (καρκίνος του ήπατος), BCR - ABL (χρόνια μυελογενής λευχαιμία), BRAF V600E (μελάνωμα), CA19.9 (καρκίνος του παγκρέατος), CEA (ποικίλες νεοπλασίες), EGFR (μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα), HER-2 (καρκίνος του μαστού)⁵⁻⁷. Ωστόσο, η χαμηλή ευαισθησία και η ειδικότητα των εν χρήσει βιοδεικτών αποτελεί το έναυσμα για έρευνα νέων βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά, όπως τα microRNAs.

2.2 microRNAs

Η ιδέα ότι η έκφραση ενός γονιδίου μπορεί να ελέγχεται από το προϊόν ενός άλλου γονιδίου αποτέλεσε μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις των πρώιμων χρόνων της μοριακής βιολογίας. Προτάθηκε κυρίως τη δεκαετία του '50 από τους Francois Jacob και Jacques Monod, ενώ μηχανιστικές λεπτομέρειες της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μελετώνται από τότε μέχρι και σήμερα. Η ιδέα ότι μόρια RNA θα μπορούσαν επίσης να είναι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης αποτέλεσε αρχικά μια αμφιλεγόμενη επιστημονική θέση. Τα τελευταία χρόνια όμως συνέβη μια έκρηξη στη μελέτη μικρών ρυθμιστικών μορίων RNA, ιδιαίτερα στους ευκαρυώτες, τα οποία δρουν κατεξοχήν στο επίπεδο της μετάφρασης. Το νέο αυτό πεδίο αναδύθηκε από δύο

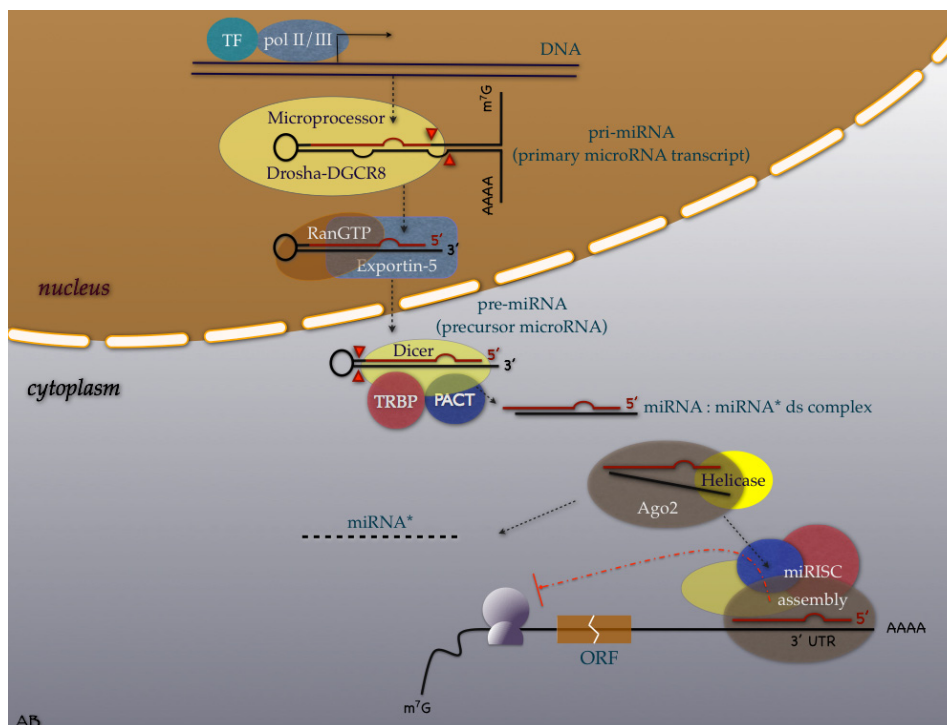
πηγές: την ανακάλυψη των μορίων microRNAs (miRNAs) και ενός φαινομένου, γνωστού ως παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ο Victor Ambros και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν το *lin-4*, γνωστό για το ρόλο του στη ρύθμιση της ανάπτυξης των προνυμφών του *C. elegans*. Παραδόξως, αυτό το 21-νουκλεοτιδικό μετάγραφο δεν κωδικοποιούσε κάποια πρωτεΐνη, αλλά αλληλεπιδρούσε με το mRNA του γονιδίου *lin-14* δρώντας ανασταλτικά στην πρωτεϊνική έκφρασή του ⁸. Συγκεκριμένα, οι ερευνητικές ομάδες των εργαστηρίων Ambros και Ruvkun διαπίστωσαν ότι αυτά τα *lin-4* RNAs εμφάνιζαν συμπληρωματικότητα με την 3'αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) περιοχές του μετάγραφου του γονιδίου *lin-14*, και διαδραμάτιζαν κάποιο ρόλο στην καταστολή της μετάφρασης του *lin-14*. Μάλιστα, η ερευνητική ομάδα του Ruvkun επισήμανε το ρόλο αυτής της συμπληρωματικότητας στη ρύθμιση του *lin-14* από το *lin-4*, οδηγώντας στη μείωση του πρωτεϊνικού προϊόντος του *lin-14*, χωρίς αντίστοιχη μείωση των μορίων mRNA του εν λόγω γονιδίου. Τελικά, και οι δύο αυτές μελέτες υποστήριζαν την ύπαρξη ενός μοντέλου μέσω του οποίου μόρια RNA του *lin-4* συζεύγνυνται με την 3' UTR περιοχή του *lin-14* mRNA καταστέλλοντάς τη μετάφρασή της, ως τμήμα ενός ρυθμιστικού μηχανισμού κατά τα αναπτυξιακά στάδια του *C. Elegans* ⁹. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε την απαρχή για μια σειρά από ερευνητικές προσπάθειες που φώτισαν το νέο αυτό κόσμο των microRNAs.

2.2.1 Βιογένεση των miRNAs

Τα miRNAs είναι μικρά, ενδογενή, μονόκλωνα μόρια RNA μεγέθους από 19 έως 25 νουκλεοτίδια (nt). Αποτελούν μία κυρίαρχη τάξη μικρών μορίων RNA στους περισσότερους ιστούς. Πάνω από 60% των ανθρώπινων πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από γονίδια που περιέχουν τουλάχιστον μία εξελικτικά συντηρημένη περιοχή miRNA-δέσμευσης ¹⁰. Η βιογένεση και η λειτουργία των miRNAs ρυθμίζεται αυστηρά, γι αυτό και η απορρύθμιση τους συσχετίζεται με πολλές ασθένειες και τον καρκίνο. Η πλειονότητα των miRNA γονιδίων εντοπίζονται σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν ή δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ωστόσο μερικά γονίδια των miRNAs εδρεύουν σε περιοχές εξωνίων long non-coding RNAs. Κάποια γονίδια miRNA που εδρεύουν στα εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μοιράζονται τον εκκινητή του γονιδίου ξενιστή. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι τα γονίδια των miRNA έχουν συχνά πολλαπλές περιοχές έναρξης της μεταγραφής ¹¹. Η μεταγραφή του

miRNA γονιδίου πραγματοποιείται από τη RNA polymerase II και ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες και επιγενετικούς ρυθμιστές ¹². Κατά τη μεταγραφή προκύπτει το primary miRNA (pri-miRNA) το οποίο έχει μέγεθος περίπου 100 nt, περιέχει μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας και μία ακραία θηλιά (T-loop). Το σύμπλοκο μικροεπεξεργαστής (microprocessor), το οποίο περιλαμβάνει την πυρηνική RNase III Droscha και τον συμπαράγοντα DGCR8, περικόπτει τη δομή στελέχους-βρόχου ¹³. Το σύμπλοκο microprocessor πέπτει τα 5' και 3' άκρα του pri-miRNA. Μετά την περικοπή προκύπτει ένα μόριο RNA σε σχήμα φουρκέτας, μήκους περίπου 65 nt με δύο ασύμμετρα άκρα, το precursor miRNA (pre-miRNA) ¹⁴. Στη συνέχεια η exportin 5, μία RanGTP εξαρτώμενη πρωτεΐνη, προάγει τη μεταφορά του pre-miRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ¹⁵. Η Dicer συνδέεται με το pre-miRNA μέσω μιας αλληλουχίας μήκους 2 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του pre-miRNA, η οποία έχει δημιουργηθεί από την πρωτεΐνη Droscha στην αρχή της βιογένεσης ¹⁶. Το ένζυμο Dicer δημιουργεί ένα σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες TRBPC (TAR DNA Binding Protein) και PACT, οι οποίες βοηθούν στην σταθερότητα του ενζύμου και αυξάνουν την επεξεργαστική του ικανότητα. Στο κυτταρόπλασμα το pre-miRNA πέπτεται από το ένζυμο Dicer κοντά στη “θηλιά”, απελευθερώνοντας ένα μικρό δίκλωνο μόριο RNA. Το ώριμο miRNA είναι εν μέρει συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό του κλώνο (miRNA*) μαζί με τον οποίο συνιστά το μίσχο. Συνήθως, μόνο ο ένας κλώνος miRNA (ώριμο miR) του δίκλωνου μορίου miRNA-miRNA* είναι ενεργός και εισέρχεται σε ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το miRISC. Το RNA-induced silencing complex (RISC) είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που μεσολαβεί στη μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγαση ¹⁷. Τα ώριμα microRNAs προσδένονται στις πρωτεΐνες της κατηγορίας Argonaute οι οποίες αποτελούν βασικά συστατικά του συμπλέγματος RISC. Το συγκεκριμένο σύμπλεγμα αποτελείται από τις πρωτεΐνες Ago2, Dicer, TRBP και PACT και καθοδηγείται από το miRNA στην 3'UTR των mRNA-στόχων για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η συμπληρωματικότητα μεταξύ των βάσεων των miRNA και mRNA καθοδηγεί το σύμπλοκο RISC στο mRNA στόχο, το οποίο διασπάται, αποσταθεροποιείται ή αναστέλλεται μεταφραστικά. ¹⁸



Εικόνα 1. Το μονοπάτι της βιογένεσης των miRNAs.

Επιλογή Strand

Η επιλογή του ενός από τους δύο κλώνους, του miRNA, miR-5p ή leading miRNA και miRNA*, miR-3p ή passenger miRNA δεν είναι αυστηρά ελεγχόμενη. Επομένως, ο κλώνος που δεν είναι «επιλέξιμος» μπορεί επίσης να επιλεγεί με διαφορετική συχνότητα κάθε φορά. Αρχικά, επικρατούσε η άποψη ότι μόνο το miR-5p σκέλος ήταν λειτουργικό, ενώ το miR-3p αποικοδομούνταν. Ωστόσο, στις τελευταίες αναφορές φαίνεται ότι ο λιγότερο άφθονος κλώνος (miRNA*) είναι επίσης λειτουργικός. Εναλλακτική επιλογή κλώνου - arm switching- έχει παρατηρηθεί σε μελέτες που σύγκριναν και τις 2 ισομορφές ενός miRNA σε διαφορετικούς ιστούς^{19,20}. Τέτοια φαινόμενα ίσως να μπορούν να εξηγηθούν από την εναλλακτική διαχείριση της Drosha, η οποία αλλάζει τη θερμοδυναμική σταθερότητα των δύο άκρων του miRNA²¹.

2.2.2 Εναλλακτικά μονοπάτια βιογένεσης

Εκτός από το κανονικό μονοπάτι της βιογένεσης των miRNAs που αναφέρθηκε παραπάνω (εικόνα 1) κάποια miRNA παράγονται μέσω εναλλακτικών μονοπατιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα miRNAs τα οποία εδρεύουν στην περιοχή

του ιντρονίου που ενώνεται με το εξώνιο ²². Τα συγκεκριμένα pre-miRNA προέρχονται από το μάτισμα του γονιδίου που εδρεύουν, χωρίς να απαιτείται το ένζυμο Drosha ²³. Στη συνέχεια το pre-miRNA επεξεργάζεται από τη Dicer και το RISC όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Επιπλέον εναλλακτικό μονοπάτι αποτελεί η βιογένεση χωρίς την επεξεργασία του pre-miRNA από τη Dicer, αλλά από τις πρωτεΐνες Ago ^{24,25}. Ένα παράδειγμα αποτελεί το miR-451. Μετά τη μεταγραφή του το pre-miRNA συνδέεται άμεσα με την πρωτεΐνη ago2, αντί της Dicer, και η ago2 διασπά τον συμπληρωματικό κλώνο ²⁴. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα επισημαίνουν την ποικιλία και την ευελιξία στη βιογένεση των miRNA στα θηλαστικά.

2.2.3 Στόχευση miRNA

Το σύμπλοκο miRISC (miRNA-associated RNA-induced silencing complex) σχετίζεται με την αναγνώριση και αποδόμηση ή καταστολή της μετάφρασης των mRNA στόχων. Η μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγαση αρχίζει όταν ένα miRNA επιστρατεύει το σύμπλεγμα RISC, το οποίο συμβάλλει στην τοποθέτηση του miRNA επάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA-στόχου. Παρά την ύπαρξη εξαιρέσεων, η ειδικότητα της στόχευσης εμπλέκει αλληλουχίες τόσο του miRNA όσο και του mRNA. Τα νουκλεοτίδια 2-8 του miRNA, που ονομάζεται περιοχή φύτερας (seed region, SR) και βρίσκονται στην 5'απόληξη του miRNA, πρέπει να υβριδοποιούνται συνεχώς με τμήμα του mRNA-στόχου με απόλυτη ή σχετική συμπληρωματικότητα. Οι θέσεις σύνδεσης για την περιοχή SR του miRNA βρίσκονται κατά κανόνα στην 3'-UTR του mRNA. Παρόλο που στις περισσότερες περιπτώσεις η πρόσδεση συμβαίνει στην 3'-UTR περιοχή του mRNA, πρόσφατες έρευνες εντόπισαν και πρόσδεση στην 5'-UTR όπως και μέσα στην κωδική περιοχή. Η σύνδεση του microRNA στον mRNA στόχο τυπικά οδηγεί σε μεταφραστική καταστολή ή εξωνουκλεολυτική καταστροφή του στόχου ^{14,26}.

Αυτό που καθορίζει το τι ακριβώς θα συμβεί είναι ο βαθμός συμπληρωματικότητας της νουκλεοτιδικής ακολουθίας μεταξύ του mRNA και του seed region του microRNA. Έχει παρατηρηθεί ότι η πλήρης συμπληρωματικότητα, που συμβαίνει συχνότερα στα φυτά και όχι στα ζώα, έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή mRNA. Αντίθετα, ελλιπής συμπληρωματικότητα άγει την καταστολή της μετάφρασης ¹⁴.

Τα miRNAs καταστέλλουν τη μετάφραση μέσω διαφόρων μηχανισμών είτε στο στάδιο της έναρξης, είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης της μετάφρασης, ανάλογα με το πώς επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του 5' καλύμματος και της 3' πολυαδενυλιωμένης ουράς του mRNA. Παρά το γεγονός ότι ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμη καλά κατανοητός, η καταστολή της μετάφρασης περιλαμβάνει κυτταροπλασματικούς σχηματισμούς επεξεργασίας των mRNA, τα σωμάτια P (P-bodies). Αυτά πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ένα ρόλο στη σίγαση των mRNA επειδή οι mRNA-στόχοι και τα συστατικά του RISC συν-εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου. Τα P-bodies «φιλοξενούν» πολλές πρωτεΐνες που ελέγχουν τα σύμπλοκα των αγγελιοφόρων ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Τα εν λόγω σύμπλοκα αποτελούνται από mRNA και πρωτεΐνες-καταστολείς αλλά όχι από παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζουν τη μετάφραση^{27,28}.

2.2.3 Λειτουργία και Σταθερότητα των miRNAs

Πληθώρα microRNAs εμπλέκονται σε βασικές βιολογικές λειτουργίες όπως στην κυτταρική ανάπτυξη, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στο μεταβολισμό, στη μεταγωγή σήματος και στην αγγειογένεση.

Σε αντίθεση με τα mRNAs, τα miRNAs βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα σταθερά σε δυσμενείς βιολογικές συνθήκες όπως πολλαπλούς κύκλους ψύξης-απόψυξης, παρατεταμένη αποθήκευση, ακραίες διακυμάνσεις θερμοτήτας και pH⁴. Σε δείγματα ανθρώπων έχουν βρεθεί miRNAs τα οποία έχουν μείνει σταθερά για πάνω από 10 χρόνια²⁹.

2.3 miRNA και καρκίνος

Εντατικές έρευνες τα τελευταία χρόνια έχουν εστιάσει στη μελέτη του ρυθμιστικού ρόλου διαφόρων miRNAs στην αυτο-ανανέωση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι πάνω από το 50% των χαρακτηρισμένων miRNAs στον άνθρωπο βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος γνωστές ως «εύθραυστες θέσεις», οι οποίες εμπλέκονται στην καρκινογένεση διαφόρων τύπων όγκων³⁰.

Τα miRNAs σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου και δρουν τόσο ως ογκογονίδια, όσο και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Η πρώτη ένδειξη ότι τα miRNAs εμπλέκονται στην καρκινογένεση προήλθε από μελέτες οι οποίες έγιναν σε ασθενείς με Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία . Οι ασθενείς παρουσίαζαν συχνά ελλείψεις σε χρωμοσωμική περιοχή που εδρεύουν 2 γονίδια miRNA, το miR-15a και miR-16-1. Αναλυτικότερα, το 65% των περιπτώσεων της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, το 60% των καρκίνων του προστάτη και το 16-40% των περιπτώσεων πολλαπλού μυελώματος, παρουσιάζουν έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14. Οι επιστήμονες θεώρησαν ότι σε αυτή την περιοχή των 30 kbp πρέπει να υπάρχει κάποιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Ωστόσο, στην περιοχή αυτή βρέθηκαν μόνο τα miR-15a και miR-16-1, τα οποία εδράζονται στο εσόνιο ενός ως τότε αγνώστου μη πρωτεϊνικού γονιδίου, του *leu-2*^{31,32}.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα miR-15-a και miR-16-1 ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της πρωτεΐνης *bcl-2*, μιας αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης που συχνά υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων λευχαιμιών και λεμφωμάτων. Κατά συνέπεια, τα miR-15-a και miR-16-1 λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, και κατασταλτικές μεταλλαγές σε αυτά προκαλούν αυξημένη έκφραση του *bcl-2*³³.

Άλλα miRNA φαίνεται να έχουν δράση ογκογονιδίων όπως για παράδειγμα, η έκφραση του miR-21 είναι κατά 5-100 φορές μεγαλύτερη σε γλοιώματα, σε σχέση με τους φυσιολογικούς εγκεφαλικούς ιστούς. Μελέτες του miR-21 με παρεμπόδιση της λειτουργίας του (antisense RNA) σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος έδειξαν ότι αυτό το μόριο ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, εμποδίζοντας την απόπτωση, χωρίς όμως να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που υποδηλώνει ρόλο ογκογονιδίου^{34,35}.

3. Καρκίνος του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες παγκοσμίως. Περίπου 1,38 εκατομμύρια νέα περιστατικά διαγνώστηκαν το 2008, ποσοστό 23% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου, και καταγράφηκαν 458.000 θάνατοι³⁶. Σε ότι αφορά την Ελλάδα, δεν υπάρχουν επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα λόγω έλλειψης συστηματικής καταγραφής. Παρ' όλα αυτά και στην Ελλάδα, ο καρκίνος του μαστού, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία του European Cancer Observatory για το 2012, καταλαμβάνει την πρώτη θέση στις γυναίκες.

Σταδιοποίηση

Η κλινική σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού στηρίζεται στο μέγεθος του όγκου (T), την παρουσία ή όχι διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων (N) και την παρουσία ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων (M).

Επιπλέον, αξιολογούνται διάφοροι προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες όπως ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου (πορογενές, λοβιακό κλπ), ο βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης (grade) καθώς και η έκφραση ή όχι οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών υποδοχέων (PR) αλλά και του ογκογονιδίου *HER2* (Human Epidermal growth factor 2). Τα υπάρχοντα συστήματα ταξινόμησης προσφέρουν εκτιμήσεις σχετικά με την πρόγνωση των ασθενειών και προτείνουν την εφαρμογή συγκεκριμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Συνοπτικά, στα στάδια I έως III (T₁₋₄N₁₋₃M₀) κατατάσσονται ασθενείς με όγκους που περιορίζονται στον μαζικό αδένα και τους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ενώ το στάδιο IV (T₁₋₄N₁₋₃M₁) περιλαμβάνει περιπτώσεις προχωρημένης νόσου με απομακρυσμένες μεταστάσεις και φυσικά δυσμενέστερη πρόγνωση³⁷.

Θεραπεία

Οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως το κλινικό στάδιο της νόσου, ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης, το βιολογικό προφίλ, η ηλικία της ασθενούς κ.α. Η χειρουργική εξαίρεση του καρκίνου αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της θεραπευτικής διαδικασίας, καθώς προσφέρει τη μοναδική δυνατότητα ίασης στα αρχικά στάδια της νόσου, εφόσον περιορίζεται σε τοποπεριοχικό επίπεδο. Η χημειοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία, και η ανοσοθεραπεία έχουν κυρίως παρηγορητικό ρόλο σε περιπτώσεις προχωρημένης νόσου με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Συχνά όμως, συστηματικές φαρμακοθεραπείες και ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται και επικουρικά μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση του καρκίνου για αποτροπή ή καθυστέρηση μεταστατικής εξέλιξης της νόσου και επίτευξη μακροχρόνιας επιβίωσης³⁷.

Η χειρουργική θεραπεία στον διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού συνιστάται στην εξαίρεση όλου του μαζικού αδένα (τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή) ή μέρους αυτού (επεμβάσεις διατήρησης του μαστού), με την προϋπόθεση της μετεγχειρητικής ακτινοβόλησης του μαστού, ενώ σε κάθε περίπτωση συναφαιρούνται και οι επιχώριοι

λεμφαδένες της μασχαλιαίας κοιλότητας. Όταν κατά την ιστολογική εξέταση του χειρουργικού παρασκευάσματος ανευρίσκονται επιπλέον και διηθημένοι λεμφαδένες χορηγείται επικουρική συστηματική θεραπεία (adjuvant therapy), η οποία καθορίζεται από την έκφραση οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων ή της ογκοπρωτεΐνης HER2. Η επιβίωση είναι αδρά συνυφασμένη με το στάδιο της νόσου και ποικίλει από 88% 5-ετή επιβίωση σε ασθενείς με νόσο σταδίου I μέχρι 15% 5-ετή επιβίωση σε ασθενείς σταδίου IV.

3.1 miRNAs και Καρκίνος του Μαστού

Τρία miRNAs έχουν ιδιαίτερα μελετηθεί στο καρκίνο του μαστού: τα miR-21, miR-155 και miR-195. Η συσχέτιση υψηλών επιπέδων miR-21 και του καρκίνου του μαστού έγινε σαφής στα πειράματα των Si, Zhu και των συνεργατών τους, οι οποίοι επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση του miR-21 σε δείγματα όγκων μαστού έναντι υγιών ιστών. Στην ίδια έρευνα διαπίστωσαν την καταστολή της κυτταρικής αύξησης *in vivo* και *in vitro*, χρησιμοποιώντας ένα ολιγονουκλεοτίδιο- αναστολέα του miR-21, το anti-miR-21, το οποίο σχετίζεται τόσο με την αυξημένη απόπτωση όσο και με την καταστολή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2³⁸ Ένας βασικός παράγοντας που επιδρά στα επίπεδα του miR-21 είναι η υποξία. αυξάνοντάς τα, και σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού³⁹. Μάλιστα, η περιοχή πρόσδεσης του HIF-1 (Hypoxia-Induced Factor 1) βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του pri-miR-21, αν και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την περίπτωση άμεσης επίδρασης⁴⁰.

Το 2010 ο William Kong και οι συνεργάτες του, διαπίστωσαν πώς το miR-155 ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση και την αύξηση του όγκου. Πιο αναλυτικά, το miR-155 επάγει την επιβίωση και ενισχύει την ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπείες⁴¹.

Το miR-195 παρατηρήθηκε ότι υπερεκφράζεται σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε δείγματα αίματος και ιστού⁴². Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ότι το miR-195 εκφράζεται διαφορετικά πριν και μετά την επέμβαση. Τα επίπεδα του miR-195 ήταν χαμηλότερα 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, υποστηρίζοντας το δυναμικό του ρόλο ως μη επεμβατικό βιοδείκτη στον καρκίνο του μαστού⁴³.

4. Καρκίνος του Στομάχου

Διάφοροι τύποι καρκίνου μπορούν να αναπτυχθούν στο στομάχι. Ο πιο συνήθης τύπος είναι το αδενοκαρκίνωμα, δηλαδή νεόπλασμα που προέρχονται από το αδενικό

επιθήλιο. Διακρίνεται σε δύο τύπους, τον εντερικό και τον διάχυτο. Δυστυχώς το αδενοκαρκίνωμα έχει πτωχή πρόγνωση λόγω του ότι είναι συχνά ασυμπτωματικό, επειδή προκαλεί μη ειδικά συμπτώματα στα αρχικά στάδια. Επομένως, η διάγνωση γίνεται συχνά σε προχωρημένο στάδιο για αυτό και το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί ένα καρκίνο με μεγάλη θνησιμότητα ⁴⁴.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του IARC (International Agency for Research on Cancer) ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί την τέταρτη πιο συχνή κακοήθεια στον κόσμο, μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου. Πάνω από το 70% των περιπτώσεων (677.000 περιπτώσεις ετησίως) συμβαίνουν στις αναπτυσσόμενες χώρες (456.000 άνδρες, 221.000 στις γυναίκες), και το ήμισυ του συνόλου συμβαίνει στην Ανατολική Ασία (κυρίως στην Ιαπωνία). Στην Ελλάδα ο καρκίνος του στομάχου κατέχει συχνά την 6^η ή 7^η θέση, πιθανότατα λόγω διατροφικών συνηθειών. ^{45,46}.

Θεραπεία

Ριζική θεραπεία του εντοπισμένου καρκίνου του στομάχου αποτελεί η γαστρεκτομή. Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία περιορίζουν τα συμπτώματα, αλλά δεν επιφέρουν ίαση της νόσου. Η πενταετής επιβίωση μετά από χειρουργική αφαίρεση του όγκου είναι περίπου 20-25% σε ασθενείς με όγκους στο άπω τρίτο του στομάχου, 10% σε ασθενείς με εγγύς όγκους και 5% σε ασθενείς με όγκους που διηθούν όλο το στομάχι. Η ελαττωμένη επιβίωση των ασθενών με εγγύς όγκους μπορεί να οφείλεται στο ότι οι όγκοι συνήθως είναι διάχυτου τύπου αλλά και σε δυσκολίες της χειρουργικής αφαίρεσής τους ⁴⁷.

Ιστολογική Ταξινόμηση

Δύο είναι οι βασικοί ιστολογικοί τύποι του καρκίνου στομάχου:

Ο εντερικός τύπος αναπτύσσεται κυρίως σε άνδρες ηλικίας περί τα 55 έτη και εμφανίζει σαφή μείωση επίπτωσης τα τελευταία χρόνια.

Ο διάχυτος τύπος (αδιαφοροποίητο καρκίνωμα) εμφανίζει σταθερή επίπτωση τα τελευταία χρόνια, προσβάλλει ισότιμα τα δύο φύλλα σε μ.ο. ηλικίας τα 48 έτη και δεν αναπτύσσεται σε έδαφος πρόδρομης δυσπλαστικής βλάβης. Φαίνεται να σχετίζεται με συγκεκριμένες γονιδιακές ανωμαλίες και όχι με γνωστούς και τεκμηριωμένους παράγοντες κινδύνου.

4.1 miRNAs και Καρκίνος του Στομάχου

Από την πληθώρα των miRNAs που έχουν μελετηθεί στον καρκίνο του στομάχου, ορισμένα miRNAs έχουν δειχθεί να έχουν κύρια κλινική σημασία.

Η έκφραση του miR-21 βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά υψηλότερη σε καρκινικούς ιστούς του γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τους μη καρκινικούς ιστούς και συσχετιζόνταν με την έκταση του όγκου⁴⁸. Στόχος του miR-21 είναι το μετάγραφο του γονιδίου PTEN (Phosphatase and tensin homolog) η έκφραση του οποίου είναι ελαττωμένη σε νεοπλασματικούς ιστούς του καρκίνου του στομάχου. Η έκφραση του miR-155 παρατηρήθηκε να είναι μειωμένη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς σε δείγμα 123 ασθενών και 46 υγιών ατόμων⁴⁹⁻⁵². Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του miR-155 σχετίζεται με την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία του καρκίνου του στομάχου⁴⁹. Το miR-200c, έχει διαπιστωθεί ότι υπερεκφράζεται στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και βρέθηκε ότι αποτελεί καλό δείκτη επιβίωσης των ασθενών⁵³. Τα miR-200c, miR-200b και miR-125 στοχεύουν τα περισσότερα από τα γονίδια που οδηγούν σε μεσεγχυματικό υπότυπο του καρκίνου του στομάχου, ένα τύπο καρκίνου που έχει συσχετιστεί με χαμηλή επίβιωση⁵⁴.

Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη, η οποία βασίζεται σε προηγούμενα ευρήματα σε δείγματα ιστού με καρκίνο του στομάχου, τα miR-17-5p, miR-21, miR-106a, miR-106b και let-7a επιλέχθηκαν για ανάλυση και σε δείγματα πλάσματος. Διαπιστώθηκε ότι τέσσερα miRNAs (miR-17-5p, miR-21, miR-106a και miR-106b) ήταν σημαντικά αυξημένα στο πλάσμα ασθενών, ενώ τα συνολικά επίπεδα του let-7a ήταν μειωμένα⁵⁵.

5. Ο Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) κατατάσσεται ως η τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο. Κάθε χρόνο, καταγράφονται περισσότεροι από 600.000 θάνατοι σε όλο τον κόσμο. Τα ποσοστά θνησιμότητας από τον καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν μειωθεί στις δυτικές κοινωνίες, λόγω της αυξημένης εφαρμογής της προληπτικής ενδοσκοπικής εξέτασης, ενώ στην Ασία συνεχίζει να είναι μια ολοένα και πιο διαδεδομένη ασθένεια. Λόγω της απουσίας συμπτωμάτων μέχρι προχωρημένα στάδια, πολλές φορές μέχρι τη δημιουργία μετάστασης, συνεχίζει να αποτελεί ένα

σοβαρό πρόβλημα υγείας. Εάν ο καρκίνος του εντέρου διαγνωστεί νωρίς, πολύ περισσότερο ως αδενωματώδης πολύποδας, έχει μεγάλη πιθανότητα να θεραπευτεί μέσω χειρουργικής εκτομής^{34,56}.

Θεραπεία

Η χειρουργική αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση της πρώιμης νόσου. Ειδικά στα αρχικά στάδια η χειρουργική αντιμετώπιση, τις περισσότερες φορές οδηγεί σε ίαση. Η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία είναι συμπληρωματική της χειρουργικής αντιμετώπισης. Σκοπός της χημειοθεραπείας – αφού έχει γίνει ορθή ογκολογική εκτίμηση – είναι η καταστροφή πιθανών καρκινικών κυττάρων τα οποία έχουν ήδη διασπαρθεί πριν τη χειρουργική εκτομή. Είναι τεκμηριωμένο ότι η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία αυξάνει την πιθανότητα ίασης και το προσδόκιμο επιβίωσης. Η συστηματική ανοσο-χημειοθεραπεία έχει ανακουφιστικό χαρακτήρα και στοχεύει σε μείωση των συμπτωμάτων και παράταση της επιβίωσης των ασθενών με μεταστατική νόσο.⁵⁷

5.1 miRNAs και καρκίνος του παχέος εντέρου

Συγκεκριμένα miRNAs έχουν βρεθεί στον καρκίνο του εντέρου (CRC) με δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες.

Στο καρκίνο του εντέρου έχουν παρητηρηθεί αυξημένα επίπεδα miR-155 στο πλάσμα ασθενών, σε σχέση με το πλάσμα υγιών ατόμων⁵⁸. Το miR-155 φαίνεται να ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό κύκλο του εντερικού επιθηλίου μέσω στόχευσης του γονιδίου *E2F-2*. Ο μεταγραφικός παράγοντας *E2F-2*, μέλος της οικογένειας *E2F*, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην απόπτωση⁵⁹. Επιπλέον μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές έδειξε ότι το miR-155 επάγει τη μετανάστευση τους μέσω ρύθμισης της πρωτεΐνης *claudin-1*⁶⁰.

Ένα άλλο microRNA που φαίνεται ότι ενέχεται στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι το miR-200c^{61,62}. Σε έρευνα 24 δειγμάτων βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση του miR-200c σχετίζονταν με μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών⁶³. Η πιθανότητα εμφάνισης μετάστασης είναι αυξημένη στην περίπτωση επιγενετικής αυξορύθμισης της έκφρασης του miR-200c⁶⁴.

Το miR-135a και miR-135b υπερεκφράζονται σε αδενώματα και καρκινώματα παχέος εντέρου με ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης APC, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση των συγκεκριμένων miRNAs οδηγεί στο να συμμετέχουν στην παθογένεση του CRC⁶⁵. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν καθιερώσει τη συσχέτιση των επιπέδων του let-7a με τον καρκίνο του εντέρου^{66,67}. Όταν εξετάστηκε η έκφραση του let-7a σε ανθρώπινους όγκους καρκίνου του εντέρου και καρκινικές κυτταρικές σειρές, βρέθηκε ότι 2 από 6 περιπτώσεις και 1 από 3 κυτταρικές σειρές έδειξαν μειωμένη έκφραση του let-7a. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν την εμπλοκή του let-7 miRNA στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου⁶⁸.

6. Αγγειογένεση και χειρουργείο

Αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού και κατά την επούλωση τραυμάτων πχ. έπειτα από κάποια χειρουργική επέμβαση. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τον ορισμό που έδωσε ένας από τους πρώτους και σημαντικότερους μελετητές της αγγειογένεσης, ο Judah Folkman, ως αγγειογένεση ορίζεται «η διαδικασία σχηματισμού και επέκτασης των αιμοφόρων αγγείων από ένα προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο, σαν απάντηση σε ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα». Η διαδικασία αυτή σχετίζεται επίσης με την παροχή των όγκων σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά όταν ξεπεράσουν ένα κρίσιμο όριο μεγέθους με διάμετρο 1-2 mm. Επιπλέον, μέσω του αγγειακού αυτού συστήματος, πραγματοποιείται και η μετανάστευση καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα σημεία, δηλαδή η εμφάνιση μετάστασης^{69,70}.

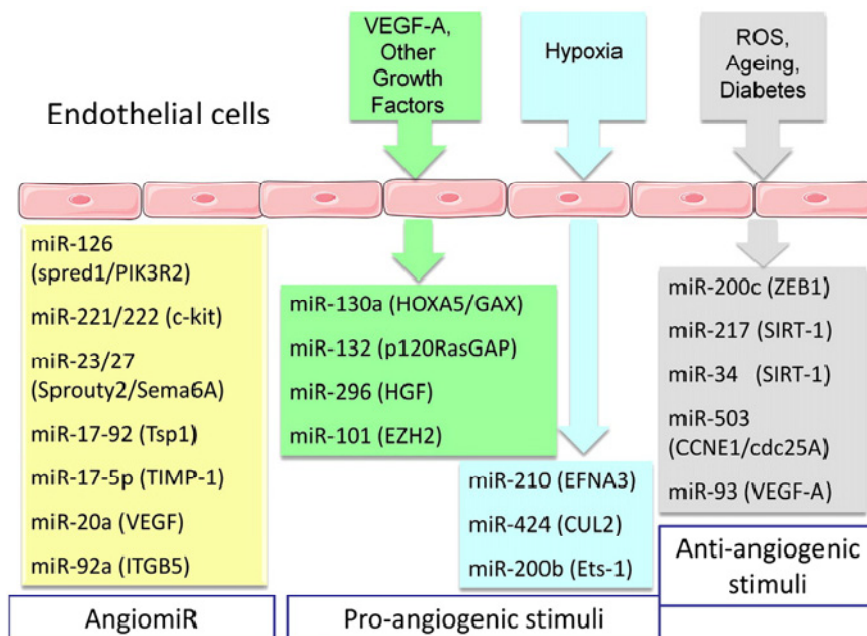
Ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων είναι μία κρίσιμη διαδικασία για την ανάπτυξη και μεταστατική εξάπλωση του όγκου⁷¹. Αυτή η διαδικασία πρωτίστως ενεργοποιείται όταν ένας αυξανόμενος όγκος δημιουργεί ένα υποξαιμικό μικροπεριβάλλον⁷². Η περαιτέρω αύξηση σε μέγεθος προϋποθέτει μια σταθερή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, την οποία ο αναπτυσσόμενος όγκος προσπαθεί να εξασφαλίσει σχηματίζοντας το δικό του δίκτυο αιμοφόρων αγγείων, μέσω του μηχανισμού της νέο-αγγειογένεσης⁷³. Χωρίς αυτήν την ικανότητα, ένας όγκος μπορεί να παραμένει στάσιμος για πολλά χρόνια όντας κλινικά μη εμφανής.

Η έξοδος από την κατάσταση ύπνωσης «dormancy» έχει συσχετιστεί στενά με την έκφραση από τον όγκο αγγειογενετικών ιδιοτήτων, αν και δεν είναι απόλυτα σαφές αν υπεισέρχονται και άλλοι παράγοντες – εκτός της αγγειογένεσης – στην όλη διαδικασία, όπως π.χ. μεταβολές στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα καρκινικά κύτταρα οδηγούν σε έκκριση αγγειογόνων παραγόντων όπως VEGF-A και πρωτεολυτικών ενζύμων σε απόκριση στην υποξία⁷⁴. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (EC) και στη δημιουργία ενός ισχυρού δικτύου νεόπλαστων τριχοειδών. Παρά την αποδιοργανωμένη δομή του, αυτό το δίκτυο είναι ικανό να παρέχει στην αυξανόμενη μάζα του όγκου όλα τα απαιτούμενους συστατικά.

Έτσι παρέχεται στα καρκινικά κύτταρα η δυνατότητα να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να εκδηλώσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις⁷⁵.

Με βάση αποδεικτικά στοιχεία της βιβλιογραφίας σχετικά με την έκφραση των miRNAs και τη λειτουργία τους στα ECs, είναι δυνατόν τα ενδοθηλιακά miRNAs να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες:

1. miRNAs που στοχεύουν γονίδια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση (angiomiRs) και
2. miRNAs των οποίων η έκφραση μπορεί να ρυθμίζεται με προ-αγγειογενετικά ή αντι-αγγειογενετικά ερεθίσματα (εικόνα 2,⁷⁶).



Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση των περισσότερων αγγειοτρόπων miRNAs προάγεται από τον VEGF όπως τα miR-296, -130a, και -132. Συνήθως υπερεκφράζονται στα ECs, και

Εικόνα 2. Ο ρόλος των microRNAs στην αγγειογένεση.

εμπλέκονται στον έλεγχο της

ανάπτυξης του όγκου, στην κυτταρική επιβίωση και στην αγγειογένεση. Ο Yamakuchi και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το miR-107 μπορεί να μεσολαβήσει στη ρύθμιση του p53 το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι της υποξίας-αγγειογένεσης των όγκων στοχεύοντας στο HIF-1β⁷⁷. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το miR-20b διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των κυττάρων του όγκου σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου και ρυθμίζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών HIF-1α και VEGF-A⁷⁸. Το ίδιο μονοπάτι στα καρκινικά κύτταρα ελέγχεται έμμεσα από το miR-21. Ειδικότερα, το miR-21 έχει σαν στόχο το PTEN και ενισχύει την έκφραση των παραγόντων HIF-1α και VEGF-A και κατ' επέκταση την αγγειογένεση^{79,80}.

7. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

Η Οξεία Λευχαιμία είναι ένας τύπος καρκίνου του αίματος που χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική αύξηση ανώριμων και πρόδρομων μορφών των, που ονομάζονται «βλάστες» και κυκλοφορούν στο αίμα ή διαπιστώνονται στο μυελό των οστών σε ποσοστά >20% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων.

Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (Ο.Μ.Α)

Η Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι καρκίνος των κυττάρων της λευκής σειράς του αιμοποιητικού ιστού. Χαρακτηρίζεται από ραγδαία ανάπτυξη νεοπλασματικών λευκών αιμοσφαιρίων (βλαστών) που συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και εμποδίζουν την φυσιολογική αιμοποίηση. Η ΟΜΛ είναι η πιο κοινή οξεία λευχαιμία που προσβάλλει ενήλικες, και η συχνότητά της αυξάνεται με την ηλικία. Παρόλο που η ΟΜΛ είναι σχετικά σπάνια ασθένεια, υπεύθυνη περίπου για το 1.2% θανάτων στις ΗΠΑ, η συχνότητα εμφάνισής της αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας του πληθυσμού⁸¹.

Τα συμπτώματα της ΟΜΛ οφείλονται στη μείωση των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού των οστών λόγω παρεκτόπισής τους από λευχαιμικά κύτταρα, γεγονός που προκαλεί ελάττωση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων και των φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων. Όπως και στην οξεία λεμφογενή λευχαιμία, η ΟΜΛ εξελίσσεται ραγδαία και τυπικά είναι θανατηφόρος μέσα σε διάστημα λίγων βδομάδων ή μηνών, αν δεν αντιμετωπιστεί⁸¹.

Η ΟΜΛ έχει πολλούς υποτύπους και η θεραπεία και πρόγνωση της ποικίλει ανάμεσα στους τύπους αυτούς. Η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται μεταξύ 15-70% και το ποσοστό υποτροπής μεταξύ 33-78% ανάλογα με ηλικία και τον τύπο. Η ΟΜΛ αρχικά αντιμετωπίζεται με χημειοθεραπεία που στοχεύει στην επίτευξη ύφεσης της ασθένειας. Στη συνέχεια οι ασθενείς μπορεί να υποβληθούν σε επιπρόσθετη χημειοθεραπεία σταθεροποίησης ή και μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από συμβατό δότη.

CD34⁺ κύτταρα

Το CD34 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I, μεγέθους 105-120kD η οποία εκφράζεται από ανθρώπινα μυελοειδή και λεμφοειδή προγονικά κύτταρα. Εκφράζεται στα ανθρώπινα αιμοποιητικά, προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, στους εμβρυακούς ινοβλάστες και σε μερικά κύτταρα του εμβρυϊκού και ενήλικου νευρικού ιστού. Το περιορισμένο πρότυπο έκφρασης του CD34 στην αιμοποίηση, υποδηλώνει ότι έχει σημαντική λειτουργία στα πρώιμα στάδια ζωής των αιμοποιητικών κυττάρων ενεργώντας ως μόριο προσκόλλησης των βλαστικών κυττάρων στο στρωματικό περιβάλλον του μυελού των οστών⁸².

7.1 miRNAs, απόπτωση και καρκίνος

Έχει δηχθεί ότι ορισμένα miRNAs έχουν ως στόχους γονίδια τα οποία εμπλέκονται άμεσα στη λευχαιμία. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *HOXB8*, ένα ογκογονίδιο το οποίο προλαμβάνει την απόπτωση μέσω της καταστολής του προαποπτωτικού γονιδίου BIM, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία του κακοήθους φαινοτύπου⁸³. Η ρύθμιση του γονιδίου *HOXB8* γίνεται από το miR-196⁸⁴. Ένα επίσης χαρακτηριστικό ογκοκατασταλτικό microRNA το οποίο σχετίζεται και με την ΟΜΛ αποτελεί η οικογένεια του miR-29b⁸⁵. Αυτή η οικογένεια μορίων υφίσταται ως τρία ομόλογα (miR-29a/b/c) σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι στόχοι των miRNA αυτών είναι γονίδια όπως το *MCL-1* και το οποίο φαίνεται να υπερεκφράζεται στην ΟΜΛ⁸⁶. Σε μία μελέτη με 53 ασθενείς με ΟΜΛ τα miR-25, miR-26a, miR-29b, miR-146a και miR-196b φαίνεται να σχετίζονται με τη συνολική επιβίωση των ασθενών⁸⁷.

Τα miR-15a και miR-16-1 λειτουργούν ως ρυθμιστές της αντιαποπτωτικής ογκοπρωτεΐνης *BCL-2*. Η έκφραση των δύο αυτών μορίων οδηγεί σε υποέκφραση του γονιδίου *bcl-2* και η απώλεια της έκφρασής τους οδηγεί σε απώλεια ελέγχου της έκφρασης του *bcl2*³³.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα miRNA το οποίο αποτελεί ογκοκατασταλτικό μόριο που σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης είναι η οικογένεια του miR-34, η οποία αποτελείται από τα miR-34-a, b και c. Η έκφραση των miRNAs αυτής της οικογένειας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου ή παγκρέατος, οι οποίες έχουν υποστεί απάλειψη του p53, οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και απόπτωση. Τα παραπάνω δείχνουν την πιθανή σχέση του miRNA-34 με τη λειτουργία του p53. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι το miR-34a καταστέλλει το HDM4, ένα ισχυρό αρνητικό ρυθμιστή του p53, δημιουργώντας ένα είδος θετικής ενεργοποίησης του μονοπατιού του p53 ⁸⁸.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως μπορεί να γίνει κατανοητό με βάση τα προαναφερθέντα, τα miRNAs εκφράζονται διαφορετικά στον καρκίνο σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Έτσι, εκτιμάται ότι μπορούν να αναζητηθούν αξιόπιστοι βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης και παρακολούθησης ικανοί να βοηθήσουν τον ιατρικό χειρισμό ασθενών με καρκίνο. Ήδη μελέτες έχουν ταυτοποιήσει την έκφραση συγκεκριμένων miRNAs με προγνωστική και προβλεπτική ικανότητα.

Στο πλαίσιο ελέγχου της έκφρασης και των δύο κλώνων του ίδιου microRNA και της επίδρασης της χειρουργικής πράξης μελετήθηκαν: 1) η κινητική τριών microRNA (miR-195, miR-21, miR-155) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, 2) η κινητική τεσσάρων microRNA (miR-155-5p, miR-155-3p, miR-21-5p, miR-21-3p, let-7a, miR-200c) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου και 3) η κινητική τεσσάρων microRNA (miR-155-5p, miR-155-3p, miR-135a-5p, miR-135a-3p, let-7a, miR-200c) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου προ-εγχειρητικά και μετεγχειρητικά (3^η, 7^η και 30^η μετεγχειρητική ημέρα). Επιπλέον μελετήθηκε η έκφραση των microRNAs που σχετίζονται με την απόπτωση στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Τα ευρήματα συσχετίστηκαν με την κλινική πορεία των ασθενών. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η απομόνωση κυκλοφορούντων στο αίμα ασθενών με καρκίνο ειδικών microRNA που σχετίζονται τόσο με την ογκογένεση (oncomiRs) όσο και με την αγγειογένεση (angiomiRs).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή ασθενών

Η νεο-αγγειογένεση, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας ανάπτυξης της πρωτοπαθούς εστίας καρκινικών κυττάρων, όσο και των μεταστάσεων. Εκτός, όμως, από την καρκινογένεση, η νέο-αγγειογένεση παρατηρείται και σε πλείστες άλλες φυσιολογικές ή και παθολογικές διεργασίες^{69,74}. Επομένως, για να καταστεί δυνατή η μελέτη της επίδρασης του χειρουργείου στον μηχανισμό της αγγειογένεσης θεωρήθηκε απαραίτητο να αποκλειστούν τέτοιες καταστάσεις που πιθανότατα θα οδηγούσαν σε μια λανθασμένη εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Έτσι, εφαρμόστηκαν τα παρακάτω κριτήρια αποκλεισμού κατά την επιλογή των υπό μελέτη ασθενών στους χειρουργήσιμους συμπαγείς όγκους:

- *Σακχαρώδης Διαβήτης (τύπου I ή II)*

Η μικροαγγειοπάθεια που παρατηρείται σε χρόνιους διαβητικούς ασθενείς έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τη νέο-αγγειογένεση⁸⁹.

- *Πρόσφατη συστηματική λοίμωξη^{90,91}*

- *Χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι και αυτοάνοσα νοσήματα*

(Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κ.α.)

Οι μεσολαβητές της φλεγμονώδους διεργασίας (IL-1, IL-8, TNF κ.α.) έχουν αναγνωριστεί παράλληλα ως παράγοντες που εμπλέκονται στη νέο-αγγειογένεση και θεωρείται πολύ πιθανό οι μηχανισμοί που κινητοποιούνται στις δύο αυτές διεργασίες να διαθέτουν κοινά μονοπάτια^{74,90,92}

- *Λήψη ερυθροποιητίνης*

Η χορήγηση ερυθροποιητίνης έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και αυτού του μαστού^{93,94}. Θεωρείται ότι καθιστά τα καρκινικά κύτταρα πιο ανθεκτικά στις συνθήκες ισχαιμίας, ενώ έχει αποδειχθεί ότι επάγει τον VEGF.

- *Ιστορικό πρόσφατου μείζονος τραυματισμού ή χειρουργικής επέμβασης^{95,96}*

- *Ιστορικό πρόσφατου εμφράγματος του μυοκαρδίου ή άλλου μείζονος καρδιαγγειακού συμβάντος*

(αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, οξεία ισχαιμία άκρου μέλους κ.α.)

Η ισχαιμία αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για την πυροδότηση της νέο-αγγειογένεσης μέσω έκλυσης του HIF-1. Η επαναϊμάτωση των ισχαιμικών ιστών επιτυγχάνεται με τη δημιουργία παράπλευρου αγγειακού δικτύου, διαδικασία στην οποία κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει ο VEGF ^{74,97}.

1.1 Ασθενείς με καρκίνο του Μαστού

Στη μελέτη περιελήφθησαν μετά από ενυπόγραφη συγκατάθεση, γυναίκες ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για θεραπεία παθήσεων του μαστού κατά το χρονικό διάστημα 04/05/09 έως 31/05/10 και που δεν ενέπιπταν στα παραπάνω κριτήρια αποκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 15 γυναίκες με καρκίνο του μαστού (Ομάδα μελέτης) και 5 γυναίκες με ινοαδενώματα (Ομάδα ελέγχου). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 1.

Ασθενής	Ηλικία	Πάθηση	TNM Στάδιο	Βαθμός διαφορο ποίησης	Τύπος επέμβασης	Ορμονικοί υποδοχείς	HER-2
1	47	Ινοαδένωμα			EKTOMH		
2	28	Ινοαδένωμα			EKTOMH		
3	43	Ινοαδένωμα			EKTOMH		
4	32	Ινοαδένωμα			EKTOMH		
5	36	Ινοαδένωμα			EKTOMH		
6	53	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₀	2	TPM+ΛKM	ER+, PR+	0+
7	58	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{1c} N ₁	2	ETE+ΛKM	ER+, PR+	2+
8	60	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (AP) μαστού	T ₂ N ₀	2	TPM+ΛKM	ER+, PR+	0+
9	50	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{1c} N ₀	2	TPM+ΛKM	ER+, PR+	2+
10	35	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (AP) μαστού	T ₂ N ₁	3	TPM+ΛKM	ER+, PR+	-
11	58	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₂	2	ETE+ΛKM	ER+, PR+	1+
12	76	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₀	2	TPM+ΛKM	ER+, PR+	0+

13	58	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₁ N ₀	3	TPM+ΛΚΜ	ER-, PR-	3+
14	74	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₁	2	TPM+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+
15	55	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₁	2	TPM+ΛΚΜ	ER+, PR+	0+
16	43	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΑΡ) μαστού	T _{1b} N ₀	2	ETE+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+
17	52	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{2c} N ₁	2	TPM+ΛΚΜ	ER+, PR	1
18	39	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΑΡ) μαστού	T _{1b} N ₂	3	ETE+ΛΚΜ	ER-, PR+	2+
19	55	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₁ N ₀	2	TPM+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+
20	43	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{2b} N ₁	2	TPM+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη: ETE: ευρεία τοπική εκτομή, ΛΚΜ: λεμφαδενικός καθαρισμός μασχάλης, TPM: τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή, ER: οιστρογονικοί υποδοχείς (estrogen receptors), PR: προγεστερονικοί υποδοχείς (progesterone receptors).

1.1.1. Στοιχεία επέμβασης/ μαστεκτομής

Οι ασθενείς της Ομάδας μελέτης είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη κακοήθεια με core biopsy πριν από το χειρουργείο, η οποία είχε διενεργηθεί στα Εξωτερικά Ιατρεία του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Ιατρείο Μαστού). Ο τύπος της επέμβασης σε κάθε περίπτωση υπαγορεύτηκε από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου της κάθε ασθενούς, αλλά και από την προσωπική επιθυμία σχετικά με τη διατήρηση του μαστού ή μη. Όλες οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, από τον ίδιο έμπειρο χειρουργό, ο οποίος εξειδικεύεται στις παθήσεις του μαστού. Μία ώρα προεγχειρητικά, αλλά και κατά τη διάρκεια της πρώτης μετεγχειρητικής ημέρας χορηγούταν ενδοφλέβια αντιβίωση (Αμπικιλλίνη και Σουλμπακτάμη) ανά δωρο. Όλες οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε γενική ενδοφλέβια αναισθησία με ενδοτραχειακή διασωλήνωση. Πιο συγκεκριμένα,

ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο αναισθητικής τεχνικής σε όλες τις περιπτώσεις, που περιλάμβανε: προνάρκωση με 1mg Μιδαζολάμης εισαγωγή στην αναισθησία με συνδυασμό ενδοφλέβια χορηγούμενης Φαιντανύλης, Προποφόλης και μυοχαλαρωτικών (σε δόσεις ανάλογες με το σωματικό βάρος) και διατήρηση αναισθησίας με εισπνεόμενο O₂ και Σεβοφλουράνιο.

1.1.2 Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του μαστού

Η διάρκεια νοσηλείας των ασθενών με καρκίνο μαστού κυμαινόταν από 7 έως 10 ημέρες, ανάλογα με την ποσότητα εκροής λεμφικού υγρού από την παροχέτευση που είχε τοποθετηθεί διεγχειρητικά στη μασχालιαία κοιλότητα. Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε εκτομή ινοαδενώματος μαστού νοσηλεύονταν για 2-3 ημέρες. Δεν παρουσιάστηκαν μετεγχειρητικές επιπλοκές σε καμία περίπτωση.

Η ιστολογική εξέταση των παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε από τον ίδιο Παθολογοανατόμο, ο οποίος είναι εξειδικευμένος σε παθήσεις του μαστού. Οι ασθενείς με καρκίνο μαστού εκτιμήθηκαν στο Ογκολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όσες είχαν υποβληθεί σε ευρεία τοπική εκτομή υποβάλλονταν σε συμπληρωματική ακτινοθεραπεία στο Ακτινοθεραπευτικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στις περιπτώσεις ανεύρεσης διηθημένων λεμφαδένων στο ιστολογικό παρασκεύασμα ακολουθούσε επικουρική χημειοθεραπεία, σύμφωνα με τα τρέχοντα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Επί παρουσίας ορμονικών υποδοχέων χορηγούταν επιπλέον ορμονοθεραπεία για χρονικό διάστημα 5 ετών. Παράλληλα, οι ασθενείς παρακολουθούταν στο Ιατρείο Μαστού από τον Χειρουργό τους με κλινική εξέταση και απεικονιστικές εξετάσεις, για το ενδεχόμενο τοπικής υποτροπής ή εμφάνιση νεοπλασματος στον ετερόπλευρο μαστό.

Οι φάκελοι των ασθενών μελετήθηκαν αναδρομικά, με σκοπό να αξιολογηθεί το ποσοστό εμφάνισης τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένης μετάστασης καθώς και να εκτιμηθεί η συνολική επιβίωση των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Η παρακολούθηση (follow-up) κυμάνθηκε από 25 έως 37 μήνες (διάμεση τιμή: 31 μήνες).

1.2. Ασθενείς με καρκίνο του στομάχου

Στη μελέτη περιλήφθηκαν, μετά από ενυπόγραφη συγκατάθεση, ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του στομάχου κατά το χρονικό διάστημα 29/05/2009 έως 8/09/2010 και που δεν ενέπιπταν στα παραπάνω κριτήρια αποκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 8 ασθενείς (4 γυναίκες και 4 άνδρες) με 7 καρκίνωμα του στομάχου και 1 με λέμφωμα στομάχου (Ομάδα μελέτης) ηλικίας 51 έως 85 ετών. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 8 αιμοδότες (4 γυναίκες και 4 άνδρες), ηλικίας 30 έως 57 από το τμήμα Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 2.

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΠΑΘΗΣΗ	ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ	TNM
1	75	Αιμορραγικό έλκος ελάσσονος τόξου στομάχου	ΟΛΙΚΗ D1 ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ+ΣΠΛΗΝΕΚΤΟΜΗ	ΑδενοCa διάχυτου τύπου	T _{2b} N ₂
2	51	Αιμορραγικό έλκος ελάσσονος τόξου στομάχου	ΟΛΙΚΗ D2 ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ+ΣΠΛΗΝΕΚΤΟΜΗ +ΟΥΡΑΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΕΚΤΟΜΗ+ΕΓΚΑΡΣΙΑΚ ΤΟΜΗ	Αδιαφοροποίητο Ca στομάχου	T ₃ N ₁
3	62	Εξωφυτικό νεόπλασμα ελάσσονος τόξου στομάχου	ΟΛΙΚΗ D1 ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ	ΑδενοCa διάχυτου τύπου χαμηλής διαφοροποίησης	T _{2b} N ₀
4	66	Νεόπλασμα σχεδόν σε όλο το στόμαχο	ΟΛΙΚΗ D1 ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ	Διάχυτο non-Hodgkin λέμφωμα από μεγάλα B λεμφοκύτταρα	
5	84	Νεόπλασμα σώματος στομάχου	ΟΛΙΚΗ D1 ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ	ΑδενοCa εντερικού τύπου μέσης διαφοροποίησης	T ₃ N _{3a}
6	78	Ελκωτική βλάβη καρδίας-θόλου στομάχου	ΟΛΙΚΗ D2 ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ	ΑδενοCa εντερικού τύπου μέσης διαφοροποίησης	T ₂ N ₁
7	78	Εξωφυτικό νεόπλασμα μείζονος τόξου άντρου στομάχου	ΥΦΟΛΙΚΗ BILLROTH II ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ	ΑδενοCa διάχυτου τύπου χαμηλής διαφοροποίησης grade 3	T ₂ N ₁

8	85	Ελκωτική βλάβη προπυλωρικά	ΥΦΟΛΙΚΗ BILLROTH II ΓΑΣΤΡΕΚΤΟΜΗ	ΑδενοCa εντερικού τύπου μέσης και εστιακά χαμηλής διαφοροποίησης	T ₃ N ₁
---	----	-------------------------------	------------------------------------	---	-------------------------------

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά ασθενών με νεοπλασία στομάχου που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

1.2.1. Στοιχεία Επέμβασης/ Γαστρεκτομής

Οι ασθενείς είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη κακοήθεια με ενδοσκοπικά ληφθείσα βιοψία πριν από το χειρουργείο. Πριν την επέμβαση διενεργήθηκε η τυπική σταδιοποίηση με αξονική τομογραφία κοιλίας και θώρακα και σε όλες τις περιπτώσεις ο όγκος θεωρήθηκε εξαιρεσίμος, κάτι που επιβεβαιώθηκε και διεγχειρητικά. Ο τύπος της επέμβασης σε κάθε περίπτωση υπαγορεύτηκε από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου του κάθε ασθενούς, λαμβάνοντας υπόψη τα διεθνώς αποδεκτά ογκολογικά πρότυπα. Κανείς ασθενής δεν υποβλήθηκε σε νέο-επικουρική (neo-adjuvant) χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία.

Όλες οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, από τον ίδιο έμπειρο χειρουργό. Οι ασθενείς με εντόπιση της εστίας στον πυλωρό ή το άντρο του στομάχου υποβλήθηκαν σε υφολική γαστρεκτομή με αποκατάσταση της γαστρεντερικής συνέχειας κατά Billroth II. Σε όγκους της εγγύς μοίρας του στομάχου διενεργήθηκε ολική γαστρεκτομή με λεμφαδενικό καθαρισμό επιπέδου D1 (αφαίρεση λεμφαδένων κατά μήκος μείζονος και ελάσσονος τόξου στομάχου) ή D2 (D1 και επιπλέον λεμφαδένες στη περιοχή της αριστερής γαστρικής αρτηρίας, της κοινής ηπατικής αρτηρίας, της κοιλιακής αρτηρίας, της σπληνικής αρτηρίας και των πυλών του σπληνός). Στον ασθενή Νο 5 έγινε επιπλέον σπληνεκτομή λόγω ιατρογενούς αιμορραγίας, ενώ στο ασθενή Νο 3 ο σπλήνας αφαιρέθηκε στα πλαίσια της ουραίας παγκρεατεκτομής, λόγω εξωφυτικής επέκτασης του όγκου στην κάψα του παγκρέατος. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε R0 εκτομή (μακροσκοπικά και μικροσκοπικά υγιή όρια).

Μία ώρα προεγχειρητικά χορηγήθηκε ενδοφλέβια αντιβίωση (αμπικιλίνη και σουλμπακτάμη). Όλες οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε γενική ενδοφλέβια αναισθησία με ενδοτραχειακή διασωλήνωση. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο χορήγησης αναισθησίας σε όλες τις περιπτώσεις, που περιλάμβανε: προνάρκωση με μιδαζολάμη, εισαγωγή στην αναισθησία με ενδοφλέβια χορήγηση φαιντανύλης,

προποφόλης και μυοχαλαρωτικών, ενώ η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με εισπνεόμενο σεβοφλουράνιο.

1.2.2 Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του στομάχου

Μετεγχειρητικά εξασφαλίστηκε αναλγησία με ενδοφλέβια αντλία μορφίνης, ενώ οι ασθενείς λάμβαναν ενδοφλέβια αντιβιοτική αγωγή (αμπικιλίνη και σουλμπακτάμη) ανά 8ωρο. Η διάρκεια νοσηλείας των ασθενών κυμάνθηκε από 7 έως 10 ημέρες, εκτός από την περίπτωση του ασθενούς Νο 3, που χειρουργήθηκε ξανά τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα λόγω εμφάνισης ενδοκοιλιακών συλλογών (έκπλυση της κοιλίας και τοποθέτηση παροχετεύσεων) και έλαβε εξιτήριο την 35^η μετεγχειρητική ημέρα.

Η ιστολογική εξέταση των παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε από τον ίδιο έμπειρο παθολογοανατόμο. Οι ασθενείς με καρκίνο στομάχου εκτιμήθηκαν στο Ογκολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στις περιπτώσεις ανεύρεσης διηθημένων λεμφαδένων στο ιστολογικό παρασκεύασμα ακολουθούσε επικουρική χημειοθεραπεία, σύμφωνα με τα τρέχοντα πρωτόκολλα.

Οι ιατρικοί φάκελοι των ασθενών μελετήθηκαν με σκοπό να αξιολογηθεί το ποσοστό εμφάνισης τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένης μετάστασης καθώς και να εκτιμηθεί η συνολική επιβίωση των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Η παρακολούθηση (follow-up) έφτασε έως και τους 52 μήνες μετά το χειρουργείο. Η ασθενής Νο 1 απεβίωσε 18 μήνες μετά την επέμβαση (έμφραγμα μυοκαρδίου). Η ασθενής Νο 6 εμφάνισε μετάσταση στους λεμφαδένες των πυλών του ήπατος και απεβίωσε 36 μήνες μετά το χειρουργείο. Η ασθενής Νο 7 απεβίωσε 36 μήνες μετά το χειρουργείο. Οι υπόλοιποι ασθενείς δεν εμφάνισαν σημεία τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένων μεταστάσεων κατά τον τελευταίο έλεγχο (στους 50-52 μήνες).

1.3 Ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του παχέος εντέρου (κόλον) κατά το χρονικό διάστημα 04/06/2009 έως 17/09/2010. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 8 ασθενείς (5 γυναίκες και 3 άνδρες) με νεοπλασματική εξεργασία στο παχύ έντερο, ηλικίας 34 έως 77 ετών (ομάδα μελέτης) και 8 υγιείς αιμοδότες (5 γυναίκες και 3 άνδρες), ηλικίας 30 έως 57

από το τμήμα Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ομάδα ελέγχου). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Ασθενής	Ηλικία	Πάθηση	Τύπος επέμβασης	TNM Στάδιο
1	77	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθοσιγμοειδούς + εκτομή τμήματος τελιού ειλεού	ΑδενοCa παχέος εντέρου T4bN1
2	51	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθοσιγμοειδούς	ΑδενοCa παχέος εντέρου T3aN0
3	71	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Σιγμοειδεκτομή	ΑδενοCa παχέος εντέρου T1N0
4	59	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθοσιγμοειδούς	ΑδενοCa παχέος εντέρου T3N1
5	52	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθοσιγμοειδούς	ΑδενοCa παχέος εντέρου T3N1
6	68	Νεόπλασμα εγκαρσίου κόλου	Εγκαρσειεκτομή	ΑδενοCa παχέος εντέρου T3N0
7	66	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθοσιγμοειδούς + AP ωοθηκεκτομή	ΑδενοCa παχέος εντέρου T4aN0
8	34	Νεόπλασμα σιγμοειδούς κόλου	Εγκαρσειεκτομή	ΑδενοCa παχέος εντέρου T3N0

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ασθενών με καρκίνο του εντέρου που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

1.3.1 Στοιχεία Επέμβασης

Οι ασθενείς είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη κακοήθεια με ενδοσκοπικά ληφθείσα βιοψία πριν από το χειρουργείο. Πριν την επέμβαση διενεργήθηκε η τυπική σταδιοποίηση με Αξονική Τομογραφία κοιλίας και θώρακα και σε όλες τις περιπτώσεις ο όγκος θεωρήθηκε προεγχειρητικά εξαιρέσιμος, κάτι που επιβεβαιώθηκε και διεγχειρητικά. Ο τύπος της επέμβασης σε κάθε περίπτωση υπαγορεύτηκε από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου του εκάστοτε ασθενούς, λαμβάνοντας υπόψη τα διεθνώς αποδεκτά ογκολογικά πρότυπα. Κανένας ασθενής δεν υποβλήθηκε σε νέο-επικουρική (neo-adjuvant) χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία.

Όλες οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, από τον ίδιο έμπειρο Χειρουργό. Στην ασθενή Νο 1 έγινε επιπλέον εκτομή τμήματος λεπτού εντέρου μήκους περίπου 30 εκατοστών (τελικός ειλεός) λόγω σύμφυσης του με τον όγκο, ενώ στην ασθενή Νο 7 πραγματοποιήθηκε συνοδός αριστερή ωοθηκεκτομή για τον ίδιο λόγο. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε R0 εκτομή (μακροσκοπικά και μικροσκοπικά υγιή όρια).

Μία ώρα προεγχειρητικά χορηγείται ενδοφλέβια αντιβίωση (κεφουροξίμη και μετρονιδαζόλη). Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε γενική ενδοφλέβια αναισθησία με ενδοτραχειακή διασωλήνωση. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο χορήγησης αναισθησίας σε όλες τις περιπτώσεις, που περιλάμβανε: προνάρκωση με μιδαζολάμη, εισαγωγή στην αναισθησία με ενδοφλέβια χορήγηση φαιντανύλης, προποφόλης και μυοχαλαρωτικών, ενώ η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με εισπνεόμενο σεβοφλουράνιο.

1.3.2. Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του εντέρου

Μετεγχειρητικά εξασφαλίστηκε αναλγησία με ενδοφλέβια αντλία μορφίνης, ενώ οι ασθενείς λάμβαναν ενδοφλέβια αντιβιοτική αγωγή ανά 8ωρο. Η διάρκεια νοσηλείας των ασθενών κυμάνθηκε από 7 έως 10 ημέρες, χωρίς να παρουσιαστούν μείζονες μετεγχειρητικές επιπλοκές, με μόνη εξαίρεση την ασθενή Νο 3. Η εν λόγω ασθενής ξαναχειρουργήθηκε την 3^η ημέρα προκειμένου να ελεγχθεί μείζων ενδοκοιλιακή αιμορραγία (λόγω λήψης χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης σε θεραπευτική δόση για προσθετική βαλβίδα) και έκτοτε παρέμεινε διασωληνωμένη στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, όπου και απεβίωσε την 32^η μετεγχειρητική ημέρα.

Η ιστολογική εξέταση των παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε από τον ίδιο έμπειρο Παθολογοανατόμο. Οι ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου εκτιμήθηκαν στο Ογκολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στις περιπτώσεις ανεύρεσης διηθημένων λεμφαδένων στο ιστολογικό παρασκεύασμα ακολουθούσε επικουρική χημειοθεραπεία, σύμφωνα με τα τρέχοντα θεραπευτικά πρωτόκολλα.

Οι φάκελοι των ασθενών μελετήθηκαν με σκοπό να ελεχθεί η εμφάνιση τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένης μετάστασης καθώς και να προσδιορισθεί η συνολική επιβίωση των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Η παρακολούθηση

(follow-up) έφτασε έως και τους 66 μήνες μετά το χειρουργείο (τελευταίος έλεγχος 04/06/12). Η ασθενής Νο 1 εμφάνισε ηπατικές μεταστάσεις στον επανέλεγχο στους 30 μήνες μετά την επέμβαση και δεν ξαναπαρουσιάστηκε στο Ογκολογικό Ιατρείο. Η ασθενής Νο 3 απεβίωσε την 32^η μετεγχειρητική ημέρα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ο ασθενής Νο 4 εμφάνισε μονήρη ηπατική μετάσταση στο τμήμα VIII του ήπατος 42 μήνες μετά την αρχική επέμβαση και υποβλήθηκε σε επιτυχή μεταστασιεκτομή. Η ασθενής Νο 7 απεβίωσε 30 μήνες μετά την επέμβαση ενώ λάμβανε χημειοθεραπεία λόγω εμφάνισης ηπατικών μεταστάσεων. Οι υπόλοιποι ασθενείς δεν εμφάνισαν σημεία τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένων μεταστάσεων κατά τον τελευταίο έλεγχο (στους 66 μήνες).

1.4 Ασθενείς με Οξεία Μυελογενής λευχαιμία (Ο.Μ.Λ.)

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με Ο.Μ.Λ της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Οι ημερομηνίες συλλογής των δειγμάτων φαίνονται στον Πίνακα 4. Πιο συγκεκριμένα επεξεργαστήκαμε δείγματα 9 ασθενών με ΟΜΛ (σε πέντε ασθενείς η επιλογή CD34+ κυττάρων έγινε σε αποθηκευμένα μονοπύρηννα κύτταρα σε υγρό άζωτο και σε τρεις η επιλογή έγινε σε μονοπύρηννα που απομονώσαμε την ίδια μέρα). Για τους δύο υγιείς μάρτυρες η απομόνωση των μονοπύρηννων από αίμα έγινε άμεσα την ημέρα της αιμοληψίας.

Ασθενείς	Ημερομηνία αποθήκευσης	Ιστός	Ημερομηνία ξεπαγώματος
Δ1	6.9.2012	Μυελός των οστών	6.11.2014
Δ2	12.6.2012	Μυελός των οστών	11.11.2014
Δ3	28.6.2012	Περιφερικό αίμα	13.11.2014
Δ4	22.8.2012	Περιφερικό αίμα	14.11.2014
Δ5	31.10.2013	Μυελός των οστών	18.11.2014
Δ6	29.5.2012	Μυελός των οστών	19.11.2014
Δ7	Δεν έγινε αποθήκευση	Μυελός των οστών	Άμεση επεξεργασία
Δ8	26.2.2013	Μυελός των οστών	20.11.2014
Δ9	Δεν έγινε αποθήκευση	Μυελός των οστών	Άμεση επεξεργασία

Δ10	Δεν έγινε αποθήκευση	Περιφερικό αίμα	Άμεση επεξεργασία
Δ11	2.12.2014	Περιφερικό αίμα	2.12.2014
Δ12	Δεν έγινε αποθήκευση	Περιφερικό αίμα	Άμεση επεξεργασία
Control 1	Δεν έγινε αποθήκευση	Περιφερικό αίμα	Άμεση επεξεργασία
Control 2	Δεν έγινε αποθήκευση	Περιφερικό αίμα	Άμεση επεξεργασία

Πίνακας 4. Δείγματα οξείας μυελογενής λευχαιμίας που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

2. Βιολογικό υλικό

2.1 Συλλογή αίματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, στομάχου και εντέρου

Τα δείγματα αίματος προήλθαν από ασθενείς με τρεις τύπους συμπαγών όγκων (μαστού, στομάχου και εντέρου) και από υγιείς αιμοδότες του τμήματος Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Οι αιμοληψίες έγιναν στις ακόλουθες χρονικές στιγμές: για τους ασθενείς, την προηγούμενη του χειρουργείου ημέρα (σήμανση ως PRE), την 1η, 3η, 7η και 30η μετεγχειρητική ημέρα (σήμανση ως D1, D3, D7 και D30 αντίστοιχα), ενώ όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού για τις ασθενείς με καλοήγη νόσο μαστού έγινε αιμοληψία την προηγούμενη του χειρουργείου ημέρα (σήμανση ως PRE), και την 1η και 3η μετεγχειρητική ημέρα (σήμανση ως D1 και D3 αντίστοιχα). Σε κάθε περίπτωση έγινε συλλογή φλεβικού αίματος συνολικού όγκου 16 ml με φλεβοκέντηση μέσω κλειστού συστήματος (21G BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set, BD Diagnostics®, NJ USA) και πάντα με την εφαρμογή γαντιών λάτεξ μιας χρήσης, από το ίδιο κάθε φορά άτομο, σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και κατά τις πρωινές ώρες (8-9 π.μ.). Ακολούθως γινόταν διαχωρισμός της συλλεγόμενης ποσότητας αίματος σε 2 ειδικά φιαλίδια απομόνωσης miRNA/mRNA (PAXgene™ Blood RNA Tubes, PreAnalytix®, GmbH) και 4 φιαλίδια που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για γενική εξέταση αίματος (BD Vacutainer® tubes, BD Diagnostics®, NJ USA).

Κάθε φιαλίδιο miRNA περιείχε 6,9 ml ειδικού αντιδραστηρίου για την απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών και συμπληρωνόταν με 2,5 ml από το συλλεγόμενο αίμα, ενώ τα φιαλίδια γενικής αίματος που περιείχαν αντιπηκτικό

K2EDTA σε συγκέντρωση of 3,6mg/ml πληρούνταν με 2 ml φλεβικού αίματος το καθένα. Μετά από ήπια ανάδευση, τα φιαλίδια απομόνωσης mRNA παρέμεναν σε όρθια θέση για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή), προκειμένου να απενεργοποιηθούν οι ριβονουκλεάσες του περιφερικού αίματος. Στη συνέχεια μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπου και αποθηκεύονταν σε ειδικό καταψύκτη στους -80oC, μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας τους.

Τα δείγματα αίματος που είχαν συλλεχθεί σε φιαλίδια της γενικής αίματος υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3.000 στροφές/λεπτό (θερμοκρασία δωματίου), στα Εργαστήρια του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και σε χρονικό διάστημα εντός 30 λεπτών από τη διενέργεια της αιμοληψίας. Το υπερκείμενο συλλεγόταν με πιπέτα και τοποθετούταν σε σωληνάρια Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz, GmbH), τα οποία επίσης μεταφέρονταν και αποθηκεύονταν στη Βιοτράπεζα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν εντός δύο ετών από την στιγμή της συλλογής τους.

2.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων και Αποθήκευση

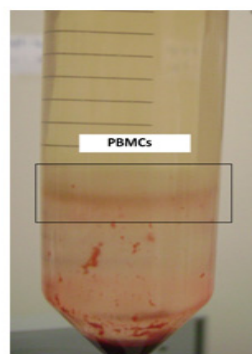
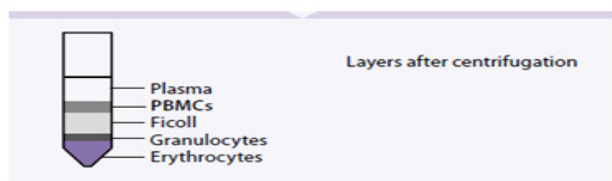
Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων θα πρέπει να πραγματοποιείται εντός 24 ωρών από την στιγμή της δειγματοληψίας. Υπάρχει βέβαια και η πιθανότητα το δείγμα να μην είναι κατάλληλο για την απομόνωση των κυττάρων κάτι που μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το αίμα ή ο μυελός να έχουν πήγμα, είτε λόγω αιμόλυσης ή πιθανά και από την ίδια τη διαδικασία της δειγματοληψίας. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος ή μυελού γίνεται σε σωληνάκια συλλογής αίματος που περιέχουν αντιπηκτικό (EDTA), ενώ όλη η διαδικασία πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή, ώστε να αποφευχθούν πιθανές μολύνσεις και των δειγμάτων και του προσωπικού.

Όλα τα αντιδραστήρια, τα διαλύματα καθώς και οι πιπέτες και τα σωληνάρια φυγοκέντρησης είναι αποστειρωμένα. Επιπλέον, όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται εντός του θαλάμου νηματικής ροής, ο οποίος προσφέρει άσηπτες συνθήκες και ένα αποστειρωμένο και ασφαλές περιβάλλον.

Εκτέλεση

- Σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 50 ml (falcon), προσθέτουμε 15 ml Ficoll-Histopaque.

- Σε δεύτερο falcon των 50 ml προσθέτουμε το δείγμα μας (περιφερικό αίμα ή μυελός) και συμπληρώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS μέχρι τα 30 ml. Το PBS είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με σύσταση 154 mM NHCl, 1,54 mM KH₄PO₄, 2,7 Na₂HPO₄, και έχει την ιδιότητα να κρατά το διάλυμα ισοτονικό έτσι ώστε να προφυλάσσονται τα κύτταρα από τη λύση λόγω διαφοράς στην ωσμωτική πίεση.
- Μεταφέρουμε με προσοχή το δείγμα μας με το ρυθμιστικό διάλυμα, στον αρχικό σωλήνα που περιέχει τη φικόλη, με τη βοήθεια της πιπέτας Pasteur. Ο σωλήνας μας πρέπει να βρίσκεται υπό κλίση, ώστε να αποφύγουμε την ανάμειξη των δύο υγρών (η φικόλη είναι τοξική για τα κύτταρα).
- Φυγοκεντρούμε στα 1600 rpm για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο, προκειμένου να πετύχουμε βαθμιαία στρωματοποίηση βάσει πυκνότητας.
- Απομακρύνουμε με προσοχή το falcon από τη φυγόκεντρο (στο σημείο αυτό είναι ορατές πλέον οι στοιβάδες που δημιουργούνται, *εικόνα 3*).
- Με τη βοήθεια της πιπέτας Pasteur μεταφέρουμε την στοιβάδα των μονοπύρηνων σε ένα καινούριο falcon και ξεκινάμε τις πλύσεις, προκειμένου να απομακρύνουμε ό,τι υπόλοιπο σε ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια έχουν απομείνει.
- Προσθέτουμε 30 ml PBS και ανακινούμε προσεκτικά, με το χέρι.
- Φυγοκεντρούμε στα 1.600 rpm για 10 min, με φρένο (πρώπλύση).
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και στο ίζημα προσθέτουμε 10 ml PBS.
- Αναδεύουμε με το χέρι, μέχρι να διαλυθεί το ίζημα (δεύτερη πλύση).
- Φυγοκεντρούμε στα 1.400 rpm για 5 min, με φρένο.



Εικόνα 3. Στρωματοποίηση του δείγματος μετά από ήπια φυγοκέντρωση.

- Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 400 μ L θρεπτικό υλικό FBS), που φυλάσσεται στους -20°C (έχει προηγηθεί η

απενεργοποίηση του στους 56°C σε υδατόλουτρο). Αναμιγνύουμε μερικές φορές με την πιπέτα.

- Μοιράζουμε το δείγμα εισάγοντας από 200μl σε δυο cryovials (ειδικά σωληνάρια τύπου erppendorff, σχεδιασμένα να αντέχουν σε χαμηλές θερμοκρασίες της τάξης των -196⁰C), τα οποία είναι ήδη τοποθετημένα στον πάγο και προσθέτουμε σταγόνα-σταγόνα 800 μl διαλύματος RPMI/DMSO (700 μl RPMI, 100 μl DMSO) στο κάθε ένα. Αναμιγνύουμε απαλά με την πιπέτα (το DMSO είναι ένα διάλυμα που προστατεύει τα κύτταρα μας σε χαμηλές θερμοκρασίες, για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων στο εσωτερικό τους. Έχει ισχυρή κυτταροτοξική δράση, γι' αυτό όταν προσθέτουμε το DMSO στα κύτταρα, θα πρέπει να βρίσκονται στον πάγο για να μην καταστραφούν).
- Αποθηκεύουμε προσωρινά, για λίγα 24ωρα στους -80°C. Τοποθετούνται στη θήκη Cool Cell, η οποία έχει την ικανότητα να μειώνει τη θερμοκρασία κατά 1°C/min. Με αυτό το τρόπο αποφεύγεται η γρήγορη πτώση της θερμοκρασίας στα δείγματα, με αποτέλεσμα να προφυλάσσονται τα κύτταρα από θερμικό σοκ κατά την απότομη πτώση της θερμοκρασίας. Τα δείγματα μεταφέρονται από τους -80°C στο υγρό άζωτο (-196°C), όπου και φυλάσσονται για απεριόριστο χρονικό διάστημα.
 - ✓ Το δοχείο μόνιμης αποθήκευσης των δειγμάτων, είναι δοχείο αζώτου αέριας φάσης και βρίσκεται στο ερευνητικό εργαστήριο της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Έχει 6 θέσεις για κάνιστρα στα οποία τοποθετούνται τα δείγματα, μέσα σε ειδικές ράβδους (straws). Σε κάθε ράβδο, μπορούν να αποθηκευτούν έως 5 cryovials.

3. Επεξεργασία βιολογικού υλικού

3.1 Απομόνωση ολικού RNA από αίμα ασθενών με συμπαγείς όγκους

Απομόνωση RNA από ολικό αίμα:

PAXgene® Blood RNA Kit

Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

- Πιπέτες 1000 μl/100 μl
- Φυγόκεντρος swing-out rotor
- Φυγόκεντρος (Kubota 3500)

- Επωαστήρας με ανάδευση
- Πάγος, parafilm
- Αντιδραστήρια και υλικά του PAXgene® Blood RNA Kit (PreAnalytiX)

Προετοιμασία

Αφήνουμε το σωληνάριο σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεπαγώσει τελείως και να έχει έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.

- Θέτουμε τη θερμοκρασία του επωαστήρα στους 55°C.
- Το δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (binding buffer, BR2) μπορεί, μετά από μακροχρόνια αποθήκευση, να σχηματίσει ίζημα. Εάν είναι αναγκαίο διαλύουμε το ίζημα με θέρμανση στους 37°C.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 2 (binding buffer, BR4) παραδίδεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν από την πρώτη χρήση προσθέτουμε στη φιάλη τον τετραπλάσιο όγκο αιθανόλης (96–100 % βαθμός καθαρότητας), όπως αναφέρεται στη φιάλη, για την παρασκευή διαλύματος εργασίας. (+ 44 ml)
- Πριν από την πρώτη χρήση του set DNάσης ελεύθερου RNάσης, ετοιμάζουμε ένα διάλυμα αποθήκευσης DNάσης I. Διαλύουμε τη DNάση σε 550 μl ρυθμιστικού διαλύματος επανασύστασης DNάσης (DRB), το οποίο περιέχεται στο κιτ.

Πρωτόκολλο

1. Φυγοκεντρούμε το PAXgene Blood RNA Tube για 10 min στα 3000-5000 x g χρησιμοποιώντας το swing-out rotor.
Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό με πιπέτα ή decanting.
2. Προσθέτουμε 4 ml RNase-free water στο ίζημα.
Κλείνουμε το tube χρησιμοποιώντας μια fresh secondary BD Hemogard closure.
Κάνουμε vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 3000-5000 g χρησιμοποιώντας το *swing-out rotor*.
Αφαιρούμε ολόκληρο το υπερκείμενο με πιπέτα ή decanting και απορρίπτοντας το.
✓ Μικρά υπολείμματα στο υπερκείμενο μετά το vortex αλλά πριν τη φυγοκέντρηση δεν επηρεάζουν τη διαδικασία
3. Προσθέτουμε 350 μl resuspension buffer (BR1).

Κάνουμε vortex μέχρι να επαναδιαλυθεί το ίζημα ολοκληρωτικά.

4. Μεταφέρετε το δείγμα με μία πιπέτα σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,5ml (MCT).
5. Προσθέτουμε 300 µl binding buffer (BR2) και 40 µl πρωτεΐνάσης K (PK)
Κάνουμε vortex για 5s.
Επιάζουμε για 10 min στους 55°C σε ένα shaker-incubator στις 400-1400 rpm.
✓ Μετά την επώαση ρυθμίζω το shaker-incubator στους 65 °C για το στάδιο 20.
Δεν αναμιγνύουμε την proteinase K και Buffer BM2 πριν τα προσθέσουμε στο δείγμα.
6. Μεταφέρουμε με πιπέτα το lysate κατευθείαν στην PAXgene Shredder spin column (lilac) PSC, την οποία προηγουμένως έχουμε τοποθετήσει στο 2 ml processing tube (PT).
Φυγοκεντρούμε για 3 min στη μέγιστη ταχύτητα (<20000 g).
7. Μεταφέρουμε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο του flow-through σε ένα 1,5 ml microcentrifuge tube (MCT) χωρίς να πειράζουμε την pellet.
8. Προσθέτουμε 350 µl αιθανόλης (96-100%).
9. Κάνουμε vortex.
Φυγοκεντρούμε για μικρό χρονικό διάστημα (1-2 s σε 500-1000 g) για να απομακρύνουμε ότι υπάρχει.
10. Μεταφέρουμε μία πιπέτα 700 µl του δείγματος στην στήλη PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη), την οποία έχουμε τοποθετήσει στο 2 ml processing tube (PT).
Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 8,000-20,000 g.
Μεταφέρουμε την PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη) σε ένα 2 ml processing tube (PT).
Απορρίπτουμε το προηγούμενο tube με το flow-through.
11. Μεταφέρουμε με πιπέτα το υπόλοιπό του δείγματος στην στήλη PAXgene RNA spin column (PRC).
Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 8,000-20,000 g
Μεταφέρουμε την PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη) σε ένα 2 ml processing tube (PT).
Απορρίπτουμε το προηγούμενο tube με το flow-through.
12. Προσθέτουμε 350 µl wash buffer 1 (BR3) στην στήλη PAXgene RNA Spin (PRC).
Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 8,000-20,000 g
Μεταφέρουμε την PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη) σε ένα 2 ml

- processing tube (PT).
- Απορρίπτουμε το προηγούμενο tube με το flow-through
- 13.** Μεταφέρουμε 10 µl DNase I (RNFD) stock solution σε 70 µl DNA digestion buffer (RDD) σε ένα 1,5 ml microcentrifuge tube (MCT).
- Αναμιγνύουμε με ελαφρά χτυπήματα.
- Φυγοκεντρούμε για μικρό χρονικό διάστημα για τη συλλογή του υπόλοιπου υγρού από τα τοιχώματα του tube.
- 14.** Μεταφέρουμε με πιπέτα το μίγμα επώασης της DNάσης I (80µl) κατευθείαν στη μεμβράνη PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη).
- Αφήνω στον πάγκο για 15 min στους 20-30 °C.
- 14.** Προσθέτουμε 350 µl wash buffer 1 (BR3) στην στήλη PAXgene RNA Spin (PRC)
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 8,000-20,000 x g.
- Μεταφέρουμε την PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη) σε ένα 2 ml processing tube (PT).
- Απορρίπτουμε το προηγούμενο tube με το flow-through.
- 15.** Μεταφέρουμε 500 µl wash buffer 2 (BR4) στην στήλη PAXgene RNA Spin (PRC).
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 8,000-20,000 g.
- Μεταφέρουμε την PAXgene RNA spin column (PRC, κόκκινη) σε ένα 2 ml processing tube (PT).
- Απορρίπτουμε το προηγούμενο tube με το flow-through.
- 16.** Προσθέτουμε και άλλα 500 µl wash buffer 2 (BR4) στην στήλη PAXgene RNA Spin (PRC).
- Φυγοκεντρούμε για 3 min στα 8,000-20,000 g.
- Μεταφέρουμε την στήλη PAXgene RNA Spin (PRC) σε ένα 2 ml processing tube (PT).
- Απορρίπτουμε το προηγούμενο tube με το flow-through.
- Φυγοκεντρούμε για 1 min σε 8,000-20,000 g.
- 17.** Απομακρύνουμε το 2 ml processing tube (PT) μαζί με το flow-through.
- Μεταφέρουμε στήλη PAXgene RNA Spin (PRC) σε ένα 1,5 ml microcentrifuge tube (MCT).
- Μεταφέρουμε με πιπέτα 40 µl elution buffer (BR5) κατευθείαν στη μεμβράνη της

στήλης PAXgene RNA Spin (PRC).

Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 8,000-20,000 x g για την εκχύλιση RNA.

18. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με 40 µl elution buffer (BR5) και το ίδιο 1,5 ml microcentrifuge tube (MCT).
19. Επωάζουμε το εκχύλισμα για 5 min στους 65 °C στο shaker-Incubator χωρίς όμως ανάδευση.
Τα μεταφέρουμε απευθείας στον πάγο.
20. Αποθήκευση στους -20 °C ή -70 °C.

Απομόνωση RNA από πλάσμα: TRIZOL

TRIZOL LS® Reagent

Ομογενοποίηση δειγμάτων

1. Προσθέτουμε 0,75 ml Trizol ®LS Reagent ανά 0,25ml του όγκου του δείγματος.
2. Ομογενοποιούμε το δείγμα πιπετάροντας το εναιώρημα πάνω και κάτω πολλές φορές.

Φάση Διαχωρισμού

1. Επωάζουμε το ομογενοποιημένο δείγμα για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε 0,2 ml χλωροφόρμιο ανά 0,75 ml Trizol LS Reagent που χρησιμοποιείται για ομογενοποίηση. Έντονη ανακίνηση του σωλήνα για 15sec
3. Επωάζουμε για 2-15min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκεντρούμε του δείγματος στα 12000 x g για 15 min στους 4 °C.
5. Αφαιρούμε την υδάτινη φάση του δείγματος.
6. Μεταφέρουμε την υδάτινη φάση σε νέο σωληνάκι και επακόλουθη διαδικασία απομόνωσης του RNA
7. Αποθηκεύουμε την ενδιάμεση και οργανική φάση για απομόνωση DNA ή πρωτεϊνών αντίστοιχα.

Διαδικασία απομόνωσης RNA

Κατακρήμνιση RNA:

1. Προσθέτουμε 0,5 ml 100% ισοπροπανόλης στην υδάτινη φάση ανά 0,75 ml Trizol LS Reagent που χρησιμοποιείται για ομογενοποίηση.
2. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

3. Φυγοκεντρούμε στα 12000 x g στους 4 °C για 10 min.

Πλύση RNA και επαναιώρηση:

1. Απομακρύνουμε υπερκείμενου αφήνοντας μόνο το ίζημα του RNA
2. Πλένουμε με 1 ml 75% αιθανόλης ανά 0,75 ml Trizol LS Reagent που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση. Vortex για ανάμειξη του δείγματος
3. Φυγοκεντρούμε το δείγμα στα 7500 x g για 5min στους 4 °C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
4. Ξηραίνουμε το ίζημα του RNA για 5-10min (δεν πρέπει το RNA να στεγνώσει εντελώς γιατί μπορεί να χάσει τη διαλυτότητά του)
5. Επαναιώρηση του ιζήματος RNA σε νερό RNase-free ή σε 0,5% διάλυμα SDS
6. Επώαση σε water bath ή heat block set στους 55-60 °C για 10-15 min
7. Αποθήκευση στους -70 °C

3.2 Απομόνωση miRNA από αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου και εντέρου

Απομόνωση miRNA από ολικό αίμα:

PAXgene® Blood miRNA Kit

Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

- Πιπέτες 1000 μl/100 μl
- Φυγόκεντρος swing-out rotor
- Φυγόκεντρος (Kubota 3500)
- Επωαστήρας με ανάδευση
- Πάγος, parafilm
- Αντιδραστήρια και υλικά του PAXgene® Blood RNA Kit (PreAnalytiX)

Πρωτόκολλο

1. Φυγοκεντρούμε το PAXgene Blood RNA Tube για 10 min στα 3000-5000 x g χρησιμοποιώντας το *swing-out rotor*.
2. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με πιπέτα ή decanting.

- Προσθέτουμε 4 ml RNase-free water στο ίζημα.
- Κλείνουμε το tube χρησιμοποιώντας μια fresh secondary Hemogard closure.
3. Κάνουμε vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 3000-5000 x g χρησιμοποιώντας το *swing-out rotor*.
Αφαιρούμε ολόκληρο το υπερκείμενο με πιπέτα ή decanting και απορρίπτοντας το.
✓ *Μικρά υπολείμματα στο υπερκείμενο μετά το vortex αλλά πριν τη φυγοκέντρωση δεν επηρεάζουν τη διαδικασία.*
 4. Προσθέτουμε 350 μl buffer BM1.
Κάνουμε vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα τελείως.
 5. Μεταφέρουμε με πιπέτα το δείγμα σε ένα 1.5 ml microcentrifuge tube.
Προσθέτουμε 300 μl Buffer BM2 και 40 μl proteinase K.
Κάνουμε vortex για 5 s.
Επώαζουμε για 10 min στους 55 °C σε ένα shaker-incubator στις 400-1400 rpm

✓ *Μετά την επώαση ρυθμίζω το shaker-incubator στους 65 °C για το στάδιο 20. Δεν αναμιγνύουμε την proteinase K και Buffer BM2 πριν τα προσθέσουμε στο δείγμα*
 6. Μεταφέρουμε το δείγμα στην PAXgene Shredder spin column (lilac) η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα processing tube 2 ml.
Φυγοκεντρούμε για 3 min σε μέγιστη ταχύτητα (να μην υπερβαίνει 20,000 x g).
 7. Μεταφέρουμε όλο το υπερκείμενο του flow-through από την PAXgene Shredder spin column σε ένα νέο 1,5 ml microcentrifuge tube χωρίς να πάρουμε καθόλου ίζημα.
 8. Προσθέτουμε 700 μl **ισοπροπανόλη** (100% purity)
Κάνουμε vortex
 9. Μεταφέρουμε 700 μl του δείγματος στην PAXgene Shredder spin column (κόκκινη) η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα processing tube 2 ml.
Κλείνουμε *απαλά* και Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 8000-20,000 x g.
Τοποθετούμε τη spin στήλη σε ένα processing tube 2 ml.
Πετάμε το προηγούμενο tube μαζί με το flow-through.
 10. Μεταφέρουμε το υπόλοιπο δείγμα στην PAXgene Shredder spin column (κόκκινη).
Κλείνουμε *απαλά* και Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 8000-20,000 x g.

Τοποθετούμε την spin στήλη σε ένα processing tube 2 ml.

Πετάμε το προηγούμενο tube μαζί με το flow-through.

- 11.** Προσθέτουμε 350 μl Buffer BM3 στην PAXgene Shredder spin column.

Κλείνουμε *απαλά* και Φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000-20,000 x g.

Τοποθετούμε την spin στήλη σε ένα processing tube 2 ml.

Πετάμε το προηγούμενο tube μαζί με το flow-through.

- 12.** Προσθέτουμε 10 μl DNase I stock σε 70 μl Buffer RDD σε ένα microcentrifuge tube των 1,5 ml.

Αναδεύουμε ανακινώντας το tube.

Φυγοκεντρούμε σύντομα για να συλλέξουμε ότι έχει μείνει.

- 13.** Μεταφέρουμε 80 μl DNase I απευθείας στη μεμβράνη της PAXgene RNA spin στήλης.

Επιάζουμε στο benchtop (πάγκος) (20-30 °C) για 15 min.

- 14.** Προσθέτουμε 350 μl Buffer BM3 στην PAXgene RNA spin column.

Κλείνουμε *απαλά* και φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000-20,000 x g.

Τοποθετούμε την spin στήλη σε ένα processing tube 2 ml.

Πετάμε το προηγούμενο tube μαζί με το flow-through.

- 15.** Προσθέτουμε 500 μl Buffer BM4 στην PAXgene RNA spin column.

Κλείνουμε *απαλά* και Φυγοκεντρούμε για 15 s στα 8000-20000 g.

Απορρίπτουμε το flow-through.

Τοποθετούμε τη spin στήλη σε ένα processing tube 2 ml.

Πετάμε το προηγούμενο tube μαζί με το flow-through.

- 16.** Προσθέτουμε άλλα 500 μl Buffer BM4 στην PAXgene RNA spin column.

Κλείνουμε *απαλά* και φυγοκεντρούμε για 2 min στα 8000-20,000 x g.

Αφαιρούμε την PAXgene RNA spin column από το processing tube 2ml ώστε να μην έρθει σε επαφή η στήλη με το flow-through.

- 17.** Απορρίπτουμε το processing tube 2 ml που περιέχει το flow-through.

Τοποθετούμε τη spin στήλη σε ένα processing tube 2 ml.

Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 8000-20,000 x g.

- 18.** Απορρίπτουμε το processing tube 2 ml που περιέχει το flow-through.

Τοποθετούμε τη spin στήλη σε ένα microcentrifuge tube των 1.5 ml.

Μεταφέρουμε 40 μl Buffer BR5 κατευθείαν στη μεμβράνη της στήλης.

Κλείνουμε *απαλά* και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 8000-20,000 x g για να εκλούσουμε το RNA.

19. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 18 χρησιμοποιώντας 40 μl Buffer BR5 στο ίδιο microcentrifuge tube.
20. Επιάζουμε το εκλούμενο RNA για 5 min στους 65 °C στο shaker-incubator χωρίς ανάδευση.
Τοποθετούμε κατευθείαν στον πάγο.
21. Αποθηκεύουμε στους – 20 °C ή στους – 70 °C.

3.3 Απομόνωση CD34+ κύτταρων και miRNA/mRNA/DNA από μονοκύρηνα κύτταρα ασθενών με Ο.Μ.Λ.

Ξεπάγωμα κυττάρων

Το ξεπάγωμα των κυττάρων τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο (-196°C) αποτελεί μία πολύ ευαίσθητη διαδικασία την οποία πραγματοποιούμε με λεπτούς χειρισμούς. Τέτοιοι χειρισμοί είναι απαραίτητοι ώστε να αποφύγουμε το θάνατο των κυττάρων αυτών, τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα.

Εργαστηριακός εξοπλισμός-Υλικά

- Υδατόλουτρο
- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 15ml (falcon, Corning 15 centrifuge tube)
- Ηλεκτρικός αναρροφητήρας πιπετών
- Πιπέτα 10ml
- Πιπέτα 1000μl
- RPMI (Gibco)
- PBS (Gibco, pH 2,7)

Πρωτόκολλο

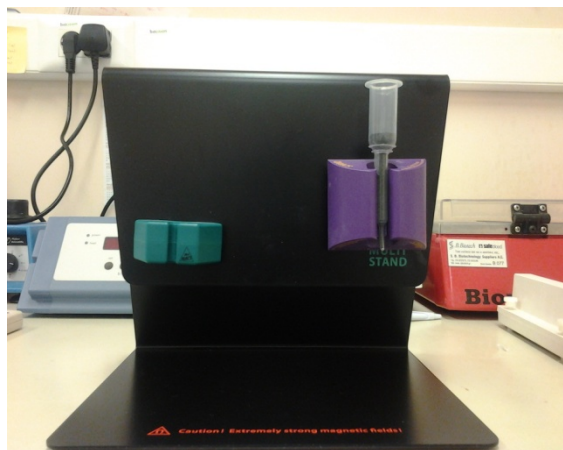
1. Τοποθετούμε για δύο με τρία περίπου λεπτά τα cryovials στο προθερμασμένο στους 37°C υδατόλουτρο, έως ότου ξεπαγώσει μέρος των κυττάρων (δεν πρέπει να ξεπαγώσει ολόκληρη η μάζα των κυττάρων καθώς το DMSO που περιέχεται είναι κυτταροτοξικό).
2. Μεταφέρουμε 1ml από το κάθε cryovial σε δυο σωληνάκια φυγοκέντρησης των 15ml (falcon) και σε κάθε ένα από αυτά προσθέτουμε 10ml προθερμασμένο RPMI.

3. Φυγοκεντρούμε στα 200 x g για 10min.
4. Απορρίπτουμε το RPMI και κρατάμε μόνο το ίζημα των μονοκύτταρων κυττάρων.
5. Αραιώνουμε το ίζημα σε τελικό όγκο 1ml PBS.
6. Μεταφέρουμε το ίζημα από τα δύο falcon που χρησιμοποιήσαμε νωρίτερα σε ένα νέο falcon των 15 ml.
7. Πιπετάρουμε ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα.

Απομόνωση CD34⁺ κυττάρων με τη μέθοδο των Magnetic beads

Αφού ολοκληρώσουμε τη διαδικασία του ξεπαγώματος των κυττάρων, ακολουθεί η απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων με μαγνητική σήμανσή τους και μαγνητικό διαχωρισμό.

Για την απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων χρησιμοποιήσαμε τη μεθοδολογία των magnetic beads της εταιρείας MACS Miltenyi Biotec (εικόνα 4). Στην εικόνα φαίνεται η συσκευή στην οποία πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία. Διακρίνονται δύο βάσεις στήριξης των στηλών, η mini separation unit (πράσινο χρώμα) και η midi separation unit (μωβ χρώμα), (Miltenyi biotec) οι οποίες στηρίζονται σε έναν ισχυρό μαγνήτη που δημιουργεί μαγνητικό πεδίο. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο στήλες έγκειται στην ποσότητα των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα (πράσινη για μεγάλο αριθμό κυττάρων, μωβ για μικρό αριθμό κυττάρων). Η επιλογή της στήλης, γίνεται με κριτήριο τον αριθμό των κυττάρων που εμπεριέχονται στο διάλυμα του δείγματος. Καθώς το διάλυμα με τα κύτταρα διέρχεται από την στήλη (μετά από την επώαση με το αντίσωμα), τα κύτταρα στα οποία έχει προσδεθεί το αντίσωμα με τα σφαιρίδια συγκρατούνται λόγω του μαγνητικού πεδίου στην στήλη, ενώ τα μη σημασμένα εξέρχονται της στήλης.



Εικόνα 4. Μαγνητικός διαχωριστής και βάσεις στήριξης στηλών.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για τα CD34⁺ είναι τύπου θετικής επιλογής (positive selection) των σημασμένων κυττάρων.

Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

- Φυγόκεντρος 5702 R centrifuge (Eppendorf)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 15ml (falcon, Corning 15 centrifuge tube)
- Buffer PBS/EDTA/BSA
- FcR Blocking Reagent
- Αντίσωμα CD34
- Στήλη διαχωρισμού (MS, LS ή XS ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων)
- Μαγνητικός διαχωριστής

Πρωτόκολλο

Μαγνητική σήμανση κυττάρων:

Αφού ολοκληρώσουμε το ξεπάγωμα,

1. Φυγοκεντρούμε στα 300 g για 10min, σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο.
2. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα σε 600μL buffer PBS/EDTA/BSA.
3. Προσθέτουμε 200 μl FcR Blocking Reagent (μπλοκάρει τη μη ειδική σύνδεση) και 200 μl του αντισώματος CD34.
4. Αναδεύουμε καλά και αφήνουμε το δείγμα στο ψυγείο, στους 4°C για 30 min.
5. Ξεπλένουμε τα κύτταρα προσθέτοντας 1 ml διαλύματος PBS/EDTA/BSA και φυγοκεντρούμε στα 300g για 10 min, χωρίς φρένο
6. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 500 μl διαλύματος PBS/EDTA/BSA.

Μαγνητικός διαχωρισμός

1. Τοποθετούμε την στήλη στη βάση (separation unit) που βρίσκεται επάνω στο μαγνήτη της ειδικής συσκευής.

2. Προετοιμάζουμε την στήλη προσθέτοντας 500 μl PBS για τη μικρή στήλη (MS) και 3 ml για τη μεγαλύτερη στήλη (LS). Στη συνέχεια απορρίπτουμε την ποσότητα που χρειάστηκε για την εfügρανση της στήλης.
3. Κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας δεν αφήνουμε την στήλη να στεγνώσει, δεν προσθέτουμε περίσσεια υγρού εάν η στήλη είναι ήδη γεμάτη.
4. Εισάγουμε το δείγμα στην στήλη. Τα κύτταρα που έχουν σημανθεί με το αντίσωμα έχουν προσκολληθεί μέσα στην στήλη από τα μαγνητικά σφαιρίδια, λόγω του μαγνητικού πεδίου. Όσα κύτταρα δε σημάνθηκαν, εκκλούνται και συλλέγονται ως εκλουόμενα (eluted cells).
5. Συνεχίζουμε με 3 ξεπλύματα της στήλης. Ανάλογα με το είδος της στήλης που έχουμε χρησιμοποιήσει, εισάγουμε και την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PBS/EDTA/BSA.

MS: 3x500 μl

LS: 3x3 ml

6. Κάθε φορά, μετά από κάθε ξέπλυμα, συλλέγουμε σε καθαρά αποστειρωμένα erpendorfs τα κύτταρα που εκκλούνται.
7. Αφαιρούμε την στήλη από το μαγνητικό πεδίο και προσθέτουμε ποσότητα διαλύματος PBS/EDTA/BSA σε αυτήν.

MS: 1 ml

LS: 5 ml

8. Με τη βοήθεια ενός εμβόλου που εφαρμόζει αεροστεγώς στην στήλη, ασκούμε πίεση και μεταφέρουμε το δείγμα σε ένα καινούργιο αποστειρωμένο erpendorf. Αυτό το δείγμα περιέχει τα σημασμένα κύτταρα που επιθυμούμε (selected cells).

Απομόνωση miRNA, large RNA, DNA και πρωτεϊνών

Για να πραγματοποιήσουμε την απομόνωση των μακρομορίων, συνδυάσαμε δύο kit απομόνωσης.

Προετοιμασία

- Αρχικά πραγματοποιούμε μία φυγοκέντρηση στα 14000g για να γίνει καθίζηση των CD34⁺ (selected) κυττάρων. Στη συνέχεια απορρίπτουμε το υπερκείμενο και κρατάμε μόνο το ίζημα (pellet) των κυττάρων.

Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

- DNA, RNA and protein purification (NucleoSpin miRNA) kit

- Absolute ethanol (96-100%)
- 50% ethanol
- DNA, RNA and protein purification (NucleoSpin TriPrep) kit
- Φυγόκεντρος KUBOTA 3500
- Vortex VELP scientific
- Πιπέτες 1000μl, 200μl, 20μl, 2μl
- Filter tips για τις πιπέτες
- Υδατόλουτρο

Πρωτόκολλο

Στο δείγμα κυττάρων προσθέτουμε 300 μl ML buffer (διάλυμα λύσης κυττάρων) και πιπετάρουμε μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

1. Επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Τοποθετούμε τη μωβ στήλη σε collection tube των 2 ml (lid). Προσθέτουμε ολόκληρο το δείγμα στη μωβ στήλη ώστε να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος και καθαρισμός από αδιάλυτα ξένα σώματα.
3. Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000 x g.
4. Απορρίπτουμε την στήλη (κρατάμε το flowthrough) το οποίο είναι 300 μl.
5. Προσθέτουμε 150 μl absolute ethanol στο flowthrough που έχουμε κρατήσει, και κάνουμε vortex για 5sec.
6. Επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Τοποθετούμε τη μπλε στήλη σε collection tube των 2 ml (lid)
8. Προσθέτουμε το δείγμα (~450μl) στη μπλε στήλη και φυγοκεντρούμε για 1min στα 14000 x g.
9. Κρατάμε το flowthrough το οποίο περιέχει τα miRNA και τις πρωτεΐνες (στους 4°C) μέχρι του σημείου που πραγματοποιούμε την πέψη του DNA.
10. Κρατάμε όμως και τη μπλε στήλη στην οποία έχουν συκρατηθεί το DNA και το large RNA.

DNA elution

1. Τοποθετούμε τη μπλε στήλη σε ένα νέο collection tube (χωρίς καπάκι)
2. 1^η πλύση: προσθέτουμε 500 μl DNA wash και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000 x g.

3. 2^η πλύση: (ίδιο collection tube με πριν): προσθέτουμε 500 μl DNA wash και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000 x g.
4. Απορρίπτουμε το flowthrough.
5. Στεγνώνουμε τη μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου αφήνοντας την στήλη με ανοιχτό το καπάκι για 3 min.
6. Μεταφέρουμε την στήλη σε νέο collection tube του 1,5 ml
7. Προσθέτουμε 100 μl DNA elute απευθείας επάνω στη μεμβράνη.
8. Επωάζουμε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου με κλειστό το καπάκι.
9. Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 1100 x g.

Στο επόμενο βήμα πρέπει να πραγματοποιήσουμε πέψη του εναπομείναντος στην στήλη DNA ώστε να μπορέσουμε να απομονώσουμε το large RNA.

1. Αρχικά προετοιμάζουμε το rDNase reaction mix, προσθέτοντας 10 μl rDNase και 90 μl rDNase buffer.
2. Προσθέτουμε 100 μl rDNase reaction mixture απευθείας επάνω στη μεμβράνη.
3. Επωάζουμε για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου με κλειστό καπάκι.

Στο flow through το οποίο έχουμε κρατήσει και περιέχει τα miRNAs και τις πρωτεΐνες:

1. Προσθέτουμε 300 μl MP buffer.
2. Κάνουμε vortex για 5 sec.
3. Φυγοκεντρούμε για 3 min στα 11000 x g. (Στο στάδιο αυτό δημιουργείται η protein pellet και την οποία κρατάμε στους 4°C μέχρι να την επεξεργαστούμε).
4. Τοποθετούμε τη λευκή στήλη σε collection tube των 2 ml (lid).
5. Μεταφέρουμε ολόκληρη την ποσότητα του υπερκειμένου (≈750μl) στη λευκή στήλη.
6. Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11000 x g.
7. Απορρίπτουμε τη λευκή στήλη και κρατάμε το flowthrough, διότι εκεί περιέχονται τα miRNAs.
8. Προσθέτουμε 800 μl MX buffer.
9. Κάνουμε vortex για 5sec.
10. Τοποθετούμε την πράσινη στήλη σε ένα collection tube των 2 ml (χωρίς καπάκι).

11. Μεταφέρουμε 725 μl από το δείγμα στην πράσινη στήλη (δε χωρά 1500 μl η στήλη).
12. Φυγοκεντρούμε για 40 sec στα 11000 x g.
13. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για τα υπόλοιπα 725 μl (με την ίδια στήλη).

Στο σημείο αυτό, αφού έχει ολοκληρωθεί και η πέψη του DNA, συντονίζουμε τα βήματα για την απομόνωση miRNA από την πράσινη στήλη και large RNA από τη μπλε στήλη, εφόσον χρησιμοποιούμε τα ίδια διαλύματα καθώς και τους ίδιους όγκους.

Συντονισμός βημάτων:

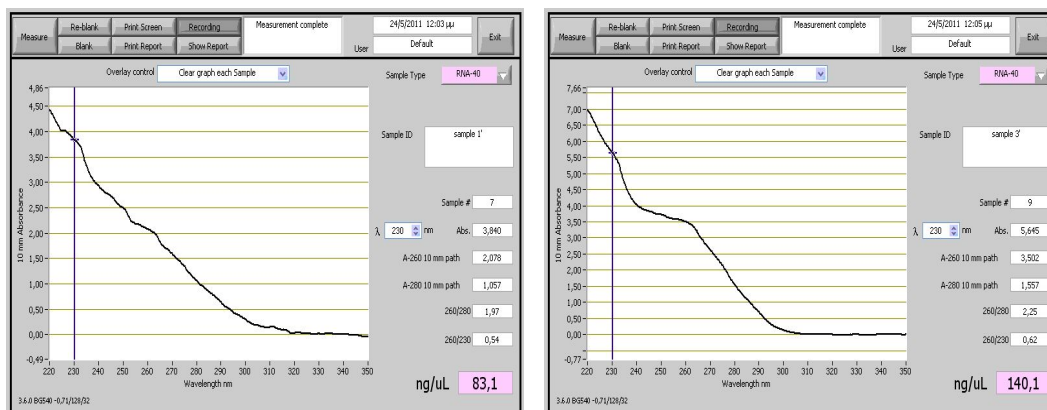
1. Τοποθετούμε και τις δύο στήλες σε collection tubes των 2ml.
2. 1^η πλύση: Προσθέτουμε 600 μl MW1 και στις δύο στήλες.
3. Απορρίπτουμε το flowthrough.
4. 2^η πλύση: Προσθέτουμε 700 μl MW2.
5. Απορρίπτουμε το flowthrough.
6. 3^η πλύση: Προσθέτουμε 250 μl MW2.
7. Φυγοκεντρούμε για 2 min στα 11000 x g.
8. Απορρίπτουμε το flowthrough.
9. Φυγοκεντρούμε για 2 min στα 11000g, ώστε να στεγνώσει εντελώς η μεμβράνη.
10. Στο σημείο αυτό γίνεται η έκλυση των miRNA και large RNA. Αφού τοποθετήσουμε τις στήλες σε ένα νέο collection tube του 1,5 ml, προσθέτουμε από 30 μl RNase free water σε κάθε μία στήλη.
11. Επιάζουμε τις στήλες για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Φυγοκεντρούμε για 40 sec στα 11000 x g.
13. Αποθηκεύουμε στους -80°C.

3.4 Ποσοτικός και Ποιοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου RNA και miRNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου RNA έγινε μετρώντας την απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm μήκους κύματος φωτός (A_{260}) με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου (NanoDrop® ND-1000). Η απορρόφηση 1 μονάδας στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 44 μg RNA ανά ml δείγματος. Για κάθε ένα από τα δείγματα RNA που φωτομετρήσαμε λάβαμε ποσότητα 1 μl από τα συνολικά 80 μl όγκου τελικού διαλύματος που είχαμε απομονώσει, αφού πρώτα το δείγμα

αποκαταψύχθηκε στον πάγο (από τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Πριν από οποιαδήποτε μέτρηση προηγήθηκε καθαρισμός των κυψελίδων του φασματοφωτόμετρου με RNA-ase free water και το μηχάνημα μηδενίστηκε χρησιμοποιώντας elution buffer (BR5).

Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων στο κάθε δείγμα υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα (Εικόνα 5), με βάση την τροποποιημένη εξίσωση Beer-Lambert: Συγκέντρωση δείγματος RNA = $44 \times A_{260}$.



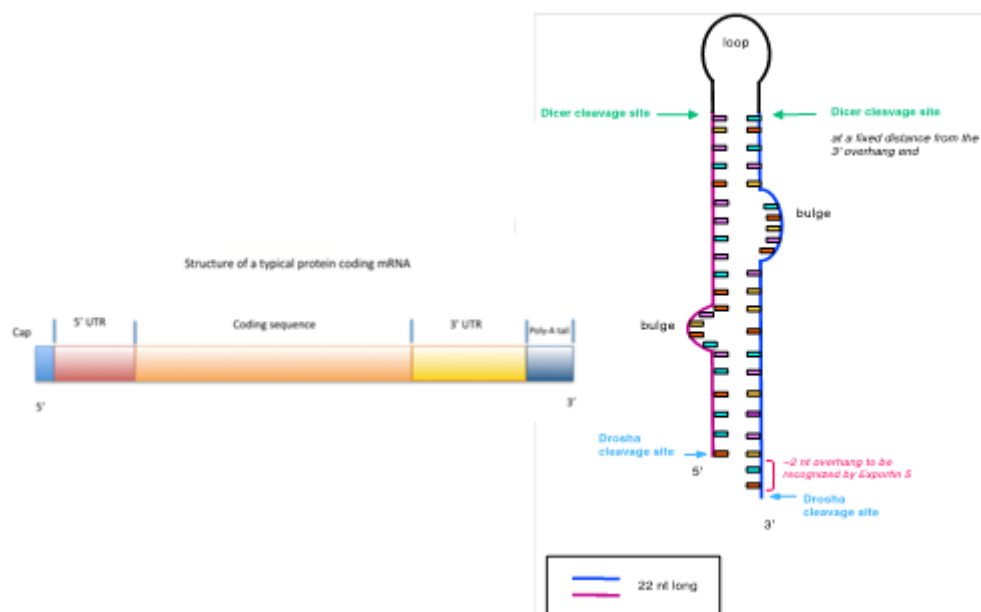
Εικόνα 5. Η καμπύλη που προκύπτει από την απορρόφηση σε διάφορα μήκη κύματος φωτός, ενώ υπολογίζεται αυτόματα και ο λόγος A_{260}/A_{280} .

Η συγκέντρωση που προκύπτει είναι σε ng/μl δείγματος που φωτομετρήθηκε. Το πηλίκο της απορρόφησης του δείγματος RNA στα 260 και στα 280 nm αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη της καθαρότητας του απομονωμένου RNA. Το καθαρό RNA έχει λόγο απορρόφησης A_{260}/A_{280} που κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, σε pH 7,5. Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος $\sim 1,8$ είναι γενικά αποδεκτός ότι συμβαδίζει με «καθαρό» DNA, ενώ ο λόγος ~ 2 με «καθαρό» RNA. Ο λόγος αυτός υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα δείγματά μας και βρέθηκε εντός των συγκεκριμένων ορίων, καταδεικνύοντας απομόνωση RNA υψηλής καθαρότητας.

3.5 Πολυαδενυλίωση, Αντίστροφη Μεταγραφή και σύνθεση cDNA

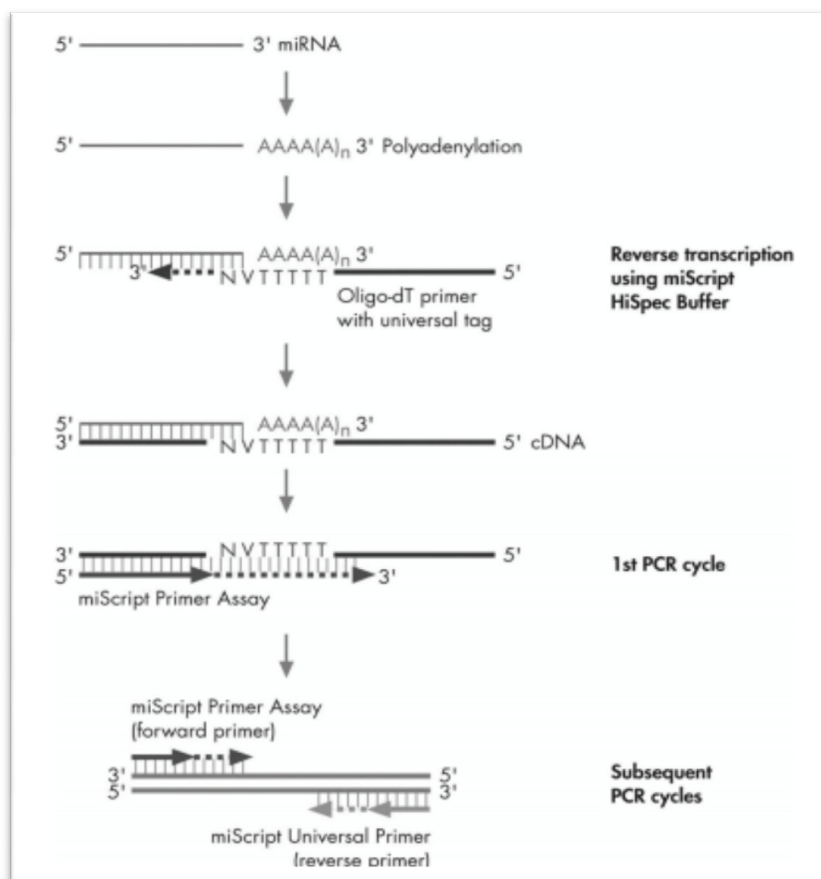
Πολυαδενυλίωση των miRNAs

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ώριμων miRNAs είναι ότι δεν διαθέτουν πολυαδενυλιωμένα άκρα σε αντίθεση με τα mRNAs, όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.



Εικόνα 6. Αριστερά η δομή ενός mRNA και δεξιά ενός precursor miRNA.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του miScript II RT kit (QIAGEN), αρχικά πραγματοποιείται η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης με τη βοήθεια του ενζύμου *E. coli Poly(A) Polymerase*. Με τον όρο πολυαδενυλίωση εννοούμε την προσθήκη μιας πολύ (A) ουράς στο 3' άκρο του miRNA. Στη συνέχεια μέσω του HiSpec buffer γίνεται η επιλογή των miRNAs από το ολικό RNA και ταυτόχρονα μετατρέπονται σε cDNA, μέσω oligo-dT primers. Η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης και της αντίστροφης μεταγραφής γίνεται παράλληλα στο ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Οι oligo-dT primers διαθέτουν ένα 3' μονόκλωνο άκρο και μια 5' καθολική αλληλουχία πρόσδεσης όπου η συμπληρωματική της αλληλουχία χρησιμοποιείται σαν Universal primer στη Real Time PCR.



Εικόνα 7. Πολυαδενυλίωση και επιλογή.

Με βάση τα αποτελέσματα του Nanodrop υπολογίστηκε ο κατάλληλος όγκος RNA ή miRNA που προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής. Η τελική συγκέντρωση RNA ή miRNA ήταν 0,5 µg.

Υλικά

- RNase free PCR tubes (20 µl)
- Πάγος
- miScript II RT kit
- Κυκλοποιητής iCycler (BIO-RAD)

Πρωτόκολλο

- Ξεπαγώνουμε τα δείγματα στο πάγο και τα εξής αντιδραστήρια του kit σε θερμοκρασία δωματίου: 10x miScript Nucleic Mix, RNase Free water, 5x HiSpec Buffer

- Προετοιμάζουμε το μίγμα της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής με βάση τον ακόλουθο πίνακα, δουλεύοντας στον πάγο και προσθέτοντας τα αντιδραστήρια με τη σειρά:
 - Η προσθήκη του διαλύματος που περιέχει το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης προστίθεται στο τέλος της αντίδρασης και διατηρείται καθόλη τη διάρκεια του χειρισμού της στον πάγο, όπου βρίσκεται σε υγρή μορφή.

Αντιδραστήριο (σειρά προσθήκης)	Ποσότητες
1. RNase free water	Προσαρμόσιμη
2. 5x miScript HiSpec buffer	4 μl
3. 10x miScript Nucleic mix	2 μl
4. RNA (0,5 μg)	Προσαρμόσιμη
5. miScript Reverse transcriptase mix	2 μl
<i>Συνολικός όγκος</i>	20 μl

Πίνακας 5: Reverse transcription mix.

- Τοποθετούμε τα δείγματα στον κυκλοποιητή και στο εξής πρόγραμμα:
 - 37°C για 1 ώρα
 - 95°C για 5min (απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση).
 - 4°C cooling.
- Αποθηκεύουμε στους -20°C

3.6 Real Time PCR

Για τη μελέτη της ποσοτικής έκφρασης των microRNA χρησιμοποιήθηκε το LightCycler^R 480 SybrGreen I Master kit (Roche 4707516). Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στο LightCycler^R 480 (Roche).

Η Real Time PCR είναι μια ποσοτική μέθοδος αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης για τη μέτρηση της σχετικής ή απόλυτης έκφρασης μιας επιθυμητής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε ένα δείγμα. Η εν λόγω αλυσιδωτή αντίδραση περιλαμβάνει την επανάληψη του κύκλου τριών βασικών σταδίων που επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας:

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε RT-PCR αντίδραση για σχετική έκφραση και PCR arrays. Οι αλληλουχίες των microRNAs που χρησιμοποιήθηκαν για τους εκκινητές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Η επιλογή των “housekeeping genes” έγινε με βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας 98,99.

miRNA	ID	Αλληλουχία miRNA	Cat. No
has-miR-195-5p	MIMAT0000461	5'UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	MS00003703
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	5'UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	MS00009079
hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494	5'CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	MS00009086
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	5'UUAAUGCUAUUCGUGAUAGGGGU	MS00031486
hsa-miR-155-3p	MIMAT0004658	5'CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA	MS00008778
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	5'UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGA	MS00008624
hsa-miR-135-3p	MIMAT0004595	5'UAUAGGGAUUGGAGCCGUGGCG	MS00042259
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	5'UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA	MS00003752
Hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	5'UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	MS00031220

Πίνακας 6. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

A. Για τη σχετική έκφραση των miR-195, miR-21 και miR-155 στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού χρησιμοποιήθηκε για σκοπούς κανονικοποίησης και σύγκρισης των αποτελεσμάτων ως «γονίδιο» αναφοράς το miR-39 του c. Elegans (miRNeasy Serum/Plasma Spike –In Control in Serum /Plasma miRNA Profiling) το οποίο προστίθεται εξωγενώς στο αρχικό δείγμα σε συγκεκριμένη ποσότητα. Έχει δειχθεί ότι η αλληλουχία του δεν υπάρχει στο ανθρώπινο γονιδίωμα⁹⁹.

B. Για τη σχετική έκφραση των miR-21-3p, miR-21-5p, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-135a-3p, miR-135a-5p, miR-200c και Let-7a-5p, στους ασθενείς με καρκίνο του στομάχου και εντέρου χρησιμοποιήθηκαν για σκοπούς κανονικοποίησης και σύγκρισης των αποτελεσμάτων 2 ενδογενή μόρια RNA RNU6 και SNORD68.¹⁰⁰

Γ. Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των miRNAs που σχετίζονται με την απόπτωση στα δείγματα ασθενών με O.M.A. χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος miSCRIPT

PCR Arrays της SABiosciences (Qiagen). Το ευρύ δυναμικό φάσμα της μεθόδου αυτής επιτρέπει τον προσδιορισμό miRNAs ακόμα και σε ελάχιστες ποσότητες, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται ταυτόχρονη ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού miRNAs κάθε φορά. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το kit miSCRIPT PCR SYBR Green, με αριθμό καταλόγου MIHS-114ZF-12 το οποίο περιλαμβάνει μία πλατφόρμα ενός συνόλου 96 miRNAs, με 84 miRNAs να σχετίζονται με την απόπτωση και 12 γονίδια ελέγχου (εικόνα 8).

Array Layout											
hsa-let-7a-5p A01	hsa-let-7c-5p A02	hsa-let-7e-5p A03	hsa-let-7g-5p A04	hsa-miR-1-3p A05	hsa-miR-101-3p A06	hsa-miR-106b-5p A07	hsa-miR-122-5p A08	hsa-miR-125a-5p A09	hsa-miR-125b-5p A10	hsa-miR-128-3p A11	hsa-miR-1285-3p A12
hsa-miR-133a-3p B01	hsa-miR-133b B02	hsa-miR-134-5p B03	hsa-miR-141-3p B04	hsa-miR-143-3p B05	hsa-miR-144-3p B06	hsa-miR-145-5p B07	hsa-miR-146a-5p B08	hsa-miR-149-3p B09	hsa-miR-153-3p B10	hsa-miR-15a-5p B11	hsa-miR-15b-5p B12
hsa-miR-16-5p C01	hsa-miR-17-5p C02	hsa-miR-181a-5p C03	hsa-miR-181b-5p C04	hsa-miR-181c-5p C05	hsa-miR-181d-5p C06	hsa-miR-183-5p C07	hsa-miR-185-5p C08	hsa-miR-186-3p C09	hsa-miR-192-5p C10	hsa-miR-193a-5p C11	hsa-miR-193b-3p C12
hsa-miR-194-5p D01	hsa-miR-195-5p D02	hsa-miR-200c-3p D03	hsa-miR-203a-3p D04	hsa-miR-204-5p D05	hsa-miR-205-5p D06	hsa-miR-206 D07	hsa-miR-20a-5p D08	hsa-miR-21-5p D09	hsa-miR-210-3p D10	hsa-miR-212-3p D11	hsa-miR-214-3p D12
hsa-miR-218-5p E01	hsa-miR-221-3p E02	hsa-miR-222-3p E03	hsa-miR-23a-3p E04	hsa-miR-24-3p E05	hsa-miR-25-3p E06	hsa-miR-26a-5p E07	hsa-miR-26b-5p E08	hsa-miR-27a-3p E09	hsa-miR-29a-3p E10	hsa-miR-29b-3p E11	hsa-miR-29c-3p E12
hsa-miR-30a-5p F01	hsa-miR-30b-5p F02	hsa-miR-30c-5p F03	hsa-miR-30d-5p F04	hsa-miR-30e-5p F05	hsa-miR-31-5p F06	hsa-miR-32-5p F07	hsa-miR-33b-3p F08	hsa-miR-34a-5p F09	hsa-miR-34c-5p F10	hsa-miR-365a-3p F11	hsa-miR-378a-3p F12
hsa-miR-409-3p G01	hsa-miR-449a G02	hsa-miR-451a G03	hsa-miR-491-5p G04	hsa-miR-497-5p G05	hsa-miR-512-5p G06	hsa-miR-542-3p G07	hsa-miR-7-5p G08	hsa-miR-708-5p G09	hsa-miR-9-5p G10	hsa-miR-92a-3p G11	hsa-miR-98-5p G12
cel-miR-39-3p H01	cel-miR-39-3p H02	SNORD61 H03	SNORD68 H04	SNORD72 H05	SNORD95 H06	SNORD96A H07	RNU6-8P H08	miRTC H09	miRTC H10	PPC H11	PPC H12

Εικόνα 8. Η διάταξη των miRNA-γονιδίων στην πλατφόρμα με τα 96 wells.

Πρωτόκολλο RTPCR

- Προετοιμάζουμε το μίγμα (για κάθε miRNA χωριστά) της αντίδρασης με βάση τον παρακάτω πίνακα. Το cDNA προστίθεται κατευθείαν στο PCR plate:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
RNase Free Water	5 μl
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 μl
10x miScript Universal Primer	2 μl
Forward Primer/ miRNA	2 μl
cDNA (βήμα 3)	1 μl
<i>Συνολικός όγκος</i>	20 μl

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια, ποσότητες για PCR.

- Προσθέτουμε το αντίστοιχο μίγμα της αντίδρασης στο αντίστοιχο πηγαδάκι του PCR plate.
- Προσθέτουμε στο PCR plate το cDNA
- Σφραγίζουμε το PCR plate με ταινία sealing film.
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 2000 g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προγραμματισμός της Real Time PCR μέσω του λογισμικού Roche - LightCycler® 480, με βάση τον παρακάτω πίνακα ρυθμίσεων:

Στάδιο	Συνθήκες	
PCR initial activation	15 min	95 °C
3-step cycling	Denaturation	30 sec
	Annealing	45 sec
	Extension	45 sec
	Cycle number	45 cycles
Melting Curve	15 sec	60 °C
	continuous	95 °C

Πίνακας 8. Συνθήκες Real Time PCR.

- Τοποθέτηση του PCR plate εντός του οργάνου Roche - LightCycler® 480 και έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Πρωτόκολλο RTPCR ARRAYS

1. Προετοιμάζουμε το μίγμα της αντίδρασης με βάση τον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
10x Universal primer	275μl
2x SYBR Mix	1375μl
RNase free water	1000μl
cDNA	100μl
Final volume	2750μl

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια, ποσότητες για PCR.

2. Προσθέτουμε όλα τα αντιδραστήρια του πίνακα σε ένα falcon των 15ml, και ανακινούμε πολύ ελαφρά.
3. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του falcon στο δοχείο παρασκευής διαλυμάτων.
4. Με την πολυπιπέτα προσθέτουμε 25μl σε κάθε ένα από τα 96 wells του panel.
5. Σφραγίζουμε το panel με το sealing film.
6. Φυγοκεντρούμε για 2min στα 700g.
7. Τοποθετούμε το plate εντός του οργάνου LightCycler[®] 480 και αρχίζει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.
8. Προγραμματίζουμε τη Real Time- PCR μέσω του λογισμικού ως εξής:

Στάδιο		Συνθήκες	
PCR initial activation		15 min	95 °C
3-step cycling	Denaturation	15 sec	94 °C
	Annealing	30 sec	55 °C
	Extension	30 sec	70 °C
	Cycle number	45 cycles	
Melting Curve		15 sec	60 °C
		continuous	95 °C

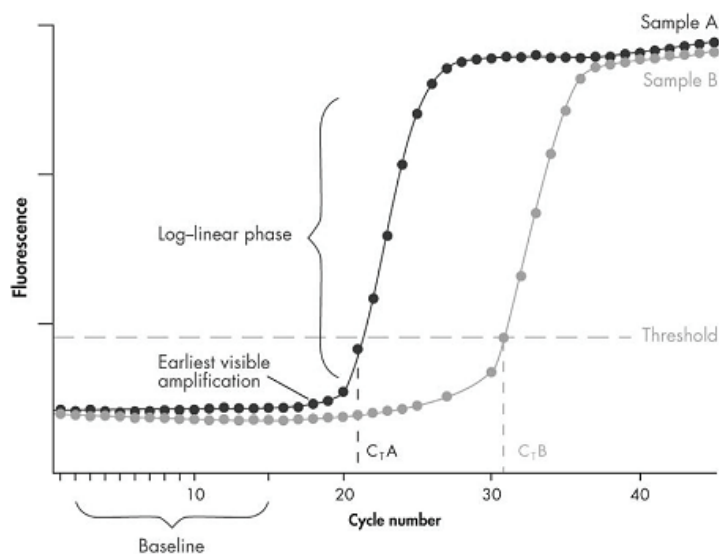
Πίνακας 10. Συνθήκες Real Time PCR.



Εικόνα 9. Μηχάνημα Real Time PCR LightCycler480.

3.7 Σχετική Ποσοτικοποίηση Real Time PCR: μέθοδος ανάλυσης $\Delta\Delta C_T$

Μετά την ολοκλήρωση της Real Time PCR των δειγμάτων το λογισμικό του οργάνου παρέχει δεδομένα «εξόδου» προς επεξεργασία για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Το πρώτο είδος δεδομένων που λαμβάνονται είναι οι σιγμοειδείς καμπύλες φθορισμού προς τον αριθμό κύκλων της PCR, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

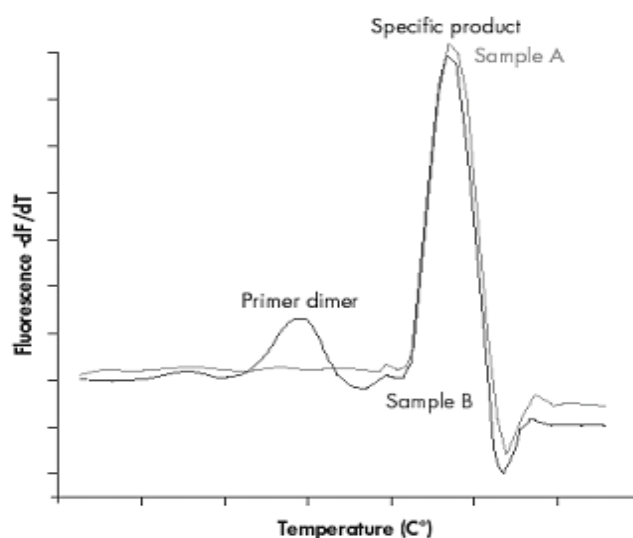


Εικόνα 10: PCR output C_T (Threshold).

Το κατώφλι (threshold) το οποίο καθορίζεται αυθαίρετα, αποτελεί, πρακτικά, το σημείο από το οποίο αρχίζει να αυξάνει ο φθορισμός, που οφείλεται στο PCR

product. Η τιμή C_T υποδεικνύει τον κύκλο στο οποίο εμφανίζεται η αύξηση του εν λόγω φθορισμού και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της αρχικής ποσότητας της επιθυμητής αλληλουχίας στο αρχικό δείγμα.

Το δεύτερο output δεδομένων της Real Time PCR είναι η melting curve, δηλαδή η καμπύλη που δηλώνει τη θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει η μετουσίωση του DNA. Θεωρητικά, όταν η PCR πραγματοποιείται χωρίς διμερισμούς των εκκινητών (primer dimer) και μη ειδικά προϊόντα, θα πρέπει να εμφανίζεται μία κορυφή.



Εικόνα 11. Melting Curve.

➤ Η σχετική ποσοτικοποίηση των PCR products των ασθενών με καρκίνο του μαστού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του $2^{-\Delta C_t}$ σε υπολογιστικό φύλλο Excel, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα:

1. Αρχικά υπολογίζουμε τον μέσο όρο των C_t του Spike In που έχουμε επιλέξει (miR-39, *C. Elegans*). Έστω ότι ο $M.O_{H.G.}$ είναι 24,52.
2. Αφαιρούμε από κάθε τιμή C_t των δειγμάτων μας τον $M.O_{H.G.}$.

$$\Delta C_t = C_t D_{miR-21} - 24,52.$$

$$\text{Αν } C_t D_{miR-21} = 25,46 \text{ τότε } \Delta C_t D_{miR-21} = 26,46 - 24,52 = 1,94$$

3. Υπολογίζουμε το $2^{-\Delta \Delta C_t}$: $2^{-1,94} = 0,26$

➤ Όλες οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί σε σχέση με το Spike In και είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους.

➤ Η σχετική ποσοτικοποίηση των PCR products των ασθενών με καρκίνο του στομάχου και παχέος εντέρου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁹⁹ σε υπολογιστικό φύλλο Excel, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα:

1. Αρχικά υπολογίζουμε τον μέσο όρο των Ct των γονιδίων αναφοράς που έχουμε επιλέξει σε κάθε περίπτωση. Έστω ότι ο Μ.Ο. των γονιδίων αναφοράς (Housekeeping gene, H.G.) είναι 28,52.
2. Αφαιρούμε από κάθε τιμή Ct των δειγμάτων (ασθενών και υγιών ατόμων) μας τον Μ.Ο._{H.G.}

$$\Delta Ct = Ct_{D_{1miR-21}} - 28,52.$$

$$\text{Αν } Ct_{D_{1miR-21}} = 29,46 \text{ τότε } \Delta Ct_{D_{1miR-21}} = 29,46 - 28,52 = 0,94$$

3. Υπολογίζουμε τον μέσο όρο των ΔCt των υγιών ατόμων ($\Delta Ct_{\text{υγιών}} = 0,44$). Υπολογίζουμε το $\Delta\Delta Ct$ (ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς) χρησιμοποιώντας την εξίσωση $\Delta Ct(D_{1miR-21}) - \text{Μ.Ο.}\Delta Ct(\text{υγιών}) = \Delta\Delta Ct(\text{ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς})$: $0,94 - 0,44 = 0,5$
 4. Υπολογίζουμε το $2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2^{-0,5} = 0,71$
 - Εάν τα αποτελέσματα ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) είναι μεγαλύτερα ή μικρότερα του 1 θεωρείται ότι υπερεκφράζεται ή υποεκφράζεται το αντίστοιχο miRNA στον συγκεκριμένο ασθενή σε σχέση με τους υγιείς, αντίστοιχα.
- Όλες οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί σε σχέση με τα υγιή άτομα, τα οποία αντιπροσωπεύονται με την τιμή ίσο με 1.

➤ Η σχετική έκφραση των miRNAs της απόπτωση στους ασθενείς με Ο.Μ.Λ. με βάση τα αποτελέσματα από τον αναλυτή έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$, μέσω του ειδικού λογισμικού που διατίθεται στην ιστοσελίδα της εταιρίας Qiagen.

(<https://www.qiagen.com/gr/products/genes%20and%20pathways/data-analysis-center-overview-page/?UID=67ff8e8c-ec85-4b7f-a754-e109cb553d54>)

3.8 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε εφαρμόζοντας t-test, με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism v6.00. Οι διαφορές με $p < 0.05$ ορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

3.9 Αλληλούχιση- Sequencing

Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση συγκεκριμένων δειγμάτων για το miR-195. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR και στη συνέχεια το προϊόν κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα με το πρωτόκολλο (TOPO TA CLONING, Invitrogen). Στείλαμε για αλληλούχιση τον πλασμιδιακό φορέα με το ένθεμά μας στην Eurofins Genomics/ VBC Biotech της Αυστρίας. Επεξεργαστήκαμε κατάλληλα το αποτέλεσμα της αλληλούχισης με το εργαλείο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.10 Πρόβλεψη σχετικά με την απόπτωση microRNA στόχων

Επεξεργαστήκαμε τα microRNAs- σχετικά με την απόπτωση- που διαφοροποιείται η έκφραση τους σημαντικά, με το πρόγραμμα RNA22 που αφορά στην πρόβλεψη των microRNA στόχων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Έκφραση microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

Όπως προαναφέρθηκε στις μεθόδους, η σύγκριση και η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων των miRNA στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (προεγχειρητικά και την 3^η, 7^η και 30^η ημέρα μετεγχειρητικά) και στην ομάδα ελέγχου (προεγχειρητικά και την 3^η ημέρα μετεγχειρητικά), πραγματοποιήθηκε μέσω της Real Time-PCR. Για την κανονικοποίηση και την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $2^{-\Delta Ct}$ και το πρόγραμμα Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA USA). Η σύγκριση των μέσων τιμών των επιπέδων των microRNAs που καταγράφονται στην πάροδο του χρόνου σε ασθενείς και μεταξύ της ομάδας ελέγχου και μελέτης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το t-test θεωρώντας ως στατιστικά σημαντικό τιμές $p \leq 0,05$.

1.1 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του απομονωθέντος RNA

Προτού χρησιμοποιηθεί η μέθοδος RT-PCR, με τη βοήθεια του nanodrop, έγινε η μέτρηση του ολικού RNA και του cDNA των δειγμάτων. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται οι ποσότητες και οι καθαρότητες του RNA και του cDNA των δειγμάτων.

	HMEPA ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Code Number	ng/ μ l RNA	ng/ μ l cDNA
Control 1	PRE	C1	139,2	250,25
	D3	C2	54,4	356,25
Control 2	PRE	C3	75,5	368,5
	D3	C4	107	562,25
Control 3	PRE	C5	122,3	684,25
	D3	C6	75,34	691,36
Control 4	PRE	C7	58,34	521,47
	D3	C8	97,23	459,38
Control 5	PRE	C9	102,4	489,69
	D3	C10	132,5	652,25

Πίνακας 11. Μετρήσεις ποσοτικού ελέγχου της ομάδας ελέγχου. Control: ασθενής με ινοαδένομα, PRE: πριν το χειρουργείο, D3: 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: 7^η μετεγχειρητική ημέρα.

	ΗΜΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Code Number	ng/ μl RNA	ng/μl cDNA
Ασθενής 1	PRE	D1	101,3	866,5
	D3	D2	92,6	859,1
	D7	D3	115	782,5
	D30	D4	97,3	859,1
Ασθενής 2	PRE	D5	94	812
	D3	D6	107,7	648,8
	D7	D7	160,1	950
	D30	D8	82,3	794,2
Ασθενής 3	PRE	D9	47,9	299,9
	D3	D10	29,1	471,5
	D7	D11	17,2	354,7
	D30	D12	102,7	459,6
Ασθενής 4	PRE	D13	110	490,6
	D3	D14	51,7	764,6
	D7	D15	115,4	873,4
	D30	D16	89,3	769,2
Ασθενής 5	PRE	D17	119,3	467,7
	D3	D18	203,8	687,1
	D7	D19	103,9	478,5
	D30	D20	163,1	454,8
Ασθενής 6	PRE	D21	36,4	568,5
	D3	D22	64	678,3
	D7	D23	120,1	546,7
	D30	D24	178,4	346,9
Ασθενής 7	PRE	D25	69	384,1
	D3	D26	20,9	567,8
	D7	D27	89,2	439,5
	D30	D28	77,3	487,6
Ασθενής 8	PRE	D29	149,2	387,6
	D3	D30	160,9	578,4
	D7	D31	120,4	598,4
	D30	D32	134	436,9
Ασθενής 9	PRE	D33	56,7	398,5
	D3	D34	68,9	763,6
	D7	D35	79,4	745,9
	D30	D36	120,9	565,4
Ασθενής 10	PRE	D37	58,4	532,6
	D3	D38	87,6	438,6
	D7	D39	59,45	467,9
	D30	D40	98,43	438,7
Ασθενής	PRE	D41	129,4	495,6

11	D3	D42	156,5	768,4
	D7	D43	78,45	645,8
	D30	D44	165,3	547,9
Ασθενής 12	PRE	D45	78,23	453,8
	D3	D46	45,8	576,9
	D7	D47	65,98	469,7
Ασθενής 13	D30	D48	76,98	587,9
	PRE	D49	49,67	435,9
	D3	D50	134,6	805,8
Ασθενής 14	D7	D51	78,4	793,6
	D30	D52	73,76	578,9
	PRE	D53	95,4	543,9
Ασθενής 15	D3	D54	78,34	736,9
	D7	D55	28,67	654,9
	D30	D56	89,5	698
Ασθενής 15	PRE	D57	121,56	724,9
	D3	D58	99,5	691,8
	D7	D59	89,5	654,9
	D30	D60	84,5	632,9

Πίνακας 12. Μετρήσεις ποσοτικού ελέγχου της ομάδας μελέτης. , PRE: πριν το χειρουργείο, D3: 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: 7^η μετεγχειρητική ημέρα, D30: 30^η μετεγχειρητική ημέρα.

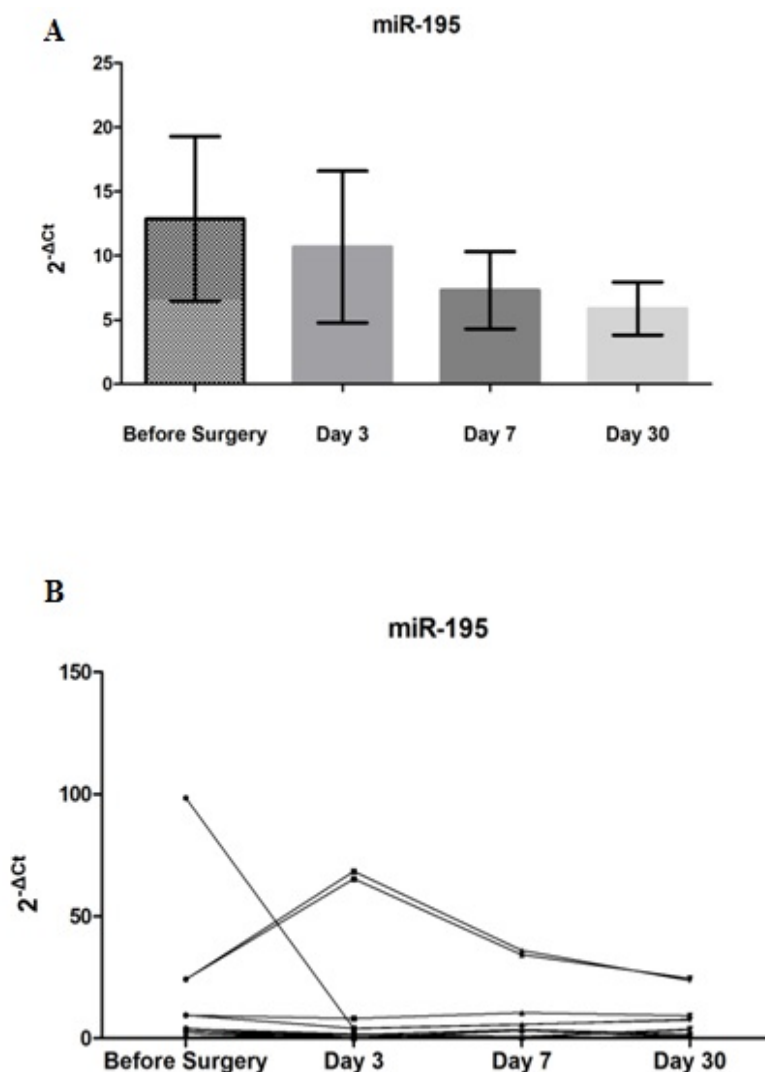
1.2 Περιεγχειρητική κινητική κυκλοφορούντων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

Η έκφραση των miR-195, miR-155 και miR-21 αξιολογήθηκε σε δείγματα αίματος, γυναικών με καρκίνο του μαστού (n=15) και γυναικών με ινοαδένωμα (n=5) με τη χρήση της μεθόδου real time PCR. Επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι το miR-195 υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού (σχήμα 13). Επιπλέον το miR-155 φαίνεται να προάγεται μετά τη μαστεκτομή, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με την αγγειογένεση.

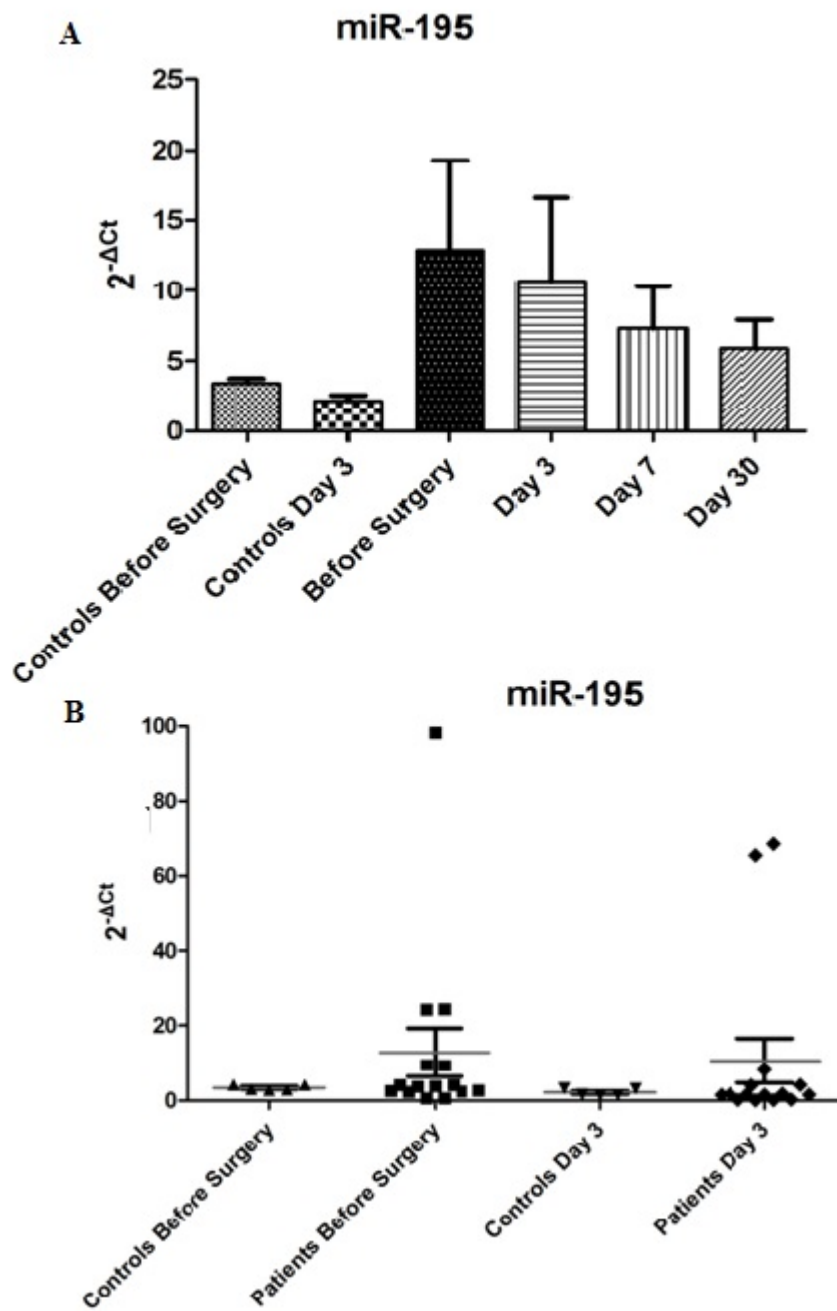
miR-195

Οι μέσες τιμές της ομάδας ελέγχου δε διαφέρουν σημαντικά πριν και μετά το χειρουργείο. Στην ομάδα μελέτης οι μέσες τιμές μειώνονται σημαντικά μετά το χειρουργείο αλλά παραμένουν σε υψηλότερα επίπεδα από την ομάδα ελέγχου ακόμα

και την 30^η ημέρα μετεγχειρητικά. Ωστόσο, οι παραπάνω αλλαγές δεν είναι στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 12Α). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δύο ασθενείς που υποτροπίασαν. Στους συγκεκριμένους ασθενείς παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα μεταγράφων του miR-195 σε όλες τις μετεγχειρητικές ημέρες που μελετήσαμε στην έρευνα μας (Εικόνα 12Β).



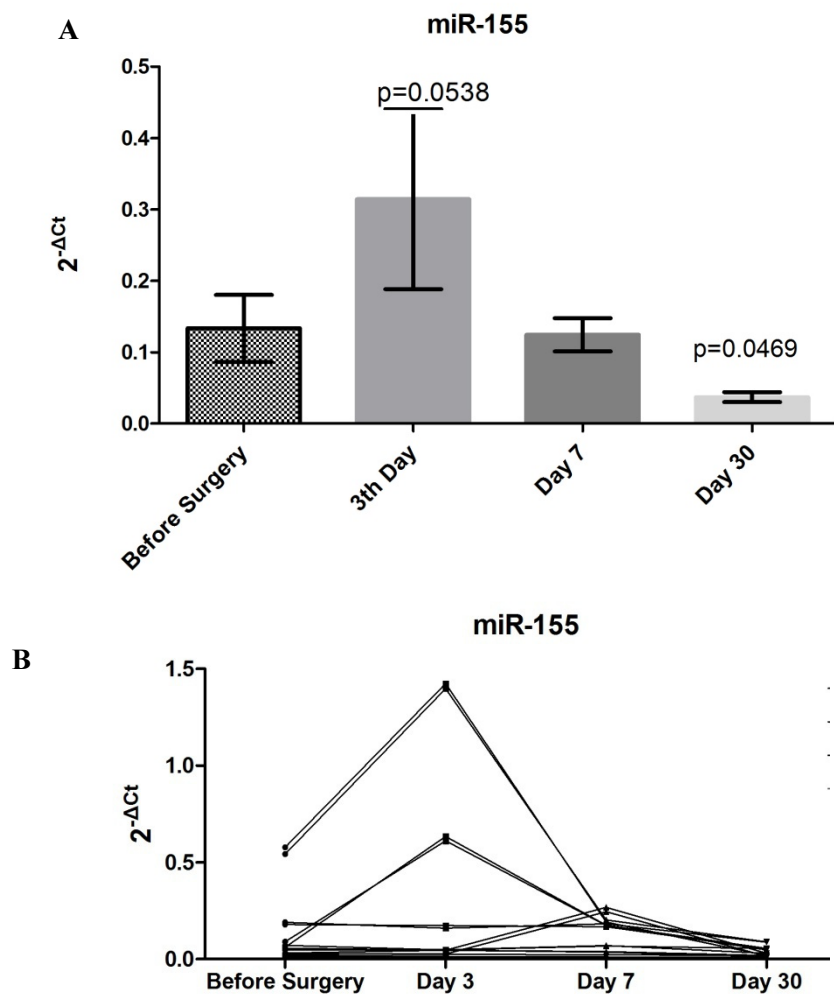
Εικόνα 12. Επίπεδα έκφρασης του miR-195 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πριν και μετά το χειρουργείο. 12Α. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα της μεσης τιμής. 12Β. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-195 σε κάθε ασθενή. Οι δύο επάνω γραμμές αντιπροσωπεύουν τους ασθενείς που τελικά υποτροπιάζουν.



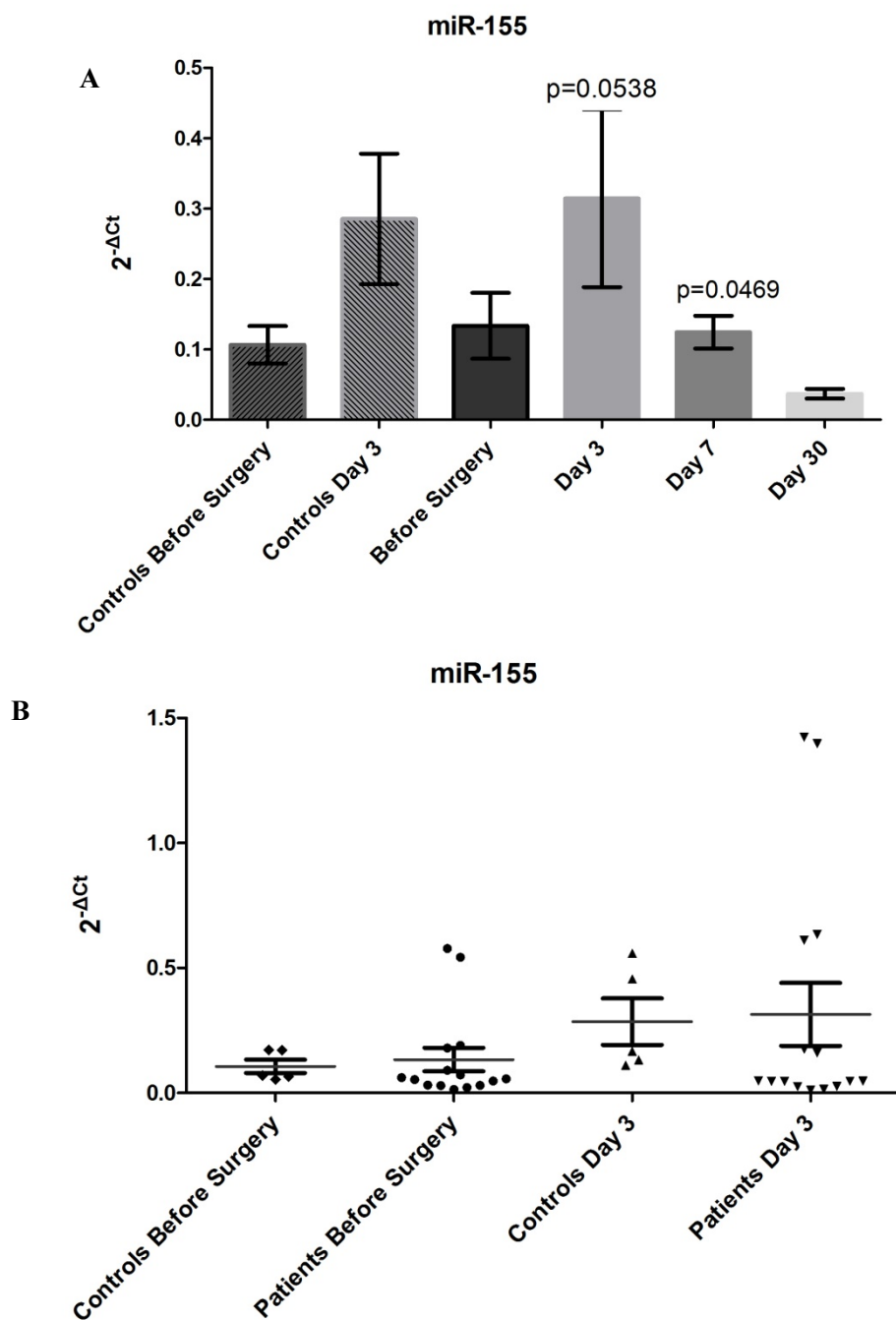
Εικόνα 13. Απεικόνιση της έκφρασης του miR-195 στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στις γυναίκες με ινοαδένομα. 13Α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε τιμές $2^{-\Delta Ct}$ τόσο στην ομάδα μελέτης όσο και στην ομάδα ελέγχου. 13Β. Η σύγκριση της ομάδας ελέγχου και της ομάδας μελέτης προ-εγχειρητικά και την 3^η μετεγχειρητική ημέρα.

miR-155

Τα επίπεδα του miR-155 στην ομάδα μελέτης φαίνεται να αυξάνονται την 3^η ημέρα μετά το χειρουργείο ($p=0,053$). Ωστόσο την 7^η ημέρα μετά το χειρουργείο οι μέσες τιμές επιστρέφουν στα προ-εγχειρητικά επίπεδα, ενώ την 30^η ημέρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης τους, φτάνοντας σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα προ-εγχειρητικά (εικόνα 14Α). Στην ομάδα ελέγχου φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα του miR-155 την 3^η ημέρα μετά το χειρουργείο.



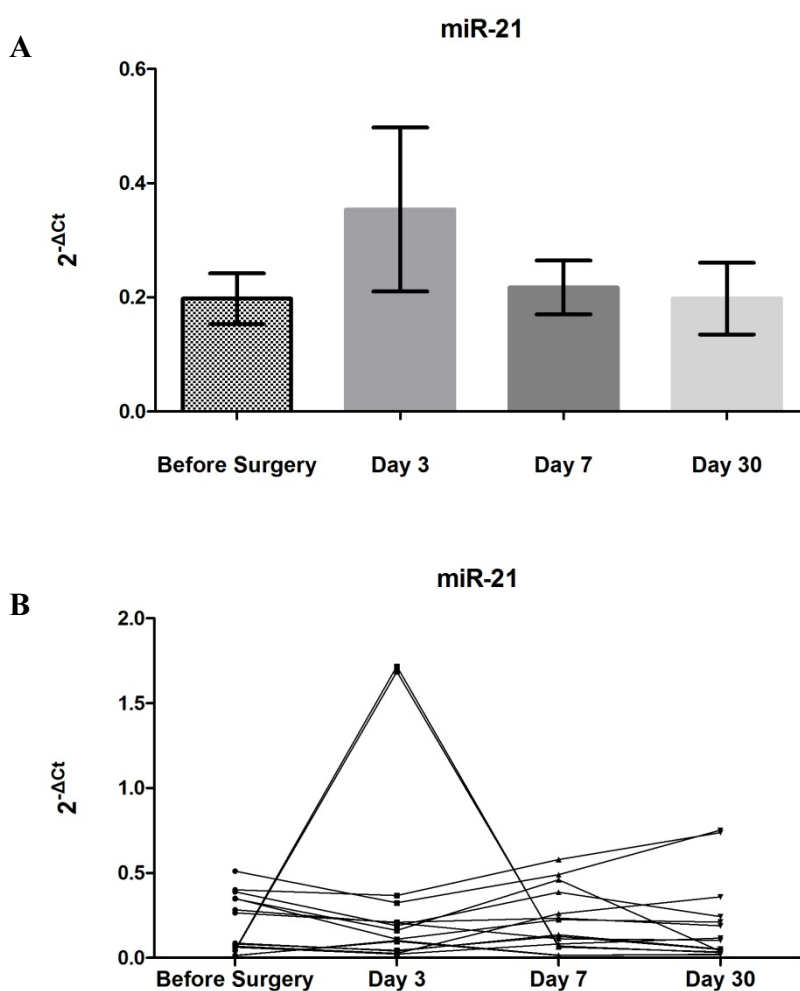
Εικόνα 14. Επίπεδα έκφρασης του miR-155 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πριν και μετά το χειρουργείο. 14Α. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα της μεσης τιμής. 14Β. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-155.



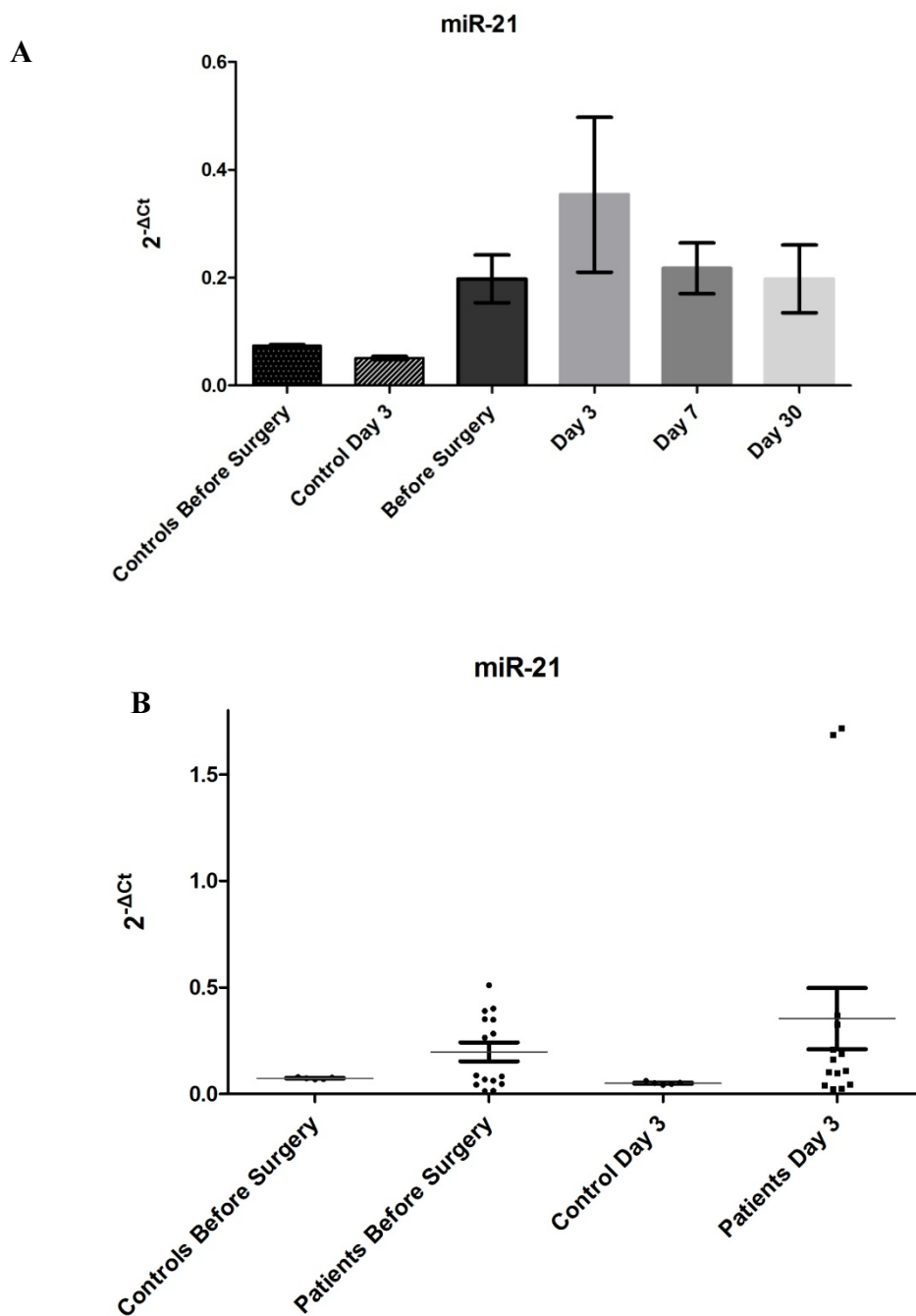
Εικόνα 15. Απεικόνιση της έκφρασης του miR-155 στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στις γυναίκες με ινοαδένωμα. 15A. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε τιμές $2^{-\Delta Ct}$ τόσο στην ομάδα μελέτης όσο και στην ομάδα ελέγχου. 15B. Η σύγκριση της ομάδας ελέγχου και της ομάδας μελέτης προ-εγχειρητικά και την 3^η μετεγχειρητική ημέρα.

miR-21

Στην ομάδα ελέγχου τα μετεγχειρητικά επίπεδα του miR-21 μειώνονται σημαντικά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα. Στην ομάδα μελέτης τα επίπεδα παραμένουν υψηλότερα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθ' όλη τη μετεγχειρητική περίοδο που μελετήσαμε, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές στην έκφραση. Φαίνεται ότι δεν ακολουθούν κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης (εικόνα 16).



Εικόνα 16. Επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πριν και μετά το χειρουργείο. 16A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα της μεσης τιμής. 16B. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-21.



Εικόνα 17. Απεικόνιση της έκφρασης του miR-21 στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στις γυναίκες με ινοαδένωμα. 17Α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε τιμές $2^{-\Delta Ct}$ τόσο στην ομάδα μελέτης όσο και στην ομάδα ελέγχου. 17Β. Η σύγκριση της ομάδας ελέγχου και της ομάδας μελέτης προ-εγχειρητικά και την 3^η μετεγχειρητική ημέρα.

2. Έκφραση microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου

Η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων των miRNA στους ασθενείς με καρκίνο του στομάχου (προεγχειρητικά, την 3^η και 7^η ημέρα μετεγχειρητικά) και στην ομάδα ελέγχου (αιμοδότες), πραγματοποιήθηκε μέσω της Real Time-PCR. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta C_t}$ και το πρόγραμμα Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA USA). Η σύγκριση των μέσων τιμών των επιπέδων των microRNA που καταγράφονται στην πάροδο του χρόνου στην ομάδα μελέτης και μεταξύ της ομάδας ελέγχου και μελέτης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το t-test θεωρώντας ως στατιστικά σημαντικό, τιμές $p \leq 0,05$.

2.1 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του απομονωθέντος RNA

Προτού χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της RT-PCR, με τη βοήθεια του nanodrop, έγινε η μέτρηση του miRNA και του cDNA των δειγμάτων. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται οι ποσότητες και οι καθαρότητες του miRNA και του cDNA των δειγμάτων.

	Code Number	ng/ μ l miRNA	ng/ μ l cDNA
Αιμοδότης	C11	124,56	456,98
Αιμοδότης	C12	128,54	498,3
Αιμοδότης	C13	368,3	435,78
Αιμοδότης	C14	36,4	422,4
Αιμοδότης	C15	120,8	605,6
Αιμοδότης	C16	109,8	454,5
Αιμοδότης	C17	150,4	463,1
Αιμοδότης	C18	132,2	449,1

Πίνακας 13. Μετρήσεις ποσοτικού ελέγχου της ομάδας ελέγχου.

	ΗΜΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Code Number	ng/ μl miRNA	ng/μl cDNA
Ασθενής 16	PRE	D61	47,60	381
	D3	D62	39,1	335,4
	D7	D63	32,6	331,8
Ασθενής 17	PRE	D64	34,3	468,8
	D3	D65	79,3	503,8
	D7	D66	202,7	570,4
Ασθενής 18	PRE	D67	95,4	553,5
	D3	D68	45,1	678,3
	D7	D69	58,5	454,7
Ασθενής 19	PRE	D70	90,6	538,1
	D3	D71	120,6	532,6
	D7	D72	74,9	434,1
Ασθενής 20	PRE	D73	92,5	490,1
	D3	D74	57,7	441,5
	D7	D75	96,6	452,2
Ασθενής 21	PRE	D76	98,6	448,8
	D3	D77	61,6	826,7
	D7	D78	78,94	726,1
Ασθενής 22	PRE	D79	41,5	631,7
	D3	D80	50,6	672,6
	D7	D81	52,2	744,4
Ασθενής 23	PRE	D82	69,4	583,8
	D3	D83	56,2	722,7
	D7	D84	64,6	673,3

Πίνακας 14. Μετρήσεις ποσοτικού ελέγχου της ομάδας μελέτης. PRE: πριν το χειρουργείο, D3: 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: 7^η μετεγχειρητική ημέρα.

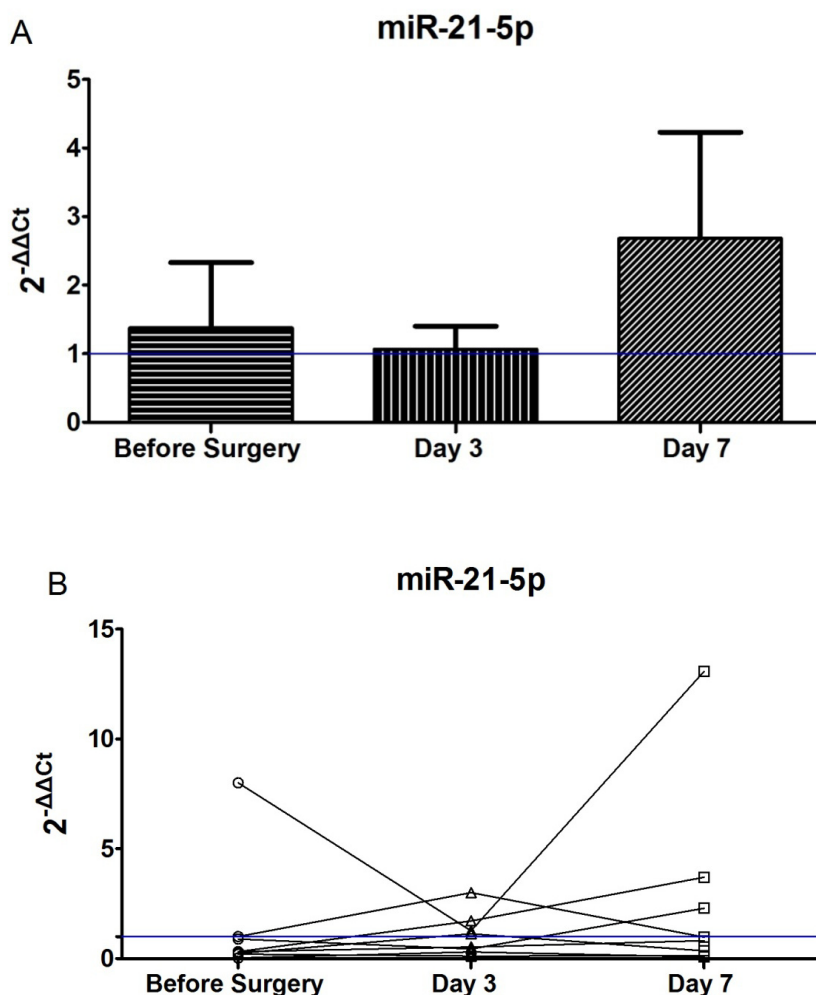
2.2 Περιεγχειρητική κινητική κυκλοφορούντων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου

Η έκφραση των miR-21, miR-21-3p, miR-155, miR-155-3p, miR-200c και let-7a-5p αξιολογήθηκε σε δείγματα αίματος ασθενών με καρκίνο του στομάχου (n=8) και αιμοδοτών (n=8). Δεν παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης των microRNAs μετά το χειρουργείο. Η έκφραση του Let-7a στους ασθενείς βρέθηκε μειωμένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

miR-21

➤ miR-21-5p

Οι μέσες τιμές της ομάδας ελέγχου δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά πριν και μετά το χειρουργείο. Την 7^η μετεγχειρητική ημέρα φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα του miR-21-5p σε σύγκριση με τα προ-εγχειρητικά επίπεδα, χωρίς όμως να φτάνουν σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (εικόνα 18A). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ασθενής που έχει υποβληθεί σε επανεπέμβαση τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα λόγω μετεγχειρητικών συλλογών, στον οποίο τα επίπεδα του miR-21 πριν το χειρουργείο είναι υψηλότερα, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ασθενείς, και παραμένουν υψηλά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 18B).

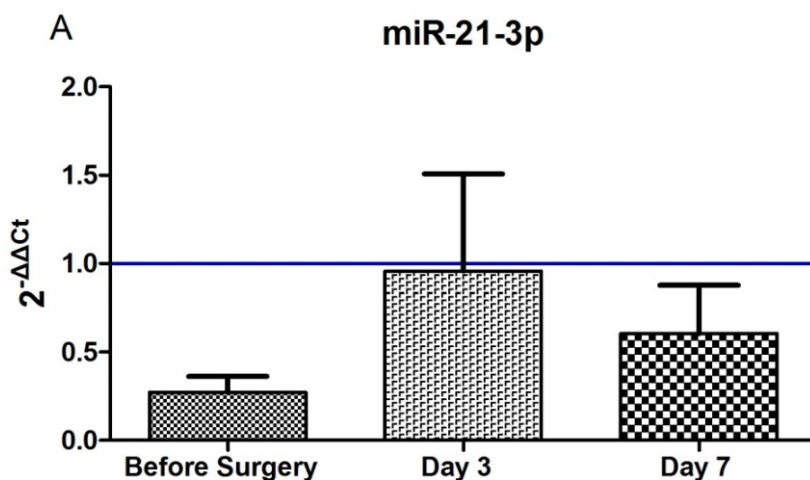


Εικόνα 18. Επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. 18A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής. 18B. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-21-5p σε κάθε ασθενή. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

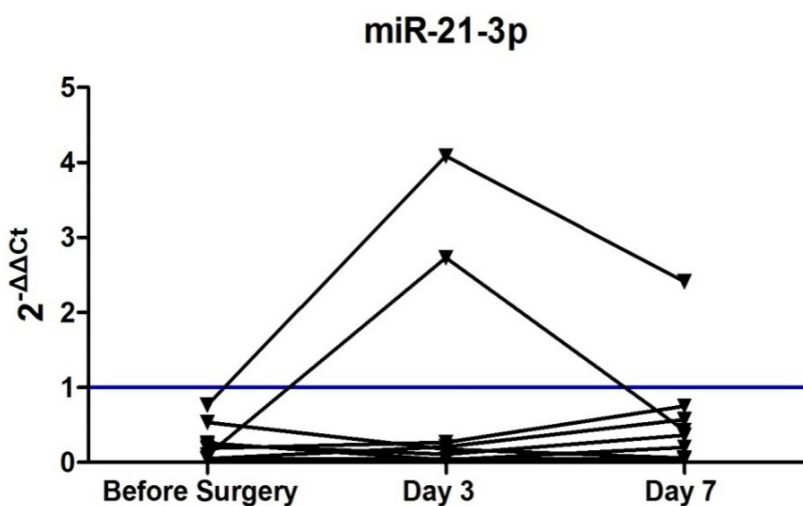
Στους περισσότερους ασθενείς την 3^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p αυξάνονται. Ωστόσο, σε σύγκριση με τους αιμοδότες, μετά το χειρουργείο το miR-21-5p υποεκφράζεται (-1,2 <fold<-12,2), με εξαίρεση τον ασθενή που υποβλήθηκε σε επανεπέμβαση.

➤ **miR-21-3p**

Ο δεύτερος κλώνος του miR-21, το miR-21-3p παρατηρήθηκε ότι εκφράζεται στους ασθενείς με καρκίνο του στομάχου. Δεν διαφέρουν σημαντικά τα επίπεδα πριν και μετά το χειρουργείο. Παρατηρείται αύξηση την 3^η μετεγχειρητική ημέρα σε σχέση με τα προ-εγχειρητικά επίπεδα. Ωστόσο, η έκφραση του miR-21-3p παραμένει κάτω από 1 (μπλε γραμμή) υποδηλώνοντας ότι υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (εικόνα 19). Στην εικόνα 20 φαίνονται οι 2 ασθενείς με τα υψηλότερα επίπεδα την 3^η μετεγχειρητική ημέρα ($2^{-\Delta Ct}=2,73$ και 4,08). Χωρίς όμως κάποια συσχέτιση με την κλινική τους εικόνα (εικόνα 20).

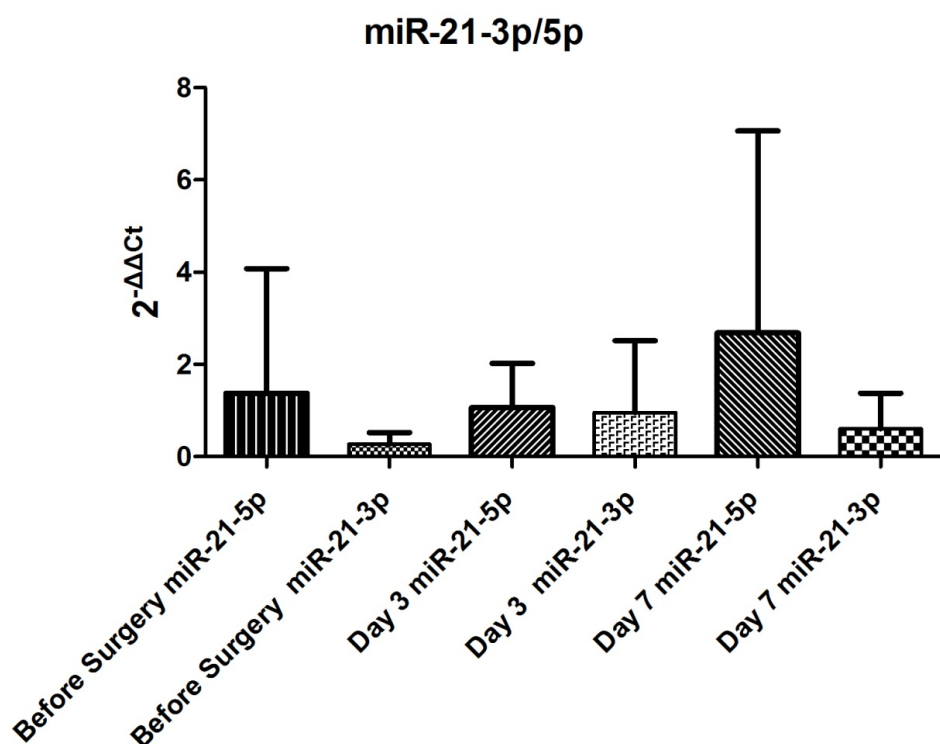


Εικόνα 19. Επίπεδα έκφρασης του miR-21-3p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 20. Επίπεδα έκφρασης του miR-21-3p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-21-3p. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

Η σύγκριση των 2 κλώνων του miR-21 φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 21). Παρατηρείται ότι το miR-21-5p εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το miR-21-3p. Επιπλέον ακολουθούν διαφορετικό κινητικό μοτίβο έκφρασης.

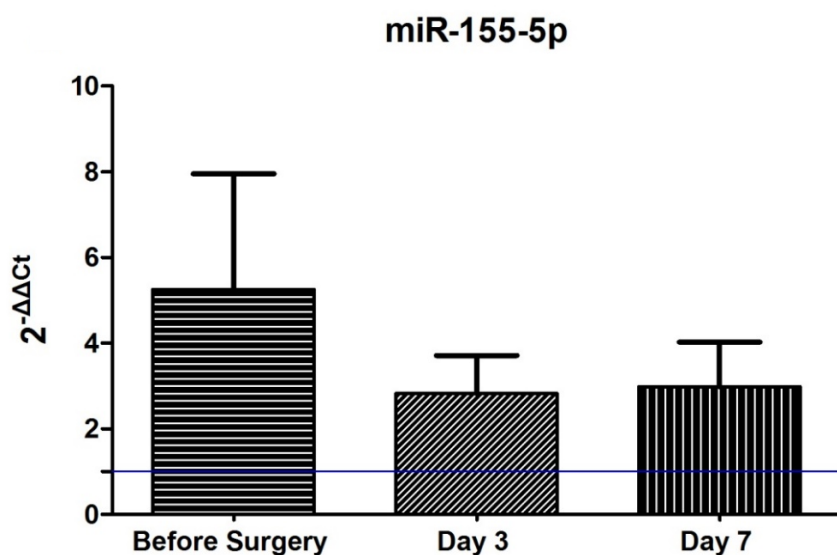


Εικόνα21. Επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p και miR-21-3p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου.

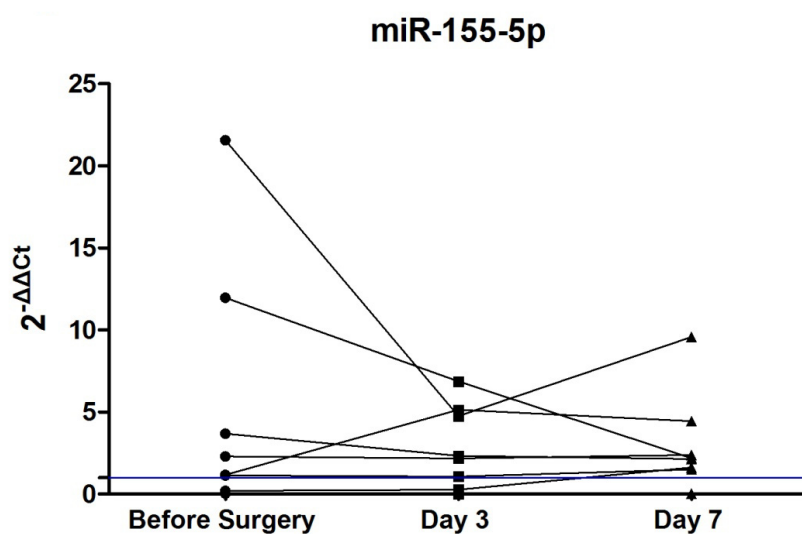
miR-155

➤ miR-155-5p

Η κινητική του miR-155-5p στους ασθενείς με καρκίνο του στομάχου δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση. Παρατηρείται μείωση των επιπέδων μετά την εγχείρηση, τα οποία παραμένουν σταθερά μέχρι και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 22). Σε σύγκριση με τους αιμοδοτές, οι τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$ των ασθενών μετά το χειρουργείο είναι μεγαλύτερες της τιμής 1, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπερεκφράζονται. Είναι ενδιαφέρον ότι οι δύο ασθενείς με τα υψηλότερα επίπεδα προ-εγχειρητικά απεβίωσαν περίπου 3 χρόνια μετά το χειρουργείο (εικόνα 23).



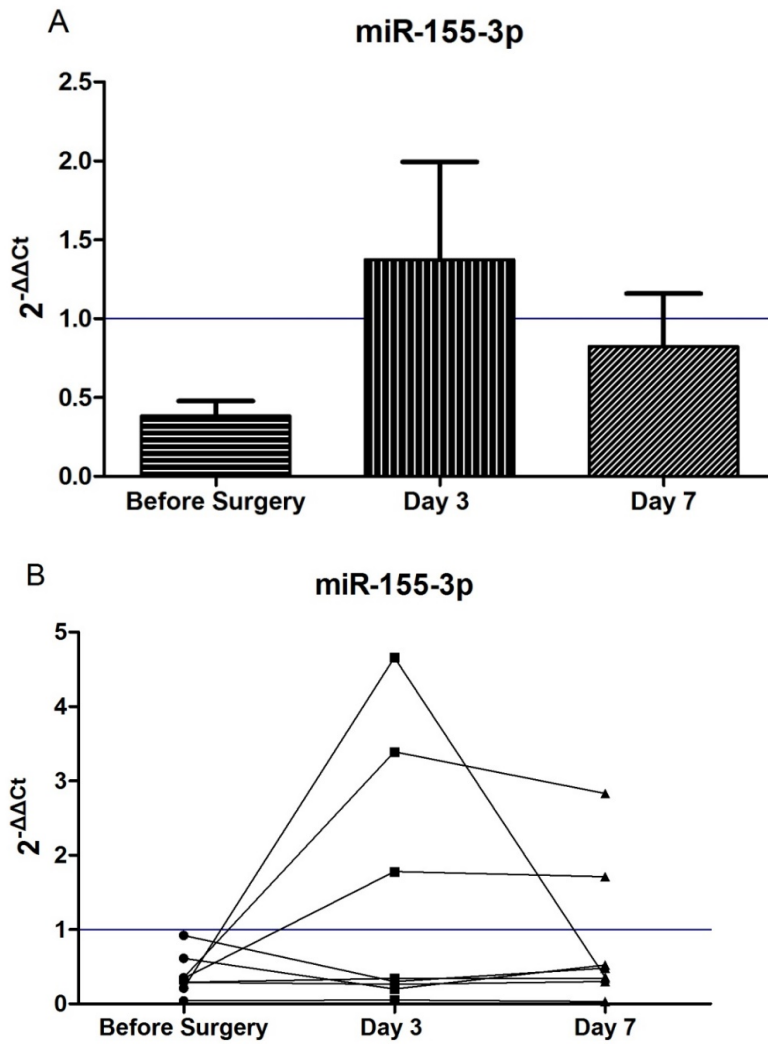
Εικόνα 22. Επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα23. Επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής έκφρασης του miR-155-5p. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

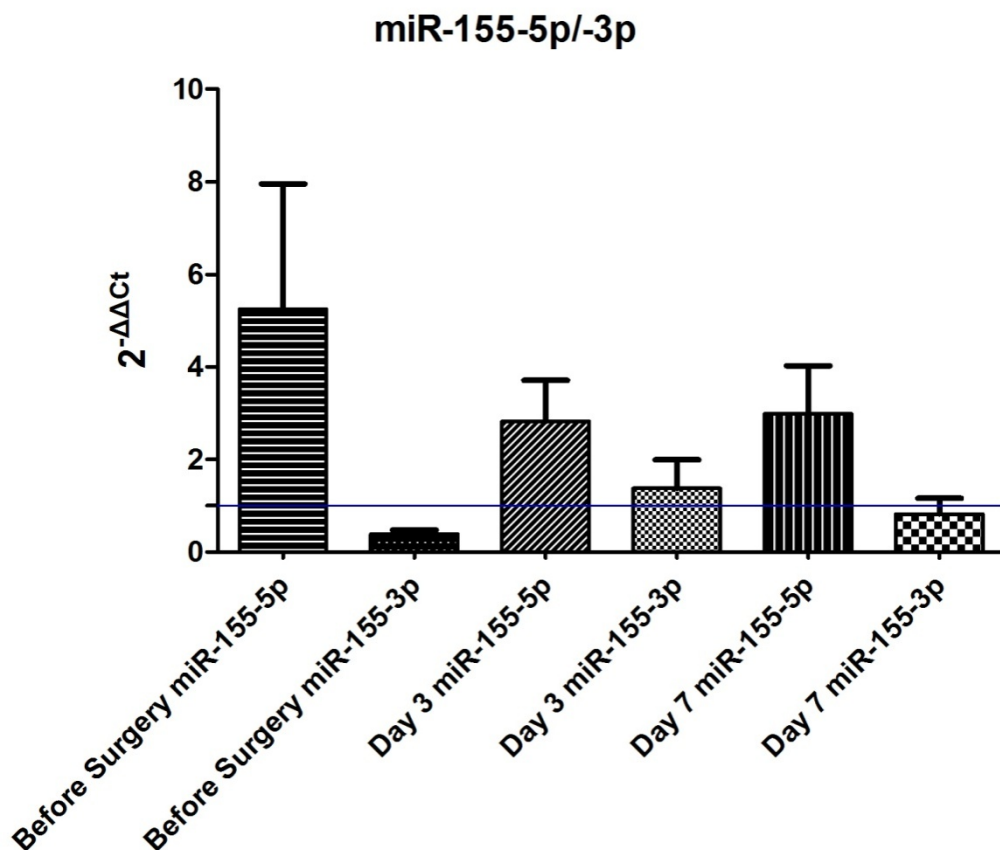
miR-155-3p

Η έκφραση του miR-155-3p δεν φαίνεται να ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο στους ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. Ωστόσο, τα επίπεδα του miR-155-3p αυξάνονται την 3^η μετεγχειρητική ημέρα χωρίς να είναι όμως στατιστικά σημαντική η παραπάνω διαφορά (εικόνα 24A). Οι τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$ των δειγμάτων έχουν εύρος από 0,003 έως 4,66. Οι υψηλότερες τιμές περιεγχειρητικά ανήκουν σε 2 ασθενείς των οποίων τα επίπεδα του miR-155-3p ήταν αυξημένα μέχρι και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς (εικόνα 24B).



Εικόνα 24. Επίπεδα έκφρασης του miR-155-3p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά την εγχείρηση. 24A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 24B. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές τις κινητικής έκφρασης του miR-155-3p. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει τη ομάδα ελέγχου.

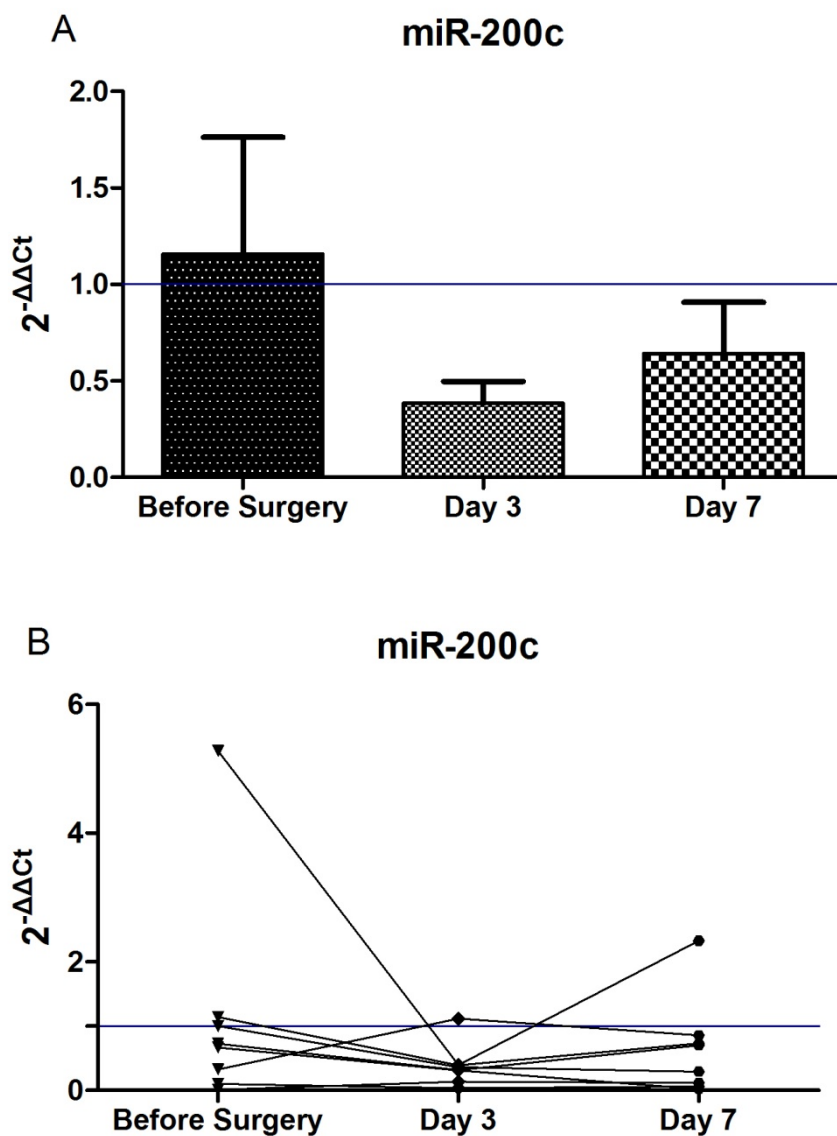
Η σύγκριση των 2 κλώνων του miR-155 φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 25). Παρατηρείται ότι το miR-155-5p εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το miR-155-3p. Επιπλέον ακολουθούν διαφορετικό κινητικό μοτίβο έκφρασης.



Εικόνα 25. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του miR-155-3p και miR-155-5p σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

miR-200c

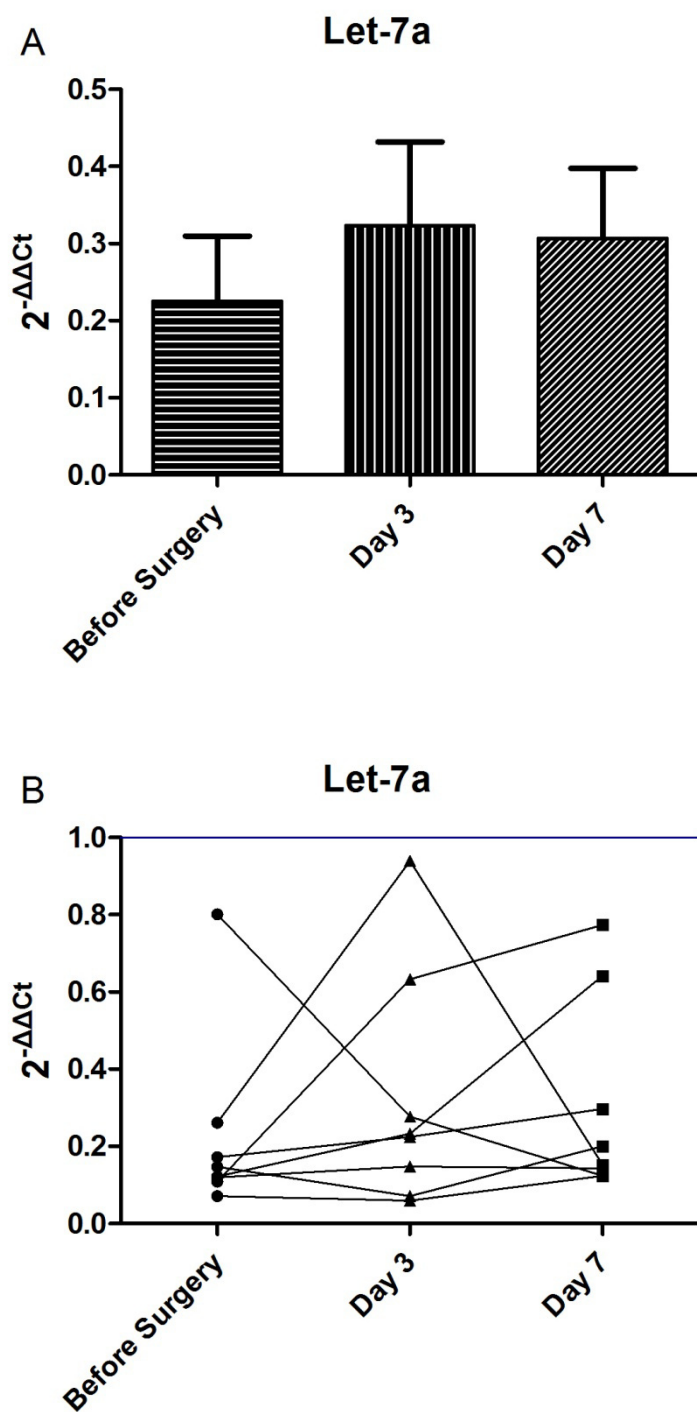
Τα επίπεδα του miR-200c στα δείγματα των ασθενών πριν και μετά την εγχείρηση δεν διαφέρουν σημαντικά. Η κινητική του miR-200c δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης (εικόνα 26A). Φαίνεται ότι την 3^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με τα προ-εγχειρητικά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ασθενής με την υψηλότερη τιμή προ-εγχειρητικά ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 5,28$) ο οποίος εμφάνισε μετάσταση στους λεμφαδένες. Τα επίπεδα του miR-200c παραμένουν ψηλά στον ίδιο ασθενή και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 26B).



Εικόνα 26. Επίπεδα έκφρασης του miR-200c σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. 26Α. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 26Β. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-200c. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

Let-7a-5p

Τα επίπεδα έκφρασης του let-7a στους ασθενείς υποεκφράζονται σε σύγκριση με τους αιμοδοτές. Όσον αφορά τα μετεγχειρητικά επίπεδα παρατηρείται αύξηση σε σχέση με τα προ-εγχειρητικά χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (εικόνα 27Α).



Εικόνα 27. Επίπεδα έκφρασης του let-7a σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου πριν και μετά το χειρουργείο. 27Α. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 27Β. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του let-7a. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

3. Έκφραση microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου

Η έκφραση των miR-155-3p, miR-155-5p, miR-135a-5p, miR-135a-3p, miR-200c και let-7a αξιολογήθηκε με τη μέθοδο της real time PCR. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA USA). Η σύγκριση των μέσων τιμών των επίπεδων των microRNAs που καταγράφονται στην πάροδο του χρόνου στην ομάδα μελέτης και μεταξύ της ομάδας ελέγχου και μελέτης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το t-test θεωρώντας ως στατιστικά σημαντικό $p \leq 0,05$.

3.1 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του απομονωθέντος RNA

Προτού πραγματοποιηθεί η μέθοδος της RT-PCR, με τη βοήθεια του nanodrop, έγινε η μέτρηση του miRNA και του cDNA των ασθενών. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται οι ποσότητες και οι καθαρότητες του miRNA και του cDNA των δειγμάτων.

	Code Number	ng/ μ l miRNA	ng/ μ l cDNA
Αιμοδότης	C19	123,8	480
Αιμοδότης	C20	68,5	472,4
Αιμοδότης	C21	92,4	468,5
Αιμοδότης	C22	56,8	493,5
Αιμοδότης	C23	89,6	459,24
Αιμοδότης	C24	100	410
Αιμοδότης	C25	73,95	445,7
Αιμοδότης	C26	79,3	401,3

Πίνακας 15. Μετρήσεις ποσοτικού ελέγχου της ομάδας ελέγχου.

Καρκίνος του Εντέρου	ΗΜΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Code Number	ng/ μl miRNA	ng/μl cDNA
Ασθενής 24	PRE	D85	110,90	685,3
	D3	D86	326,9	697,3
	D7	D87	148,4	613
Ασθενής 25	PRE	D88	133,7	355,5
	D3	D89	182,2	339,7
	D7	D90	71,1	319,7
Ασθενής 26	PRE	D91	66,7	408,7
	D3	D92	60,4	447,9
	D7	D93	125,9	459,4
Ασθενής 27	PRE	D94	140	413,3
	D3	D95	47,4	441,1
	D7	D96	37,4	400,4
Ασθενής 28	PRE	D97	37	392,5
	D3	D98	94,7	353,5
	D7	D99	95,9	378,5
Ασθενής 29	PRE	D100	37,7	355,8
	D3	D101	51,3	382,4
	D7	D102	88,8	359,3
Ασθενής 30	PRE	D103	77,9	363,2
	D3	D104	53,8	316,2
	D7	D105	37,6	319,2
Ασθενής 31	PRE	D106	54,6	407,7
	D3	D107	68,5	398,8
	D7	D108	59,5	419

Πίνακας 16. Μετρήσεις ποσοτικού ελέγχου της ομάδας μελέτης. PRE: πριν το χειρουργείο, D3: 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: 7^η μετεγχειρητική ημέρα

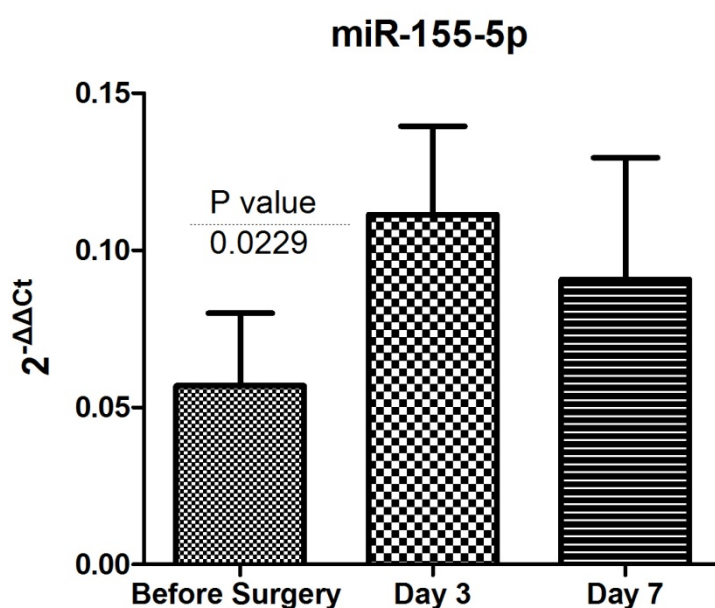
3.2 Περιεγχειρητική κινητική κυκλοφορούντων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου

Η έκφραση των miR-155, miR-155-3p, miR-135a-3p, miR-135a-5p, miR-200c και let-7a αξιολογήθηκε σε δείγματα αίματος ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (n=8) και αιμοδοτών (n=8) με τη χρήση της μεθόδου real time PCR. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η οποία αντιπροσωπεύει την τιμή 1.

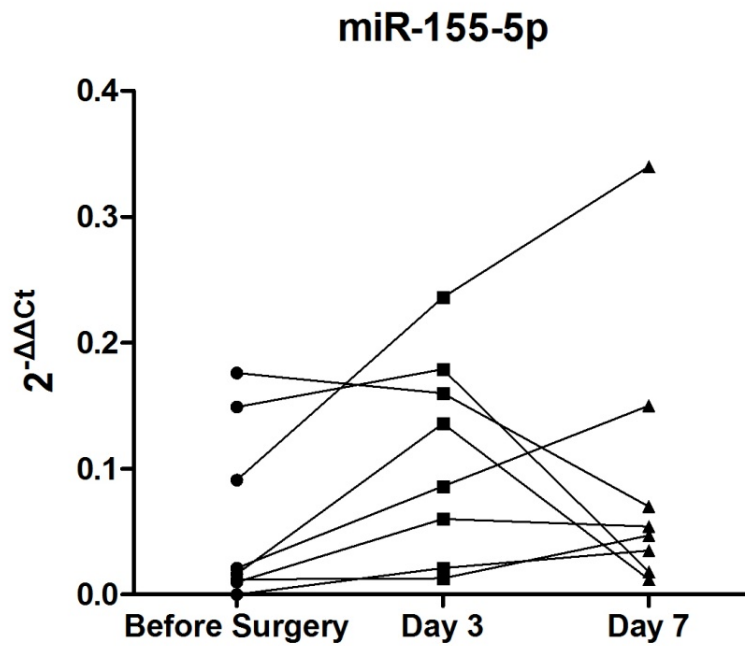
➤ miR-155

miR-155-5p

Οι τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$ των ασθενών για το miR-155-5p κυμαίνονται από 0 έως 0,34. Σύμφωνα με τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$ το miR-155-5p υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Την 3^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα του miR-155-5p αυξάνονται στατιστικά σημαντικά ($p=0,0229$) σε σχέση με τα προ-εγχειρητικά. Την 7^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα μειώνονται χωρίς όμως να φτάσουν τα επίπεδα πριν το χειρουργείο (εικόνα 28). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι 2 ασθενείς που εμφάνισαν ηπατικές μεταστάσεις είχαν αισθητά χαμηλά επίπεδα έκφρασης (-98 fold) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης (εικόνα 29). Επιπλέον, οι δύο ασθενείς που διατηρούν υψηλά επίπεδα και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα παρουσιάζουν φυσιολογικό υπέρηχο.



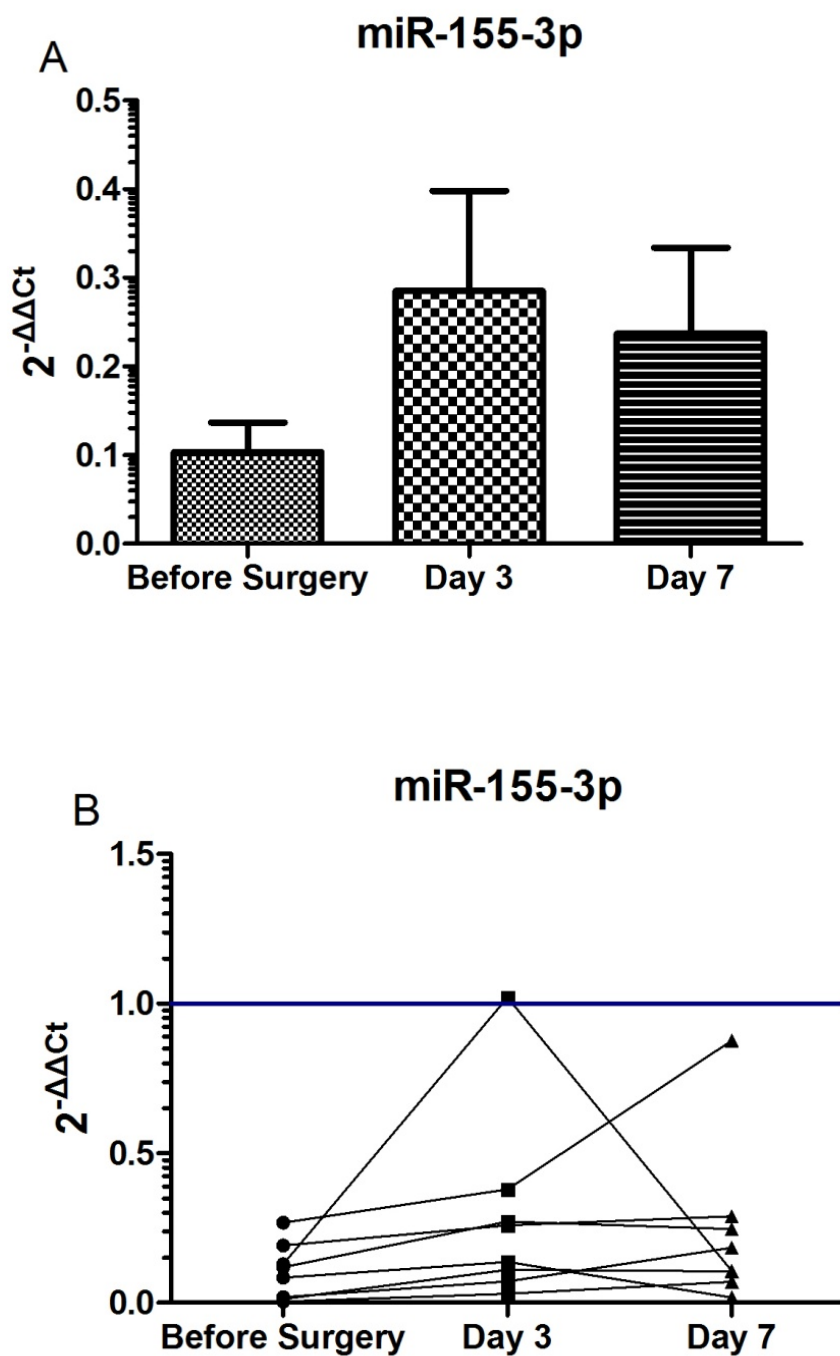
Εικόνα 28. Επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p πριν και μετά το χειρουργείο. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές.



Εικόνα 29. Επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p πριν και μετά το χειρουργείο. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-155-5p.

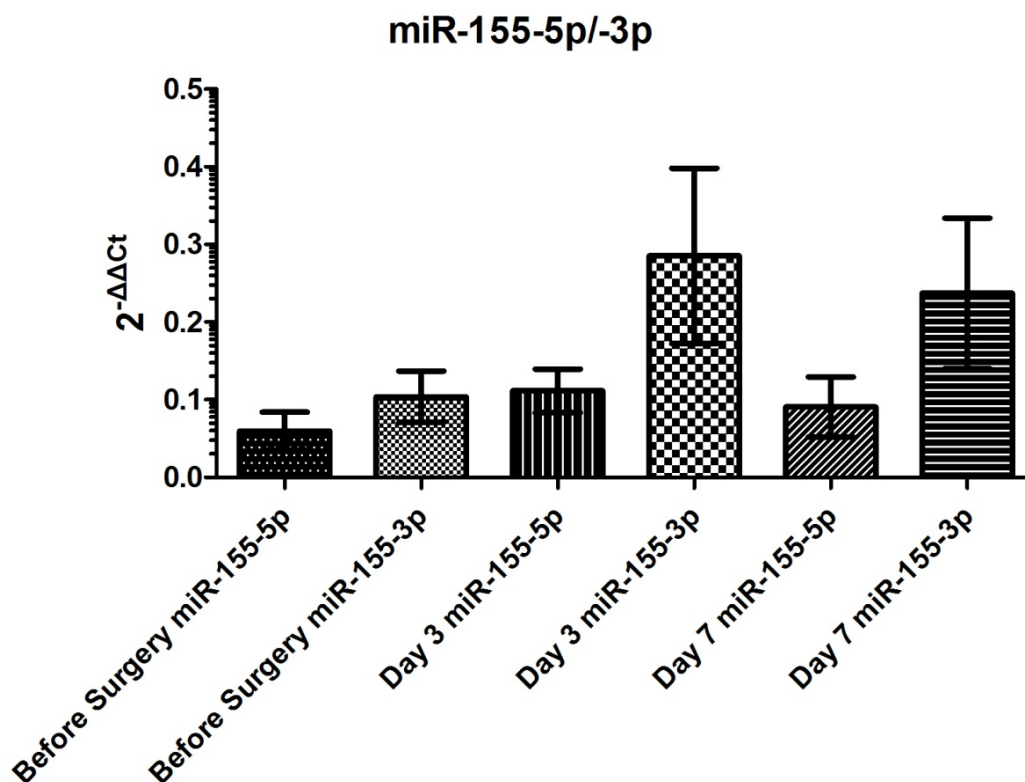
miR155-3p

Οι μέσες τιμές του miR-155-3p στους ασθενείς μετά το χειρουργείο αυξάνονται χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά. Στη συνέχεια τα επίπεδα την 7^η μετεγχειρητική ημέρα παραμένουν ίδια αλλά υψηλότερα από τα επίπεδα πριν το χειρουργείο (εικόνα 30A). Συγκρίνοντας την επιμέρους κινητική έκφραση για κάθε ασθενή παρατηρούμε ότι ακολουθούν ίδιο κινητικό μοτίβο μετά το χειρουργείο. Εξαιρέση παρουσιάζει ένας ασθενής ο οποίος έχει τα υψηλότερα επίπεδα την 3^η ημέρα ($2^{-\Delta\Delta C_t}=1,021$) και απεβίωσε από ηπατικές μεταστάσεις (εικόνα 30B).



Εικόνα 30. Επίπεδα έκφρασης του miR-155-3p πριν και μετά το χειρουργείο. 30Α. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 30Β. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-155-3p. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

Η σύγκριση των κλώνων του miR-155 παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα. Διαπιστώθηκε ότι στον καρκίνο του εντέρου το miR-155-3p εκφράζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με το miR-155-5p. Επιπλέον φαίνεται ότι ακολουθούν ίδιο μοτίβο έκφρασης μετά τη χειρουργική επέμβαση.

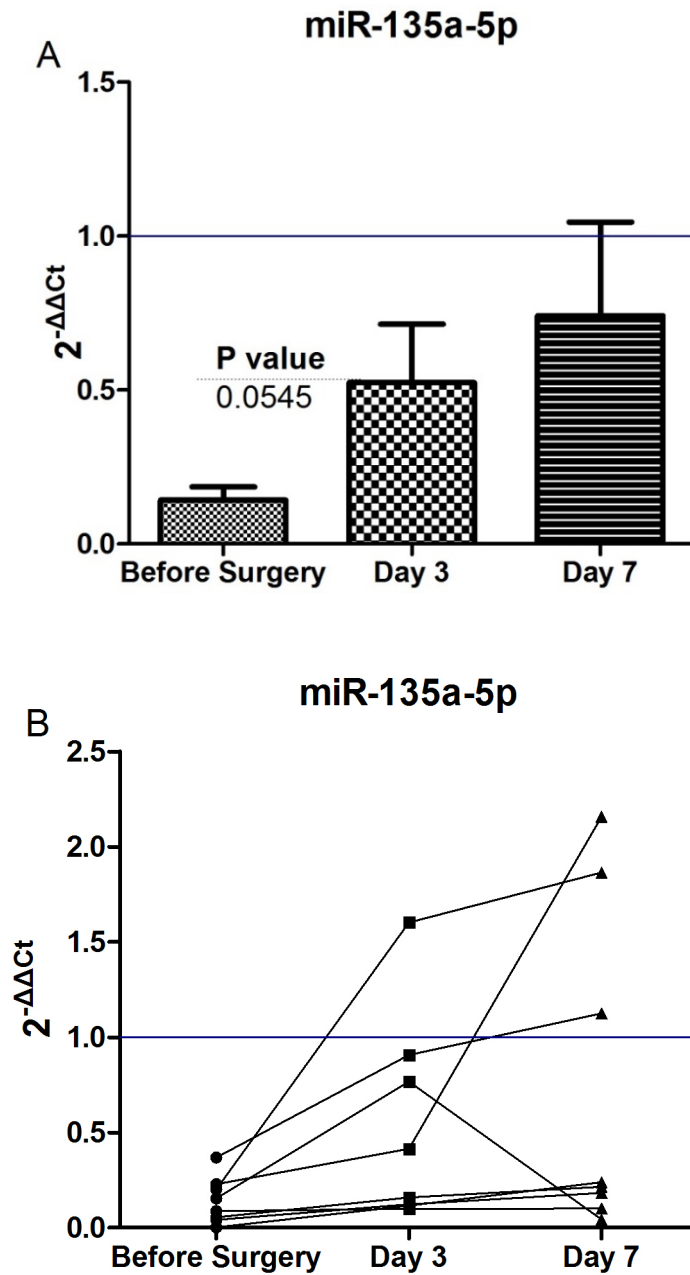


Εικόνα 31. Επίπεδα έκφρασης των δύο κλώνων του miR-155.

➤ miR-135a

miR-135a-5p

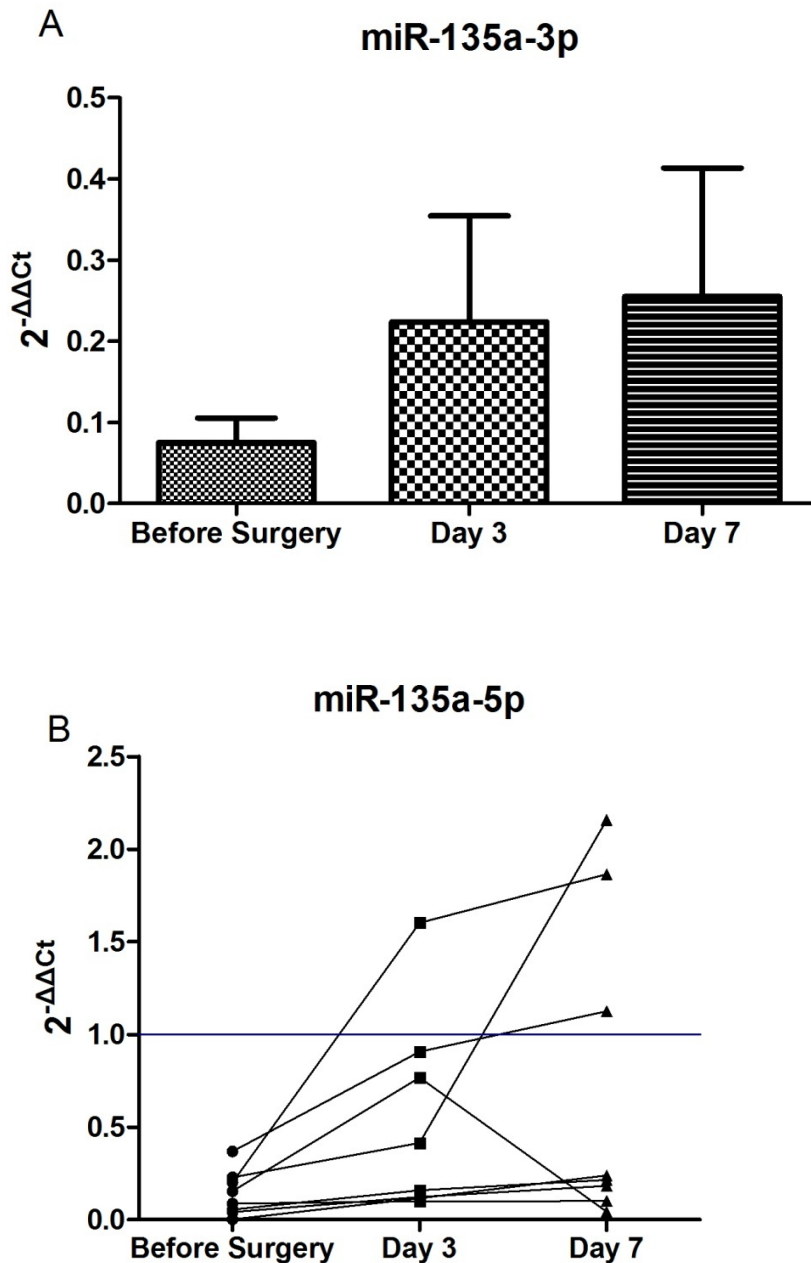
Οι μέσες τιμές του miR-135a-5p στους ασθενείς με καρκίνο του εντέρου παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 32A). Παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-135a-5p αυξάνονται την 3^η μετεγχειρητική ημέρα ($p=0,0545$) και ακολουθούν ανοδική πορεία και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα ($p=0,0675$). Εξάιρεση στα παραπάνω αποτελέσματα αποτελεί ο ασθενής που εμφάνισε ηπατικές μεταστάσεις, στον οποίο τα επίπεδα έκφρασης μειώθηκαν την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 32B).



Εικόνα 32. Επίπεδα έκφρασης του miR-135a-5p πριν και μετά το χειρουργείο. 32A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 32B. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-135a-5p. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

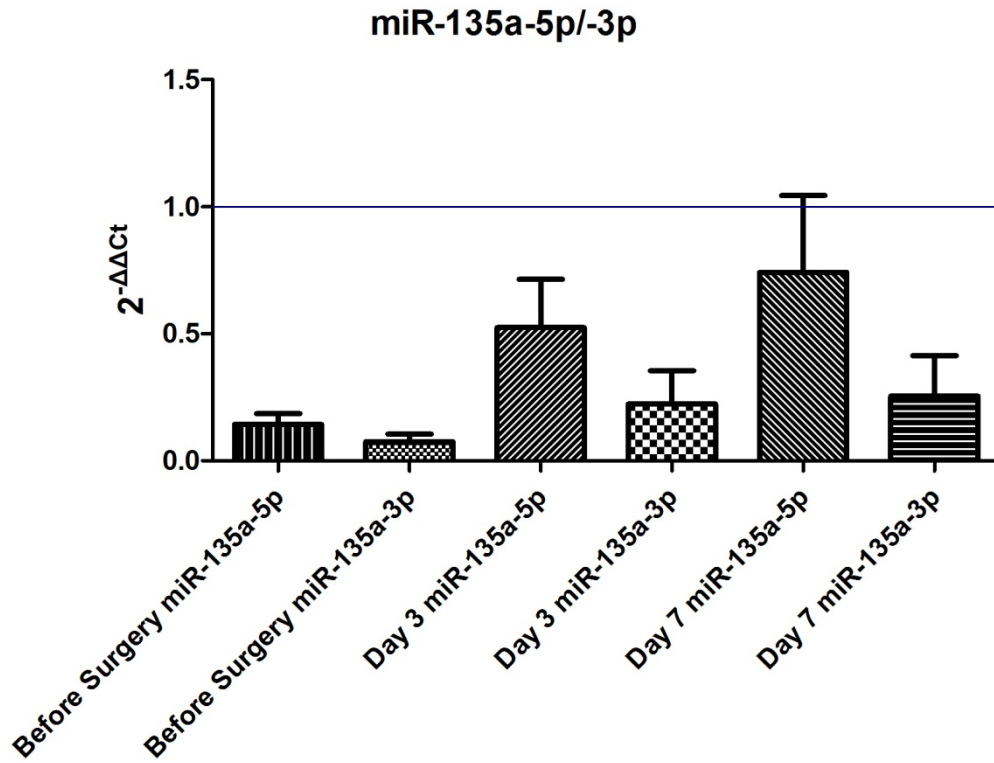
miR-135a-3p

Μετά τη χειρουργική επέμβαση, η έκφραση του miR-135a-3p αυξάνεται στους ασθενείς με καρκίνο του εντέρου την 3^η μετεγχειρητική ημέρα. Οι μέσες τιμές την 7^η μετεγχειρητική ημέρα παραμένουν στα ίδια επίπεδα με την 3^η (εικόνα 33A). Παρατηρώντας επιμέρους τους ασθενείς δεν παρατηρείται να ακολουθούν κάποιο συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης (εικόνα 33B).



Εικόνα 33. Επίπεδα έκφρασης του miR-135a-3p πριν και μετά το χειρουργείο. 33A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 33B. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-135a-3p. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

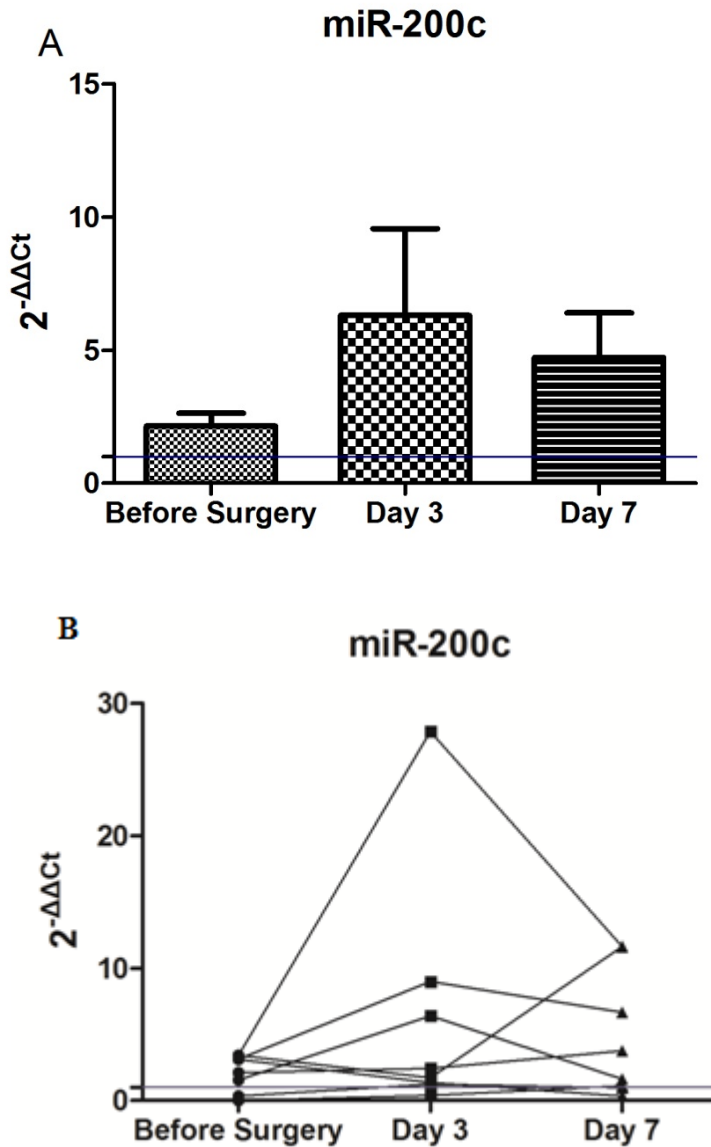
Η σύγκριση των δύο κλώνων του miR-135a φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Παρατηρείται ότι ο κλώνος 5p εκφράζεται περισσότερο σε σχέση με τον 3p. Ωστόσο, και οι δύο κλώνοι ακολουθούν ίδιο προφίλ έκφρασης μετεγχειρητικά.



Εικόνα 34. Επίπεδα έκφρασης των δύο κλώνων του miR-135a πριν και μετά το χειρουργείο στους ασθενείς με καρκίνο του εντέρου.

miR-200c

Η περιεγχειρητική κινητική του miR-200c στους ασθενείς με καρκίνο του εντέρου σε σχέση με τους αιμοδοτές απεικονίζεται στην εικόνα 35. Οι μέσες τιμές των δειγμάτων αυξάνονται την 3^η μετεγχειρητική ημέρα. Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου τα επίπεδα του miR-200c είναι αυξημένα στην ομάδα μελέτης (έως και 20 φορές πάνω) (εικόνα 35B).

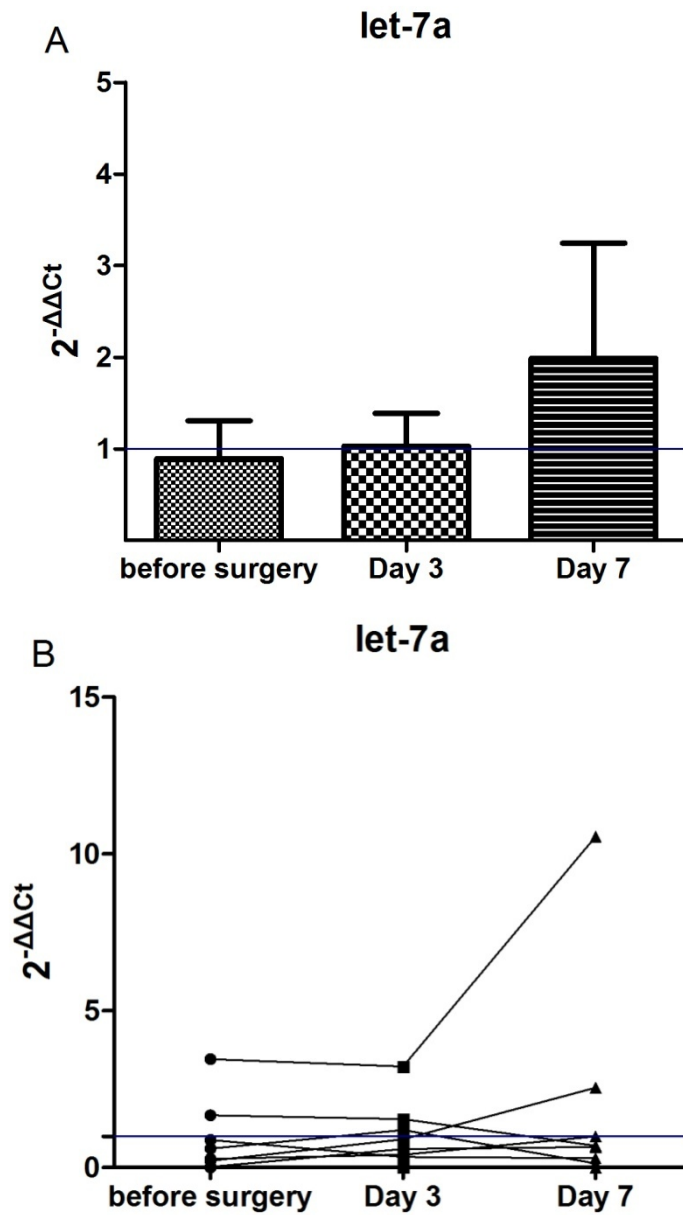


Εικόνα 35. Επίπεδα έκφρασης του miR-200c πριν και μετά το χειρουργείο. 35A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 35B. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του miR-200c. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου.

Let-7a-5p

Η μελέτη έκφρασης του let-7a έδειξε ότι το συγκεκριμένο miR υποεκφράζεται στους ασθενείς με καρκίνο του εντέρου σε σχέση με τους υγιείς. Δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές την 3^η μετεγχειρητική ημέρα. Ενώ, την 7^η μετεγχειρητική ημέρα οι μέσες τιμές του let-7a αυξάνονται χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές οι αλλαγές (εικόνα 36A). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ασθενής με τις υψηλότερες τιμές (περίπου

10 φορές πάνω από τους υγιείς) ο οποίος έπασχε από προχωρημένο νεόπλασμα (εικόνα 36B).



Εικόνα 36. Επίπεδα έκφρασης του let-7a πριν και μετά το χειρουργείο. 36A. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές. 36B. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως επιμέρους γραμμές της κινητικής του let-7a. Η μπλε γραμμή ορίζει την τιμή 1 η οποία αντιπροσωπεύει τη ομάδα ελέγχου.

4. Αλληλούχιση-Sequencing

Επεξεργαστήκαμε κατάλληλα το αποτέλεσμα της αλληλούχισης και μετά από ανάλυση με το εργαλείο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) διαπιστώσαμε πως η αλληλουχία μας miR-195 έχει 100% ομολογία με τις ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες miR- 195 στη GeneBank (εικόνα 37).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Transcripts					
<input type="checkbox"/> Homo sapiens microRNA 195 (MIR195), microRNA	40.1	40.1	100%	0.017	100%

Homo sapiens microRNA 195 (MIR195), microRNA
Sequence ID: [reflNR_029712.1](#) Length: 87 Number of Matches: 1

Range 1: 16 to 35 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

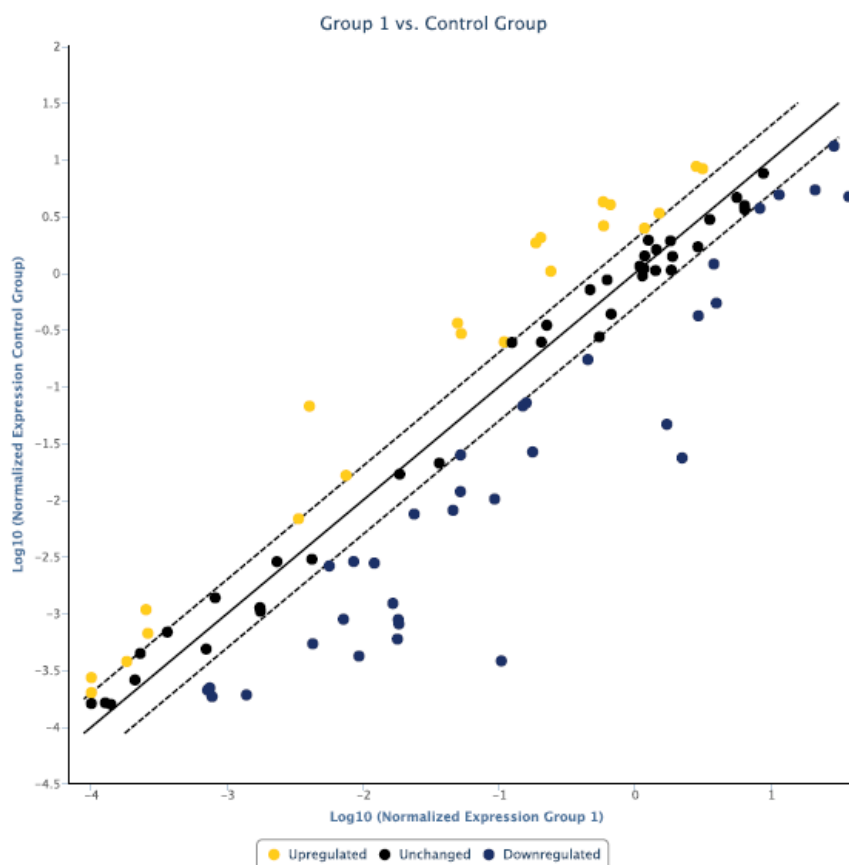
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.017	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

Query 1 AGCAGCACAGAAATATTGGC 20
Sbjct 16 AGCAGCACAGAAATATTGGC 35

Εικόνα 37. Αποτέλεσμα από την αλληλούχιση του miR-195.

5. Έκφραση των ρυθμιστικών της απόπτωσης microRNAs σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έγινε μέσω Real Time PCR arrays. Ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση 84 miRNAs που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης σε λευχαιμικά κύτταρα 9 ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία (OMΛ) και σε μονοπύρηννα υγιών ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα της συγκριτικής έκφρασης μεταξύ της Ομάδας Ελέγχου και της Ομάδας Μελέτης παρουσιάζονται στο διάγραμμα διασποράς (Scatter Plot) της εικόνας 38.



Εικόνα 38. Συγκριτική έκφραση των miRNAs μεταξύ της Ομάδας Ελέγχου και της Ομάδας Μελέτης.

Αναλυτικά τα miRNAs που υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται παρατίθενται στον Πίνακα 17 και Πίνακα 18. Βρήκαμε 32 miRNAs που υποεκφράζονται και 20 που υπέρ-εκφράζονται σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα 10 κορυφαία υποεκφραζόμενα miRNAs ήταν miR-31-5p, miR-451, miR-29b-3p, miR-409-3p, miR-144-3p, miR-9-5p, miR-192-5p, miR-542-3p, miR-134-5p, miR-29c-3p, ενώ 10 υπέρ-εκφραζόμενα miRNAs ήταν miR-34a-5p, miR-181-5p, miR-181c-5p, miR-181d-5p, miR-181b-5p, miR-222-3p, miR-125b-5p, miR-221-3p, Let-7c-5p, miR-186-3p. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το miR-31-5p το οποίο εμφανίζει την υψηλότερη (271 fold) υποέκφραση στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς.

Genes Over-Expressed in	
Group 1 vs. Control Group	
Mature ID	Fold Regulation
hsa-let-7c-5p	4,3316
hsa-miR-106b-5p	2,237
hsa-miR-122-5p	2,0068
hsa-miR-125b-5p	5,5679
hsa-miR-133b	2,5677
hsa-miR-149-3p	2,202
hsa-miR-17-5p	2,1163
hsa-miR-181a-5p	10,1254
hsa-miR-181b-5p	7,2961
hsa-miR-181c-5p	9,9018
hsa-miR-181d-5p	7,3186
hsa-miR-186-3p	4,2868
hsa-miR-193a-5p	2,0466
hsa-miR-20a-5p	2,648
hsa-miR-214-3p	2,7246
hsa-miR-221-3p	4,4465
hsa-miR-222-3p	6,0859
hsa-miR-34a-5p	16,7105
hsa-miR-449a	2,0768
hsa-miR-92a-3p	3,0878

Πίνακας 17. miRNAs που υπερ-εκφράζονται

Genes Under-Expressed in	
Group 1 vs. Control Group	
Mature ID	Fold Regulation
hsa-let-7a-5p	-2,2287
hsa-let-7g-5p	-3,1652
hsa-miR-1-3p	-3,1494
hsa-miR-134-5p	-7,857
hsa-miR-141-3p	-2,147
hsa-miR-143-3p	-4,3372
hsa-miR-144-3p	-22,1035
hsa-miR-145-5p	-5,6463
hsa-miR-153-3p	-2,9658
hsa-miR-183-5p	-3,369
hsa-miR-185-5p	-2,6029
hsa-miR-192-5p	-9,0637
hsa-miR-193b-3p	-4,175
hsa-miR-194-5p	-6,6401
hsa-miR-200c-3p	-4,3724
hsa-miR-204-5p	-7,2188
hsa-miR-21-5p	-7,9208
hsa-miR-218-5p	-3,3937
hsa-miR-23a-3p	-2,3377
hsa-miR-26a-5p	-2,2082
hsa-miR-26b-5p	-3,9134
hsa-miR-29a-3p	-6,9595
hsa-miR-29b-3p	-36,931
hsa-miR-29c-3p	-7,2942
hsa-miR-31-5p	-271,5535
hsa-miR-365b-3p	-2,0851
hsa-miR-409-3p	-22,5766
hsa-miR-451a	-94,5411
hsa-miR-542-3p	-8,0345
hsa-miR-7-5p	-2,2048
hsa-miR-9-5p	-13,4811
hsa-miR-98-5p	-2,2159

Πίνακας 18. miRNAs που υπό-εκφράζονται

Χρησιμοποιώντας το RNA22 αναγνωρίσαμε τα γονίδια στόχους που προβλέπονται να στοχεύονται ταυτόχρονα και από τα 10 κορυφαία υποεκφραζόμενα miRNAs ταυτόχρονα, και τα γονίδια στόχους που προβλέπονται να στοχεύονται ταυτόχρονα και από τα 10 κορυφαία υπερεκφραζόμενα miRNAs ταυτόχρονα. Ανάμεσα στους προβλεπόμενους στόχους των 10 κορυφαίων υποεκφραζόμενων miRNAs ήταν τα γονίδια *NSD1*, *MYST4* και *SACS*. Το γονίδιο *NSD1* κωδικοποιεί μια histone methyltransferase, ενώ το *MYST4* μια histone acetyltransferase. Οι προβλεπόμενοι στόχοι των 10 κορυφαίων υπερεκφραζόμενων miRNAs ήταν 35 γονίδια μεταξύ των

οποίων μεταγραφικοί παράγοντες zinc finger με προαποπτωτική δραστηριότητα (ZNF704, ZNF268) και Solute Carrier (SLC) μεμβρανικοί μεταφορείς (SLC24A2, SLC24A4, SLC35E3) με άγνωστη λειτουργία. Όταν συγκρίναμε την έκφραση των miRNA ασθενών με παθολογικό καρυότυπο με αυτήν ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο βρήκαμε να υπερκφράζεται το miR-125a-5p στους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανακάλυψη των microRNAs έφερε μία νέα αντίληψη στη μελέτη της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στην ογκογένεση. Υπάρχουν σημαντικές αναφορές για την άμεσα εμπλεκόμενη δράση των miRNAs στον καρκίνο σε όλα τα στάδια της νόσου. Επιπλέον, η έρευνα στον τομέα της Ογκολογίας έχει επικεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό στην αγγειογένεση του καρκίνου. Πιο ειδικά, στην πορεία των ερευνών άρχισε να μελετάται το ενδεχόμενο πιθανής προαγωγής της μεταστατικής διασποράς μετά τη χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου μέσω πρόσκαιρης ενεργοποίησης της αγγειογένεσης. Συγκεκριμένα miRNAs (angiomiRs) έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης η οποία αποτελεί κλειδί για την ανάπτυξη του όγκου. Ορισμένα miRNAs (oncomiRs) έχουν βρεθεί ακόμη να λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και άλλα ως ογκογονίδια. Μελετήσαμε την κινητική συγκεκριμένων miRNAs (που σχετίζονται με την ογκογένεση και την αγγειογένεση) στο αίμα ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο μαστού, στομάχου και παχέος εντέρου προεγχειρητικά και μετεγχειρητικά. Επιπλέον αξιολογήσαμε την έκφραση 84 miRNAs που σχετίζονται με την απόπτωση σε λευχαιμικούς βλάστες που απομονώθηκαν από ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

1. Αξιολόγηση της έκφρασης τριών microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

Μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις στην αντιμετώπιση και πρόληψη του καρκίνου του μαστού αποτελεί η ανακάλυψη ευαίσθητων και ειδικών μη επεμβατικών βιοδεικτών. Πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια ερευνούν την αξιοποίηση των microRNAs στην πρόγνωση και διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs, miR-21, miR-155 και miR-195. Αρχικά μελετήσαμε το miR-195 καθώς αποτελεί ένα δείκτη-microRNA που υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού τόσο σε δείγματα παθολογικού ιστού όσο και σε βιολογικά υγρά¹⁰¹. Στη συνέχεια μελετήσαμε το miR-155, του οποίου ο ρόλος στην αγγειογένεση και στην αιμοποίηση είναι αρκετά εδραιωμένος^{102,103}. Αυτό που θέλαμε κυρίως να ερευνήσουμε είναι κατά πόσο η χειρουργική πράξη επηρεάζει την έκφραση του. Τέλος το miR-21 αποτελεί ένα από τα πιο καλά μελετημένα microRNAs στην παθογένεια του καρκίνου. Έχει βρεθεί να διαφοροποιείται η έκφραση του σε προχωρημένα και πρώιμα στάδια του καρκίνου

του μαστού¹⁰⁴. Ωστόσο για πρώτη φορά ερευνάται η έκφραση των παραπάνω microRNAs πριν τη χειρουργική πράξη και μέχρι και 1 μήνα μετά.

Βρήκαμε ότι η έκφραση του miR-195 μειώθηκε μετά το χειρουργείο παραμένοντας σε υψηλότερα επίπεδα από την ομάδα ελέγχου. Έχει ήδη αναφερθεί ότι το miR-195 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας μη επεμβατικός διαγνωστικός βιοδείκτης σε πρώιμο καρκίνο του μαστού. Οι Heneghan και οι συνεργάτες της μελέτησαν επτά microRNAs και διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα του miR-195 και του let-7a στο αίμα ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με υγιή άτομα⁴³. Σε άλλη μελέτη, οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ότι το miR-195 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαφοροποιήσει τον καρκίνο του μαστού από άλλες κακοήθειες και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για μη επεμβατική ανίχνευση του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο¹⁰¹. Στην παρούσα έρευνα δίνουμε για πρώτη φορά, μια ένδειξη ότι επίμονα αυξημένα επίπεδα του miR-195 για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη μαστεκτομή μπορεί να προσφέρει προγνωστικές πληροφορίες σχετικά με πρώιμη υποτροπή του όγκου.

Το miR-155 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου³⁴. Αναφορικά με την εμπλοκή του στην αγγειογένεση, ο Kong και οι συνεργάτες του, πρότειναν ότι το miR-155 έχει ένα κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση των όγκων ρυθμίζοντας την ογκοκατασταστική πρωτεΐνη von Hippel -Lindau¹⁰³. Περαιτέρω έρευνα από τον Suarez και συνεργάτες, έδειξε ότι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) επάγει την έκφραση του miR-155¹⁰⁵. Μελετώντας την επίδραση της χειρουργικής επέμβασης στην κινητική του miR-155, παρατηρήσαμε για πρώτη φορά την έμμεση απόδειξη ότι η χειρουργική επέμβαση μπορεί να προωθήσει την αγγειογένεση που σχετίζονται με microRNA όπως αντανακλάται από τη διφασική κινητική της: την άμεση αύξηση των κυκλοφορούντων miR-155 σε επίπεδα που εμπίπτουν κάτω από τα αρχικά 30 ημέρες αργότερα.

Το microRNA-21 είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα microRNAs στο καρκίνο. Ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2001 από τους Lagos et al.¹⁰⁶ και το 2005 παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζει αποκλίνουσα έκφραση στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα του ανθρώπου⁴⁰. Έκτοτε, το miR-21 θεωρείται ογκογόνο miRNA

που διαμορφώνει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων στόχων που σχετίζονται με το καρκίνο, όπως του *PTEN*, *TPMI*, *PDCD* και έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου^{48,107,108}. Σε πληθώρα μελετών φαίνεται η αυξημένη έκφραση του να συσχετίζεται με τη μετάσταση¹⁰⁹. Επιπλέον, φαίνεται ότι δρα ως oncomiR στο καρκίνο του μαστού¹¹⁰. Από τα αποτελέσματα της διδακτορικής αυτής έρευνας προκύπτουν ότι τα μέσα επίπεδα του miR-21 ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Πιθανόν να έχει περιορισμένη αξία σε πρώιμο καρκίνο του μαστού, δεδομένου ότι υψηλά επίπεδα του miR-21 έχουν συσχετιστεί με προχωρημένο κλινικό στάδιο¹¹¹.

2. Αξιολόγηση της έκφρασης τεσσάρων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου

Κυκλοφορούντα microRNAs μελετήθηκαν στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου. Πληθώρα ερευνών υποστηρίζει τη χρήση των microRNAs στην πρόγνωση του καρκίνου του στομάχου. Στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε τα miR-155-5p και miR-155-3p, miR-21-5p και miR-21-3p, miR-200c και let-7a. Αρχικά θέλουμε να διερευνήσουμε την πιθανή συνύπαρξη των δύο κλώνων του ίδιου microRNA και αν διαφοροποιείται η έκφραση του στον ίδιο ασθενή. Έτσι μελετήσαμε τους 2 κλώνους των miR-21 και miR-155, τα οποία είναι oncomiRs και εδραιωμένη η έκφραση τους στον καρκίνο του στομάχου. Στη συνέχεια μελετώντας το miR-200c θέλουμε να ελέγξουμε αν η έκφραση του miR-200c σε ιστικά δείγματα αντανακλάται και στο αίμα, καθώς έχει μελετηθεί ελάχιστα στον καρκίνο του στομάχου και κυρίως σε δείγματα ιστού. Τέλος μελετήσαμε το let-7a το οποίο εμπλέκεται στη φλεγμονή και παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη των επιπέδων του ακόμη και 1 μήνα μετά το χειρουργείο.

Όπως αναπτύχθηκε στο γενικό μέρος τα ώριμα miRNAs αποτελούνται από τον 5p ή τον 3p κλώνο. Στην αρχή επικράτησε η άποψη ότι μόνο ο ένας κλώνος, συνήθως ο -5p παραμένει λειτουργικός ενώ ο συμπληρωματικός (που χαρακτηρίζεται με αστερίσκο ή -3p) αποικοδομείται. Ωστόσο, σε τελευταίες έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι και ο 3p κλώνος είναι λειτουργικός ή ακόμη σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί η συνύπαρξη των 2 κλώνων²⁰. Στα πλαίσια της διερεύνησης των

λειτουργικών κλώνων των microRNAs ερευνήθηκε, αρχικά, η πιθανότητα συνύπαρξης των miR-5p και -3p στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου.

Συνολικά, τα πειραματικά δεδομένα μελέτης των δύο κλώνων του miR-21 έδειξαν ότι εκφράζονται και οι δύο. Πιο ειδικά, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα του miR-21-5p σε σχέση με το miR-21-3p, το miR-21-5p και miR-21-3p υπέρ-εκφράζεται και υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Ωστόσο, για πρώτη φορά διαφαίνεται ότι και οι δύο κλώνοι του miR-21 εκφράζονται σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου, αν και ακολουθούν διαφορετικό προφίλ έκφρασης. Όσον αφορά τις κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται το miR-21-3p, τα δεδομένα είναι πολύ πρώιμα, καθώς η μελέτη των συγκεκριμένων μορίων-κλώνων ερευνάται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πρωτεΐνης *HDAC8*¹¹². Οι ιστόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση στον κυτταρικό κύκλο και σε αναπτυξιακά μονοπάτια. Η πρωτεΐνη *HDAC8* έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε αρκετούς καρκίνους^{113,114}. Ενώ οι αναστολείς των HDAC πρωτεϊνών μελετώνται για την αξιοποίησή τους στη θεραπεία του καρκίνου¹¹⁵. Αρκετές μελέτες στο καρκίνο του στομάχου έδειξαν ότι η έκφραση του miR-21 σε ιστούς όγκων ήταν σημαντικά υψηλότερη από ό, τι σε φυσιολογικούς ιστούς, και ήταν στενά συνδεδεμένη με το μέγεθος του όγκου⁴⁸. Με βάση τα αποτελέσματα και τη συσχέτιση με την κλινική πορεία των ασθενών φαίνεται ότι υψηλά επίπεδα του miR-21-5p πριν και μετά το χειρουργείο μπορούν να παρέχουν προγνωστικές πληροφορίες.

Στην προσπάθεια διερεύνησης της συν-έκφρασης των miR-3p και miR-5p μελετήσαμε επιπλέον το miR-155-3p και miR-155-5p. Παρατηρήθηκε ότι το miR-155-5p υπερεκφράζεται στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα του miR-155-3p αυξάνονται μετά το χειρουργείο. Στη σύγκριση των δύο κλώνων παρατηρούμε ότι το miR-155-5p βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το miR-155-3p και φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά στην έκφραση τους την 7^η μετεγχειρητική ημέρα. Τα υψηλά επίπεδα του miR-155-5p μετεγχειρητικά αντανakλούν τη σύνδεση του miR-155-5p με την αγγειογένεση. Αξίζει να σημειωθεί ότι υψηλά επίπεδα του miR-155-5p βρέθηκαν και στο καρκίνο του μαστού όπως αναφέραμε παραπάνω. Ο Elton και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι, αν και το miR-155-3p ήταν ανιχνεύσιμο σε έναν αριθμό ανθρώπινων ιστών τα επίπεδα έκφρασης αυτού του miRNA ήταν 20 έως 200 φορές μικρότερη σε σύγκριση με το miR-155-5p¹¹⁶.

Είναι γνωστό ότι η οικογένεια miR-200 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη μετάσταση του καρκίνου¹¹⁷. Ωστόσο, μικρός αριθμός ερευνών έχουν μελετήσει την έκφραση του miR-200c σε δείγματα καρκίνου του στομάχου. Σε μία έρευνα του 2013 διαπιστώθηκε ότι το miR-200c υποεκφραζόταν σε δείγματα καρκίνου του στομάχου και σε κυτταρικές σειρές. Βρέθηκε ότι τα ιστικά επίπεδα του miR-200c συσχετιζόνταν σημαντικά με το κλινικό στάδιο, το στάδιο T, τη μετάσταση στους λεμφαδένες και την επιβίωση των ασθενών¹¹⁸. Στην έρευνα μας η έκφραση του κυκλοφορούν miR-200c στους ασθενείς με καρκίνο του στομάχου ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους αιμοδότες. Τα επίπεδα του miR-200c βρέθηκε να μειώνονται μετά το χειρουργείο και να αυξάνονται την 7^η ημέρα χωρίς όμως να επιστρέφουν στις αρχικές τιμές. Ωστόσο, κάποιες έρευνες έδειξαν ότι το miR-200c βρέθηκε αυξημένο στο αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του στομάχου σε σχέση με υγιείς⁵³. Αν και τα παραπάνω αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά, παρουσιάζει ενδιαφέρον η διαπίστωση ότι οι ασθενείς με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης προεγχειρητικά παρουσιάζουν περισσότερες πιθανότητες για την εμφάνιση μετάστασης. Έχει ευρέως παρατηρηθεί ότι το miR-200c στοχεύει γονίδια που οδηγούν σε ένα τύπο καρκίνο του στομάχου που έχει συσχετιστεί με χαμηλή επιβίωση⁵⁴.

Ένα από τα πρώτα μέλη της μεγάλης κατηγορίας των μη-κωδικοποιούντων RNAs είναι το let-7, το οποίο μαζί με το lin-4 ρυθμίζουν την ακριβή χρονική στιγμή της κυτταρικής διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού στον *C.elegans*. Το let-7 είναι το πρώτο ανθρώπινο miR που εντοπίστηκε και χαρακτηρίστηκε ως «θανατηφόρο» σύμφωνα με τον φαινότυπο ενός μεταλλαγμένου σκώληκα με ανεπάρκεια του let-7. Συμφωνα με πληθώρα μελετών, το let-7a υποεκφράζεται σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου σε σχέση με τους υγιείς^{55,119,120}. Η υποέκφραση του let-7a στον καρκίνο του στομάχου επιβεβαιώνεται στη μελέτη μας. Παρατηρήσαμε ότι όλοι οι ασθενείς είχαν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τους αιμοδότες πριν το χειρουργείο μέχρι και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα. Ωστόσο δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση στην έκφραση μετά το χειρουργείο και την κλινική εικόνα των ασθενών. Σε μία πολυπαραγοντική μελέτη βρέθηκε ότι 5 microRNAs, ανάμεσα τους και το let-7a, αποτελούν έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για τη συνολική επιβίωση και την υποτροπή¹²¹.

3. Αξιολόγηση της έκφρασης τεσσάρων microRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου

Μελέτες έχουν δείξει τη χρησιμότητα των κυκλοφορούντων miRNAs ως βιοδείκτες για τον καρκίνο και συγκεκριμένα για τον καρκίνο του εντέρου (CRC). Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την έκφραση 4 microRNAs, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-135a-3p, miR-135a-5p, miR-200c και let-7a. Επιλέξαμε να μελετήσουμε την έκφραση και των δύο κλώνων των miR-155 και miR-135a. Το miR-135a έχει μελετηθεί ελάχιστα στον καρκίνο του παχέος εντέρου και κυρίως σε ιστικά δείγματα. Αντίστοιχα λιγιστές είναι και οι μελέτες για το miR-200c το οποίο εμπλέκεται σε πληθώρα μονοπατιών όπως του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Τέλος το let-7a στον καρκίνο του εντέρου φαίνεται να δρα ως ογκοκατασταλτικό. Για πρώτη μελετώνται οι δύο κλώνου του ίδιου microRNA, το miR-200c και το let-7a σε περιεγχειρητικά δείγματα.

Μελετήσαμε την έκφραση και των δύο κλώνων του miR-155 στο αίμα ασθενών με καρκίνο του εντέρου. Με βάση βιβλιογραφικές έρευνες έχει χαρακτηριστεί η λειτουργία του miR-155-5p στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Κινητική ανάλυση των miR-155-5p και -3p, αποκάλυψε ότι η έκφραση του miR-155-3p προκλήθηκε στο πρώιμο στάδιο της ενεργοποίησης του *TLR7*, και η έκφραση του miR-155-5p προκαλείται στα προχωρημένα στάδια, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή τους στην ενεργοποίησης του *PDC*¹²². Συνολικά τα πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι τα επίπεδα του miR-155-5p αυξάνονται στατιστικά σημαντικά ($p=0,0229$) την 3^η μετεγχειρητική ημέρα. Τα επίπεδα πέφτουν την 7^η μετεγχειρητική ημέρα αλλά παραμένουν σε υψηλότερα επίπεδα από τα προεγχειρητικά. Ίδιο προφίλ έκφρασης με το miR-155-5p ακολουθεί και το miR-155-3p στην ομάδα μελέτης. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του καρκίνου του στομάχου, η έκφραση του miR-155-3p φτάνει σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το miR-155-5p. Η ως άνω διαπίστωση αποτελεί για πρώτη φορά την ένδειξη ότι το miR-155-3p πιθανόν να έχει λειτουργικό ρόλο στον καρκίνο του εντέρου.

Το miR-135a θεωρείται ογκογόνο^{123,124}. Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες για το miR-135 έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα ιστού ή κυτταρικές σειρές καρκίνου του εντέρου. Η μελέτη έκφρασης των κλώνων του miR-135a έδειξε ότι ο κλώνος miR-135a-5p εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το miR-135a-3p

ακολουθώντας και οι δύο ίδιο προφίλ έκφρασης μετά το χειρουργείο. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του miR-135a-5p αυξάνονται την 3^η (p=0,0545) ημέρα και την 7^η (p=0,0675) ημέρα μετά το χειρουργείο. Την 7^η ημέρα οι ασθενείς φθάνουν σε υψηλά επίπεδα (>1) που σημαίνει ότι το miR-135a-5p υπερεκφράζεται σε σχέση με τους αιμοδοτές. Ωστόσο, οι λειτουργίες και οι μηχανισμοί του miR-135a στο καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Ο Zhou και οι συνεργάτες του ερεύνησαν τις λειτουργίες και τους μηχανισμούς του miR-135a, ειδικά τη σχέση του με το γονίδιο του καταστολέα μετάστασης 1 (*MTSS1*) σε CRC. Αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι το miR-135a προάγει την ανάπτυξη και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων CRC, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της στόχευσης του *MTSS1* ¹²⁵. Η υπερέκφραση του miR-135a και miR-135b έχει διαπιστωθεί ότι συσχετίζεται με μειωμένη έκφραση του γονιδίου *APC* ⁶⁵. Στη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μας με την κλινική πορεία των ασθενών έδειξε ότι παρατεταμένη μείωση των επιπέδων του miR-135a-5p σχετίζεται ενδεχόμενα με αυξημένες πιθανότητες μετάστασης.. Όσον αφορά το miR-135a-3p παρατηρήσαμε ότι αυξάνεται την 3^η και την 7^η μετεγχειρητική χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικό. Οι μελέτες για το miR-135a-3p είναι λίγες, ενώ οι περισσότερες έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα ιστού. Σύμφωνα με μία έρευνα του 2015 βρέθηκε ότι το miR-135a-3p ήταν αυξημένο σε δείγματα ιστού καρκίνου του εντέρου σε σχέση με τα δείγματα φυσιολογικών ιστών ¹²⁶.

Σε συγκεκριμένη έρευνα το miR-200c βρέθηκε να έχει αυξημένη έκφραση στο πλάσμα ασθενών συγκριτικά με τα φυσιολογικά άτομα. Αναλύσεις σε ιστούς που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του εντέρου έδειξαν πως το miR-200c έχει υψηλή έκφραση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Επίσης σε ιστούς ασθενών με καρκίνο του εντέρου η απορρύθμιση του miR-200c έδειξε πως προάγει τη μετάσταση του όγκου στο ήπαρ ¹²⁷. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-200c σε ιστούς ασθενών με καρκίνο του εντέρου έχει συσχετισθεί με μεταλλάξεις του *p53* ογκοκατασταλτικού γονιδίου ^{63,128}. Στα πλαίσια της διερεύνησης της έκφρασης του miR-200c σε ασθενείς με καρκίνο του εντέρου παρατηρήθηκε ότι υπέρ-εκφράζεται στο αίμα των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς. Σε σύγκριση με τα προ-εγχειρητικά επίπεδα, το miR-200c αυξάνεται την 3^η μετεγχειρητική και μειώνεται την 7^η χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικό. Άξια προς αναφορά αποτελεί η παρατήρηση ότι χαμηλά επίπεδα του miR-200c σχετίστηκαν με υποτροπή του ασθενούς. Σε μελέτη

συσχέτισης της έκφρασης του miR-200c με την υποτροπή έχει υποστηριχθεί ότι το miR-200c μπορεί να λειτουργήσει σαν προγνωστικός δείκτης¹²⁹.

Η ανώμαλη έκφραση του let-7a συνδέθηκε με μια ποικιλία ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, ασθένειες του πνεύμονα και καρκίνους. Υπάρχει μια σαφής σχέση μεταξύ της απώλειας της έκφρασης του let-7a και της ανάπτυξης της χαμηλής διαφοροποίησης των επιθετικών καρκίνων. Εκτός από τη ρύθμιση της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών κυττάρων, το let-7 εμπλέκεται στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και θεωρείται ευρέως ως ογκοκατασταλτικό. Επιπλέον το let-7a έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε καρκινικούς σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς^{68,124} Στη μελέτη μας το let-7a στους περισσότερους ασθενείς υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιβεβαιώνεται στην έρευνα μας η υποέκφραση του let-7a σε ασθενείς με καρκίνο του εντέρου ακόμη και 7 ημέρες μετά το χειρουργείο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι αυξημένα επίπεδα let-7a σε σχέση με την ομάδα ελέγχου βρέθηκαν σε ένα ασθενή με προχωρημένο νεόπλασμα.

4 Έκφραση των ρυθμιστικών της απόπτωσης microRNAs σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία με τη μέθοδο PCR arrays

Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι τα λευχαιμικά κύτταρα παρουσιάζουν ανωμαλίες συχνά στα μονοπάτια της απόπτωσης¹³⁰. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην απόπτωση καθώς φαίνεται ότι η διαταραχή της μειώνει την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία¹³¹. Επιπλέον σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης διαδραματίζουν αρκετά microRNAs¹³². Στην παρούσα διατριβή, αξιολογήθηκε ένα πάνελ 84 microRNAs τα οποία συσχετίζονται με την απόπτωση, σε CD34⁺ αιμοποιητικά κύτταρα ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Βρήκαμε 32 miRNAs τα οποία υπο-εκφράζονται και 20 τα οποία υπερεκφράζονται σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Διερεύνηση των πιθανών στόχων, με τη χρήση του εργαλείου RNA22, για τον εντοπισμό γονιδίων που αποτελούν κοινό στόχο των 10 κορυφαίων υποεκφραζόμενων microRNAs ανέδειξε 35 γονίδια, μεταξύ των οποίων είναι zinc finger μεταγραφικοί παράγοντες με προαποπτωτική δραστηριότητα

(ZNF704, ZNF268) και Solute Carrier (SLC) μεμβρανικοί μεταφορείς (SLC24A2, SLC24A4, SLC35E3) άγνωστης λειτουργίας.

Μεταξύ των υπο-εκφρασμένων miRNAs ήταν η οικογένεια miR-29 η οποία έχει συσχετισθεί και στο παρελθόν στην οξεία μυελογενή λευχαιμία^{133,134}. Το miR-31-5p το οποίο παρουσιάζει την υψηλότερη υποεκφράση στους ασθενείς με λευχαιμία φαίνεται να δρά ως προ-αποπτωτικός παράγων¹³⁵. Η πλειονότητα των microRNAs που υποεκφράζονται φαίνεται να έχουν προ-αποπτωτική λειτουργία^{136,137}. Μεταξύ των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miRNAs που βρέθηκαν να υποεκφράζονται είναι γονίδια που εμπλέκονται στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης, υποδηλώνοντας ότι οι διαταραχές επιγενετικών τροποποιητών στην ΟΜΛ οφείλονται σε ένα βαθμό σε διαταραγμένη έκφραση miRNAs.

Μεταξύ των υπερ-εκφρασμένων ήταν η οικογένεια miR-181, η οποία έχει συσχετισθεί στο παρελθόν στην οξεία μυελογενή λευχαιμία¹³⁸. Βρήκαμε ότι και τα 4 μέλη της οικογένειας του miR-181 ήταν ανάμεσα στα 10 κορυφαία microRNAs που υπερεκφράζονται. Επίσης τα περισσότερα από τα microRNAs που υπερεκφράζονται φαίνεται να έχουν στόχους αντι-αποπτωτικά γονίδια ή να αποτελούν στόχους προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών¹³⁹⁻¹⁴¹. Το miR-34a, το οποίο εκφράζεται υψηλότερα απ'όλα τα υπόλοιπα miRNAs, έχει βρεθεί να εμπλέκεται άμεσα στην απόπτωση^{140,142}.

Όταν συγκρίναμε την έκφραση των miRNA ασθενών με παθολογικό καρυότυπο με αυτήν ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο βρήκαμε να υπερεκφράζεται το miR-125a-5p στους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο. Η υπερέκφραση του miR-125b έχει προηγουμένα αναφερθεί σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή απόπτωση.

3 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η διαταραγμένη έκφραση συγκεκριμένων κυκλοφορούντων microRNAs πιθανόν να παρέχει προγνωστικές και προβλεπτικές πληροφορίες για τους μελετηθέντες καρκίνους. Επίσης, για πρώτη φορά μελετώνται οι δύο κλώνοι του ίδιου microRNA. Πιο συγκεκριμένα:

Καρκίνος του Μαστού

1. Βάσει των ευρημάτων της μελέτης επιβεβαιώνεται η υπερέκφραση του miR-195 στον καρκίνο του μαστού. Συμπεραίνεται ότι επίμονα αυξημένα επίπεδα του miR-195 για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη μαστεκτομή μπορεί να προσφέρει προγνωστικές πληροφορίες σχετικά με πρόιμη υποτροπή.
2. Στη μελέτη της έκφρασης του miR-155 πριν και μετά τη μαστεκτομή παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι η χειρουργική επέμβαση μπορεί να προάγει την αγγειογένεση σε συσχέτιση με την επαγωγή έκφρασης microRNA.
3. Η διαπιστωθείσα σε αυτή τη μελέτη μη σημαντική υπερέκφραση του miR-21 στο καρκίνο του μαστού πιθανόν επιβεβαιώνει συσχέτιση υψηλών επιπέδων του μόνο με προχωρημένο κλινικό στάδιο.

Καρκίνος του Στομάχου

1. Για πρώτη φορά μελετήθηκε η ταυτόχρονη έκφραση των δύο κλώνων του miR-21. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο προφίλ έκφρασης των δύο κλώνων, ενώ σημαντικά αυξημένα επίπεδα του miR-21-5p πριν και μετά το χειρουργείο πιθανόν να παρέχουν προγνωστικές πληροφορίες.
2. Ανιχνεύθηκαν σημαντικά επίπεδα των δύο κλώνων του miR-155 στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου. Επιβεβαιώθηκε ότι τα υψηλά μετεγχειρητικά επίπεδα του miR-155-5p αντανακλούν την επαγωγή της αγγειογένεσης, όπως και στον καρκίνο του μαστού.
3. Βάσει της ανάλυσης της έκφρασης του miR-200c στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου, παρατηρήθηκε ότι υψηλά επίπεδα του προ-εγχειρητικά πιθανώς να σχετίζονται με την αυξημένη πιθανότητα μετάστασης.

4. Αν και δεν είναι στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του let-7a, επιβεβαιώνεται η υποέκφραση του συγκεκριμένου microRNA στον καρκίνο του στομάχου.

Καρκίνος του Παχέος Εντέρου

1. Μελετήθηκε για πρώτη φορά η συν-έκφραση των miR-155-3p και miR-155-5p στο αίμα ασθενών με καρκίνο του εντέρου. Η διαπίστωση ότι το miR-155-3p παρουσίασε υψηλότερη έκφραση από το miR-155-5p, αποτελεί μία πρώτη ένδειξη ότι το miR-155-3p ενδεχόμενα να έχει λειτουργικό ρόλο στον καρκίνο του εντέρου.
2. Η συσχέτιση της έκφρασης του miR-135a-5p έδειξε ότι η παρατεταμένη μείωση των επιπέδων του πιθανόν να σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μετάστασης. Αναφέρουμε για πρώτη φορά την υψηλή έκφραση του miR-135a-3p σε βιολογικά δείγματα.
3. Επιβεβαιώθηκε, όπως και στον καρκίνο του στομάχου, η υπό-έκφραση του let-7a στο αίμα ασθενών με καρκίνο του εντέρου. Πρώιμη ένδειξη αποτελεί ότι αυξημένα επίπεδα του μπορεί να σχετίζονται με προχωρημένο νεόπλασμα.
4. Στη μελέτη της έκφρασης του miR-200c συμπεραίνεται ότι επίμονα χαμηλά επίπεδα μετά το χειρουργείο ενδεχομένως να προσφέρουν προγνωστικές πληροφορίες σχετικά με την υποτροπή του όγκου.

Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

1. Επιβεβαιώνεται η διαταραγμένη έκφραση των οικογενειών miR-29 και miR-181, ενώ βρέθηκε επιπλέον το miR-125a-5p υπερεκφράζεται σε ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο.
2. Σημαντικό εύρημα είναι ότι μεταξύ των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miRNAs που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται είναι γονίδια που κωδικοποιούν προαποπτωτικές zinc finger πρωτεΐνες και Solute Carrier μεμβρανικούς υποδοχείς.
3. Μεταξύ των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miRNAs που βρέθηκαν να υποεκφράζονται είναι γονίδια που εμπλέκονται στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης, υποδηλώνοντας ότι οι διαταραχές επιγενετικών τροποποιητών στην OML μπορεί να οφείλονται σε διαταραγμένη έκφραση miRNAs.

Περίληψη

“Προσδιορισμός κυκλοφορούντων oncomiRs και angiomiRs στο αίμα ασθενών με καρκίνο και διερεύνηση της διαγνωστικής, προγνωστικής και προβλεπτικής τους ικανότητα”

Σημαντικός ρόλος στη διαδικασία της ογκογένεσης και αγγειογένεσης αποδίδεται τα τελευταία χρόνια στα microRNAs. Τα microRNA είναι μικρά μόρια RNA που ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση γονιδίων σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο. Αρχικά, επικρατούσε η άποψη ότι μόνο το 5' σκέλος των microRNAs ήταν λειτουργικό, ενώ το 3' αποικοδομούνταν. Ωστόσο, σε τελευταίες μελέτες φαίνεται ότι ο λιγότερο άφθονος κλώνος (miRNA* ή miR-3p) είναι επίσης λειτουργικός. Όντας σταθερά στην κυκλοφορία και ανθεκτικά σε βιοχημικές αλλαγές, τα microRNAs αποτελούν ελπιδοφόρους βιοδείκτες. Πληθώρα μελετών έχουν ταυτοποιήσει την έκφραση συγκεκριμένων microRNA με προγνωστική και προβλεπτική ικανότητα. Εκτιμάται ότι τέτοιου είδους μικρά μόρια RNA μπορούν να αξιοποιηθούν για τον καλύτερο ιατρικό χειρισμό ασθενών με καρκίνο.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το ρόλο των microRNA που σχετίζονται τόσο με την αγγειογένεση όσο και με την ογκογένεση σε συμπαγείς όγκους, τον καρκίνο του μαστού, του στομάχου και του παχέος εντέρου. Επιπλέον μελετήσαμε την πιθανή έκφραση και των δύο κλώνων του ίδιου microRNA. Στο πλαίσιο ελέγχου της επίδρασης της χειρουργικής πράξης μελετήσαμε την κινητική τριών microRNA (miR-195, miR-21, miR-155) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, τεσσάρων microRNA (miR-155-5p, miR-155-3p, miR-21-5p, miR-21-3p, let-7a, miR-200c) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του στομάχου και τεσσάρων microRNA (miR-155-5p, miR-155-3p, miR-135a-5p, miR-135a-3p, let-7a, miR-200c) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου προ-εγχειρητικά και μετεγχειρητικά (3^η, 7^η και 30^η μετεγχειρητική ημέρα). Επιπλέον μελετήσαμε την έκφραση μιας ομάδας microRNAs που έχουν συσχετισθεί με την απόπτωση σε βλάστες που απομονώθηκαν από ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) και την πρόβλεψη των γονιδίων – στόχων τους.

Στον καρκίνο του μαστού επίμονα αυξημένα μετεγχειρητικά επίπεδα του miR-195 ανιχνεύθηκαν μόνο σε ασθενείς που ανέπτυξαν πρόωμη υποτροπή του όγκου και τα

επίπεδα του miR-155 έτειναν να αυξάνονται τρεις ημέρες μετά την επέμβαση. Στον καρκίνο του στομάχου για πρώτη φορά διαπιστώθηκε ότι και οι δύο κλώνοι του miR-21 και του miR-155 εκφράζονται σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου, αν και ακολουθούν διαφορετικό προφίλ έκφρασης. Επίσης βρέθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης προεγχειρητικά του miR-200c παρουσιάζουν περισσότερες πιθανότητες για εμφάνιση μετάστασης. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του καρκίνου του στομάχου, η έκφραση του miR-155 -3p φτάνει σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το miR-155-5p στον καρκίνο του εντέρου. Η ως άνω διαπίστωση αποτελεί για πρώτη φορά την ένδειξη ότι το miR-155-3p πιθανόν να έχει λειτουργικό ρόλο στον καρκίνο του εντέρου. Στη μελέτη των microRNA που εμπλέκονται στην απόπτωση στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία βρήκαμε ότι μεταξύ των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miRNAs που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται είναι γονίδια που κωδικοποιούν προαποπτωτικές zinc finger πρωτεΐνες και Solute Carrier μεμβρανικούς υποδοχείς, ενώ μεταξύ των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miRNAs που βρέθηκαν να υποεκφράζονται είναι γονίδια που εμπλέκονται στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης, υποδηλώνοντας ότι οι διαταραχές επιγενετικών τροποποιητών στην ΟΜΛ μπορεί να οφείλονται σε διαταραγμένη έκφραση miRNAs.

Συνολικά, τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρόλο των miRNAs στην ογκογένεση και την αγγειογένεση αλλά την κλινική τους σημασία ως δυνητικούς βιοδείκτες πρόγνωσης σε νεοπλασίες.

Abstract

“Determination of circulating oncomiRs and angiomiRs in blood of cancer patients and investigation of their diagnostic, prognostic and predictive capacity”

An important role in the process of tumorigenesis has been attributed in recent years to microRNAs. The microRNAs are small RNA molecules that negatively regulate the gene expression of the majority of proteins on post-transcriptional level. Initially, it was thought that only the 5' side of mature RNA was functional, while the other strand was degraded. However, the latest studies suggest that the less abundant strand (miRNA* or miR-3p) is also functional. A progress in the understanding of the biology and contribution of microRNAs in cancer is steadily ongoing. They are considered promising biomarkers due to their resistance to biochemical changes and their stability on circulation. Numerous studies have identified the prognostic and predictive value of specific microRNAs in cancer.

In this study we investigated the role of microRNA associated with both angiogenesis and tumorigenesis in solid tumors, breast, gastric and colorectal cancer. Under control of the expression both of the two strands of the same microRNA and the effect of the surgical resection we studied the kinetics of three microRNAs (miR-195, miR-21, miR-155) in the blood of breast cancer patients, four microRNAs (miR-155-5p, miR-155-3p, miR-21-5p, miR-21-3p, let-7a, miR-200c) in gastric cancer patients and four microRNAs (miR-155-5p, miR-155-3p, miR-135a-5p, miR-135a-3p, let-7a, miR-200c) in the blood of colorectal cancer patients pre-operatively and post-operatively (3d, 7th and 30th post-operative day). Furthermore, we studied the expression of a group of microRNAs that have been associated with apoptosis in blasts isolated from patients with acute myeloid leukemia and the prediction of their target genes.

In breast cancer persistently elevated levels postoperatively miR-195 were detected only in the patients who developed early tumor recurrence and that the levels of miR-155 tended to be increased three days after surgery. In gastric cancer, for the first time, it found that both strands of miR-21 and miR-155 are expressed, following different expression profiles. It is also found that high expression levels preoperatively of miR-200c provide more chances to occurrence of metastasis.

However, in contrast to gastric cancer, the expression of miR-155-3p is expressed in higher levels than the miR-155-5p in colorectal cancer. For the first time we found that, the miR-155-3p may have a functional role in colorectal cancer.

In the study of microRNAs involved in apoptosis in patients with acute myeloid leukemia, we found that between the predicted targets of over-expressed microRNAs are genes encoding pro-apoptotic zinc finger proteins and solute carrier membrane receptors. While, between the predicted target of downregulated miRNAs are genes involved in chromatin remodeling suggesting that altered function of epigenetic modifiers in AML may be due to dysregulation of miRNAs.

Overall, these data highlight the role of microRNAs in oncogenesis and angiogenesis and their clinical potential as predictive cancer biomarkers.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015;65:5-29.
2. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Molecular oncology* 2012;6:140-6.
3. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical reviews in oncology/hematology* 2011;80:193-208.
4. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2013;15:827-34.
5. Behne T, Copur MS. Biomarkers for hepatocellular carcinoma. *International journal of hepatology* 2012;2012:859076.
6. Lamparella N, Barochia A, Almokadem S. Impact of genetic markers on treatment of non-small cell lung cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 2013;779:145-64.
7. Orphanos G, Kountourakis P. Targeting the HER2 receptor in metastatic breast cancer. *Hematology/oncology and stem cell therapy* 2012;5:127-37.
8. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
10. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 2009;19:92-105.
11. Oszolak F, Poling LL, Wang Z, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 2008;22:3172-83.
12. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 2004;23:4051-60.
13. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 2004;10:1957-66.
14. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014;15:509-24.
15. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 2003;17:3011-6.
16. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004;118:57-68.
17. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199-208.
18. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 2009;11:228-34.
19. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & development* 2010;24:992-1009.
20. Choo KB, Soon YL, Nguyen PN, Hiew MS, Huang CJ. MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *Journal of biomedical science* 2014;21:95.
21. Wu H, Ye C, Ramirez D, Manjunath N. Alternative processing of primary microRNA transcripts by Droscha generates 5' end variation of mature microRNA. *PLoS one* 2009;4:e7566.
22. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* 2007;28:328-36.

23. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;448:83-6.
24. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 2010;465:584-9.
25. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 2007;131:1097-108.
26. Soriano A, Jubierre L, Almazan-Moga A, et al. microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2013;75:3-14.
27. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* 2005;7:719-23.
28. Kulkarni M, Ozgur S, Stoecklin G. On track with P-bodies. *Biochemical Society transactions* 2010;38:242-51.
29. Toyama Y, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Circulating cell-free microRNAs as biomarkers for colorectal cancer. *Surgery today* 2015.
30. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-8.
31. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:2999-3004.
32. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:15524-9.
33. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:13944-9.
34. Chira P, Vareli K, Sainis I, Papandreou C, Briasoulis E. Alterations of MicroRNAs in Solid Cancers and Their Prognostic Value. *Cancers* 2010;2:1328-53.
35. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer research* 2008;68:8164-72.
36. Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 2012;11:269-80.
37. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up dagger. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2015;26 Suppl 5:v8-v30.
38. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26:2799-803.
39. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology* 2007;27:1859-67.
40. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009;13:39-53.
41. Kong W, He L, Coppola M, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:17869-79.
42. Li D, Zhao Y, Liu C, et al. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:1722-30.
43. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of surgery* 2010;251:499-505.

44. Waddell T, Verheij M, Allum W, et al. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24 Suppl 6:vi57-63.
45. Παπαδάκου Μ. *Επιδημιολογία του Καρκίνου Κλινική Ογκολογία* 2007
46. All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. IARC 2012.
47. The World Cancer Report--the major findings. *Central European journal of public health* 2003;11:177-9.
48. Motoyama K, Inoue H, Mimori K, et al. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer. *International journal of oncology* 2010;36:1089-95.
49. Kim CH, Kim HK, Rettig RL, et al. miRNA signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy. *BMC medical genomics* 2011;4:79.
50. Li X, Luo F, Li Q, et al. Identification of new aberrantly expressed miRNAs in intestinal-type gastric cancer and its clinical significance. *Oncology reports* 2011;26:1431-9.
51. Yao Y, Suo AL, Li ZF, et al. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Molecular medicine reports* 2009;2:963-70.
52. Luo H, Zhang H, Zhang Z, et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2009;28:82.
53. Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, et al. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of translational medicine* 2012;10:186.
54. Song F, Yang D, Liu B, et al. Integrated microRNA network analyses identify a poor-prognosis subtype of gastric cancer characterized by the miR-200 family. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:878-89.
55. Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *British journal of cancer* 2010;102:1174-9.
56. Ren A, Dong Y, Tsoi H, Yu J. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 2015;16:2810-23.
57. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, Group EGW. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014;25 Suppl 3:iii1-9.
58. Gironella M, Seux M, Xie MJ, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:16170-5.
59. Li T, Yang J, Lv X, et al. miR-155 regulates the proliferation and cell cycle of colorectal carcinoma cells by targeting E2F2. *Biotechnology letters* 2014;36:1743-52.
60. Zhang GJ, Xiao HX, Tian HP, Liu ZL, Xia SS, Zhou T. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression. *International journal of molecular medicine* 2013;31:1375-80.
61. Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, et al. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Annals of surgery* 2014;259:735-43.
62. Zhang GJ, Zhou T, Liu ZL, Tian HP, Xia SS. Plasma miR-200c and miR-18a as potential biomarkers for the detection of colorectal carcinoma. *Molecular and clinical oncology* 2013;1:379-84.
63. Xi Y, Formentini A, Chien M, et al. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomarker insights* 2006;2:113-21.

64. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 2013;62:1315-26.
65. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, et al. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer research* 2008;68:5795-802.
66. Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, et al. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. *The oncologist* 2012;17:823-9.
67. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PloS one* 2014;9:e92921.
68. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2006;29:903-6.
69. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery* 2007;6:273-86.
70. Folkman J. Angiogenesis. *Annual review of medicine* 2006;57:1-18.
71. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
72. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:464-78.
73. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275-88.
74. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine* 1995;1:27-31.
75. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology* 2002;29:15-8.
76. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascular pharmacology* 2011;55:79-86.
77. Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:6334-9.
78. Lei Z, Li B, Yang Z, et al. Regulation of HIF-1 α and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration. *PloS one* 2009;4:e7629.
79. Liu XQ, Song WJ, Sun TM, Zhang PZ, Wang J. Targeted delivery of antisense inhibitor of miRNA for antiangiogenesis therapy using cRGD-functionalized nanoparticles. *Molecular pharmaceutics* 2011;8:250-9.
80. Liu LZ, Li C, Chen Q, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PloS one* 2011;6:e19139.
81. Dohner K, Paschka P, Dohner H. [Acute myeloid leukemia]. *Der Internist* 2015;56:354-63.
82. Furness SG, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunologic research* 2006;34:13-32.
83. Salmanidis M, Brumatti G, Narayan N, et al. Hoxb8 regulates expression of microRNAs to control cell death and differentiation. *Cell death and differentiation* 2013;20:1370-80.
84. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004;304:594-6.
85. Gong JN, Yu J, Lin HS, et al. The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia. *Cell death and differentiation* 2014;21:100-12.
86. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007;26:6133-40.

87. Wang Y, Li Z, He C, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood cells, molecules & diseases* 2010;44:191-7.
88. Okada N, Lin CP, Ribeiro MC, et al. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes & development* 2014;28:438-50.
89. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-50.
90. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-45.
91. Kraft A, Weindel K, Ochs A, et al. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 1999;85:178-87.
92. Folkman J. Targeted Therapies in Rheumatology (eds Smolen, J. S. & Lipsky P. E.) p111-131 (Martin Dunitz, London). 2003.
93. Cao Y. Erythropoietin in cancer: a dilemma in risk therapy. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:190-9.
94. Acs G, Acs P, Beckwith SM, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3561-5.
95. van der Bilt JD, Borel Rinke IH. Surgery and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1654:95-104.
96. Hofer SO, Molema G, Hermens RA, Wanebo HJ, Reichner JS, Hoekstra HJ. The effect of surgical wounding on tumour development. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:231-43.
97. Schaper W. SJ. Collateral Circulation; Heart, Brain, Kidney, Limbs. Kluwer Academic Publishers (Boston) 1993.
98. Tam W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* 2001;274:157-67.
99. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
100. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circulation research* 2011;109:670-9.
101. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *The oncologist* 2010;15:673-82.
102. Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, Levy Y, Swaminathan S. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology* 2014;142:32-8.
103. Kong W, He L, Richards EJ, et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2014;33:679-89.
104. Ng EK, Li R, Shin VY, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PloS one* 2013;8:e53141.
105. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, et al. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:14082-7.
106. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853-8.
107. Liu J, Lei DP, Jin T, Zhao XN, Li G, Pan XL. Altered expression of miR-21 and PTEN in human laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2011;12:2653-7.
108. Ma WJ, Lv GD, Tuersun A, et al. Role of microRNA-21 and effect on PTEN in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular biology reports* 2011;38:3253-60.
109. Pan X, Wang ZX, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer biology & therapy* 2010;10:1224-32.

110. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society transactions* 2009;37:918-25.
111. Yan LX, Huang XF, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Rna* 2008;14:2348-60.
112. Yan M, Chen C, Gong W, et al. miR-21-3p regulates cardiac hypertrophic response by targeting histone deacetylase-8. *Cardiovascular research* 2015;105:340-52.
113. Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 2008;22:1026-34.
114. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, et al. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:91-9.
115. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of clinical investigation* 2014;124:30-9.
116. Elton TS, Sansom SE, Martin MM. Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins. *RNA biology* 2010;7:540-7.
117. Roybal JD, Zang Y, Ahn YH, et al. miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1. *Molecular cancer research : MCR* 2011;9:25-35.
118. Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:5602-12.
119. Yang Q, Jie Z, Cao H, et al. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. *Carcinogenesis* 2011;32:713-22.
120. Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* 2007;13:2883-8.
121. Li X, Zhang Y, Zhang Y, Ding J, Wu K, Fan D. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut* 2010;59:579-85.
122. Zhou H, Huang X, Cui H, et al. miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2010;116:5885-94.
123. Koga Y, Yasunaga M, Takahashi A, et al. MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening. *Cancer prevention research* 2010;3:1435-42.
124. Earle JS, Luthra R, Romans A, et al. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2010;12:433-40.
125. Zhou W, Li X, Liu F, et al. MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2012;44:838-46.
126. Rotelli MT, Di Lena M, Cavallini A, et al. Fecal microRNA profile in patients with colorectal carcinoma before and after curative surgery. *International journal of colorectal disease* 2015;30:891-8.
127. Tanaka S, Hosokawa M, Ueda K, Iwakawa S. Effects of Decitabine on Invasion and Exosomal Expression of miR-200c and miR-141 in Oxaliplatin-Resistant Colorectal Cancer Cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2015.
128. Ota T, Doi K, Fujimoto T, et al. KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer research* 2012;32:2271-5.
129. Chen J, Wang W, Zhang Y, Chen Y, Hu T. Predicting distant metastasis and chemoresistance using plasma miRNAs. *Medical oncology* 2014;31:799.

130. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92:81-94.
131. Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, Minden MD. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood* 2001;98:3541-53.
132. Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *European journal of cancer* 2011;47:163-74.
133. Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009;114:5331-41.
134. Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:3183-9.
135. Bhatnagar N, Li X, Padi SK, Zhang Q, Tang MS, Guo B. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cell death & disease* 2010;1:e105.
136. Li C, Nie H, Wang M, et al. MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer. *Cancer letters* 2012;320:189-97.
137. Tay YM, Tam WL, Ang YS, et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem cells* 2008;26:17-29.
138. Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Lowenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:5078-85.
139. Tang N, Zhang J, Du Y. [Curcumin promoted the apoptosis of cisplatin-resistant human lung carcinoma cells A549/DDP through down-regulating miR-186*]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer* 2010;13:301-6.
140. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell death and differentiation* 2010;17:193-9.
141. Chai H, Liu M, Tian R, Li X, Tang H. miR-20a targets BNIP2 and contributes chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2011;43:217-25.
142. Wang X, Liu P, Zhu H, et al. miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain research bulletin* 2009;80:268-73.

