



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

***ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ: ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ. Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.***

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΝΑΣΤΟΥΛΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΓΚΛΑΡΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΤΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΗΣ: 2019



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

***ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ: ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ. Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.***

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΝΑΣΤΟΥΛΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΓΚΛΑΡΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΤΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΗΣ: 2019

Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ναστούλη Αναστασία

Τίτλος ΜΔΕ: Υγρή βιοψία: εξωσώματα. Ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Ημερομηνία παρουσίασης: 29/11/2019

Εξεταστική επιτροπή: Μαγκλάρα Αγγελική, Λεονταρίτης Γεώργιος,
Μπαϊρακτάρη Ελένη.

Η διαδικασία επικυρώνεται από:
Την/ον διευθυντή του ΠΜΣ ΒΒΕ
Την/ον Πρόεδρο του Τμήματος

Στους γονείς μου Κοσμά και Αμαλία για τη στήριξη, την αγάπη και την εμπιστοσύνη τους.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η νόσος του καρκίνου αποτελεί έναν παγκόσμιο προβληματισμό σχετικά με την πιθανότητα στο μέλλον να μπορεί να αντιμετωπιστεί. Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας βασίζεται σε αυτόν τον προβληματισμό. Σκοπός της να διευκρινήσει κάποιους όρους γύρω από τη μελέτη του καρκίνου, όπως και να αναλύσει μία καινούργια σχετικά μέθοδο διάγνωσης του, τη μέθοδο της υγρής βιοψίας, η οποία κάνει την επανάστασή της τα τελευταία χρόνια, με παγκόσμια απήχηση.

Η εργασία ξεκινά με επιδημιολογικά στοιχεία (κεφάλαιο 1), διευκρινίζοντας όρους αλλά αναφέροντας επίσης τα αίτια και τη μοριακή βάση της καρκινογένεσης. Στο κεφάλαιο δύο γίνεται μία προσέγγιση των καρκινικών κυττάρων, ενώ στο τρίτο κεφάλαιο εισάγονται οι βιοδείκτες και παρατίθενται εκείνοι που χρησιμοποιούνται με αξιοπιστία στον καρκίνο. Στην παρούσα διπλωματική αναφέρεται και η βιοψία ιστού (κεφάλαιο 4), ώστε να συγκριθεί με την σύγχρονη μέθοδο της υγρής βιοψίας. Η εργασία προχωρά εισάγοντας την έννοια της υγρής βιοψίας και αναλύοντας τις μεθόδους της, καθώς και τεχνικές που την περικλείουν (κεφάλαιο 5).

Το κύριο μέρος της εργασίας αποτελείται από τα κεφάλαια 6 και 7. Στο κεφάλαιο 6 αναλύεται μία παράμετρος της υγρής βιοψίας, τα εξωσώματα και ο ρόλος τους στον καρκίνο. Παρουσιάζονται αναλυτικά η ανακάλυψή τους, η σύνθεση και η έκκριση από τα κύτταρα, ο ρόλος τους στο περιβάλλον του όγκου και οι εφαρμογές τους στον καρκίνο. Το τελευταίο κεφάλαιο αναλύει τις διάφορες τεχνικές απομόνωσης και ανίχνευσης των εξωσωμάτων με τη μέθοδο της υγρής βιοψίας, επισημαίνοντας και μελέτες πάνω στις οποίες ανακαλύφθηκαν συγκεκριμένοι δείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου. Επίσης, αναλύονται 3 σημαντικά περιεχόμενα των εξωσωμάτων και ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση του καρκίνου, σύμφωνα με έγκυρες μελέτες. Τέλος, αναφέρονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των εξωσωμάτων στην υγρή βιοψία, σε σχέση με άλλους δύο παραμέτρους, τα CTCs (ελεύθερα καρκινικά κύτταρα) και το ctDNA (ελεύθερο καρκινικό DNA).

Η εργασία αυτή θα ήταν αδύνατο να διεκπεραιωθεί χωρίς την καθοδήγηση και τη συνδρομή της επιβλέπουσας καθηγήτριας κας Μαγκλάρα Αγγελικής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦ.1: ΚΑΡΚΙΝΟΣ : 1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

1.2 Εννοιολογική προσέγγιση

1.3 Μοριακή βάση

ΚΕΦ 2 : ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

2.1 Εισαγωγή / διαφορές καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων

2.2 Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων

2.3 Στάδια διήθησης και μετάστασης

ΚΕΦ 3 : ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

3.1 Εισαγωγή

3.2 Βιοδείκτες / παραδείγματα

3.3 Τεχνικές μοριακής διαγνωστικής

ΚΕΦ 4 : ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

4.1 Εισαγωγή

4.2 Περιγραφή τεχνικών υγρής βιοψίας

4.3 Ελεύθερο καρκινικό DNA, ctDNA

4.3.1 Απομόνωση και ανάλυση ctDNA

4.4 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, CTCs

4.4.1 Απομόνωση και ανάλυση των CTCs

ΚΕΦ 5 : ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

5.1 Η σύνθεση και ο σχηματισμός των εξωσωμάτων / Ιστορική αναδρομή

5.2 Βιογένεση και απελευθέρωση των εξωσωμάτων

5.3 Η λειτουργία των εξωσωμάτων στη φυσιολογία και την εξάπλωση της νόσου

5.4 Εφαρμογές εξωσωμάτων στον καρκίνο

ΚΕΦ 6 : ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

6.1 Εισαγωγή

6.2 Τεχνικές απομόνωσης / ανίχνευσης εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά

6.2.1 Τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στην υπερφυγοκέντρωση

6.2.2 Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων βασιζόμενες στο μέγεθος

6.2.3 Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων με βάση την ανοσοσυγγένεια

6.2.4 Διήθηση εξωσωμάτων

6.2.5 Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων βασιζόμενες στα μικρορευστά

6.3 Μέθοδοι ταυτοποίησης εξωσωμάτων / δείκτες

6.4 Ο ρόλος των εξωσωμικού περιεχομένου ως βιοδείκτης στον καρκίνο

6.4.1 Εξωσωμικά microRNAs

6.4.1.1 Καρκίνος πνεύμονα και αδενοκαρκίνωμα

6.4.1.2 Μελάνωμα

6.4.1.3 Καρκίνος μαστού και ωθηκών

6.4.1.4 Καρκίνος προστάτη

6.4.1.5 Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος / παχέος εντέρου

6.4.2 Εξωσωμικά lncRNAs

6.4.3 Εξωσωμικό DNA, exoDNA

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

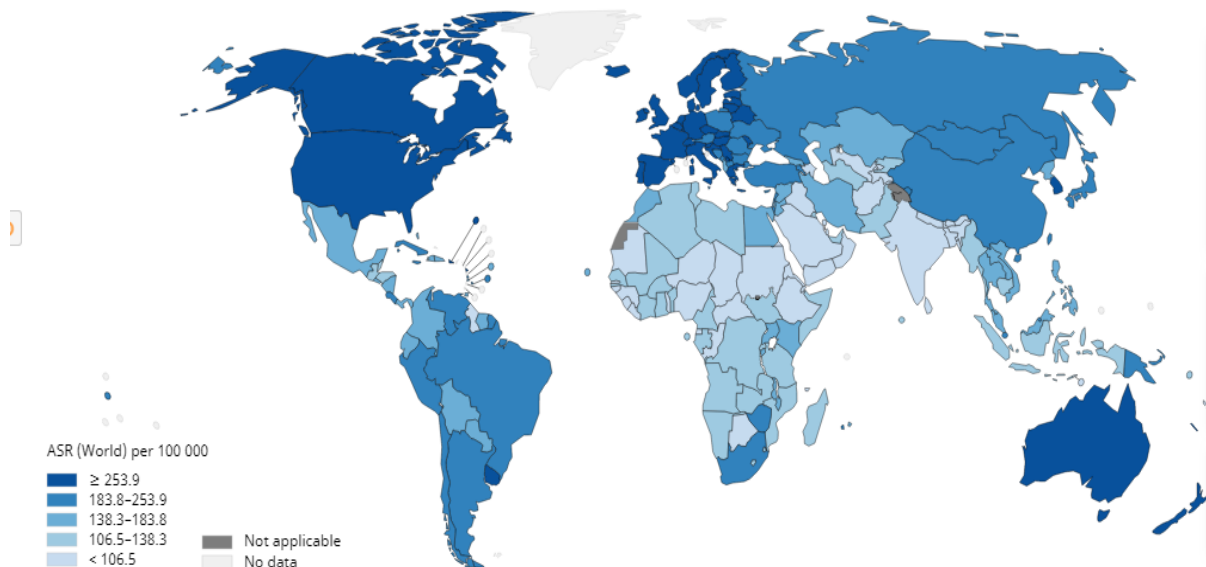
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μεγαλύτερο σύγχρονο πρόβλημα της εποχής, ο καρκίνος, αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Παρά την εξέλιξη των ερευνών και της ιατρικής επιστήμης εξαπλώνεται σαν επιδημία απειλώντας όλους τους ανθρώπους ανεξαιρέτως ηλικίας και καταγωγής. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας 84 εκ. άνθρωποι θα πεθάνουν από καρκίνο μεταξύ 2005-2015. Οι παράγοντες που επιτελούν στη δημιουργία του είναι πολλοί μεταξύ άλλων η χρήση ουσιών καπνού και αλκοόλ, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η υποκατανάλωση λαχανικών και φρούτων, το άγχος, καθώς και περιβαλλοντολογικοί παράγοντες.

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, all cancers, both sexes, all ages



Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης ποσοστών καρκίνου εν έτη 2018. Τα μεγαλύτερα ποσοστά φαίνονται στην Ευρώπη, τη βόρεια Αμερική και τον Καναδά, καθώς και στην Αυστραλία ((GCO), 2018).

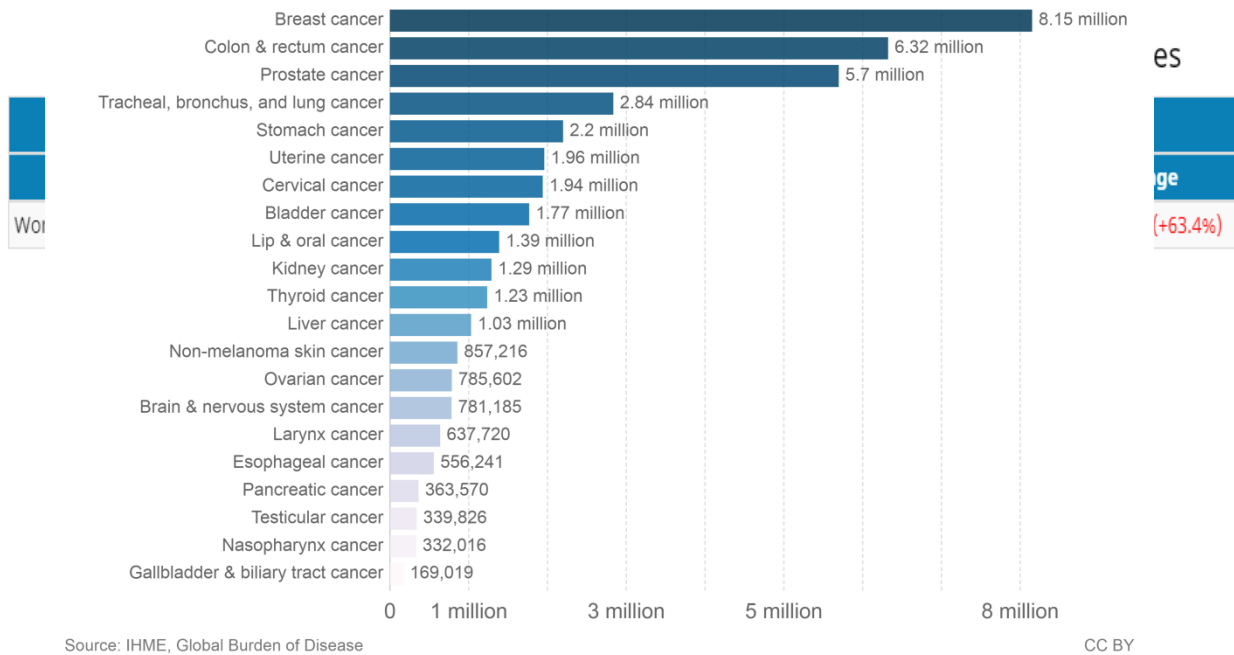
Το κομμάτι του καρκίνου που απασχολεί ιδιαίτερα τον κόσμο και την επιστημονική κοινότητα είναι οι θάνατοι σε παγκόσμιο επίπεδο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί πως το 2016 οι θάνατοι από καρκίνο στους πνεύμονες, την τραχεία και τους βρόγχους ξεπέρασαν τους 1.7 εκατομμύρια μέσα σε μία μόλις χρονιά. Έπειτα ακολουθούν ο καρκίνος του στομάχου και του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του ήπατος με 830.000 θανάτους (Max Roser, 2019).

Μία σημαντική εκτίμηση των επιδημιολογικών ερευνών, αναφέρει σημαντική αύξηση των κρουσμάτων του καρκίνου, από το 2018 έως το 2040, της τάξεως του 60 τοις εκατό, όπως φαίνεται στην εικόνα 2 ((GCO), 2018).

Number of people with cancer by type, World, 2016

Total number of people suffering from cancer at any given time, differentiated by cancer type. This is measured across both sexes and all ages.

Our World
in Data



Εικόνα 2 : Αριθμός ατόμων παγκοσμίως που νόσησαν από διαφορετικού τύπου καρκίνο εν έτη 2016 ([Max Roser, 2019](#)).

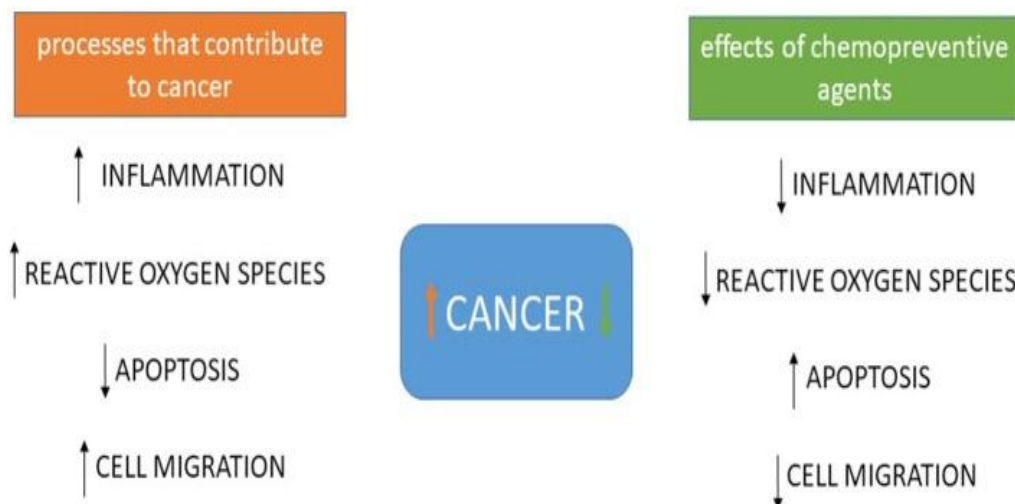
Ο πιο συχνός καρκίνος στη χώρα μας φαίνεται να είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και ακολουθούν ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη και τέλος της ουροδόχου κύστης. Οι μελέτες που γίνονται αφορούν ενήλικο πληθυσμό από 15 έτη και άνω και καταγράφονται τα κρούσματα αλλά και οι θάνατοι από τη νόσο. Παγκοσμίως στην πρώτη θέση βρίσκεται ο καρκίνος του μαστού και ακολουθούν ο καρκίνος του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του προστάτη όπως αναπαρίσταται στην εικόνα 2.

1.2 ΕΝΝΟΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η γενετική βάση του καρκίνου ανακαλύφθηκε πριν από περισσότερο από έναν αιώνα, όταν ο David von Hansemann παρατήρησε ότι κύτταρα από διαφορετικά καρκινικά δείγματα αποτελούνταν από χρωμοσωμιακές παραλλαγές. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, ο Theodor Boveri ανέφερε πως ο καρκίνος ίσως είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμιακών ανωμαλιών οδηγώντας στην αντιμετώπιση του καρκίνου ως γενετική ασθένεια. Ωστόσο δεν υπήρξε ιδιαίτερη απήχηση για αυτή την ανακάλυψη για το λόγο ότι υπήρχαν αρκετά ερωτηματικά, όπως για παράδειγμα για ποιο λόγο καθυστερεί η εμφάνιση του καρκίνου έπειτα από έκθεση σε ένα μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Στο δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, η ιδέα πως η ανάπτυξη του καρκίνου

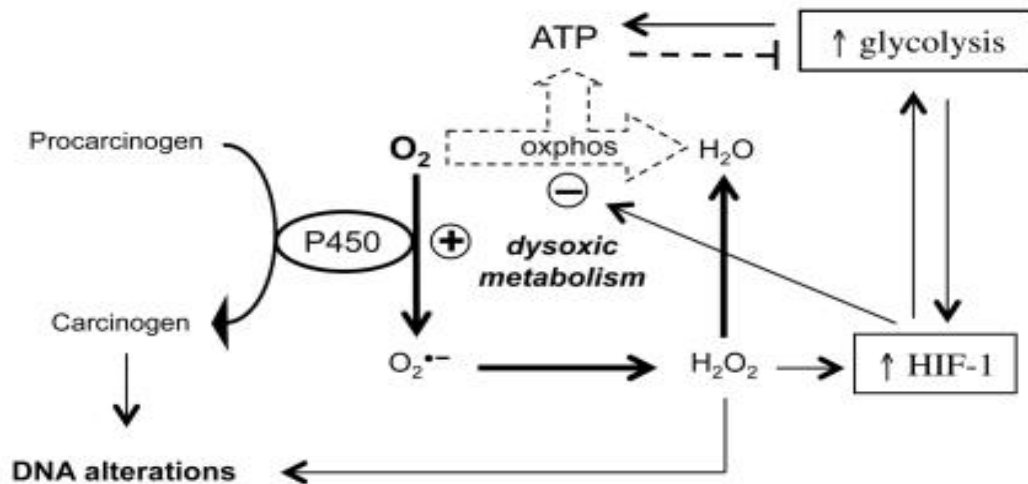
οφείλεται σε ποικίλες μεταλλάξεις άρχισε να γίνεται ευρέως αποδεκτή και ξεκίνησαν οι προσπάθειες να βρεθούν τα γονίδια εκείνα που είναι υπεύθυνα στη διεργασία της καρκινογένεσης. Το 1980 τα πρώτα ανθρώπινα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά ανακαλύφθηκαν, δικαιώνοντας τους επιστήμονες, οι οποίοι ισχυρίζονταν πως ο καρκίνος οφείλεται στην παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια ([López-Lázaro, 2010](#)).

Η καρκινογένεση, δηλαδή η δημιουργία και ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, σχετίζεται με διάφορους παράγοντες. Παράγοντες ατομικούς, αλλά και περιβαλλοντικούς. Πολλά είναι τα άτομα τα οποία κληρονομούν κάποιου είδους μετάλλαξη από τους προγόνους τους. Επίσης, άλλα άτομα δύσκολα αποβάλλουν τις τοξίνες και τις καρκινογόνες ενώσεις που μπορούμε να προσλάβουμε από ορισμένα είδη τροφίμων (αφλατοξίνες). Αυτές οι ενώσεις δεν σημαίνει πως είναι πάντα καρκινογόνες. Όταν όμως εισέρχονται στον οργανισμό, παίρνουν μέρος σε μεταβολικές διεργασίες και μεταβολίζονται στο ήπαρ, χάρη σε ενζυμικά συστήματα, σε επιβλαβείς ουσίες. Επιπλέον, άλλο αίτιο καρκινογένεσης μπορεί να είναι και κάποιος ιός ή μικρόβιο. Συνεπώς, δεν μπορούμε να πούμε με ακρίβεια ποιο είναι το έναυσμα της δημιουργίας και του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων, όμως ξέρουμε πως παίρνουν μέρος διάφοροι περιβαλλοντικοί, ατομικοί, ψυχολογικοί, γενετικοί κ.ά. παράγοντες. Στην εικόνα 3 παρατίθενται διαδικασίες οι οποίες συμβάλλουν στην καρκινογένεση και την εξέλιξή της, καθώς και τα αποτελέσματα των χημειοπροστατευτικών παραγόντων ([Fabiana Henriques Machado de Melo, 2018](#)).



Εικόνα 3: Διαδικασίες οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη ενός όγκου και οι επιδράσεις των χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Η απόπτωση είναι εμφανώς αντιστρόφως ανάλογη της ανάπτυξης του καρκίνου, ενώ η φλεγμονή, η μετανάστευση των κυττάρων και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου αυξάνουν την καρκινογένεση ([Fabiana Henriques Machado de Melo, 2018](#)).

Οι περισσότεροι καρκινογόνοι παράγοντες είναι ικανοί να προκαλέσουν αλλαγές στο γενετικό υλικό. Επίσης προκαλούν αλλαγές στο μεταβολισμό του οξυγόνου, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οδηγώντας στο οξειδωτικό στρες. Ένα παράδειγμα του πώς ένας καρκινογόνος παράγοντας μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στο γενετικό υλικό και παράλληλα στο μεταβολισμό του οξυγόνου παρουσιάζεται στην εικόνα 4 ([López-Lázaro, 2010](#)).

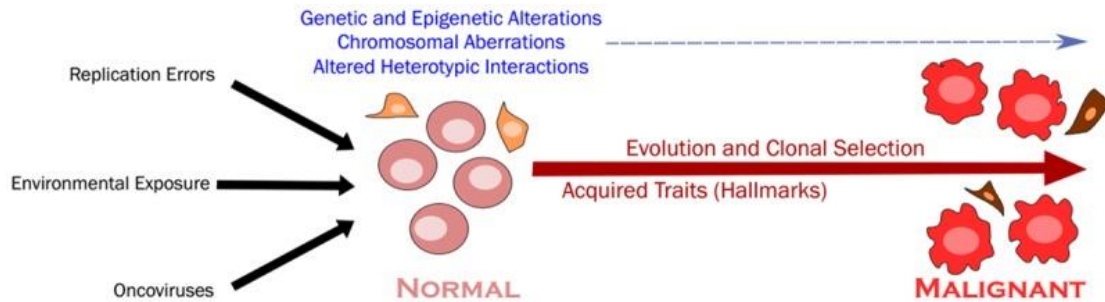


Εικόνα 4: Οι περισσότεροι προκαρκινογόνοι παράγοντες απαιτούν την ενεργοποίησή τους από ένζυμα, ώστε να μετατραπούν σε καρκινογόνους και να προκαλέσουν αλλαγές στο γενετικό υλικό. Το κυτόχρωμα P450 ενεργοποιεί το σχηματισμό καρκινογόνων ενώσεων, καθώς και το μεταβολισμό του οξυγόνου σε ελεύθερη ρίζα οξυγόνου, που έπειτα σχηματίζει το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Μία αύξηση στην παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνει τη συγκέντρωση του παράγοντα 1 που ενεργοποιείται από την υποξία (Hypoxia Induced Factor 1), ο οποίος με τη σειρά του αυξάνει τη γλυκόλυση και καταστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση (López-Lázaro, 2010).

Καρκινογόνος λέγεται μία ένωση, η οποία θα φέρει μια ειδική και καθορισμένη ανεπιθύμητη ενέργεια, την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο. Όμως για να προσδιοριστεί μία ένωση ως καρκινογόνος θα πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις. Αυτή η καρκινογόνος ένωση, θα πρέπει να προκαλεί όγκους, να αυξάνει τους όγκους που παρατηρούνται και να αυξάνει την πρόκληση πολλαπλών όγκων. Υπάρχουν διάφορες καρκινογόνες ενώσεις, οι οποίες έχουν ερευνηθεί κατά καιρούς από την επιστημονική κοινότητα και έχουν πιστοποιηθεί πως αυξάνουν την πιθανότητα πρόκλησης ενός όγκου, όμως κάποιες από αυτές δεν έχουν αξιόλογα αποτελέσματα. Αυτές μπορεί να βρίσκονται στις τροφές, στο περιβάλλον, ακόμη και σε φαρμακευτικές ενώσεις (Loffler, 2007).

1.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Τα νεοπλασματικά κύτταρα παρεκκλίνουν αρκετά από τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα χαρακτηριστικά που συνιστούν μια νεοπλασία είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, η απώλεια της διαφοροποίησης, η ελάττωση της απόπτωσης, η διηθητική ικανότητα και η πρόκληση αγγειογένεσης (Charles 2010). Η γενική ιδιότητα των νεοπλασιών, άλλωστε, είναι η διαταραχή της αύξησης, της διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου. Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται η διαδικασία της μεταλλαγής των γονιδίων.

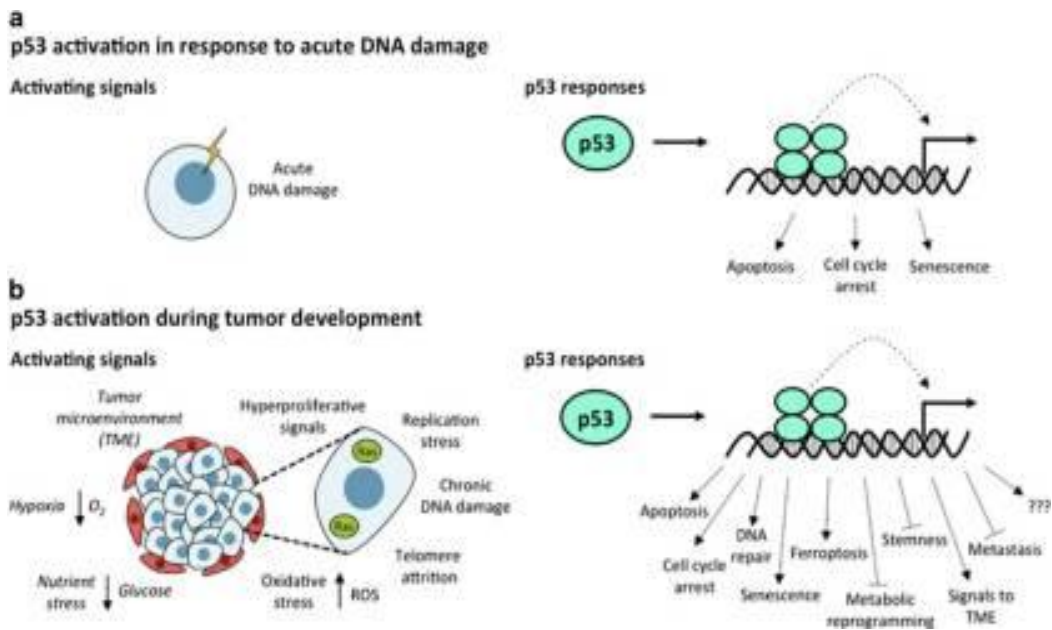


Εικόνα 5: Ποικίλοι παράγοντες επιδρούν στα κύτταρα οδηγώντας σε αλλαγές γενετικές, επιγενετικές, αλλαγές στον αριθμό και την αλληλουχία των χρωμοσωμάτων και ετεροτυπικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα στο μονοπάτι προς την ανάπτυξη κακοήθειας ([Aanei, 2017](#)).

Οι δύο κατηγορίες γονιδίων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση είναι τα πρωτοογκογονίδια και τα αντιογκογονίδια, ή αλλιώς ογκοκατασταλτικά. Τα πρωτοογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαίρεση των κυττάρων ([Loffler, 2007](#)). Με την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα, ιικών αλληλουχιών, προκύπτει υπερέκφραση των κυτταρικών γονιδίων και με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούνται τα πρωτοογκογονίδια, τα οποία μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Με τη σειρά τους τα ογκογονίδια διαταράσσουν την ισορροπία μεταξύ αύξησης και διαίρεσης και έτσι ξεκινά η δημιουργία καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες ογκογονιδίων. Τα κυτταρικά ογκογονίδια και τα ιικά. Τα κυτταρικά ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένα ογκογονίδια συγγενικά με τα υπόλοιπα, τα οποία προκαλούν όγκους. Από την άλλη, τα ιικά ογκογονίδια, είναι τα αντίστοιχα ιικής προέλευσης.

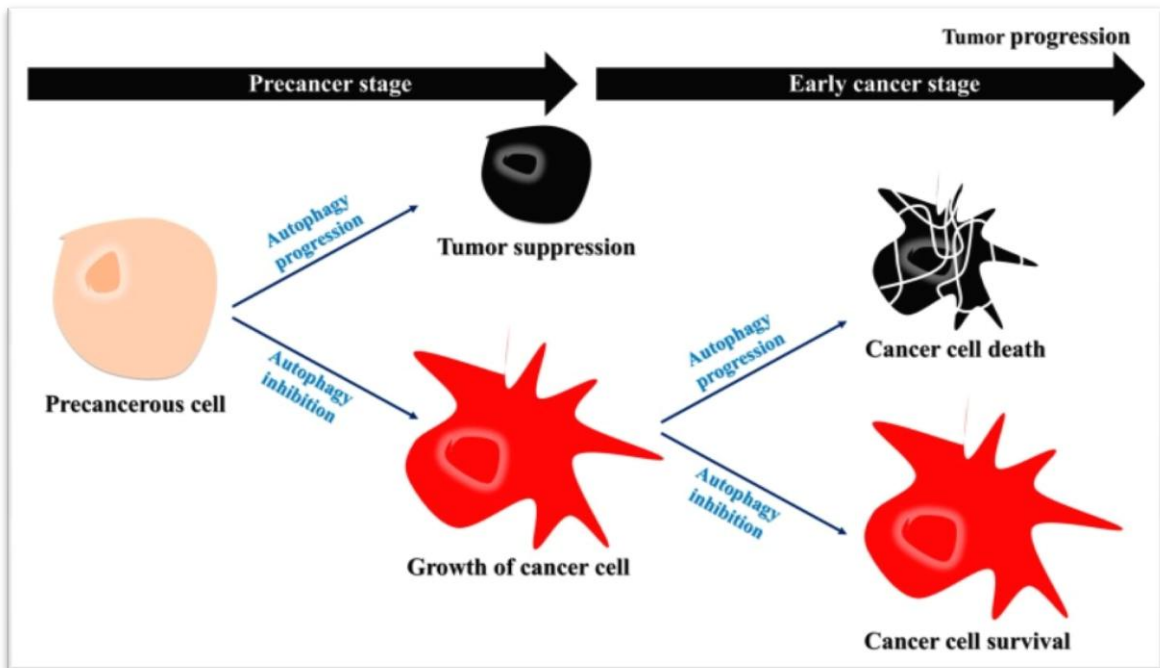
Τα ογκοκατασταλτικά έχουν λειτουργία αντίθετη από τα ογκογονίδια. Συμμετέχουν στην καταστολή της αύξησης και της διαίρεσης των κυττάρων, όταν υπάρχει βλάβη στο γενετικό υλικό. Οι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες-ογκοκατασταλτικά είναι η πρωτεΐνη P53 και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος PRb. Αυτές καθίστανται μη λειτουργικές, όταν υπάρχει μετάλλαξη και στα δύο αλληλόμορφα, ενώ αν υπάρχει μόνο στο ένα χρωμόσωμα η λειτουργία τους δεν επηρεάζεται. Η απενεργοποίηση των P53 πρωτεϊνών πραγματοποιείται από ιικές πρωτεΐνες (E6, E7), οι οποίες δεσμεύουν τις P53 και εμποδίζουν τη δράση τους, με αποτέλεσμα την επαγωγή της καρκινογένεσης. Οι παραπάνω πρωτεΐνες έχουν ως λειτουργία τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ([Loffler, 2007](#)). Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται οι λειτουργίες του P53 σε βλάβη του γενετικού υλικού και κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.

Η καρκινογένεση, οφείλεται στη διαταραχή της αύξησης, της διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου. Ο κυτταρικός θάνατος επιτυγχάνεται με τρεις βασικούς μηχανισμούς: την απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), την αυτοφαγία και τη νέκρωση. Η απόπτωση είναι μια φυσιολογική λειτουργία, κατά την οποία το κύτταρο οδηγείται σε συρρίκνωση και ο πυρήνας του κατακερματίζεται, με τη συμμετοχή των κασπασών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ωστόσο, δεν οδηγούνται όλα τα καρκινικά κύτταρα σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα, η νέκρωση διογκώνει και λύει τα κύτταρα, με έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών.



Εικόνα 6: Ενεργοποίηση του P53 a. Ενεργοποίηση του γονιδίου ως απάντηση σε βλάβη του γενετικού υλικού, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, καταστολή του κυτταρικού κύκλου και σε σταδιακή αλλοίωση. Τα μονοπάτια αυτά καταστέλλουν υπεράριθμους καρκινικούς τύπους b. Ενεργοποίηση του γονιδίου P53 κατά τη διάρκεια καρκινογένεσης. Στέλλονται κάποια σήματα, όπως η υποξία, το οξειδωτικό στρες, η χαμηλή γλυκόζη, ικανά να ενεργοποιήσουν το P53, ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση ([Attardi, 2018](#)).

Μια σημαντική κατηγορία κυτταρικού θανάτου είναι η αυτοφαγία. Μέσω αυτού του καταβολικού μηχανισμού πρωτεΐνες και οργανίδια του κυττάρου οδηγούνται προς αποικοδόμηση στα λυσοσώματα. Αυτή η διαδικασία, παρέχει στα κύτταρα επιπλέον ενέργεια, για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και τη διατήρηση της ομοιόστασης, σε στρεσογόνες καταστάσεις. Η αυτοφαγία επιτυγχάνεται, κάτω από ορισμένες συνθήκες, όπως είναι η έλλειψη οξυγόνου, η απουσία των αυξητικών παραγόντων και η βλάβη ενός κυττάρου. Υπάρχουν τρεις τύποι αυτοφαγίας, με τον πιο διαδεδομένο και συχνό, την μακρο-αυτοφαγία. Ο ρόλος αυτής της διαδικασίας, είναι να προστατεύει τον οργανισμό στην καρκινογένεση, με τη μεσολάβηση έμφυτων και επίκτητων μηχανισμών του ανοσοποιητικού, καταστέλλοντας τα καρκινικά κύτταρα. Στον καρκίνο η αυτοφαγία κατέχει σπουδαίο ρόλο, εμποδίζοντας την ανάπτυξη ενός όγκου ή περιορίζοντας το μέγεθός του ([Yunho Jin, 2017](#)).



Εικόνα 7: Ο ρόλος της αυτοφαγίας σε προ-καρκινικό στάδιο και σε αρχικά στάδια του καρκίνου. Σε προ-καρκινικό στάδιο, όταν η αυτοφαγία ανασταλεί, επέρχεται ανάπτυξη του καρκινικού κυττάρου. Εάν η αυτοφαγία προχωρήσει, σε αρχικό στάδιο του καρκίνου, τότε το καρκινικό κύτταρο οδηγείται σε θάνατο (Yunho Jin, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

2.1 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

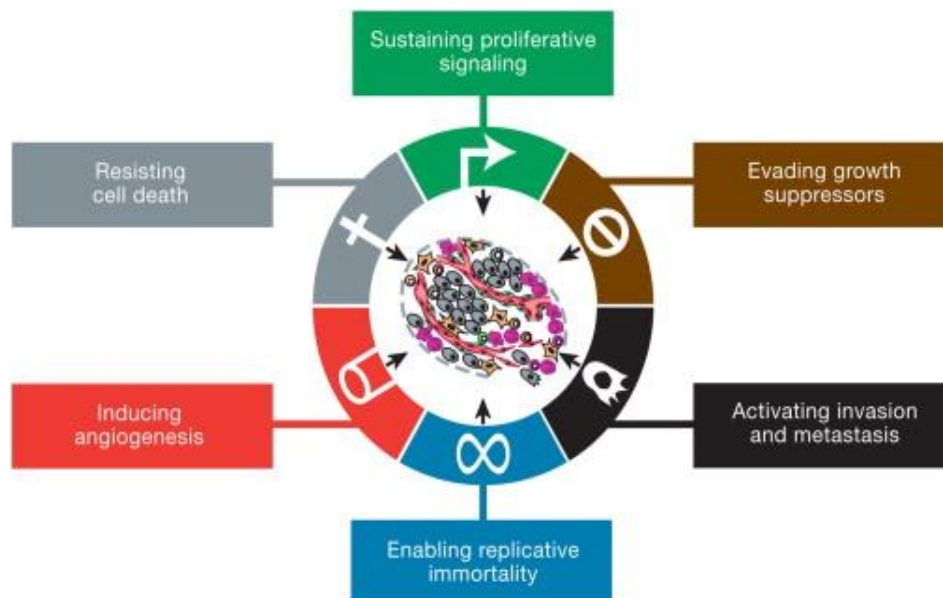
Οι όγκοι, αποτελούνται από πολλά είδη καρκινικών κυττάρων και αυτός είναι ο λόγος της μεγάλης ετερογένειάς τους. Τα καρκινικά κύτταρα, είναι συνέπεια πολλών μεταλλαγών που γίνονται στα φυσιολογικά κύτταρα. Ωστόσο, ελάχιστα μόνο μεταλλαγμένα κύτταρα, επιβιώνουν και μετατρέπονται σε καρκινικά, εξαιτίας διάφορων ανατροφοδοτικών ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι παρεμποδίζουν την υπέρμετρη αύξηση του πληθυσμού τους.

Οι διαφορές μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, βασίζονται στη δομή, την αιμάτωση και τους μηχανισμούς που διαθέτουν. Στα φυσιολογικά κύτταρα, το γενετικό υλικό (DNA) και τα χρωμοσώματα, ακολουθούν μια φυσιολογική ανάπτυξη. Στα καρκινικά κύτταρα, υπάρχει διαφορετική δομή του γενετικού υλικού και μη φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα, διαιρούνται χωρίς έλεγχο και τάξη, με συνέπεια τη δημιουργία μιας μάζας/συσσωμάτωμα (όγκος). Από την άλλη, τα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται, μόνο όταν τα χρειάζεται ο οργανισμός. Τα κύτταρα αιματώνονται φυσιολογικά από το αγγειακό δίκτυο. Τα καρκινικά κύτταρα σχηματίζουν δικό τους δίκτυο (νεοαγγείωση) και λεμφαγγείωση, ούτως ώστε να τρέφονται από αυτό, αυτόνομα. Οι αυξητικοί παράγοντες, στα φυσιολογικά κύτταρα, προσφέρουν ισορροπημένη παραγωγή κυττάρων και ορμονών, ενώ στα καρκινικά υπάρχει αύξηση της λειτουργίας των αυξητικών παραγόντων, με υπό- ή υπερλειτουργία των ενζύμων και

των ορμονών. Τα φυσιολογικά κύτταρα, αρκετές φορές, σχηματίζουν όγκους (καλοήθεις), οι οποίοι δεν μεθίστανται και δεν αποτελούν απειλή για τη ζωή, αφού εύκολα μπορούν να αφαιρεθούν. Όμως, τα καρκινικά κύτταρα δημιουργούν κακοήθεις όγκους, απειλητικούς για τη ζωή, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διηθούν παρακείμενους ή απομακρυσμένους ιστούς.

2.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου αποτελούνται από έξι βιολογικές ικανότητες που χρειάζονται για την ανάπτυξη των ανθρώπινων νεοπλασιών. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνθέτουν ένα σύστημα, ώστε να γίνει κατανοητή η πολυπλοκότητα της νεοπλασματικής νόσου. Περιλαμβάνουν την διατήρηση της σηματοδότησης του πολλαπλασιασμού, την αποφυγή της καταστολής της ανάπτυξης, την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, την αθανασία των καρκινικών κυττάρων, την πρόκληση της αγγειογένεσης και την ενεργοποίηση της διήθησης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Γίνεται έτσι κατανοητό πως οι όγκοι είναι πολύπλοκοι ιστοί αποτελούμενοι από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, τα οποία συμμετέχουν σε αλληπάλληλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Τα έξι χαρακτηριστικά που περιλαμβάνει μία νεοπλασία απεικονίζονται στην εικόνα 8 ([Weinberg, 2011](#)).



Εικόνα 8: Χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης, τα οποία απαιτούνται για την εξέλιξη της ([Weinberg, 2011](#)).

Τα καρκινικά κύτταρα λειτουργούν ως αυτόνομα οργανίδια. Διαθέτουν έμφυτες και επίκτητες ιδιότητες. Διακρίνονται για την ικανότητά τους να απευαισθητοποιούν αντι-αναπτυξιακά σήματα και για το μεγάλο δυναμικό αναπαραγωγής τους. Οι επίκτητες ιδιότητές τους είναι η ικανότητα να προκαλούν φλεγμονή στους γύρω ιστούς, να σχηματίζουν δικό τους αγγειακό δίκτυο (αγγειογένεση), καθώς και να διαφεύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) και να μεθίστανται σε άλλους ιστούς ή οργανίδια.

Οι ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων συνοψίζονται παρακάτω :

1. Στα καρκινικά κύτταρα, υπάρχουν ανωμαλίες σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση.
2. Το θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητα να διατηρούν χρόνιο πολλαπλασιασμό, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που ελέγχουν την παραγωγή και απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων ([Weinberg, 2011](#)).
3. Για την διατήρηση της ομοιόστασης στα κύτταρα σημαντικό ρόλο παίζουν οι μηχανισμοί αρνητικής ανάδρασης, οι οποίοι στα καρκινικά κύτταρα είναι διαταραγμένοι ([Weinberg, 2011](#)).
4. Σχηματίζονται ενιαία συσσωματώματα καρκινικών κυττάρων, με κύτταρα διαφορετικής προέλευσης.
5. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα, λόγω αδυναμίας ματαίωσης των μηχανισμών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, είναι ανώμαλος και συνεπώς συχνά, δεν υπάρχει η διαφοροποίηση.
6. Ο μηχανισμός της απόπτωσης των κυττάρων (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) περιλαμβάνει θετική και αρνητική ρύθμιση, η οποία απορυθμίζεται καθώς τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν διάφορες στρατηγικές, μέσω αντι-αποπτωτικών μορίων (Bcl-2), και την αναστολή της λειτουργίας των μορίων καταστολής των όγκων (TP53) ([Weinberg, 2011](#)).
7. Η αυτοφαγία είναι παρόμοιος μηχανισμός με την απόπτωση και είναι μία φυσιολογική αποκριση του οργανισμού, η οποία ενεργοποιείται σε συγκεκριμένες καταστάσεις όπως είναι η έλλειψη θρεπτικών ουσιών και το stress. Παραδόξως, αυτές οι καταστάσεις, έλλειψης θρεπτικών ουσιών, προκαλούν αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας, τα οποία όμως δρουν προστατευτικά στα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας τα σε μία κατάσταση αναστρέψιμης παύσης, ώστε να επιβιώσουν ([Weinberg, 2011](#)).
8. Ιόντα νατρίου, καλίου και ασβεστίου, ευρίσκονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στα καρκινικά κύτταρα.
9. Τα καρκινικά κύτταρα δρουν αυτόνομα, καθώς διεγείρουν την αγγειογένεση, μέσω έκκρισης πρωτεασών και εμβρυϊκών πρωτεϊνών, προσλαμβάνοντας την απαιτούμενη αιμάτωση και τα θρεπτικά στοιχεία που χρειάζονται. Εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες (VEGF-A), δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων. Με τη σειρά τους αυτά, ξεκινούν να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν νέα αγγεία.

10. Τέλος, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων, είναι ο διεισδυτικός τους χαρακτήρας. Διακρίνονται για τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και δεν απαιτούν την παρουσία των ίδιων αυξητικών παραγόντων, που χρησιμοποιούν τα φυσιολογικά κύτταρα, για να αναπτυχθούν. Επίσης, εμφανίζουν πολύ μικρότερη προσκολλητικότητα μεταξύ τους. Αυτό εξηγεί το λόγο, τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα, τείνουν να περιπλανώνται μέσα στους ιστούς, να μεταφέρονται σε άλλα σημεία του σώματος και να δημιουργούν νέους καρκινικούς όγκους (Hall, 2008).

Γενικά ο καρκινικός ιστός, ανταγωνίζεται τον φυσιολογικό, για να προσλάβει θρεπτικές ουσίες. Επειδή τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται συνεχώς και ακατάπαυστα, ο πληθυσμός του αυξάνεται ραγδαία και έτσι, απαιτούν όλες τις θρεπτικές ουσίες, που εισέρχονται στο σώμα, για τον εαυτό τους. Αποτέλεσμα αυτού, είναι οι φυσιολογικοί ιστοί συνεχώς να “πεθαίνουν” από ασιτία.

2.3 ΣΤΑΔΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

MMP's : Μεταλλοπρωτεϊνάσες.

Διήθηση και μετάσταση, είναι δύο όροι, οι οποίοι έχουν κοινά χαρακτηριστικά και επίσης, κοινά στάδια. Με τον όρο διήθηση, εννοείται η τοπική επέκταση των καρκινικών κυττάρων, ενώ μετάσταση καλείται η λεμφογενής ή αιματογενής διασπορά των καρκινικών κυττάρων, από τον πρωτοπαθή όγκο, σε απομακρυσμένους ιστούς. Αξίζει να αναφερθεί, πως δεν είναι όλα τα καρκινώματα διηθητικά. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: το καρκίνωμα *in situ* και το διηθητικό καρκίνωμα. Το καρκίνωμα *in situ* θεωρείται η αρχική μορφή καρκίνου, η οποία δεν δίνει μεταστάσεις και δεν έχει καταστρέψει τη βασική μεμβράνη. Είναι μία καλοήθης κατάσταση, τοπική, η οποία μπορεί εύκολα να αφαιρεθεί. Από την άλλη, το διηθητικό καρκίνωμα, διαπερνά όλους εκείνους τους φραγμούς του οργανισμού, προκειμένου να εισβάλει σε γειτονικούς ιστούς και στη συνέχεια να μεταφερθεί σε απομακρυσμένους ιστούς, ώστε να δημιουργήσει νέες νεοπλασίες (μετάσταση). Χωρίς τη διηθητική ικανότητα και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, ο καρκίνος θα ήταν πλήρως *in situ*.

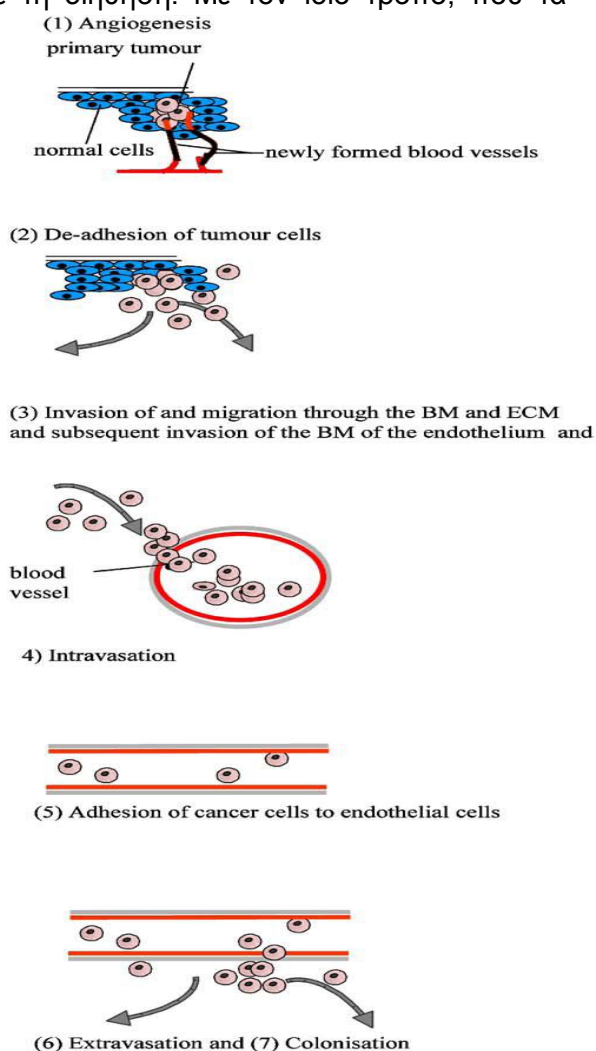
Ο τρόπος με τον οποίο δημιουργείται ένα *in situ* καρκίνωμα και μεταπίπτει σε διηθητικό και έπειτα σε μεταστατικό, βασίζεται στις μεταλλαγές που υφίσταται ένα επιθηλιακό κύτταρο, το οποίο δεν διαιρείται. Όταν, λοιπόν, το επιθηλιακό κύτταρο μεταλλαγεί, ξεκινά να πολλαπλασιάζεται. Μία δεύτερη μετάλλαξη αυτού, οδηγεί σε κύτταρο με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, που καλείται υπερπλασία. Σε επόμενη πιθανή μετάλλαξη, το κύτταρο που θα δημιουργηθεί θα είναι ανώμαλο στη μορφή και θα έχει ακόμη μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται δυσπλασία. Σε αυτό το στάδιο, ο όγκος που έχει σχηματιστεί από τα μεταλλαγμένα κύτταρα, δε διηθεί γειτονικούς ιστούς και παραμένει σταθερός. Αυτό είναι το καρκίνωμα *in situ*. Το καρκίνωμα αυτό, είτε μπορεί να παραμείνει ως έχει,

είτε με κάποιες άλλες μεταλλάξεις, να τροποποιηθεί και να διαπεράσει τους ιστικούς φραγμούς, ώστε να αποικίσει απομακρυσμένους ιστούς (μεταστατικό καρκίνωμα) (Μαρμάρα-Λαμπροπούλου, 2005).

Η διαδικασία της διήθησης, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, καθώς εμπλέκει διάφορους μηχανισμούς. Η αρχή για να προκληθεί μετακίνηση των κυττάρων, είναι οι τροποποιήσεις που δέχονται οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κύτταρο-κύτταρική προσκόλληση. Θεωρείται πιο συχνή από τη μετάσταση, με εκατομμύρια κύτταρα να φεύγουν με την κυκλοφορία και να αποικίζουν γειτονικούς ιστούς. Ωστόσο αυτό δε σημαίνει, πως όλοι οι όγκοι εμφανίζουν την ικανότητα για διήθηση. Γι' αυτό το λόγο, ένα τοπικό καρκίνωμα ενδέχεται να εκριζωθεί με τοπικό καθαρισμό της πρωτοπαθούς εστίας. Από την άλλη, πολλά πρωτοπαθή καρκινώματα και αρχικού σταδίου όγκοι, εμφανίζουν τη διηθητική ικανότητα πολύ νωρίς, ακόμη και όταν ο όγκος είναι δύσκολο να εντοπιστεί.

Η μετάσταση, είναι παρεμφερής με τη διήθηση. Με τον ίδιο τρόπο, που τα καρκινικά κύτταρα διηθούν παρακείμενους ιστούς, μπορούν να επιλέξουν να διηθήσουν λεμφικές ή αγγειακές οδούς, να εισέλθουν και να μεταφερθούν μέσω της κυκλοφορίας, σε απομακρυσμένες θέσεις. Πολλά κύτταρα προχωρούν σε μετάσταση από τον πρωτοπαθή όγκο, αλλά μόνο λίγα είναι ικανά να επιβιώσουν σχηματίζοντας αποικίες στο νέο όργανο-στόχο. Η διαδικασία της μετάστασης είναι πολυσταδιακή και εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του όγκου και του ξενιστή, όπως επίσης και τους φραγμούς του οργανισμού. Δεν είναι τυχαίο, ότι οι περισσότερες μεταστάσεις εγκαθίσταται σε πνευμονικούς ή ηπατικούς ιστούς.

Επιγραμματικά η πορεία της διήθησης και της μετάστασης, μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω στάδια. Αρχικά, τα καρκινικά κύτταρα αποκολλώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και διηθούν τη βασική μεμβράνη του όγκου. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια μεταλλοπρωτεϊνών (MMP'S). Προκαλείται χημειοταξία μέσω χημειοκινών και τα καρκινικά κύτταρα μετακινούνται διαμέσου του στρώματος. Σε αυτό το σημείο επάγεται η αγγειογένεση και η ενδοαγγείωση, από τα καρκινικά κύτταρα. Με σκοπό να μετακινηθούν και να σχηματίσουν νέες αποικίες, διαφεύγουν από την ανοσοολογική επιτήρηση του οργανισμού και προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με στόχο την εξαγγείωσή τους. Η εξαγγείωση επιτυγχάνεται, έπειτα από



πρωτεύουσα της υπενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης και τα καρκινικά κύτταρα είναι πλέον ελεύθερα να αποικήσουν νέους ιστούς (*Εικόνα 9: Μηχανισμός διήθησης και μετάστασης*) ([Νακοπούλου, 2017](#)).

Ο μηχανισμός της μετάστασης, κατά κύριο λόγο οφείλεται στην αποτυχία των κυττάρων, να προσκολλώνται στα γειτονικά τους κύτταρα. Αυτή η ικανότητα επιτυγχάνεται με πρωτεΐνες διακυτταρικών επιθηλιακών συνδέσεων. Ειδικά η μη παραγωγή, από τα καρκινικά κύτταρα, της E-καντερίνης, που είναι το κυρίαρχο μόριο αυτής της κατηγορίας πρωτεϊνών, προσδίδει στα καρκινικά την ευκαιρία να μεταναστεύσουν, καθώς θεωρείται κατασταλτικός παράγοντας της μετάστασης. Επίσης η καντερίνη, είναι υπεύθυνη για τη μεταγωγή σημάτων, που αφορούν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Άλλες πρωτεΐνες με παρόμοια δράση είναι οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες. Ο ρόλος τους υπόκειται, στη σύνδεση των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.

Σημαντικό στάδιο στη μετανάστευση των κυττάρων, είναι η καταστροφή της βασικής μεμβράνης. Η καταστροφή αυτή επιτυγχάνεται με την δράση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP'S) και πρωτεασών σερίνης. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες δεν παράγονται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και από το στρώμα. Είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία αποδομούν το εξωκυττάριο στρώμα. Επιστήμονες συσχέτισαν την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, με το στάδιο του καρκίνου. Η έκφραση αυτή, μας δίνει την ένδειξη της διηθητικής ικανότητας και του μεταστατικού δυναμικού του όγκου. Συνεπώς, αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών, θα ήταν το βήμα για την πρόληψη των μεταστάσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κλινική εξέταση και ψηλάφηση των μαστών, λεμφαδένων και άλλων σημείων του σώματος, είναι ικανές να οδηγήσουν στην ανίχνευση ενός όγκου. Από το ιστορικό, επίσης, που λαμβάνει ένας κλινικός ιατρός, μπορεί να υποψιαστεί την πιθανότητα ένας ασθενής να νοσήσει από μια συγκεκριμένη κληρονομική νεοπλασία. Έπειτα από όλα αυτά, τη σειρά τους παίρνουν οι διαγνωστικές εξετάσεις. Καθώς η επιστήμη και η έρευνα προχωρούν, ολοένα και περισσότεροι βιοδείκτες εμφανίζονται να καλύψουν τυχόν κενά, ως προς την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου. Ο βιοδείκτης είναι ένα μετρήσιμο χαρακτηριστικό, το οποίο περιγράφει μία φυσιολογική ή μη κατάσταση σε έναν οργανισμό, αναλύοντας βιομόρια όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες, πεπτίδια ή χημικές τροποποιήσεις των βιομορίων αυτών ([Nicolas Goossens, 2015](#)).

Ωστόσο, δεν είναι λίγες οι φορές, που ένας δείκτης δεν μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία καρκίνου. Η ευαισθησία και η ειδικότητα ενός βιοδείκτη, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάγνωση. Ευαισθησία ονομάζεται η ικανότητα ενός δείκτη, να προσδιορίσει αν κάποιος πάσχει από ένα είδος καρκίνου. Όσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία ενός δείκτη, τόσο περισσότερο θα ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Από την άλλη, ειδικότητα ονομάζεται η ικανότητα ενός δείκτη να αποκλείσει το ενδεχόμενο ύπαρξης ενός είδους καρκίνου. Το ζητούμενο, συνεπώς, είναι να

υπάρχει 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Αυτό όμως δεν συνυπάρχει και πολλές φορές τα αποτελέσματα, οδηγούν σε λανθασμένα συμπεράσματα.

Μέχρι σήμερα η επιστήμη έχει προχωρήσει ραγδαία, ανακαλύπτοντας νέους τρόπους ανίχνευσης του καρκίνου, όσο πιο έγκαιρα και αξιόπιστα γίνεται. Το screening test (προσυμπτωματικός έλεγχος) είναι εξέταση, η οποία είναι ικανή να προσδιορίσει την ύπαρξη κακοήθειας, σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, δηλαδή στα πρώιμα στάδια. Επίσης, τα θετικά αποτελέσματα από τις εξετάσεις αυτές, δεν σημαίνουν απαραίτητα πως ο ασθενής έχει καρκίνο, αλλά πως υπάρχει μία αυξημένη προδιάθεση να σχηματίσει νεοπλασία και κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση. Ο όρος διάγνωση, χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση του όγκου, έπειτα από ιστολογικές εξετάσεις ή ακόμη βιοψία.

Στις εξετάσεις διερεύνησης κακοήθειας, συμπεριλαμβάνονται μια πληθώρα εργαστηριακών διαδικασιών. Στα screening tests περιλαμβάνονται και το ιστορικό, με την φυσική εξέταση από τον κλινικό ιατρό. Ακόμη, εργαστηριακές εξετάσεις, που θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω, απεικονιστικές (imaging procedures) και γενετικά τεστ, για την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλαγών των γονιδίων.

Σημαντική κατηγορία των μεθόδων διάγνωσης καρκίνου είναι οι απεικονιστικές εξετάσεις. Μπορούν να απεικονίσουν με ιδιαίτερη ευκρίνεια τα εσωτερικά όργανα και να προσδιορίσουν την πιθανότητα κακοήθειας ή δυσλειτουργίας. Στις απεικονιστικές εξετάσεις περιλαμβάνονται ο ακτινολογικός έλεγχος, η αξονική και μαγνητική τομογραφία, η ποζιτρονική τομογραφία ([Lino Möhrmann](#)) και η PET-CT, που συνδυάζει τον ποζιτρονικό με τον αξονικό τομογράφο. Ο ακτινολογικός έλεγχος χρησιμοποιείται κυρίως για την απεικόνιση του πνεύμονα, καθώς και του πεπτικού με ιδιαίτερο ποσοστό επιτυχίας στη διάγνωση. Ωστόσο, για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού χρήσιμη θεωρείται η μαστογραφία. Η αξονική-μαγνητική τομογραφία είναι ικανές να διαγνώσουν όλες τις μορφές καρκίνου, γι' αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως, όχι μόνο για κακοήθεια αλλά και για την παρακολούθηση δυσλειτουργιών του οργανισμού. Η ποζιτρονική τομογραφία είναι από τις πιο σύγχρονες απεικονιστικές διαγνωστικές μεθόδους, με υψηλή ευαισθησία και ευκρίνεια. Είναι από τις λίγες εξετάσεις που μπορούν να προσδιορίσουν κάποια κακοήθεια στα πιο πρώιμα στάδια. Τέλος, η PET-CT συνδυάζει την ανατομική απεικόνιση του αξονικού τομογράφου, με πληροφορίες για τη μεταβολική διεργασία του οργανισμού, που παρέχει ο ποζιτρονικός τομογράφος.

Ο ραδιοϊσοτοπικός έλεγχος, ή αλλιώς σπινθηρογράφημα, γίνεται με την έγχυση ραδιενεργών ισοτόπων και αποτελεί χρήσιμη μέθοδο για τη διάγνωση καρκίνου του ήπατος, των νεφρών και του θυρεοειδούς. Δε χρησιμοποιεί τον ίδιο βαθμό ακτινοβολίας όπως στις άλλες απεικονιστικές εξετάσεις. Ακόμη μία μέθοδος διάγνωσης αποτελεί και η υπερηχοτομογραφία. Είναι μία ανώδυνη και απλή μέθοδος, με μεγάλα ποσοστά επιτυχίας στη διάγνωση. Η κάθε υποψία για νεόπλασμα, αλλά και ο κάθε ασθενής, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται εξατομικευμένα και να επιλέγεται κάθε φορά, η καλύτερη μέθοδος διάγνωσης για τον καθένα.

Μία μεγάλη και σημαντική κατηγορία μεθόδων διάγνωσης νεοπλασματος είναι οι κυτταρολογικές εξετάσεις. Σε αυτές γίνεται εξέταση εκκρίσεων ή ιστού έπειτα από απόξεση και διαβάθμισή τους, σύμφωνα με το πόσο ανώμαλα διαφαίνονται τα κύτταρα, έπειτα από λεπτομερή παρακολούθηση στο μικροσκόπιο. Η κατάταξη I είναι όταν τα κύτταρα δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες στη δομή και τη μορφολογία τους, η IV όταν υπάρχει σοβαρή υποψία καρκίνου και η V όταν τα κύτταρα μοιάζουν

με τα καρκινικά. Κυτταρολογικά ο καρκίνος μπορεί να ανιχνευτεί αρκετό καιρό πριν αρχίσει να φαίνεται με τις απεικονιστικές εξετάσεις. Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να ληφθεί κυτταρολογικό υλικό είναι με την απόξεση, την αποφολίωση, την παρακέντηση και την έκπλυση-αναρρόφηση. Το test PAP (Παπανικολάου) ανήκει στις κυτταρολογικές εξετάσεις και λαμβάνεται υλικό-κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας έπειτα από απόξεση. Παρακέντηση γίνεται με τη χρήση βελόνης και λαμβάνεται περικαρδιακό, πλευριτικό, ασκίτικό και εγκεφαλονωτιαίο υγρό προς εξέταση. Η απόσπαση κυττάρων από τις επιφάνειες του βλεννογόνου ονομάζεται αποφολίωση. Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνονται πτύελα, βλέννη, ούρα και έκκριμα από τη θηλή του μαστού ([Εγγανονηλίδου, 2014](#)).

Σε ιδιαίτερη θέση βρίσκονται σήμερα και οι ενδοσκοπήσεις, που με τη βοήθεια εξειδικευμένων εύκαμπτων σωληναρίων, υπάρχει η δυνατότητα λήψης μικρών τεμαχίων από συγκεκριμένους ιστούς, για τη διενέργεια ιστολογικών εξετάσεων. Η ενδοσκόπηση χρησιμοποιείται στο κόλον, στο στόμαχο και το βρογχικό δένδρο. Την τελική διάγνωση θέτει η ιστολογική εξέταση. Θεωρείται η πιο ακριβής μέθοδος διάγνωσης και χρησιμοποιεί υλικό από ιστούς ή κομμάτια οργάνων έπειτα από αφαίρεση τμημάτων εγχειρητικά ή έπειτα από λήψη μικρού δείγματος, ύστερα από ενδοσκοπήσεις. Ιστολογικά όμως μπορούν να εκτιμηθούν και διάφοροι σπίλοι. Η τελική διάγνωση φέρεται, έπειτα από λεπτομερή εξέταση του δείγματος μικροσκοπικά, με την κατάλληλη προεργασία.

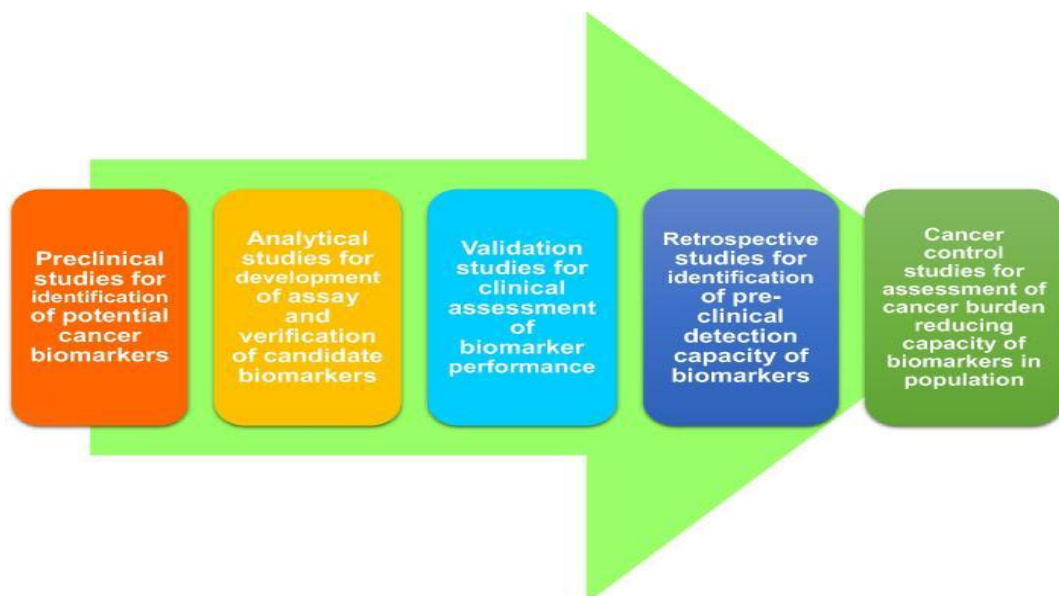
3.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ / ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

Αλλαγές στην αλληλουχία των γονιδίων, την έκφραση και τη δομή ή τη λειτουργία των πρωτεϊνών έχουν συσχετιστεί με κάθε τύπο καρκίνου. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την ανίχνευση πρώιμου σταδίου νεοπλασματος, την παρακολούθηση της εξέλιξής του ή επίσης την θεραπευτική απάντηση. Οι δείκτες, οι οποίοι βασίζονται στο DNA, περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, έλλειψη ετεροζυγωτίας, υπερμεθυλίωση του DNA, μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και ανίχνευση του ιικού DNA. Τέλος, οι τεχνικές για τον προσδιορισμό των αλλαγών στη δομή ή την λειτουργία των πρωτεϊνών, που συσχετίζονται με τον καρκίνο, περιλαμβάνουν μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων, μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων και δισδιάστατη ανάλυση με γέλη των δειγμάτων ([Sidransky, 2002](#)).

Με τον όρο καρκινικοί δείκτες ονομάζονται ουσίες, ανιχνευόμενες στο αίμα ή τα υγρά του οργανισμού, που δείχνουν την ύπαρξη ή την απουσία καρκίνου. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι πρωτεΐνες ή ένζυμα στα σωματικά υγρά, ορμόνες, οι οποίες είτε εκκρίνονται από τον οργανισμό ως απάντηση στη δημιουργία μιας νεοπλασίας, είτε εκκρίνονται από τον ίδιο τον όγκο και αντιγόνα, τα οποία εκφράζονται στις επιφάνειες των κυττάρων. Οι βιοδείκτες γενικότερα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ευρύτερες κατηγορίες: τους δείκτες του γενετικού υλικού (DNA Biomarkers), τους καρκινικούς δείκτες του γενετικού υλικού (DNA tumor Biomarkers) και τους βιοδείκτες (General Biomarkers), οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως και είναι λιγότερο ειδικοί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Μέσω της κατάλληλης μεθόδου γίνεται ανίχνευση των DNA biomarkers, οι οποίοι δείχνουν κάποιες

αλλαγές στην αλληλουχία του γενετικού υλικού, όπως είναι η προσθήκη, ο διπλασιασμός, η αφαίρεση, η επανάληψη κάποιας αλληλουχίας και ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP's, Single Nucleotide Polymorphisms). Οι καρκινικοί δείκτες, από την άλλη, αντιπροσωπεύουν τους ειδικούς δείκτες για έναν συγκεκριμένο καρκινικό όγκο ([Hala Fawzy, 2017](#)).

Οι βιοδείκτες πλέον χρησιμοποιούνται σαν πανίσχυρα όπλα όχι μόνο για τη διάγνωση ενός συγκεκριμένου όγκου, αλλά και για την όσο το δυνατόν εξατομικευμένη θεραπεία, καθώς και τα αποτελέσματα αυτής. Επίσης είναι δυνατόν να κρίνουμε κατά πόσο ο ασθενής θα ανταποκριθεί στη θεραπεία. Συνεπώς οι καρκινικοί βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και την πρόγνωση ενός συγκεκριμένου όγκου, ενώ οι General Biomarkers δεν είναι ικανοί να προβλέψουν έναν συγκεκριμένο όγκο. Για το λόγο αυτό υπάρχουν δύο ειδών βιοδείκτες, οι προγνωστικοί και οι προβλεπτικοί. Οι προγνωστικοί υποδηλώνουν την εξέλιξη της νόσου, ανεξαρτήτως θεραπείας, επομένως σχετίζονται με την επιβίωση του ασθενούς, ενώ οι προβλεπτικοί για να παρακολουθούν την αναμενόμενη και πιο πιθανή ανταπόκριση σε μία θεραπεία. Στην εικόνα 10 παρατίθενται τα βήματα ούτως ώστε ένας δείκτης να καταστεί κατάλληλος για την εφαρμογή του στην κλινική πράξη.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων για την ταυτοποίηση και την επικύρωση ενός πιθανού βιοδείκτη, καθώς και την ενσωμάτωσή του στην κλινική πράξη ([Hala Fawzy, 2017](#)).

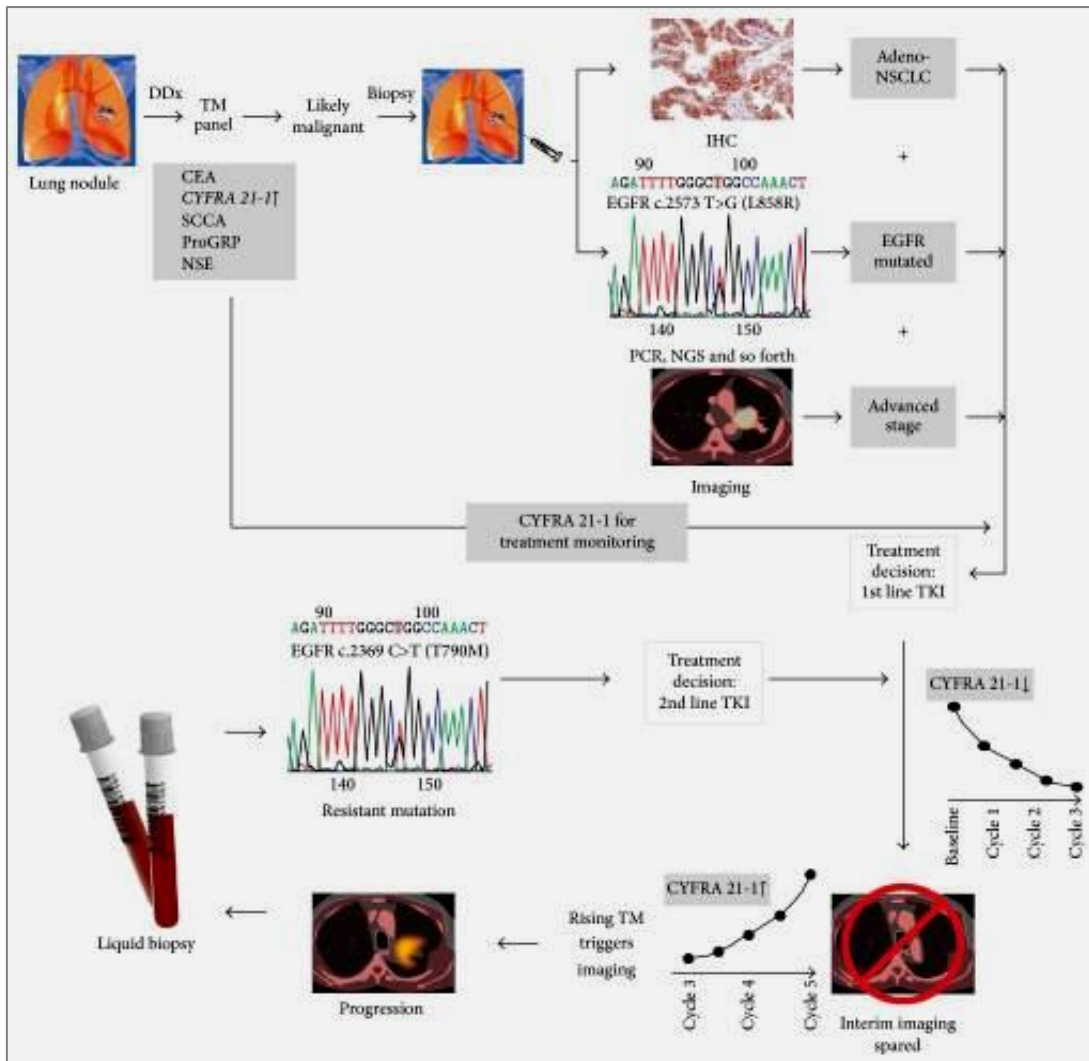
Ενώ οι καρκινικοί δείκτες αποτελούν ένα βήμα στην καλύτερη προσέγγιση του καρκίνου, δεν θεωρούνται ιδιαίτερα ειδικοί από μόνοι τους. Ακόμη και το PSA (Prostate Specific Antigen) που θεωρείται εξαιρετικά ειδικό για τον καρκίνο του προστάτη, από μόνο του δε μπορεί με απόλυτη ακρίβεια να δηλώσει την ύπαρξη ενός όγκου. Με τη μέτρηση πολλών δεικτών ταυτόχρονα, το πρόβλημα της αξιοπιστίας επιλύεται, ούτως ώστε έπειτα να ξεκινήσει η εξατομικευμένη θεραπεία. Η θεραπεία αυτή εκμεταλλεύεται τις πληροφορίες από τα γονίδια και τις πρωτεΐνες του κάθε ατόμου ξεχωριστά προκειμένου να βοηθήσει στην διάγνωση, να σχεδιάσει το πλάνο της θεραπείας, για την επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων.

Η διαφορική διάγνωση παίζει σημαντικό ρόλο στην πρώιμη και έγκαιρη ανίχνευση ενός όγκου. Με τη χρήση βιοδεικτών, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα να στενέψουν τα περιθώρια μιας λάθος διάγνωσης. Κατάλληλο παράδειγμα αποτελεί η μέτρηση του καρκινικού αντιγόνου 125 (CA-125), το οποίο από μόνο του δεν είναι ικανό να προσδιορίσει με ακρίβεια την ύπαρξη καρκίνου των ωοθηκών. Αντίθετα, με την ταυτόχρονη μέτρηση του HE4 (Human Epididymis protein 4), ίσως είναι πιο πιθανό να προσδιοριστεί σωστά ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου ([Stefan Holdenrieder, 2016](#)).

Ακόμη μία αξιοσημείωτη χρήση των καρκινικών δεικτών, είναι η χρήση τους στη σταδιοποίηση και την πρόγνωση μιας νεοπλασίας. Η σύγχρονη μέτρηση δύο, ή και παραπάνω, βιοδεικτών πριν μία επέμβαση, αλλά και η παρακολούθηση των επιπέδων τους μετά ίσως προβλέψει με σχετική ακρίβεια την πρόγνωση ενός ασθενούς. Στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα τα επίπεδα του δείκτη Pro-GRP (Pro-gastrin-releasing-peptide), τόσο πριν τη θεραπεία, όσο και τα απόλυτα επίπεδα, με το πέρας του πρώτου κύκλου χημειοθεραπειών, αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για τη συνολική επιβίωση του ασθενούς ([Stefan Holdenrieder, 2016](#)).

Η καλύτερη, μέχρι σήμερα, χρήση των βιοδεικτών είναι η παρακολούθηση της πορείας της νόσου, κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Το χαμηλό κόστος, η ταχεία ενημέρωση του ιατρού και η ευκολία της μεθόδου, έναντι στη βιοψία ιστού, είναι μερικοί παράγοντες που οδήγησαν στην εκτεταμένη χρήση τους. Επίσης σε αυτό το στάδιο δεν παίζει σημαντικό ρόλο η ειδικότητα ενός δείκτη, εφόσον η διάγνωση έχει ήδη προηγηθεί. Παρόλο που οι ερευνητές ανακάλυψαν καινούργιες μεθόδους για τον προσδιορισμό και την ανίχνευση του καρκίνου (υγρή βιοψία), η χρήση των παλαιότερων βιοδεικτών δε θα υποτιμηθεί, καθώς είναι πολύτιμοι όταν πρόκειται να ληφθούν αποφάσεις όσον αφορά την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, αλλά και σε άλλα κρίσιμα σημεία της κλινικής πρακτικής.

Στην εικόνα 11 αναπαρίσταται η ενσωμάτωση της μέτρησης των καρκινικών δεικτών με άλλες διαγνωστικές μεθόδους, στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα. Χρησιμοποιούνται μετρήσεις διαφόρων δεικτών και ακόμη η μέθοδος της υγρής βιοψίας (που θα αναλυθεί παρακάτω), για τη σωστή διαχείριση και την επιλογή της καλύτερης θεραπείας. Ο δείκτης που απεικονίζεται είναι ο CYFRA 21-1 και αποτελεί τον πιο ευαίσθητο δείκτη για μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, με τον οποίο γίνεται και η επιλογή της γραμμής της θεραπείας, όπως και η παρακολούθηση των σταδίων και της μετέπειτα ανταπόκρισης στη θεραπεία. Στη συγκεκριμένη εικόνα επίσης, απεικονίζεται και η μετάλλαξη του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα EGF ([Stefan Holdenrieder, 2016](#)).



Εικόνα 11: Ενσωμάτωση των καρκινικών δεικτών με άλλες τεχνικές για τη διαχείριση του καρκίνου του πνεύμονα. Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς καρκινικούς δείκτες δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης ενός οζιδίου στον πνεύμονα και έπειτα η απόφαση για τη βιοψία του. Στο παράδειγμα της εικόνας 2 ο δείκτης CYFRA 21-1 (cytokeratin 19 fragment) ευρίσκεται αυξημένος. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας (σε αυτή την περίπτωση η θεραπεία πραγματοποιείται με αναστολέα τυροσινικής κινάσης TKI) η οποιαδήποτε απάντηση μπορεί να προσδιοριστεί με μετρήσεις του CYFRA 21-1 οι οποίες θα αποκλείουν. Κατά την άνοδο των επιπέδων του δείκτη επαναλαμβάνόμενες απεικονίσεις πραγματοποιούνται για την επιβεβαίωση της εξέλιξης της νόσου. Η υγρή βιοψία ως μία ανώδυνη διαδικασία και η μέτρηση του ελεύθερου κυκλοφορούν DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR δείχνουν την ανάπτυξη μιας ανθεκτικής μετάλλαξης. Ανάλογα με το αποτέλεσμα μία δεύτερη γραμμή με TKI επιλέγεται. Η απάντηση στη θεραπεία αυτή ανιχνεύεται πάλι χρησιμοποιώντας καρκινικούς δείκτες (Stefan Holdenrieder, 2016).

Τέλος, η χρήση των δεικτών είναι πρώτιστης σημασίας για την πρόβλεψη και τον καθορισμό της επιβίωσης. Σε μη μεταστατικούς όγκους, το πρόβλημα της υποτροπής λύνεται, έπειτα από εκτομή του όγκου και κάποιους κύκλους ακτινοβολιών ή χημειοθεραπειών. Ωστόσο σε μεταστατικούς όγκους ο κίνδυνος νέας επιδείνωσης με εμφάνιση νέων εσίων ή αύξηση του μεγέθους των ήδη υπαρχόντων πάντα караδοκεί, με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητη η μέτρηση

των βιοδεικτών, για την πρώιμη ανίχνευση μιας απομακρυσμένης καρκινικής αποικίας. Ο χρόνος της παρακολούθησης του ασθενούς κυμαίνεται πάνω από πέντε χρόνια, αλλά εξαρτάται και από τον τύπο του καρκίνου και το ποσοστό της διηθητικότητάς του.

Η μέτρηση των βιοδεικτών μπορεί να πραγματοποιηθεί στο αίμα, αλλά και σε άλλα υγρά του οργανισμού, όπως στη σίελο. Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες προσπαθούν να ανιχνεύσουν αυξητικούς παράγοντες (π.χ. EGF), οι οποίοι παίρνουν μέρος στην ογκογένεση, στη σίελο και το ορό του αίματος. Πράγματι με τα πειράματα που έγιναν ανιχνεύτηκαν υψηλές συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου αυξητικού παράγοντα σε ασθενείς με καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η σίελος κατέχει εξαιρετικές προοπτικές ως μέσο διαγνωστικό και προγνωστικό ([Zanotti L, 2017](#)).

Οι καρκινικοί δείκτες είναι ένα πολύτιμο εργαλείο στη σύγχρονη διαγνωστική του καρκίνου. Άλλοι χαρακτηρίζονται για την αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ άλλοι όχι. Ωστόσο συνεργιστικά χρησιμοποιούνται προκειμένου να επιτευχθεί η πιο ακριβής και πρώιμη ανίχνευση νεοπλασίας.

Υπάρχουν αρκετοί δείκτες από τους οποίους οι περισσότεροι χρησιμοποιούνται καθημερινά στην κλινική πρακτική. Διακρίνονται μεταξύ τους σύμφωνα με τη φύση της προέλευσης τους σε κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	Αλφα Εμβρυϊκή Φετοπρωτεΐνη (AFP) Ειδικό Αντιγόνο του Προστάτη, γλυκοπρωτεΐνη (PSA) Θυρεοσφαιρίνη B2 μικροσφαιρίνη
ΕΝΖΥΜΑ	Αλκαλική Φωσφατάση Νευροειδική Ενολάση (NSE) LDH CK-BB
ΟΡΜΟΝΕΣ	B Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (β-HCG) Καλσιτονίνη ACTH ADH (Αντιδιουρητική ορμόνη) PTH (Παραθορμόνη) IGF
ΠΑΡΑΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΤΟ ΜΥΕΛΩΜΑ	
ΑΝΤΙΓΟΝΑ	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ (Charles)	CA 125 CA 15-3 CA 19-9 CA 50
ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ/ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	P53 Μεταλλοπρωτεϊνάσες Ιντεγκρίνες
ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	IL-2 IL-4 IL-6
ΑΛΛΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	S-100 (Μελάνωμα)

Οι περισσότεροι από τους δείκτες που αναφέρθηκαν είναι ογκο-συσχετιζόμενοι. Μόνο ελάχιστοι από αυτούς είναι ογκο-ειδικοί, δηλαδή η ανίχνευσή τους οδηγεί απόλυτα στη διάγνωση ενός συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα δεν αφορά μόνο τη διάγνωση, αλλά και την παρακολούθηση της θεραπείας, την πρόγνωση, τον προσυμπτωματικό έλεγχο και την ανίχνευση των υποτροπών. Για όλους τους παραπάνω λόγους μόνο ένας χρησιμοποιείται εκτεταμένα, η β-χοριακή γοναδοτροπίνη. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί πολύτιμο δείκτη για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και τα τερατώματα των όρχεων.

Οι βιοδείκτες δε σχετίζονται πάντα με κακοήθεις καταστάσεις, αντίθετα η συγκέντρωσή τους ευρίσκεται αυξημένη και σε καλοήθεις νόσους. Για την καλύτερη διάγνωση χρησιμοποιείται μεγάλος αριθμός δεικτών, καθώς οι περισσότεροι δε είναι ειδικοί για μια συγκεκριμένη νεοπλασία. Ο πιο γνωστός θεωρούμενος ογκο-ειδικός δείκτης είναι το προστατικό αντιγόνο PSA, το οποίο χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη. Η μέγιστη φυσιολογική του συγκέντρωση καθορίζεται στα 4 ng/ml, ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις ακόμη και όταν η συγκέντρωσή του είναι κάτω από αυτό το όριο, ανιχνεύεται νεοπλασία. Το προστατικό αντιγόνο επίσης, είναι ικανό να αυξηθεί από καλοήθη κατάσταση, όπως είναι η υπερπλασία του προστάτη αδένου. Συμπεραίνουμε έτσι πως ο δείκτης αυτός δεν έχει αυξημένη ειδικότητα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται μία ισομορφή του προστατικού αντιγόνου, η [-2] proPSA, είναι εξέχων δείκτης για τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη, αλλά και για τον καθορισμό της επιθετικότητάς του ([Saini, 2016](#)).

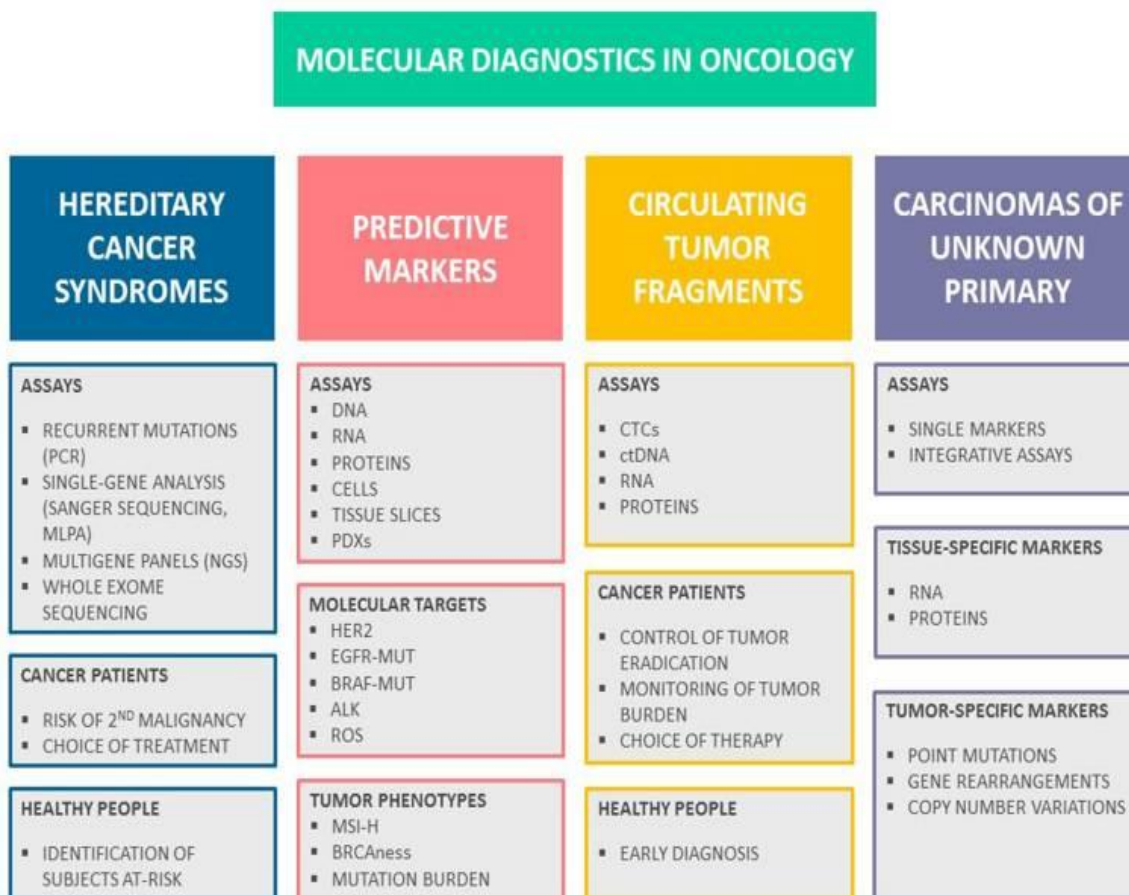
Ένας συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης, το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση ορθοκολικού καρκίνου φέρεται πως παίρνει μέρος στο μηχανισμό της νεοαγγειογένεσης, μίας ιδιότητας των καρκινικών κυττάρων. Ο δείκτης αυτός συσχετίζεται με ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου ([Li Y, 2018](#)). Το γεγονός αυτό θα δώσει τροφή στο μέλλον για έρευνα, όσον αφορά την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου και την καλύτερη συσχέτιση των δεικτών.

3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ

Η μοριακή διαγνωστική είναι μέρος της εργαστηριακής ιατρικής, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση βιολογικών μορίων. Οι δυνατότητες της διαγνωστικής

αναγνωρίστηκαν από τους όγκο-αιματολόγους. Η αναγκαιότητα της κλινικής χρήσης της μοριακής διαγνωστικής στην μοριακή ογκολογία αποδίδεται στην εξέλιξη, φιλικών ως προς το χρήστη, μεθόδων μοριακής ανάλυσης. Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), οδήγησε σε μία τεράστια ανακάλυψη όσον αφορά την κλινική δοκιμή του γενετικού υλικού. Η εξέλιξη της ανοσοϊστοχημείας (IHC), η οποία μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση ειδικού αντιγόνου μέσα στον ιστό, χρονολογείται από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Η ανοσοϊστοχημεία προσαρμόστηκε για την κλινική απόδοση του επιπέδου της έκφρασης του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) πριν από περισσότερα από τριάντα χρόνια. Αυτή θεωρήθηκε σημαντική εξέλιξη στον τομέα της ογκολογίας, καθώς άλλαξε την ιατρική αντιμετώπιση ενός διαδεδομένου ογκολογικού προβλήματος, του καρκίνου του μαστού, προσαρμόζοντας την ενδοκρινική θεραπεία σε ένα εργαστηριακό τεστ ([Imyanitov, 2018](#)).

Υπάρχουν δύο οδοί όπου οι μοριακές εξετάσεις έχουν γίνει μέρος της διαχείρισης των ασθενών. Πρώτον, η ταυτοποίηση των αντικειμένων με κληρονομικά νεοπλάσματα είναι μία καθημερινή πρακτική στην κλινική ογκολογία. Δεύτερον, υπάρχουν εξετάσεις, οι οποίες βοηθούν να επιλεγεί η πιο αποτελεσματική βασιζόμενη στα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινικών ιστών, είτε σε άλλες βιολογικές παραμέτρους της νεοπλασίας. Οι δοκιμές που γίνονται στο DNA και το RNA ίσως βοηθήσουν στη διαφοροποίηση μεταξύ όγκων ξεχωριστής ιστολογικής προέλευσης και να οδηγήσουν στη διάγνωση των καρκίνων άγνωστης πρωταρχικής εστίας ([Imyanitov, 2018](#)). Η εικόνα που ακολουθεί αναφέρει τις τεχνικές της μοριακής διαγνωστικής στην ογκολογία.



Εικόνα 12: Μοριακή διαγνωστική στην ογκολογία. Εξετάσεις για κληρονομικές μορφές καρκίνου χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ατόμων σε κίνδυνο και για εξατομικευμένη θεραπεία. Υπάρχει επίσης ένας αριθμός προγνωστικών δεικτών που συμπεριλαμβάνουν είτε την ανάλυση ατομικευμένων φαρμάκων-στόχων, είτε την ταυτοποίηση συγκεκριμένων φαινοτύπων του όγκου. Η παρακολούθηση μίας νεοπλασίας μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ανίχνευσης ελεύθερων καρκινικών μορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, το ελεύθερο καρκινικό DNA, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα και το RNA ([Imyanitov, 2018](#)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

4.1: ΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ, ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι διαγνωστικές μέθοδοι του καρκίνου, που βασίζονται σε μέτρηση των βιοδεικτών από δείγματα ενός ιστού, ήδη τις τελευταίες δεκαετίες παρείχαν επαναστατικές εξελίξεις όσον αφορά την πρόγνωση, τη διάγνωση και την επιλογή της πιο κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης ενός όγκου. Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός βιοδεικτών ανακαλύφθηκε και έστρεψε την προσοχή των

επιστημόνων, στην ανάλυση δεικτών που μπορούν να προσδιοριστούν, με την ελάχιστη επεμβατικότητα, από τη λήψη αίματος και την μετέπειτα ανάλυσή του. Αυτός ο δυναμικός τομέας της μοριακής ανάλυσης στον καρκίνο, ονομάζεται υγρή βιοψία. Όπως και η παραδοσιακή βιοψία ιστού, η υγρή βιοψία χρησιμοποιείται κυρίως για την παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνο, με ένα σημαντικό πλεονέκτημα, την έλλειψη επεμβατικότητας

Έχει πλέον αποδειχθεί πως τα ποσοστά των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα, αυξάνονται όσο ο καρκίνος προχωρά, ενώ μειώνονται όταν αυτός εξαλείφεται. Επίσης, γίνεται προφανές πως η μοριακή ανάλυση των βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων και των CTCs, παρέχει κατευθυντήριες πληροφορίες για την επιλογή, την καθοδήγηση και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, στη μέθοδο της υγρής βιοψίας προστέθηκαν και άλλα ανιχνεύσιμα μόρια εκτός των CTCs, όπως το ctDNA και τα εξωκυτταρικά κυστίδια EVs. Από τα πιο πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα για τον προσδιορισμό του καρκίνου είναι τα εξωσώματα, που ανήκουν στην κατηγορία των εξωκυτταρικών κυστιδίων και τα οποία μόλις απομονωθούν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με μεταλλάξεις στο DNA, αλλά και γενικότερα για τη σημαντική οικογένεια των microRNAs.

Όσο τα χρόνια περνούν, τόσο η ανάγκη για ιατρική ακριβείας γίνεται επιτακτική, όσον αφορά τη διαχείριση του καρκίνου. Η ανακάλυψη μοριακών παραγόντων, οι οποίοι στοχεύουν ειδικές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα ασθενών με μεταστατικό όγκο έχει εξελιχθεί, ωστόσο η ετερογένεια του όγκου παραμένει επισκιάζον εμπόδιο για τους κλινικούς ιατρούς, οι οποίοι χρειάζονται να επιλέξουν τη θεραπεία σύμφωνα με το καρκινικό γονιδίωμα του εκάστοτε ασθενούς (για εξατομικευμένη θεραπεία). Οι βιοψίες ιστού, οι οποίες αποτελούν μία κλασσική μέθοδο ανίχνευσης νεοπλασιών, αντανakλούν μόνο ένα συγκεκριμένο σημείο ενός όγκου και ως αποτέλεσμα δεν μπορούν να συμβάλλουν πλήρως στο χαρακτηρισμό μιας νεοπλασίας, καθώς είναι γνωστό πως διαφορετικές περιοχές ενός όγκου, είτε πρωτοπαθούς είτε μεταστατικού, μπορούν να περιέχουν ένα εντελώς διαφορετικό γονιδιακό προφίλ ([Speicher, 2017](#)).

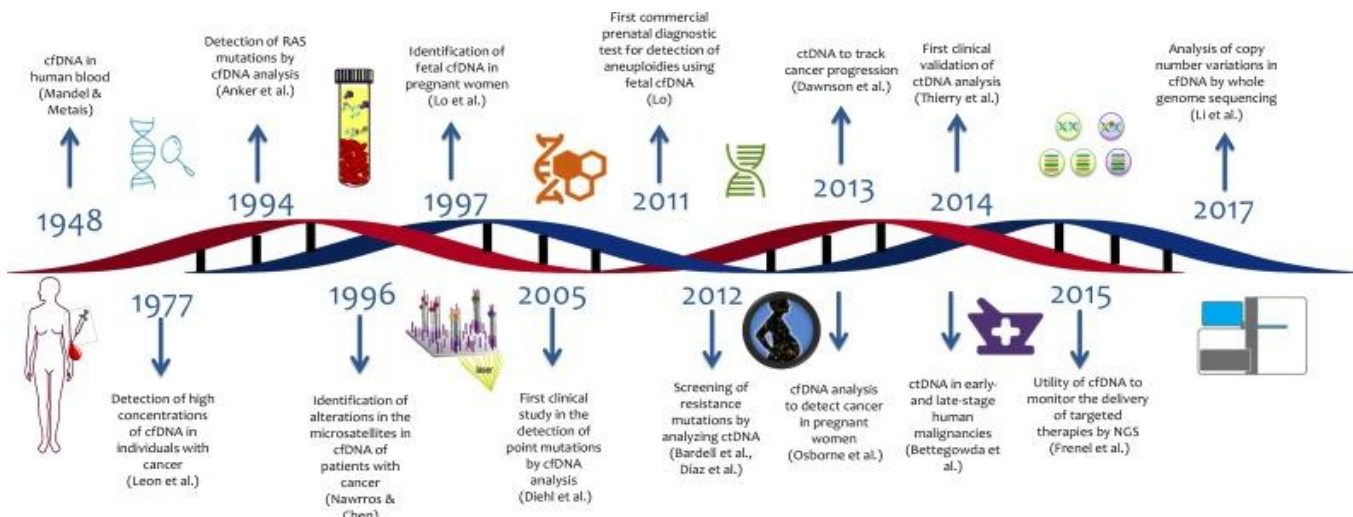
Η κλινική χρησιμότητα και ανάγκη για ανάπτυξη της υγρής βιοψίας, δε βασίζεται μόνο στην παρακολούθηση της θεραπείας, ούτε στην διαχείριση ενός όγκου, αλλά στην αναγκαιότητα για τον, όσο το δυνατόν, πιο πρώιμο προσδιορισμό μιας κακοήθειας, αλλά και στη δυνατότητα να προβλεφθεί μια μελλοντική πιθανή νεοπλασία. Η εκτεταμένη χρήση των CTCs και του ctDNA (circulating tumor DNA) για τον προσδιορισμό του καρκίνου βρίσκεται στο επίκεντρο της προσοχής, ωστόσο και οι δύο, αντιμετωπίζουν αρκετά προβλήματα ευαισθησίας και ειδικότητας με τα

τωρινά δεδομένα. Η πρόβλεψη της πρόγνωσης σε ασθενείς με θεραπεύσιμο όγκο, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, επιτυγχάνεται με υψηλή ακρίβεια. Επίσης, η παρακολούθηση της επιτυχίας ή της αποτυχίας μιας θεραπείας, ελέγχεται με μέτρηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Παρεμβατικές μελέτες για τη χρήση των προαναφερθέντων δεικτών, στη στρατηγική της θεραπείας κατά του καρκίνου, επιβάλλονται ώστε η υγρή βιοψία να μετέχει στη εξατομικευμένη προσέγγιση του καρκινοπαθούς ([Pantel, 2016](#)).

Η ανάλυση των παραμέτρων που ανιχνεύονται με τη μέθοδο της υγρής βιοψίας (CTCs, ctDNA), έχει ανοίξει νέους διαγνωστικούς ορίζοντες. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει να κάνει με την πιθανότητα να αντικαταστήσει τη βιοψία ιστού στο μέλλον. Για τον πρώιμο προσδιορισμό όγκων που δεν καθίστανται εύκολοι στη διάγνωση, όπως ο καρκίνος του πνεύμονος και την μοριακή ανάλυση μεταστατικών νεοπλασιών, η υγρή βιοψία ίσως αποτελέσει εξαιρετική εναλλακτική. Επιπρόσθετα, οι διαγνωστικές μέθοδοι της υγρής βιοψίας, ίσως εστιάσουν τις τρέχουσες μεθόδους εξέτασης του καρκίνου, στον πληθυσμό που διατρέχει υψηλό κίνδυνο. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των παρενεργειών της θεραπείας, καθώς και χαμηλότερο κόστος για τις ιατρικές μονάδες ([Pantel, 2016](#)).

Η ειδικότητα και η ευαισθησία αυτών των μεθόδων είναι κάτι που απασχολεί τους ερευνητές. Ωστόσο, η παρακολούθηση των δεικτών της υγρής βιοψίας, κατά τη διάρκεια θεραπευτικής αντικαρκινικής αγωγής, είναι εύκολο να επιτύχει και να εισαχθεί στην κλινική πρακτική. Ειδικά σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνου, η παρακολούθηση των επιπέδων αυτών των δεικτών, όσον αφορά την απάντηση ή την ανθεκτικότητα του οργανισμού σε στοχευμένες θεραπείες, αποδεικνύεται με ολοένα και περισσότερες μελέτες πως είναι δυνατό να συμβεί ([Pantel, 2016](#)).

Η μέθοδος της υγρής βιοψίας υπόσχεται πολλά, όσον αφορά την ανίχνευση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη μιας πιθανής απάντησης του οργανισμού στη θεραπεία. Οι βιοδείκτες, βασιζόμενοι στη μέθοδο της υγρής βιοψίας, είναι αρκετοί, όμως αυτοί που ξεχωρίζουν είναι οι: ctDNA (circulating tumor DNA), CTCs (circulating tumor cells), exosomes (εξωσώματα) και microRNAs.



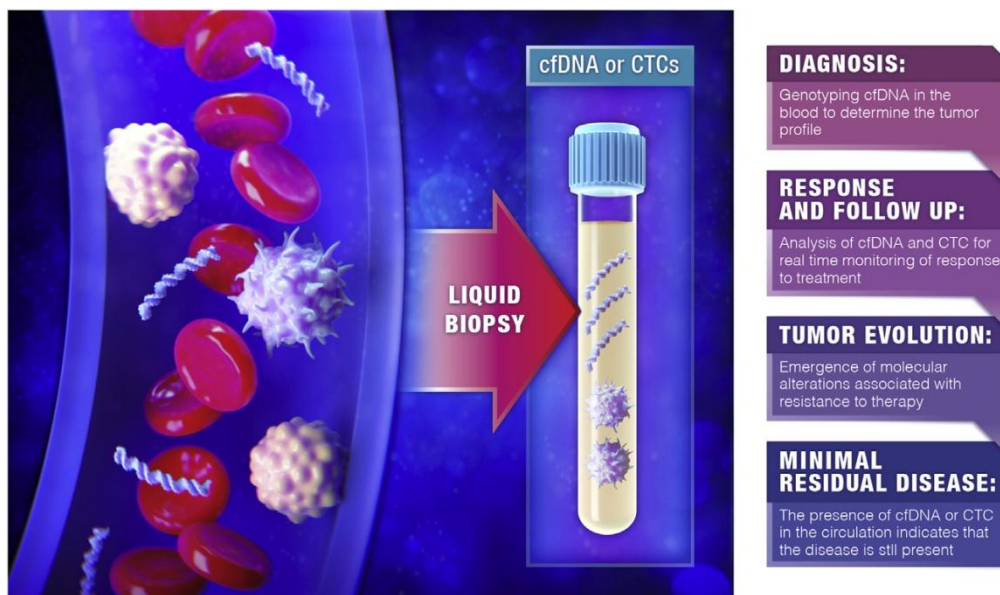
Εικόνα 14: Χρονοδιάγραμμα εξέλιξης ενός δείκτη της υγρής βιοψίας (ctDNA). ([Irma G. Dominguez-Vigil, 2018](#)).

4.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Η μοριακή και κυτταρική ετερογένεια είναι χαρακτηριστικά του καρκίνου και μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για τη διάγνωση και την αντιμετώπισή του. Τα τελευταία χρόνια, η προσοχή των επιστημόνων έχει στραφεί σε μία καινούργια μέθοδο, την υγρή βιοψία. Σε αντίθεση με τη βιοψία ιστού, στο αίμα βρίσκεται DNA από καρκινικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε απομακρυσμένες μεταστατικές αποικίες. Σύμφωνα με έρευνες από τις μεταστατικές αποικίες εκλύονται ctDNA και CTCs ταυτόχρονα. Στην εικόνα 15 που ακολουθεί επισημαίνονται οι εφαρμογές της υγρής βιοψίας, η οποία βασίζεται στα CTCs και το ctDNA ([Bardelli and Pantel, 2017](#)).

Οι έρευνες για τον έλεγχο του καρκίνου, συνήθως ξεκινούν με σύγκριση των καρκινοπαθών με υγιείς πληθυσμούς. Εστιάζοντας σε ασθενείς με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, αποτελεί ανεκτίμητη στρατηγική για την επιτάχυνση της επικύρωσης της έρευνας. CTCs προσδιορίστηκαν σε ασθενείς με ΧΑΠ, οι οποίοι δεν είχαν ανιχνεύσιμο καρκίνο του πνεύμονα. Η έρευνα περιέλαβε 168 ασθενείς με ΧΑΠ και 77 υγιείς (ομάδα ελέγχου). CTCs προσδιορίστηκαν σε 5 από τους 168, ενώ στην ομάδα ελέγχου δεν προσδιορίστηκε κανείς. Στον ετήσιο έλεγχο των θετικών σε CTCs ασθενών ΧΑΠ, μέσω αξονικής τομογραφίας, προσδιορίστηκαν πνευμονικά οζίδια 1-4 χρόνια μετά τον προσδιορισμό των CTCs, οδηγώντας σε χειρουργική εκτομή και ιστολογική διάγνωση του πρώιμου σταδίου καρκίνου του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να επικυρωθούν σε μεγάλους πληθυσμούς και γεγονότα τα οποία οδηγούν σε ευρήματα μη καρκινοπαθών ατόμων, όπως η

απελευθέρωση μη κακοήθων επιθηλιακών κυττάρων στο αίμα, να εξαιρούνται ([Bardelli and Pantel, 2017](#)).



Εικόνα 15: Υγρή βιοψία σε συμπαγείς όγκους. Οι εφαρμογές κλειδί της υγρής βιοψίας στην κλινική ιατρική περιλαμβάνουν την διερεύνηση του όγκου με την ανίχνευση ctDNA στο αίμα, την αξιολόγηση της απόκρισης του οργανισμού στη θεραπεία μέσω της ανάλυσης των ctDNA, CTCs, τον προσδιορισμό υπολειμματικής ασθένειας, η οποία καθορίζεται από την παρουσία των ctDNA, CTCs στην κυκλοφορία και την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου μέσω μοριακών αλλαγών, οι οποίες υποδεικνύουν αντίσταση στη θεραπεία (Bardelli, 2017).

Ο προσδιορισμός του καρκίνου παρακολουθώντας το ctDNA είναι υπο έρευνα, καθώς ιδιαίτερα προκλητικός θεωρείται ο προσδιορισμός μικρών ποσοστών ctDNA σε δείγμα αίματος. Το cfDNA (cell free) αποτελείται κυρίως από DNA, το οποίο προέρχεται από φυσιολογικά κύτταρα και ένα μικρό μόνο ποσοστό από καρκινικά. Η ευαισθησία της κλασικής ανάλυσης του DNA δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό του ctDNA. Όμως ένα ακόμη ζήτημα είναι η ειδικότητα των ctDNA τεστ. Όπως συνέβη με την έρευνα για τον προσδιορισμό των CTCs σε μη καρκινοπαθείς, έτσι και ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων στο cfDNA μπορεί να μην υποδεικνύει πως το άτομο που εξετάστηκε, έχει ή θα εμφανίσει καρκίνο κατά τη διάρκεια της ζωής του (Bardelli, 2017).

Ο αξιόπιστος προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση της ελάχιστα υπολειμματικής νόσου, MRD (minimal residual disease), έχει υιοθετηθεί επιτυχώς στη διαχείριση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες (π.χ. λευχαιμία), αλλά όχι σε συμπαγείς

όγκους. Ως MRD ονομάζεται η κατάσταση κατά την οποία προσδιορίζονται στο αίμα ενός ασθενούς μικρές ποσότητες καρκινικών κυττάρων, τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών, και ο οποίος βρίσκεται σε φάση θεραπείας ή και κατά το πέρας αυτής χωρίς συμπτωματολογία. Ο πρώιμος προσδιορισμός αυτών είναι ικανός να αποτρέψει τη δημιουργία μεταστατικών αποικιών. Μία μεγάλη έρευνα με 1493 ασθενείς μη μεταστατικού καρκίνου μαστού, έδειξε πως η παρουσία CTCs στο αίμα που επιμένουν μετά από χημειοθεραπεία, υποδηλώνει αρνητική έκβαση όσον αφορά την υποτροπή και τη συνολική επιβίωση ([Bardelli and Pantel, 2017](#)).

Σε ασθενείς με μη μεταστατικούς όγκους η υγρή βιοψία μέσω προσδιορισμού ctDNA μπορεί να βελτιστοποιηθεί ώστε να παρακολουθεί γενετικούς δείκτες της MRD μετά από θεραπευτική εκτομή. Αναλόγως, αναλύσεις του ctDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον διαχωρισμό ασθενών οι οποίοι βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο υποτροπής και τη διάθεση χαμηλού κινδύνου ασθενών από την τοξικότητα και τις ανεπιθύμητες συστηματικές θεραπείες. Έχει βρεθεί πως η αύξηση του ctDNA μετά από χειρουργική επέμβαση είναι συσχετιζόμενη με τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων, εξαιρουμένου του εγκεφάλου ([Bardelli and Pantel, 2017](#)).

Η διερεύνηση ασθενών υψηλού κινδύνου υποτροπής, μέσω προσδιορισμού CTCs και ctDNA, μπορεί να δημιουργήσει ευκαιρίες για θεραπευτικές παρεμβάσεις πριν την ανάπτυξη μετάστασης. Επίσης, η παρακολούθηση του διαχωρισμού των ασθενών υψηλού κινδύνου με MRD σε ταχύριθμη θεραπεία είναι ακόμη μία σημαντική εφαρμογή της υγρής βιοψίας. Παραδείγματος χάρη, οι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου Dukes B, δε λαμβάνουν χημειοθεραπείες έπειτα από εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου. Ωστόσο, το 10-20 % των ασθενών αυτών υποτροπιάζουν τα επόμενα 5 χρόνια από την χειρουργική εκτομή. Ο προσδιορισμός των CTCs μέσω ανάλυσης του δείκτη *plastin 3-RNA* με τη μέθοδο της RT-PCR (real time), στο περιφερικό αίμα, βοηθά στον προσδιορισμό αυτών των υψηλού κινδύνου ασθενών εκ των προτέρων ([Bardelli and Pantel, 2017](#)).

Οι δείκτες που ανιχνεύονται με τη μέθοδο της υγρής βιοψίας, μπορούν να απομονωθούν από το αίμα, αλλά και από άλλα βιολογικά υγρά όπως τα ούρα ([Irma G. Domínguez-Vigil, 2018](#)). Ο χειρισμός αυτής της μεθόδου θα πρέπει να είναι γρήγορος και προσεκτικός. Παράδειγμα, για τη λήψη δείγματος (αίμα), θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα σωληνάκια, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να απελευθερωθεί το DNA. Επίσης, έπειτα από τη λήψη, το δείγμα είναι αναγκαίο να σταθεροποιηθεί και να κλασματοποιηθεί εντός ωρών, ώστε να αμβλυωθεί η αποικοδόμηση κυττάρων ή νουκλεϊκών οξέων. Το πλάσμα, το οποίο έχει κλασματοποιηθεί από αίμα, μπορεί να καταψυχθεί για την απομόνωση του υλικού, σε μεταγενέστερη ημερομηνία. Για την ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών

κυττάρων, θετική διαλογή (απομόνωση ενός πληθυσμού κυττάρου-στόχου χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για τον συγκεκριμένο πληθυσμό), ή αρνητική εξάντληση (εξάντληση όλων των τύπων των κυττάρων, με εξαίρεση τα υπο μελέτη κύτταρα), θα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε φυγοκεντρημένο δείγμα αίματος που περιέχει σχεδόν όλα τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια εμπλουτισμένο με αντιπηκτικό ή σε ολόκληρο το αίμα, πριν την ψύξη ενός εμπλουτισμένου κυτταρικού ιζήματος ([Niall J. Lennon, 2016](#)).

Τεχνικές για τον προσδιορισμό γνωστών μεταλλάξεων έχουν βοηθήσει πολύ και υιοθετήθηκαν από τους επιστήμονες. Γνωστές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η PCR (real time και digital). Η PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) είναι μία μέθοδος της μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας του γενετικού υλικού. Είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος και χρησιμοποιείται για τη διάγνωση γενετικών ασθενειών, καθώς και την ανίχνευση λοιμώδων νοσημάτων. Οσον αφορά τη μέθοδο της υγρής βιοψίας, η απόδοσή της θα βελτιωνόταν με τη χρήση μιας άλλης τεχνικής, όπως είναι η NGS (Next Generation Sequencing).

Ενώ για τους περισσότερους ιστούς η αλληλουχία επόμενης γενιάς NGS έχει ήδη εδραιωθεί, η χρήση της στην υγρή βιοψία απαιτεί προσεκτική επικύρωση ολόκληρης της διαδικασίας, από τη λήψη αίματος έως την κλήση παραλλαγής. Η κλινική χρησιμότητα της αλληλούχισης επόμενης γενιάς έγκειται στη δυνατότητά της να προσδιορίζει και να μελετά μεγάλους γενετικούς τόπους ή πολλά εξόνια, στο ctDNA. Σε μία τέτοια τεχνική, για την οποία απαιτείται υψηλή ευαισθησία, θα είναι συνετό να αναμένονται και ψευδή αποτελέσματα ([Umberto Malapelle, 2016](#)).

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς, βασισόμενη στην παράλληλη μαζική αλληλούχιση εκατομμυρίων διαφορετικών μορίων γενετικού υλικού, επιτρέπει την ανίχνευση πολλών μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια. Χρησιμοποιώντας πάνελς για στοχευμένα γονίδια, η κάλυψη σε κλινικά γονίδια-στόχους στενεύει, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται υψηλή ευαισθησία. Ως γενικό κανόνα, αυτή η τεχνική αναφέρεται ως εξαιρετικά βαθιά αλληλούχιση, επιτρέποντας τον προσδιορισμό πολύ χαμηλών ποσοτήτων ctDNA στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά. Η ροή της τεχνικής αυτής διακρίνεται σε τέσσερα στάδια: τη δημιουργία βιβλιοθήκης ενός μικρού θραύσματος γενετικού υλικού, την ενίσχυση κλωνικού μορίου θραύσματος, τη μαζική παράλληλη αλληλούχιση και τέλος, την ανάλυση των δεδομένων ([Umberto Malapelle, 2016](#)). Σύμφωνα με μία έρευνα, εάν η τεχνική αυτή αξιοποιηθεί σωστά από την αρχή μέχρι και το τέλος, θα ανοίξει νέους ορίζοντες στον προσδιορισμό, συγκεκριμένων μεταλλαγών, μέσω της μεθόδου της υγρής βιοψίας.

4.3 ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ DNA (ctDNA)

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA έχει αναδυθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο, ελάχιστα επεμβατικό εργαλείο-βιοδείκτης σε πολλούς τύπους καρκίνου. Το ctDNA ίσως βοηθήσει στη διενέργεια δυναμικής γενετικής παρακολούθησης, στην εποχή της φαρμακογονιδιωματικής, μέσω του έμμεσου προσδιορισμού της γονιδιωματικής πληροφορίας του όγκου ([Julie A. Vendrell, 2017](#)).

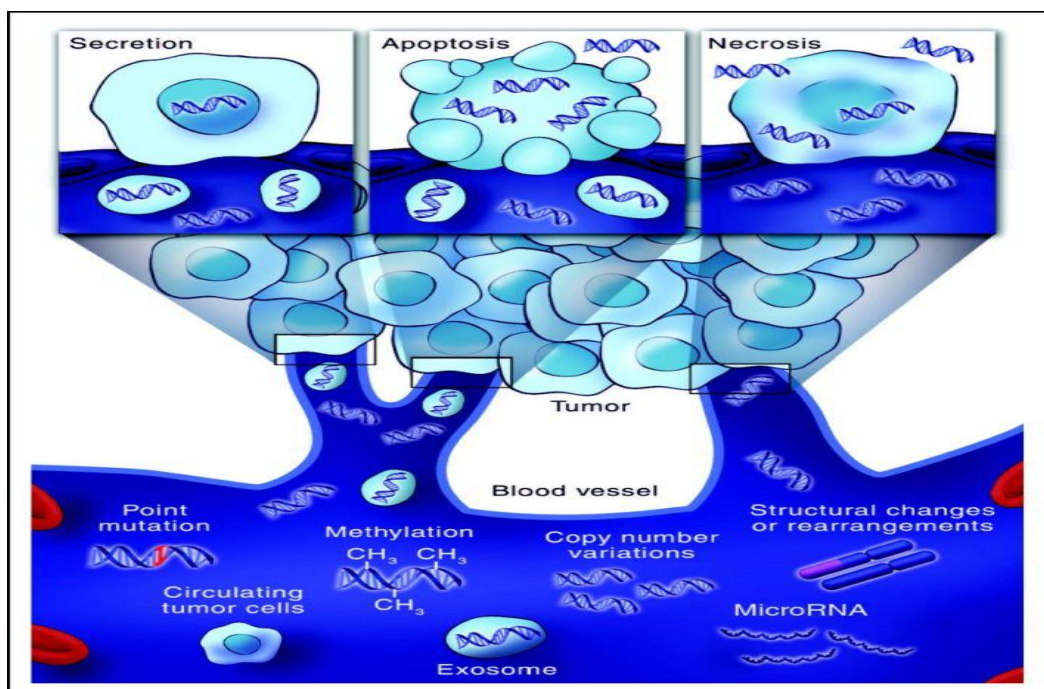
Η ύπαρξη του ελεύθερου κυττάρων DNA (cfDNA), είναι ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο θεωρείται πως προέρχεται από την απόπτωση και τη νέκρωση φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων ([Shiyu Jia, 2017](#)). Το cfDNA εκκρίνεται από μη κακοήγη κύτταρα, τα οποία “πεθαίνουν” και αυτό το φυσιολογικό ελεύθερο κυκλοφορούν DNA αραιώνει το κυκλοφορούν καρκινικό DNA, που εμφανίζεται σε ασθενείς με καρκίνο και ειδικότερα σε καταστάσεις-θεραπείες που περιλαμβάνουν βλάβη ιστού, όπως είναι η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και κάποιο χειρουργείο ([Pantel, 2016](#)). Τα θραύσματα του ctDNA έδειξαν έναν εμπλουτισμό 166 bp, που αντιστοιχεί σαφώς στο μέγεθος του DNA που τυλίγεται γύρω από τα νουκλεοσώματα ([Shiyu Jia, 2017](#)).

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA αποτελείται από μικρά κομμάτια διπλών ελίκων γενετικού υλικού, τα οποία απελευθερώνονται από όγκους και χαρακτηρίζεται από μοναδικές σωματικές μεταλλάξεις, που δεν υφίστανται σε φυσιολογικά κύτταρα. Το ctDNA εκκρίνεται στην κυκλοφορία είτε παθητικά είτε με ενεργή έξοδο μέσω συγκεκριμένων σωματιδίων, των εξωσωμάτων, όταν αυτά παρεμβάλλονται ([Aditi P. Singh, 2017](#)). Κάτω από φυσιολογικές καταστάσεις όμως, τα θραύσματα του γενετικού υλικού καταστρέφονται από τα φαγοκύτταρα. Αυτό, ωστόσο, δε συμβαίνει όταν έχουμε να κάνουμε με κάποια κακοήγη μάζα.

Αυξημένα ποσά του cfDNA παρατηρούνται σε καρκινοπαθείς και συσχετίζονται με την πρόγνωση ορισμένων καρκίνων. Πολλές φορές το cfDNA συγχέεται με το ctDNA. Το cfDNA είναι το γενετικό υλικό το οποίο κυκλοφορεί ελεύθερα στην κυκλοφορία του αίματος και δεν προέρχεται απαραίτητως από κάποιο όγκο. Από την άλλη, το ctDNA αντανakλά το γονιδίωμα του όγκου ([Veronika Vymetalkova, 2018](#)). Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA, ευρίσκεται κυρίως στο πλάσμα και τον ορό του αίματος. Ωστόσο, μπορεί να απομονωθεί και από άλλα βιολογικά υγρά, όπως η σίελος, το μητρικό γάλα, η λέμφος, περιτοναϊκά υγρά, ο μυελός των οστών, τα ούρα, προστατικά υγρά, τα πτύελα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, γαστρικά υγρά, ο ασκίτης και επίσης από δείγματα χοληφόρων και κοπράνων ([Irma G. Domínguez-Vigil, 2018](#)). Είναι γεγονός, πως ο προσδιορισμός καρκινικού DNA αποτελεί πιο ειδική τεχνική, για τη διάγνωση του καρκίνου, από τη μέτρηση πρωτεϊνικών βιοδεικτών στο πλάσμα.

Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ctDNA έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί ένα εργαλείο, όχι μόνο για τη διάγνωση του καρκίνου, αλλά κυρίως για την παρακολούθησή του, καθώς και τον προσδιορισμό της αντίστασης του όγκου σε θεραπείες. Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA αποτυπώνει καλύτερα την ενδογενή ετερογένεια του όγκου, αφού εκλύεται από όλα τα σημεία του και έτσι αναπαράγει το γονιδιωματικό πλαίσιο του όγκου.

Ως γνωστόν, μεταλλάξεις του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα EGF, οδηγούν σε υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει πως το ctDNA αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για τον προσδιορισμό αυτών των μεταλλάξεων. Παράλληλα, χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης έπειτα από την εισαγωγή συγκεκριμένης θεραπείας, gefitinib ή άλλων TKI's ([Aditi P. Singh, 2017](#)).



Εικόνα 16: Απεικόνιση των γενετικών αλλαγών που μπορούν να προσδιοριστούν με το ctDNA ([Luis A. Diaz, 2014](#)).

Ανεξάρτητα του εξαιρετικού αποτελέσματος των θεραπευτικών προσεγγίσεων του μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα, ορισμένοι ασθενείς οδηγούνται σε αντίσταση στη θεραπεία, έπειτα από ένα χρόνο περίπου. Η αντίσταση στη θεραπεία οφείλεται σε μεταλλάξεις ή γενετικές αλλαγές. Μία κοινή μετάλλαξη που προκύπτει από τη θεραπευτική αγωγή είναι η T790M. Ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων αυτών είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς τα φάρμακα που τις προκαλούν, TKI's

(Αναστολείς τυροσινικής κινάσης), χρησιμοποιούνται εκτενώς λόγω της αυξημένης ανταπόκρισης των ασθενών σε αυτά. Πολλές μελέτες έστρεψαν το ενδιαφέρον σε δείκτες που μπορούν να προσδιορίσουν αυτές τις συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές εξαιτίας της αντίστασης στα φάρμακα. Το ctDNA φέρεται να συμπληρώνει τον έλεγχο του γενετικού υλικού του όγκου, με τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων αλλαγών ([Aditi P. Singh, 2017](#)).

4.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΑΝΑΛΥΣΗ ctDNA.

Μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό του ctDNA. Πιο συγκεκριμένα, Safe-SeqS, TamSeq, και digital PCR είναι κάποιες από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται. Οι τεχνικές μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, στις στοχευμένες προσεγγίσεις, οι οποίες προσδιορίζουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε ένα σύνολο προκαθορισμένων γονιδίων και στις μη στοχευμένες προσεγγίσεις, που εξετάζουν το γονιδίωμα για νέες γονιδιακές αλλαγές. Γενικά, οι στοχευμένες τεχνικές προσδιορισμού διακρίνονται για την υψηλότερη αναλυτική ευαισθησία, σε σχέση με τις μη στοχευμένες. Επιτακτικό ζήτημα είναι, ωστόσο, η εισαγωγή μιας εξαιρετικά ευαίσθητης τεχνικής, ικανής να προσδιορίζει τη μικρότερη δυνατή ποσότητα του ctDNA, από το φυσιολογικό cfDNA ([Pantel, 2016](#)).

Οι παραδοσιακές τεχνικές προσδιορισμού, όπως η ποσοτική PCR, μπορούν να προσδιορίσουν μόνο υψηλές συγκεντρώσεις ctDNA, λόγω της χαμηλής αναλυτικής ευαισθησίας. Η ψηφιακή PCR, επιτρέπει στους ερευνητές να προσδιορίσουν εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά ctDNA, που φτάνουν ακόμη και το 0,01%, με γνωστές αλλαγές της αλληλουχίας του γενετικού υλικού. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), μπορεί να προσδιορίσει όλες τις πιθανές καρκινικές μεταλλάξεις και σπάνιες αλλαγές ([Shiyu Jia, 2017](#)).

Η τεχνική της ψηφιακής PCR (digitalPCR), ανήκει στην κατηγορία της στοχευμένης προσέγγισης προσδιορισμού. Τα πλεονεκτήματα της είναι η υψηλή ευαισθησία, η οποία εκτιμάται σε 0,01-0,1%, ο εύκολος χειρισμός της και η εφαρμογή στον προσδιορισμό των παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (CNV's). Το μόνο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι πως προσδιορίζει μόνο γνωστές μεταλλάξεις. Η τεχνική BEAMing digital PCR, χαρακτηρίζεται από περίπλοκο χειρισμό και υψηλό κόστος ανά δείγμα, γεγονός που την κάνει δύσκολα εφαρμόσιμη για την κλινική πρακτική. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) διακρίνεται από την ικανότητα ανάλυσης εκατομμυρίων μικρών τμημάτων μορίων γενετικού υλικού και τη σύγκρισή τους με μία ακολουθία αναφοράς. Έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όμως

χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος. Η NGS χωρίζεται σε διάφορες τεχνικές, με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Δύο γνωστές, μη στοχευμένες προσεγγίσεις ανίχνευσης, είναι οι WES (Whole Exome Sequencing) και WGS (Whole Genome Sequencing). Αυτές οι δύο τεχνικές παρέχουν ένα σφαιρικό γονιδιακό προφίλ των αλλαγών του ctDNA. Παρόλα τα πλεονεκτήματα και τις ιδιαίτερες χρήσεις τους, εξακολουθούν να είναι αρκετά ακριβές τεχνικές ([Julie A. Vendrell, 2017](#)).

4.4 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (CTCs)

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα είναι συνήθως σπάνια επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία εντοπίζονται στο περιφερικό αίμα ογκολογικών ασθενών ([Alfredo Tartarone, 2017](#)). Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνονται, από τον πρωταρχικό όγκο και/ή τις μεταστατικές αποικίες, στην κυκλοφορία του αίματος. Υπάρχει έτσι η δυνατότητα δημιουργίας περαιτέρω μεταστατικών αποικιών ([Shiyu Jia, 2017](#)).

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ανακαλύφθηκαν από τον Asworth το 1869 κατά τη διενέργεια αυτοψίας σε ασθενή με μεταστατικό όγκο. Τα στοιχεία δείχνουν πως ασθενείς με μετάσταση έχουν 1-10 CTCs ανά mL αίματος. Σπάνια μπορούν να εντοπιστούν σε κλινικά υγιείς ή σε άτομα με μη κακοήγη όγκο. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν εντοπιστεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως στον καρκίνο του μαστού, του προστάτου, του ήπατος, του πνεύμονος, της ουροδόχου κύστης, στο μελάνωμα και στον καρκίνο του τραχήλου. Ωστόσο, πολλές φορές δε δύναται να προσδιοριστούν σε ασθενείς με δυσπλασίες ή πρώιμες κακοήθεις αλλοιώσεις ([Irma G. Domínguez-Vigil, 2018](#)).

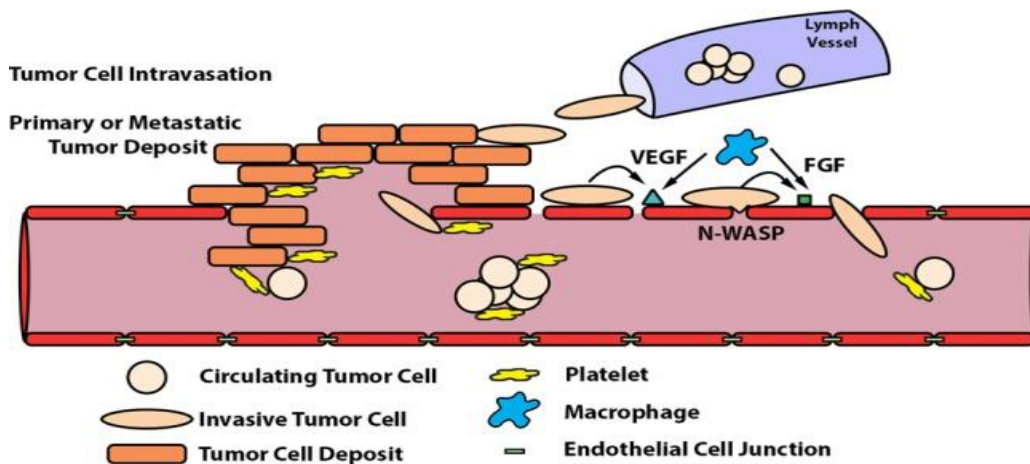
Ο χρόνος κατά τον οποίο τα CTCs βρίσκονται στην αιματική κυκλοφορία είναι σύντομος. Ο χρόνος ημιζωής τους κυμαίνεται από 1-2.4 ώρες. Το αν η απελευθέρωση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία, είναι ένα τυχαίο γεγονός ή μία προσχεδιασμένη βιολογική διεργασία μιας νεοπλασίας, αποτελεί σημείο προς συζήτηση. Παρόλα αυτά η αποβολή των επιζώντων CTCs επιτελείται, έπειτα από την εξαγγείωσή τους σε δευτερεύοντα όργανα. Παραδείγματος χάρη, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, η συγκριτική ανάλυση των CTCs σε μεσεντέριες και περιφερικές φλέβες, έδειξε πως το ήπαρ παραλαμβάνει καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από τον πρωτοπαθή όγκο ([Pantel, 2016](#)).

Τα CTCs μπορούν να εμφανίζονται μόνα τους είτε να ενσωματώνονται μεταξύ τους και με άλλους παράγοντες και κύτταρα του αίματος στην κυκλοφορία, ακόμη και

να δημιουργούν μεταστάσεις. Μπορούν να διαχωριστούν από τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ή μόρια επιφανείας κυττάρου. Η απομόνωση και ο προσδιορισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο, ως προς την πρόωμη διάγνωση, την παρακολούθηση και την πρόβλεψη των μεταστάσεων ([Shiyu Jia, 2017](#)).

Για να γίνει πλήρως κατανοητή η βιολογία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, πρέπει να αναφερθεί η ετερογένειά τους σε όλα τα επίπεδα. Τα CTCs αντιπροσωπεύουν ένα δυναμικό πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος συνεχώς αναδιαμορφώνεται με νέα κύτταρα από διάφορες πηγές. Κάθε δείγμα αίματος που περιέχει καρκινικά κύτταρα, προσφέρει ένα στιγμιότυπο του συνολικού επιθετικού φορτίου του καρκίνου, αποκαλύπτοντας την ετερογένεια. Όσον αφορά τη γονιδιωματική ετερογένεια, μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA σε κυκλοφορούντα καρκινικά του καρκίνου του μαστού έχουν εκτιμηθεί, όπως και η απώλεια ετεροζυγωτίας, που προσδιορίζεται μεταξύ μεμονωμένων CTCs και η παρουσία μοναδικών μεταλλάξεων του PIK3CA, σε διαφορετικά CTCs, στον ίδιο ασθενή. Παρομοίως, στον καρκίνο του πνεύμονος, μεταλλάξεις του T790M βρέθηκαν σε δείγματα CTCs, από ασθενείς με δείγματα πρωταρχικού όγκου αρνητικά για T790M ([Douglas S. Micalizzi, 2017](#)).

Για να επιτευχθεί η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, πρέπει πρώτα να δημιουργηθούν και να καταφέρουν να επιζήσουν και να πολεμήσουν ενάντια του ανοσοποιητικού συστήματος και των φαγοκυττάρων. Το σχήμα που ακολουθεί (εικόνα 17), δείχνει τη διαδικασία της δημιουργίας των καρκινικών κυττάρων και την είσοδο στην κυκλοφορία. Καρκινικά κύτταρα από πρωταρχικούς και μεταστατικούς όγκους εισέρχονται είτε ως μονήρη κύτταρα στο αίμα είτε ως συσσωματώματα καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία, τους λεμφαδένες και στο αίμα. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία παθητικά ή ενεργητικά χωρίς την απώλεια την ακεραιότητας των αιμοφόρων αγγείων. Όταν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα εισέλθουν στην κυκλοφορία, τα μακροφάγα συρρέουν στην περιοχή. Οι αυξητικοί παράγοντες VEGF, FGF και άλλες κυτοκίνες, που παράγονται από τα μακροφάγα και τα καρκινικά κύτταρα, οδηγούν στην απώλεια των αγγειακών συνδέσεων και την αύξηση της διαπερατότητας των αιμοφόρων αγγείων. Ο σχηματισμός *invasorodia*, ο οποίος εξαρτάται από το N-WASP στο καρκινικό κύτταρο, διευκολύνει την εισβολή μέσω του ενδοθηλίου ([Douglas S. Micalizzi, 2017](#)).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της εισβολής των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία, καθώς και της δημιουργίας των CTCs ([Douglas S. Micalizzi, 2017](#)).

Η εξαγγείωση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων είναι υπεύθυνη για τις απομακρυσμένες μεταστατικές αποικίες που δημιουργούν. Μοιάζει αρκετά με την εξαγγείωση των λευκών αιμοσφαιρίων. Πραγματοποιείται κυρίως σε μικρά τριχοειδή και σε κομβικά σημεία μεταξύ αιμοφόρων αγγείων. Αρχικά, ένα μονήρες CTC ή ένα συσσωμάτωμα δημιουργεί μία επικοινωνία με το τοίχωμα του αιμοφόρου αγγείου, πιθανότατα μέσω έκφρασης των E-σελεκτινών του ενδοθηλίου, διευκολυνόμενη από τα αιμοπετάλια. Οι E-σελεκτίνες τυπικά δεν εκφράζονται από τα κύτταρα του ενδοθηλίου, ωστόσο επάγονται από κυτοκίνες παραγόμενες από τον πρωταρχικό όγκο. Η προσκόλληση των CTCs στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων καθοδηγείται από αναρίθμητα μόρια, πέρα από τις σελεκτίνες και τις κυτοκίνες. Επόμενο βήμα είναι η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, έπειτα από διάσπαση των ενδοθηλιακών συνδέσεων. Το άνοιγμα των συνδέσεων πραγματοποιείται ως αποτέλεσμα της απάντησης σε πολλούς παράγοντες, όπως ο παράγοντας TGF και ο VEGF, οι οποίοι παράγονται από το ίδιο το καρκινικό κύτταρο. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα διασχίζουν τη βασική μεμβράνη και εισέρχονται στο στρώμα ([Douglas S. Micalizzi, 2017](#)).

Μέσω του προσδιορισμού των CTCs καθίσταται δυνατή η μέτρηση ορισμένων βιοδεικτών, οι οποίοι αποτελούν διαγνωστικό, προγνωστικό μέσο του καρκίνου, όπως επίσης μπορεί να προβλεφθεί η υψηλή πιθανότητα ένας ασθενής να νοσήσει από μία συγκεκριμένη νεοπλασία. Επίσης, το ποσοστό των CTCs, είναι ικανό να προσδιορίσει την συνολική επιβίωση και την επιθετικότητα του όγκου. Όσον αφορά, ωστόσο, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολος ο προσδιορισμός των CTCs, διότι το ποσοστό τους ήταν χαμηλότερο στο περιφερικό

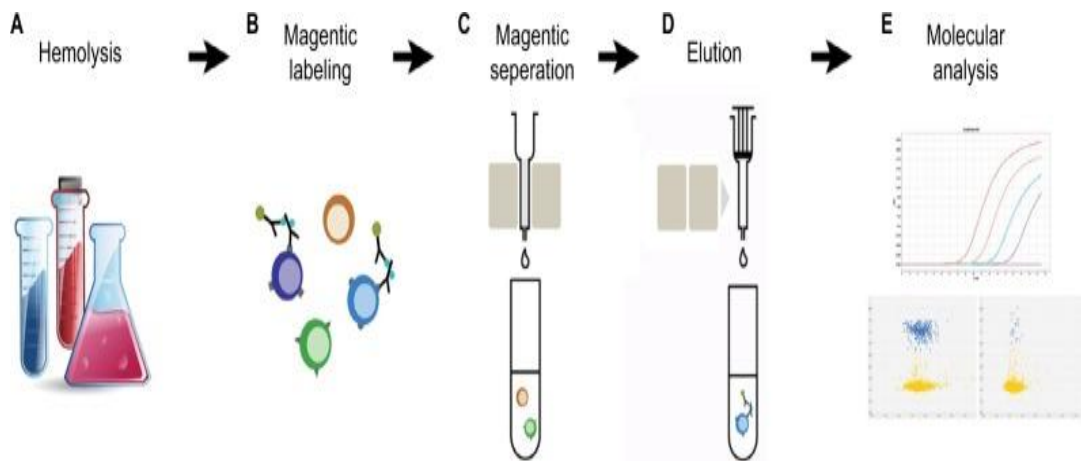
αίμα ασθενών με καρκίνο του παχέος, συγκριτικά με ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή του προστάτη ([Shiyu Jia, 2017](#)).

Μια μετα-ανάλυση έδειξε πως, για ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, ο προσδιορισμός mRNA των CTCs και η μέτρηση κάποιων βιοδεικτών όπως το CEA και οι κυτταροκερατίνες 19 και 20, με τη χρήση της rtPCR (real-time PCR), μπορεί να λειτουργήσει ως προγνωστικός δείκτης και ως μέσο της σταδιοποίησης του καρκίνου. Επιπρόσθετα, ακόμη μία δυνατότητα που προσφέρει ο προσδιορισμός των CTCs είναι η παρακολούθηση της αναπόκρισης σε θεραπευτική αγωγή (drug monitoring) και ως αποτέλεσμα η ικανότητα πρόωξης ανίχνευσης της επιθετικότητας του όγκου, με τη δημιουργία καινούργιας μεταστατικής αποικίας. Συμπερασματικά, η συμπληρωματική αξιολόγηση των CTCs, ctDNA θα βοηθούσε, ώστε να εκτιμηθεί σωστά το δυναμικό προφίλ του όγκου ([Shiyu Jia, 2017](#)).

4.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ- ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ CTCs

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των CTCs που τα καθιστούν εξαιρετικό εργαλείο για την παρακολούθηση της ασθένειας, υπάρχουν πιθανοί περιορισμοί στη χρήση των σύγχρονων τεχνικών απομόνωσης εξαιτίας της ετερογένειας των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στα φυσικά χαρακτηριστικά των CTCs για την απομόνωσή τους, συνήθως επιτυγχάνουν υψηλή απόδοση, μεγαλύτερη και από 80%. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα CTCs μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος, παραδείγματος χάρη τα καρκινικά κύτταρα τα οποία ξεπερνούν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς είναι μικρότερα σε μέγεθος. Μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούν βιοδείκτες των CTCs είναι επίσης αδύναμες, προκαλώντας το πραγματικό φορτίο των καρκινικών κυττάρων να υποτιμηθεί και τους πληθυσμούς των CTCs, οι οποίοι είναι σχετικοί με την ανάπτυξη της νόσου, να χαθούν. Η έκφραση του παράγοντα πρόσδεσης επιθηλιακών κυττάρων EpCAM ήταν χαμηλότερη στα CTCs, σε σύγκριση με πρωταρχικούς και μεταστατικούς ιστούς, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον και ρυθμίζεται αρνητικά στα CTCs. Αυτή η εξήγηση είναι πιθανή για το λόγο κατά τον οποίο δεν προσδιορίζονται κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα από το σύστημα CellSearch σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρόλο που το συγκεκριμένο σύστημα είναι εγκεκριμένο από την FDA, δεν μπορεί να συλλάβει μη επιθηλιακά CTCs, οδηγώντας σε ελλιπή αποτελέσματα ([Shiyu Jia, 2017](#)).

Για την απομόνωση και τον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ακολουθούν κάποιες προεργασίες, συμπεριλαμβανομένων και της λήψης του δείγματος σε κατάλληλα φιαλίδια συλλογής, όπως και τη φυγοκέντρηση και αποθήκευση των δειγμάτων σε κατάλληλες συνθήκες. Δείγματα περιφερικού αίματος συλλέγονται σε εμποτισμένα σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA. Τα δείγματα λήφθηκαν με σύριγγα αρνητικής πίεσης και αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Η επεξεργασία τους δεν ξεπερνά τις δύο ώρες από τη στιγμή της συλλογής, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σωληναρίων ([Stefania Benini, 2018](#)). Στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 18), αναφέρεται η διαδικασία της απομόνωσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων βήμα-βήμα, η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 18: Απομόνωση των CTC's από δείγματα περιφερικού αίματος. A) Αρχικά πραγματοποιείται λύση των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιώντας 10 ml διαλύματος ανά ml περιφερικού αίματος. B) Εμπλουτισμός των κυττάρων CD99 με μαγνητική σήμανση. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά σημαίνονται με anti-CD99 FITC αντισώματα, ακολουθούμενα από την επώαση με anti-FITC MicroBeads. C) Τα κύτταρα τα οποία δεν είναι σημασμένα περνάνε, ενώ τα κύτταρα με μαγνητική σήμανση διατηρούνται εντός των στήλων διαχωρισμού. D) Η στήλη απομακρύνεται και τα μαγνητικώς σημασμένα κύτταρα εκκλύονται. E) Το RNA από τα CTCs εξετάζεται για την παρουσία γονιδίων σύντηξης, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ποσοτικής αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*real-time quantitative reverse transcription PCR*) και την *digital reverse transcription PCR* ([Stefania Benini, 2018](#)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

5.1 Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ Ο ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ / ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Τα εξωσώματα είναι νανοκυστίδια προερχόμενα από μεμβράνη, με διάμετρο 30-100nm περίπου, τα οποία απελευθερώνονται από διάφορα είδη κυττάρων όπως τα μαστοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα, οι νευρώνες, τα λιποκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα επιθηλιακά. Σημειώτέο είναι πως τα καρκινικά κύτταρα έχουν δείχθει να παράγουν και να εκκρίνουν εξωσώματα σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τα υγιή¹. Εξωσώματα μπορούν να βρεθούν σε πολυάριθμα βιολογικά υγρά, στα οποία περιλαμβάνονται το αίμα, το αμνιακό υγρό, τα ούρα, ο κακοήθης ασκίτης, το μητρικό γάλα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, η σίελος, η λέμφος και η χολή, σε υγιείς σε νοσηρές καταστάσεις ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Εξωσώματα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά πριν τρεις δεκαετίες από τον Pan και την Johnstone¹, ενώ μελετούσαν την ωρίμανση των δικτυοκυττάρων σε ερυθροκύτταρα. Σημείωσαν πως κυστίδια, τα οποία έπειτα ονομάστηκαν εξωσώματα, απομονώθηκαν από καλλιεργημένα κύτταρα μονής στοιβάδας και διατήρησαν τον υποδοχέα της τρανσφερίνης και πολλές πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη μεμβράνη. Από τη στιγμή που θεωρήθηκε πως η λειτουργία αυτών των κυστιδίων είναι να απομακρύνουν τις περιττές πρωτεΐνες και άλλα μόρια από τα κύτταρα που απελευθερώνουν, τα εξωσώματα θεωρήθηκαν απλά ως κυτταρικοί συλλέκτες απορριμμάτων. Πριν τη δεκαετία του '90, φάνηκε πως τα εξωσώματα κατείχαν ανοσολογική λειτουργία. Από τότε, πολυάριθμες μελέτες έχουν επικυρώσει το ρόλο των εξωσωμάτων στην ενδοκυτταρική επικοινωνία, σε φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, όπως η γαλουχία, η φλεγμονή, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανοσολογική απόκριση και η νευρωνική λειτουργία. Επίσης εμπλέκονται στην παθογένεση της θρόμβωσης, του διαβήτη και της αθηροσκλήρωσης και επίσης, στην ανάπτυξη και την εξέλιξη νόσων, όπως ηπατικοί νόσοι, νευροεκφυλιστικές και πρόσφατα του καρκίνου ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Η Johnstone παρατήρησε πως τα ώριμα δικτυοκύτταρα περιείχαν μεγάλα σακίδια εμπλουτισμένα με μικρά μεμβρανικά κυστίδια, με ενιαίο μέγεθος 30-100nm, μέσα στο κυτταρόπλασμά τους. Αμέσως αναγνώρισε την τρανσφερίνη, σε άφθονες ποσότητες στη μεμβράνη αυτών των σακιδίων. Χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του υποδοχέα της τρανσφερίνης, αποκάλυψε πως τα μεγαλύτερα σακίδια, συγχωνεύονται, τελικώς, με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, απελευθερώνοντας τις μικρές μεμβρανικές δομές που εγκλείονται σε αυτά. Μεταγενέστερες μελέτες επιβεβαίωσαν την απελευθέρωση αυτών των κυστιδίων, ως ένα μηχανισμό, με τον οποίο μεμβράνες και πρωτεΐνες, όπως η τρανσφερίνη, αφαιρούνται κατά η διάρκεια της ωρίμανσης των δικτυοκυττάρων. Καθώς η διαδικασία της φυσαλιδώδους έκκρισης (vesicular secretion) ήταν παρεμφερής της ανάστροφης ενδοκύτωσης, τα μικρά κυστίδια που εξωθούνταν ονομάστηκαν εξωσώματα ([Johnny C. Akers, 2013](#)).

¹ Mohammed H. Rashed et al, 2017.

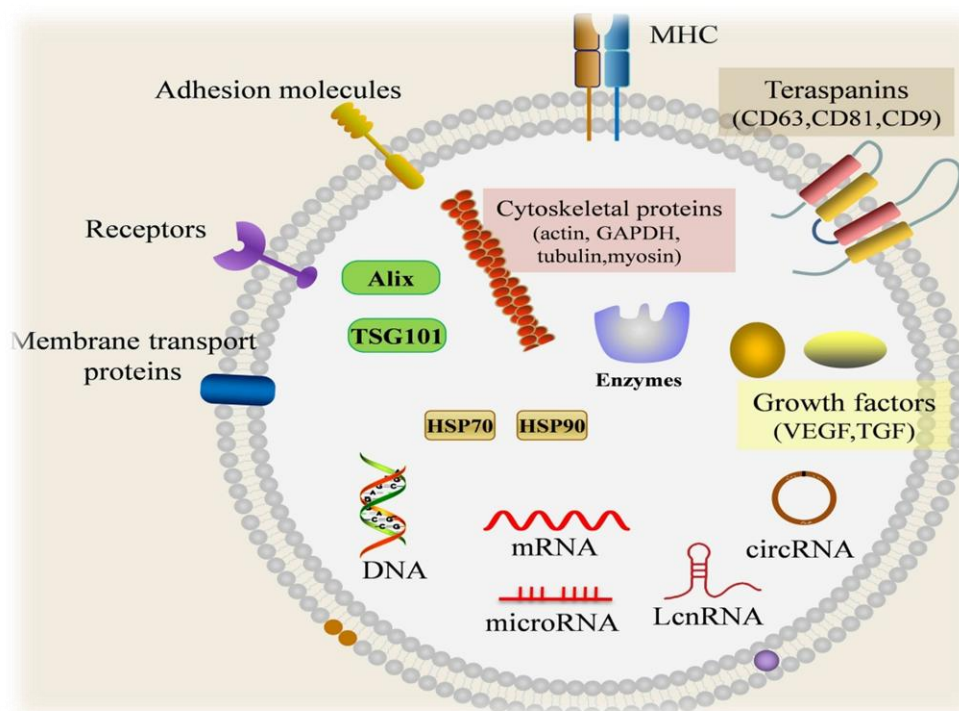
Τα περιεχόμενα και η σύνθεση των εξωσωμάτων διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο, ανάλογα με τον τύπο. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη βάση δεδομένων (Exocarta), τα εξωσώματα από διάφορους οργανισμούς και διάφορους κυτταρικούς τύπους, περιέχουν 4563 πρωτεΐνες, 194 λιπίδια, 1639 mRNAs και 764 miRNAs. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικής φύσεως συστατικά, εξαρτώνται από την κυτταρική προέλευση των εξωσωμάτων και γενικά είναι εμπλουτισμένα με συγκεκριμένα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών σύντηξης και των πρωτεϊνών-στόχων (π.χ. ιντεγκρίνες, τετρασπανίνες, λακταδερίνη), των κυτοπλασματικών ενζύμων (π.χ. GAPDH, περοξειδάσες, πιρουβικές κινάσες και γαλακτική δεϋδρογονάση), των συνοδών μορίων (π.χ. πρωτεΐνες θερμικού σοκ: Hsp60, Hsp70, Hsp90 και η μικρή HSPs), των μεμβρανικών πρωτεϊνών διακίνησης (π.χ. πρωτεΐνες Rab, αννεξίνες, ARF GTPάσες), των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στη δημιουργία πολύπλευρων σωμάτων (MBV) (π.χ. ALIX, TSG101 και κλαθρίνη), των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών (π.χ. ακτίνη και τουμπουλίνη) και τέλος των πρωτεϊνών που μετέχουν στη μεταγωγή του σήματος (π.χ. πρωτεϊνικές κινάσες και ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G) ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Τα κύρια συστατικά των εξωσωμάτων είναι τα λιπίδια. Τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη, διγλυκερίδια, γλυκεροφωσφολιπίδια, φωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια ή γλυκοσυλκεραμίδια. Πέρα από αυτά τα λιπίδια, βιοενεργά λιπίδια, όπως οι προσταγλαδίνες και τα λευκοτριένια και ένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως η φωσφολιπάση C, βρίσκονται επίσης στα εξωσώματα. Με αυτό τον τρόπο, τα εξωσώματα λειτουργούν ως λιπιδικοί μεταφορείς, μεταφέροντας βιοενεργά λιπίδια στα κύτταρα παραλήπτες. Επιπρόσθετα, τα συστατικά των εξωσωμάτων, όπως το λιπαρό οξύ δοκοσαεξαενοϊκό οξύ και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, μπορούν να ενισχύσουν την αντιγονική ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων. Σε αντίθεση, τα εξωσώματα που περιέχουν υψηλά ποσοστά προσταγλαδινών (PGE2), συμμετέχουν στην αποφυγή του ανοσοποιητικού και την προώθηση της αύξησης του όγκου ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)). Τα περιεχόμενα των εξωσωμάτων διατίθενται στην εικόνα 19.

Επιπλέον, πέρα από πρωτεΐνες και λιπίδια, τα εξωσώματα περιέχουν λειτουργικά μόρια RNA, συμπεριλαμβανομένων των mRNAs και άλλων μη κωδικοποιών RNAs, όπως τα miRNAs και τα lncRNAs. Αυτά τα εξωσωμικά RNAs, φαίνονται να λειτουργούν στο κύτταρο παραλήπτη. Παρά το ότι τα αποτελέσματα των εξωσωμικών φορτίων στα κύτταρα παραλήπτες, δεν μπορούν να αναγνωριστούν, τα miRNAs φέρονται ως σημαντικά μόρια αυτής της διαδικασίας ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Τα microRNAs είναι μικρά, μη κωδικοποιητικά RNAs, τα οποία αναφέρονται ως κύριοι ρυθμιστές του γονιδιώματος, και τα οποία συχνά απορρυθμίζονται στον καρκίνο. Η παρουσία τους και η ενδοκυτταρική τους μεταφορά στα εξωσώματα, ανέδειξαν την ανάγκη για περαιτέρω ανάλυση του εξωσωμικού miRNA (exomiR), ως δείκτη και ως κυστιδίου σήματος (signalling vehicle). Ο όρος exomiRs χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα microRNAs, τα οποία επιλεκτικά πακετάρονται, εκκρίνονται και μεταφέρονται μεταξύ κυττάρων στα εξωσώματα. Τρεις είναι οι κύριοι λειτουργικοί ρόλοι των exomiRs στην εξέλιξη του καρκίνου. Πρώτον, συμμετέχουν σε διαμεσολαβούμενη από τον υποδοχέα σηματοδότηση. Προσδένονται σε υποδοχείς όπως ο Toll-Like Receptor (TLR), προκειμένου να ασκήσουν τα αποτελέσματά τους. Δεύτερον, μεταφέρουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στο κύτταρο δέκτη. Τέλος, τα

exomiRs που προέρχονται από το στρώμα, επηρεάζουν τα καρκινικά κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, είναι ικανά να δημιουργήσουν χημειοαντίσταση και αντίσταση στην ακτινοβολία ([Rahul Bhome, 2018a](#)).



Εικόνα 19: Σχηματικό διάγραμμα και μοριακή σύσταση των εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα είναι νανοκυτίδια προερχόμενα από τη μεμβράνη με μέγεθος 30-100 nm, τα οποία απελευθερώνονται από όλους τους τύπους των κυττάρων. Περιέχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικά ενεργών συστατικών, όπως νουκλεϊκά οξέα (mRNA, miRNA, lncRNA και κυκλικά RNAs), πρωτεΐνες (CD63, CD81, Hsp90 και άλλα μόρια ειδικά ως προς τον τόπο προέλευσής τους) και λιπίδια ([Wang, 2018](#)).

Classification	Characteristics					
	Size (Zhengjia ng Sun)	Density (g/mL)	Morphology	Biogenesis and release	Molecular cargo	Possible markers enriched in the

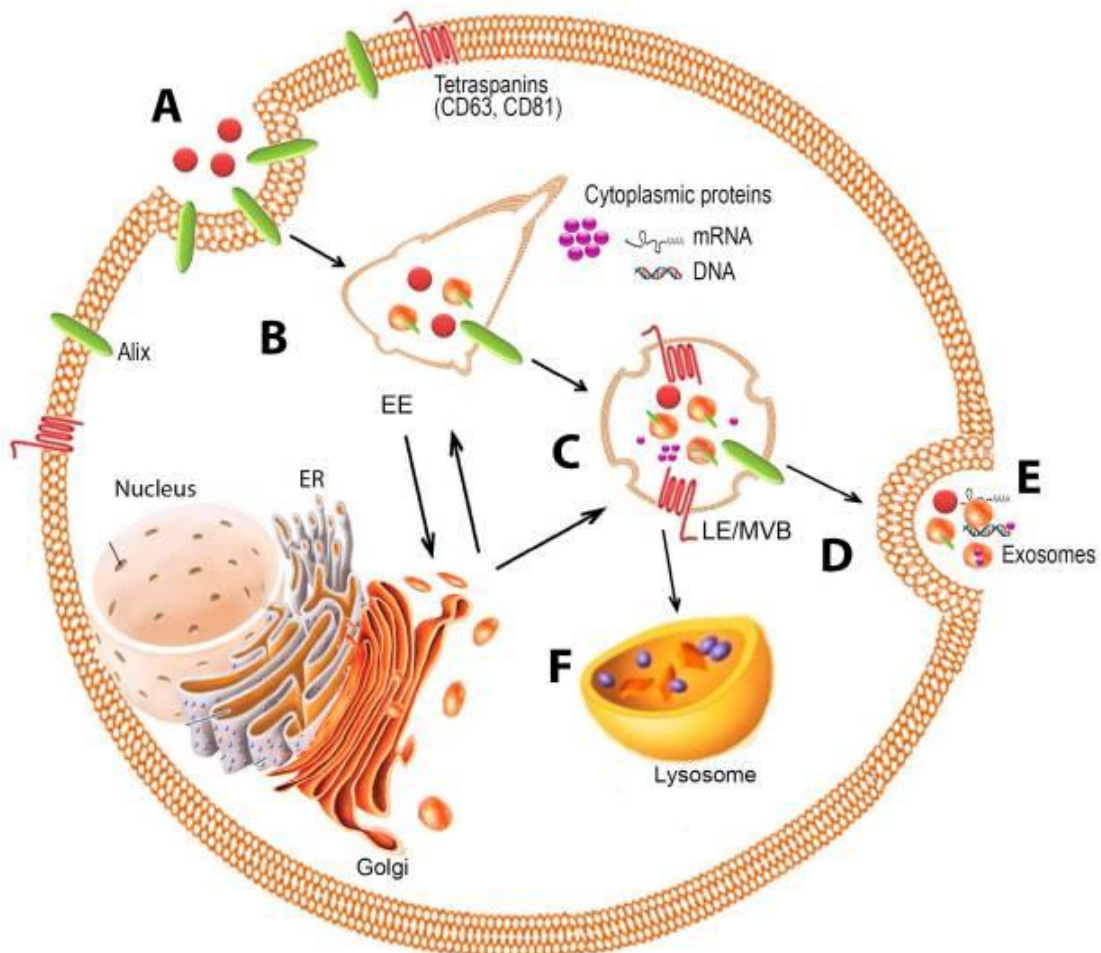
						vesicle
Exosome	30–150	1.13– 1.19	Cup-shaped	Maturation of late endosomes where intraluminal vesicles bud off into the intracytoplasmic lumen (MVBs), fusing with the plasma membrane. ESCRT complex or sphingomyelinase -2 operates MVB formation. Rab-GTPase and SNAREs involved in release of exosomes.	mRNA, miRNA, noncoding RNAs, proteins, lipids, mtDNAs, metabolites	Tetraspanins (e.g., CD9, CD63, CD81), TSG101, Alix, HSC70, flotillin-1

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων. Περιγράφονται το μέγεθος, η πυκνότητα, η μορφολογία. Επίσης, αναφέρονται περιληπτικά ο τρόπος της βιογένεσης και της απελευθέρωσής τους και τα συστατικά τους, ενώ παράλληλα γίνεται λόγος και για τους δείκτες που περιέχουν ([Ji-Young Choi, 2017](#)).

5.2 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

Τα εξωσώματα συνεχώς απελευθερώνονται και ανακυκλώνονται από τα κύτταρα. Κατά τη διαδικασία της ενδοκύτωσης, τα εξωσώματα επανεισάγονται στα κύτταρα, όπου ονομάζονται ενδοσωμάτια. Τα ενδοσωμάτια “πακετάρονται” μαζί δημιουργώντας τα πολυκυστιδιακά σωματίδια (Multivesicular Bodies). Τα σωματίδια αυτά, τα οποία είναι πλούσια σε χοληστερόλη, πηγαίνουν στην κυτταρική μεμβράνη, όπου τήκονται και απελευθερώνονται ως εξωσώματα, ενώ εκείνα στα οποία υπάρχει έλλειψη χοληστερόλης, ανακυκλώνονται στα λυσοσώματα ([Rahul Bhome, 2018a](#)). Για να ακολουθήσει αυτός ο φαύλος κύκλος, τα ενδοσωμάτια στοχεύουν ορισμένες πρωτεΐνες ή λιπίδια για λυσοσωμιακό κατακερματισμό, ενώ παράλληλα για ανακύκλωση ή εξωκύτωση στοχεύουν διαφορετικές πρωτεΐνες ([Johnny C. Akers, 2013](#)).

Σε γενικές γραμμές, η βιογένεση των εξωσωμάτων αποτελείται από δύο βήματα, την συγχώνευση των μεμβρανικών κυστιδίων των ενδοσωματίων και την απελευθέρωσή τους σε μία δομή, γνωστή ως πολύπλευρο σώμα. Ο σχηματισμός των πολύπλευρων σωματιδίων, πραγματοποιείται κατά την ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων στα ώριμα, με τη συσσώρευση ενδοκυτταρικών κυστιδίων. Μετά την ωρίμανση, τα πολύπλευρα σωματίδια κατευθύνονται προς συγχώνευση είτε με τα λυσοσώματα, είτε με την πλασματική μεμβράνη, όπου τα περιεχόμενά τους βγαίνουν στον εξωκυττάριο χώρο. Όταν τα πολύπλευρα σωματίδια ξεπεράσουν αυτές τις διαδικασίες, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συσσωματώνονται στην μεμβράνη, διατηρώντας τοπολογικό προσανατολισμό, παρόμοιο με αυτό της πλασματικής μεμβράνης ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).



Εικόνα 20: Βιογένεση εξωσωμάτων, απελευθέρωση και ταξινόμηση εμπορευμάτων. Εικονογράφηση του φορτίου των εξωσωμάτων με νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. (Α) Η ενδοκύτωση της πλασματικής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μεμβρανικών μορίων και το σχηματισμό των πρώιμων ενδοσωμάτων ([Hala Fawzy](#)). (Β) Με το σχηματισμό των πρώιμων ενδοσωμάτων στα ώριμα (LE) (C), τα εξωσώματα σχηματίζονται με την συγχώνευση των ώριμων ενδοσωμάτων/πολύπλευρων σωμάτων, με το περιεχόμενο σε παρόμοιο προσανατολισμό με την πλασματική μεμβράνη (D). Η συγχώνευση έπειτα των πολύπλευρων σωμάτων με την πλασματική μεμβράνη οδηγεί στην απελευθέρωση των εξωσωμάτων (E). Εναλλακτικά, τα πολύπλευρα σωμάτια μπορούν να τηχθούν με τα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (F ([Mohammed H. Rashed, 2017](#))). (ER: Ενδοπλασματικό δίκτυο).

Η απελευθέρωση των εξωσωμάτων στο εξωκυττάριο περιβάλλον απαιτεί τη μεταφορά και τη σύνδεση των πολύπλευρων σωμάτων, MVB, όπως επίσης την τήξη τους με την πλασματική μεμβράνη. Η απελευθέρωση φέρεται να εξαρτάται από το ενδοκυτταριο ασβέστιο, τις Rab GTPάσες και τις πρωτεΐνες SNARE. Επίσης, η διαδικασία εξαρτάται και από την τιμή του pH. Η βιβλιογραφία συνιστά πως οι πρωτεΐνες SNARE είναι σημαντικές στην τελική αλληλεπίδραση μεταξύ MVB και κυτταρική μεμβράνη ([Rahul Bhome, 2018a](#)). Σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα, η εξωσωμική απελευθέρωση εξαρτάται από την οικογένεια των Rab πρωτεϊνών και συγκεκριμένα από τις Rab11, 27A, 31, οι οποίες είναι σημαντικοί ρυθμιστές της μεμβρανικής διακίνησης. Κύτταρα με μεταλλαγμένες μορφές αυτών των πρωτεϊνών, απελευθερώνουν λιγότερα εξωσώματα ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53, βρέθηκε να συμμετέχει στην εξωσωμική απελευθέρωση. Ενεργοποίηση του παράγοντα p53, μέσω ακτινοβολίας, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση υψηλότερων ποσοστών εξωσωμάτων. Το γονίδιο που ρυθμίζεται από το p53, το TSAP6, φέρεται να ενισχύει την παραγωγή εξωσωμάτων στα κύτταρα που υφίστανται ανταπόκριση του p53 στο stress ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

5.3 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αναμφίβολα, τα εξωσώματα συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και διαδικασίες, φυσιολογικές και παθολογικές. Γενικά, τα εξωσώματα χαρακτηρίζονται ως ένας μηχανισμός για τη διάλυση πρωτεϊνών ή ανεπιθύμητων μορίων στα κύτταρα. Έρευνες έδειξαν πως τα εξωσώματα εκκρίνονται για να προκαλέσουν βλάβη σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς της τρανσφερρίνης, οι οποίες είναι άχρηστες στα ώριμα ερυθροκύτταρα. Για το λόγο αυτό, τα εξωσώματα θεωρούνται ως μία διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα αποβάλλουν άχρηστα μόρια και πρωτεΐνες, θεωρώντας τα έτσι ως ένα τμήμα για την μεταφορά κυττάρων-απορριμμάτων. Την τελευταία δεκαετία, ο ρόλος των εξωσωμάτων ως ρυθμιστών την κυτταρικής επικοινωνίας ήρθε στο προσκήνιο και υπάρχουν δεδομένα που αποκαλύπτουν πως τα εξωσώματα ελέγχουν τη φυσιολογική και την παθολογική φυσιολογία, όπως την απόκριση του

ανοσοποιητικού και τη γαλουχία, την εξάπλωση και την εξέλιξη ασθενειών, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και ειδικότερα, ο καρκίνος ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Τα εξωσώματα συμμετέχουν στην διατήρηση υγιούς φυσιολογίας, όπως για παράδειγμα, τη διατήρηση βλαστικών κυττάρων και την ανοικοδόμηση ιστού. Απελευθερώνονται από το κύτταρο-δότη και διασπείρονται στον ιστό που επρόκειτο να επιδιορθωθεί, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ευνοώντας την επικοινωνία κυττάρου με κύτταρο. Επίσης, τα εξωσώματα τα οποία προέρχονται από τα ηπατικά βλαστικά κύτταρα, μπορούν να προωθήσουν την επαναδημιουργία ηπατοκυττάρων. Ένας ακόμη ρόλος των εξωσωμάτων είναι η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Για παράδειγμα, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως έπειτα από τραυματισμό, τα επιθηλιακά κύτταρα αύξησαν τον αριθμό των εξωσωμάτων που μετέφεραν TGFβ1 mRNA, παρακινώντας έτσι τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών μέσω της επιδιόρθωσης και ανανέωσης των ιστών, μετά από παρεγχυματικές βλάβες ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Τα εξωσώματα διαθέτουν μία μεγάλη ποικιλία ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων. Για τη διατήρηση ισχυρής ανοσοδιεγερτικής δραστηριότητας μεταξύ ώριμων δενδριτικών κυττάρων και β λεμφοκυττάρων, τα οποία προσδένονται ισχυρά στα ωοθυλακικά δενδριτικά κύτταρα, η απελευθέρωση των εξωσωμάτων κρίνεται αναγκαία για την επιτυχή επικοινωνία αυτών. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα την ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού μπορούν να ρυθμιστούν από τη διαφοροποίηση και την επιβίωση, η οποία προάγεται από τα εξωσώματα, των αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών. Γενικά, εκτός από την κλασική συναπτική νευροδιαβίβαση, οι νευρώνες επικοινωνούν μέσω της έκκρισης εξωσωμάτων ή παρόμοιων κυστιδίων, τα οποία συμβάλλουν σε μία ποικιλία νευροβιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της πλαστικότητας των συνάψεων ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Έχει βρεθεί πως τα εξωσώματα κατέχουν αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες. Τα εξωσώματα τα οποία απελευθερώνονται από τα δενδριτικά κύτταρα, υπερεκφράζοντας IL-4, IL-10, κατέστειλαν καθυστερημένες αντιδράσεις υπερευαισθησίας, σε συγκεκριμένο μοντέλο επίμυος. Αυτά τα εξωσώματα κατέστειλαν την έναρξη και μείωσαν τη σοβαρότητα της αρθρίτιδας, που προέρχεται από το κολλαγόνο. Επιπρόσθετα, η FasL στα εξωσώματα είναι σημαντική για την καταστολή της αντίδρασης υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου. Δενδριτικά κύτταρα, τα οποία υποβλήθηκαν με IL-4 και IL-10, έδωσαν υπόσχεση για τη θεραπεία φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νόσων. Τέλος, τα εξωσώματα πιθανόν να κατέχουν ευεργετικό ρόλο στη σήψη, μέσω της αύξησης της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών κυττάρων ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

Για να κατανοηθεί η χρησιμότητα των εξωσωμάτων, θα πρέπει να βρεθεί ο ρόλος τους στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η επικοινωνία τους με το μικροπεριβάλλον τους. Μπορούν να επικοινωνούν και να ανταλλάσσουν πληροφορίες μεταξύ των εκκρινόμενων ουσιών (αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, χημειοκίνες και μικροί μοριακοί ρυθμιστές, όπως τα νουκλεοτίδια). Όπως χαρακτηρίζονται ως σημαντικοί ρυθμιστές της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρου με κύτταρο, τα εξωσώματα μπορούν να επηρεάσουν ένα κύτταρο δέκτη, εάν το φορτίο που μεταφέρουν περιέχει συγκεκριμένο μόριο, όπως το mRNA, το οποίο μπορεί να αλλάξει την έκφραση των γονιδίων ή την παραγωγή των πρωτεϊνών του κυττάρου ([Mohammed H. Rashed, 2017](#)).

5.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

❖ Τα εξωσώματα ως κυστίδια μεταφοράς ουσιών-φαρμάκων

Μέχρι πρόσφατα, τα προτιμώμενα συστήματα μεταφοράς ουσιών ήταν τα λιποσωμάτια και τα πολυμερή νανοσωματίδια. Το λιποσωμάτιο είναι ένα συνθετικό κυστίδιο με μεμβράνη φωσφολιπιδίων, το οποίο μπορεί να προσαρμόζεται σε μέγεθος σε υγρό περιβάλλον. Τα πολυμερή νανοσωμάτια είναι συστήματα μεταφοράς ουσιών τα οποία βοηθούν στον εγκλωβισμό, στην ενδοκύτωση ή την επισύναψη μοριακών ουσιών. Και τα δύο συστήματα χρησιμοποιούνταν για τη μεταφορά μοριακών φαρμάκων, όπως αντικαρκινικών, αντιμυκητιασικών και αναλγητικών. Ωστόσο, η ικανότητα του ιδανικού λιποσωματίου να αποφεύγει το ανοσοποιητικό σύστημα με σταθερότητα και χωρίς τοξικότητα, παραμένει αόριστη. Από την άλλη, τα πολυμερή νανοσωματίδια μπορεί να έχουν περισσότερη σταθερότητα, όμως η βιοσυμβατότητά τους παραμένει υπό διερεύνηση. Τα εξωσώματα ή οι ουσίες που τα μιμούνται, με πολλά ιδανικά χαρακτηριστικά συστήματος μεταφοράς, όπως ο διευρυμένος χρόνος ημίσειας ζωής, η βιοσυμβατότητα, η ικανότητά τους να στοχεύουν ιστούς και η μηδαμινή ή ανύπαρκτη τοξικότητα, έρχονται στην πρώτη επιλογή συστημάτων μεταφοράς, εφόσον ξεπερνούν τους περιορισμούς που εμφανίζονται στα λιποσωμάτια και τα πολυμερή ([Dinh Ha, 2016](#)).

❖ Τα εξωσώματα ως μεταφορείς μικρών μορίων

Εξονυχιστική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας εξωσώματα ως κυστίδια για τη θεραπευτική μεταφορά φαρμάκου. Μία μελέτη περιλάμβανε τη χρήση εξωσωμάτων για τη μεταφορά κουρκουμίνης (curcumin) και τη θεραπεία φλεγμονώδους νόσου. Η κουρκουμίνη είναι μία φυσική πολυφαινόλη, η οποία βρίσκεται στη ρίζα ενός ασιατικού φυτού (κουρκούμη) και διαθέτει αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Τα εξωσώματα δύνανται να δημιουργήσουν σύμπλοκο με την κουρκουμίνη ώστε να απελευθερωθούν οι ιδιότητές της. Κλινικές δοκιμές έχουν επίσης δείξει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά της σε ασθενείς με καρκίνο ([Dinh Ha, 2016](#)).

Πέρα από την ενίσχυση των ιδιοτήτων των φαρμάκων, τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν μικρά μοριακά φάρμακα διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood-Brain barrier). Πράγματι το 98% των φαρμάκων δεν μπορούν να διαπεράσουν το φραγμό. Επίσης, άλλα προβλήματα είναι η τοξικότητα και η αυξημένη κάθαρση από το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Για αυτούς τους λόγους, τα εξωσώματα προτάθηκαν για τη μεταφορά ουσιών διαμέσου αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και τη βελτίωση της μεταφοράς ουσιών στον εγκέφαλο και τη μείωση της κάθαρσης του φαρμάκου από το σύστημα φαγοκυττάρων. Αποτελέσματα ερευνών έδειξαν την πιθανότητα που κατέχουν τα εξωσώματα στη μεταφορά μικρών μοριακών φαρμάκων στο εγκέφαλο για τη θεραπεία εγκεφαλικών όγκων και νευρολογικών διαταραχών ([Dinh Ha, 2016](#)).

❖ Τα εξωσώματα ως μεταφορείς πρωτεϊνών

Πέρα από τη μεταφορά μικρών μορίων, τα εξωσώματα έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν και μεγάλες ενώσεις, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Πρόσφατη μελέτη έδειξε πως εξωσώματα στα οποία προστέθηκε η αντιοξειδωτική πρωτεΐνη καταλάση, επιτυχώς διαπέρασαν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, με αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση μιας κατάστασης στη νόσο του Parkinson. Οι ασθενείς με νόσο του Parkinson έχουν μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση και δισμουτάσης του υπεροξειδίου, τα οποία ένζυμα βοηθούν στο οξειδωτικό στρες και την αναστολή του νευροεκφυλισμού. Η μεταφορά της καταλάσης, αλλά και άλλων ενζύμων στον εγκέφαλο με τη χρήση εξωσωμάτων, φέρεται να είναι πολλά υποσχόμενη θεραπεία της νόσου και άλλων νευροεκφυλιστικών παθήσεων ([Dinh Ha, 2016](#)).

❖ Τα εξωσώματα ως μεταφορείς νουκλεϊκών οξέων

Έχει αναφερθεί πως τα εξωσώματα κουβαλούν από τη φύση τους νουκλεϊκά οξέα, όπως DNA και RNA (siRNA, miRNA), σε κύτταρα στόχους, με σκοπό να πραγματοποιήσουν γενετική διαμόρφωση σε βιολογικές και παθογονικές διεργασίες. Αυτά τα χαρακτηριστικά τους οδήγησαν στο μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά θεραπευτικές στρατηγικές, όπως η γονιδιακή θεραπεία και μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας εξωσώματα ως μεταφορικά συστήματα φαρμάκων, για τη μεταφορά γενετικών πληροφοριών, με στόχο την αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων σε συγκεκριμένες ασθένειες και τη βελτίωση της γενετικής θεραπείας ([Dinh Ha, 2016](#)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων και της ιατρικής κοινότητας έχει στραφεί στην μέθοδο της υγρής βιοψίας. Πιο συγκεκριμένα, η απομόνωση, ο προσδιορισμός και η ανάλυση των εξωσωμάτων παρέχουν όλες τις απαραίτητες πληροφορίες, ώστε να χαρακτηριστεί μορφολογικά και μοριακά ένας όγκος. Πολλές είναι οι εταιρίες που δημιούργησαν έτοιμες τεχνικές απομόνωσης και ανάλυσης εξωσωμάτων πάνω σε υπάρχουσες, στον ορό και το πλάσμα του αίματος, έτσι ώστε να μειωθεί ο χρόνος επεξεργασίας των δειγμάτων, να αυξηθεί η απόδοση και τα αποτελέσματα της ανάλυσης να χαρακτηρίζονται από αξιοπιστία.

Εξαιρετικά σημαντικό ζήτημα είναι τα περιεχόμενα των μικρών αυτών κυστιδίων με τα οποία αποτυπώνεται το γονιδίωμα. Αποτέλεσμα αυτού η καλύτερη αντιμετώπιση του κάθε ατόμου εξατομικευμένα. Οι δείκτες οι οποίοι έχουν προσδιοριστεί από τα διαφορετικά περιεχόμενα των εξωσωμάτων είναι πολλοί και συνεπώς έρχεται το ζήτημα της ειδικότητας και της ευαισθησίας στο προσκήνιο. Είναι αρκετοί οι δείκτες των οποίων η αύξηση υποδηλώνει ταυτόχρονα περισσότερους από έναν πιθανούς τύπους καρκίνου. Αυτός είναι και ο

προβληματισμός των επιστημόνων και αποτελεί μειονέκτημα της μεθόδου. Ωστόσο ο συνδιασμός περισσότερων από έναν δεικτών αποτελεί αξιόπιστη λύση με καλύτερα αποτελέσματα. Συμπερασματικά, οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε πιθανούς βιοδείκτες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνών, για την διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της θεραπείας.

6.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

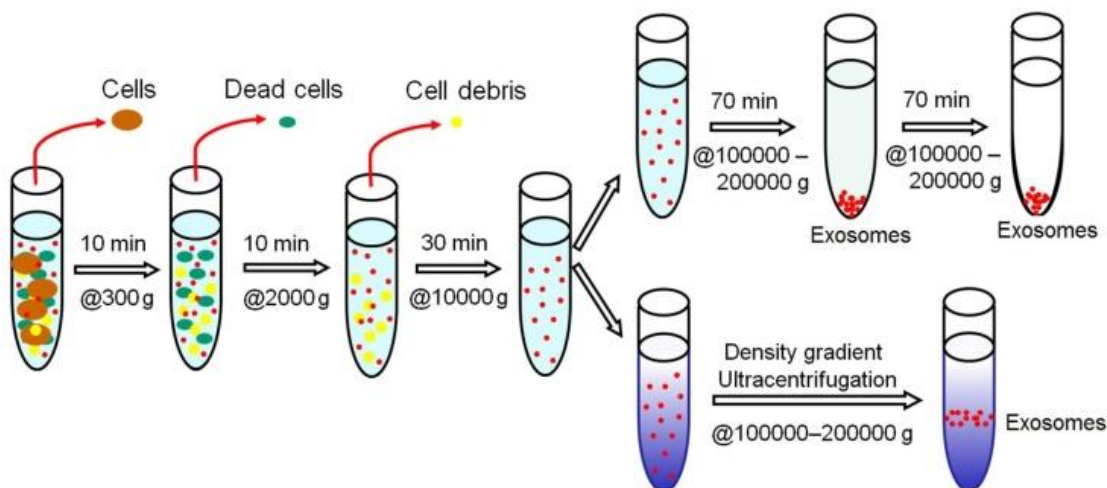
Με στόχο τη μελέτη και την εφαρμογή των μοναδικών εξωκυτταρικών κυστιδίων, των εξωσωμάτων, κρίσιμο γεγονός αποτελεί η απομόνωσή τους από όλα τα συστατικά τα οποία περιέχονται σε αυτά. Οι τεχνικές οι οποίες υιοθετούνται στην απομόνωση των εξωσωμάτων, θα πρέπει να διακρίνονται από υψηλή αποτελεσματικότητα και από την ικανότητα της απομόνωσής τους από διαφορετικά υποστρώματα. Για την εξέταση της ποιότητας των ήδη απομονωμένων εξωσωμάτων υπάρχουν διάφορες οπτικές ή μη τεχνικές, οι οποίες αναπτύχθηκαν με σκοπό να μετρήσουν το μέγεθός τους, τη μορφολογία, την ποσότητα και τη βιοχημική σύνθεσή τους. Με την εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές, κάθε μία από τις οποίες εκμεταλλεύεται ένα συγκεκριμένο γνώρισμα των εξωσωμάτων που μελετά, όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, το σχήμα και οι πρωτεΐνες επιφανείας, ώστε να οδηγηθεί στην απομόνωσή τους. Είναι γεγονός πως η κάθε μία από τις τεχνικές ανίχνευσης και απομόνωσης χαρακτηρίζεται από πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα ([Pin Li, 2017](#)).

6.2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ (Ultracentrifugation based isolation techniques)

Όταν ένα διάλυμα υπόκειται σε φυγοκέντρωση, τα συστατικά του κατακρημνίζονται και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος, την πυκνότητα και το σχήμα. Η φυγοκέντρωση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό συγκεκριμένων ουσιών, όπως επίσης και για την ανάλυση υδροδυναμικών ιδιοτήτων των πολυμερών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Η υπερφυγοκέντρωση είναι μία διαδικασία φυγοκέντρωσης, στην οποία παράγονται εξαιρετικά υψηλές φυγόκεντρες δυνάμεις. Υπάρχουν δύο τύποι υπερφυγοκέντρωσης η αναλυτική (analytical) και η παρασκευαστική (preparative). Η αναλυτική χρησιμοποιείται στη διερεύνηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων συγκεκριμένων μορίων, καθώς και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις των πολυμερών. Όσον αφορά την απομόνωση των εξωσωμάτων, η παρασκευαστική υπερφυγοκέντρωση (preparative ultracentrifugation) παίζει σημαντικό ρόλο, δεδομένου πως διαχωρίζει σε συστατικά ιούς, βακτήρια, κυτταρικά οργανίδια και εξωκυτταρικά κυστίδια ([Pin Li, 2017](#)).

Υπάρχουν δύο τύποι παρασκευαστικής υπερφυγοκέντρωσης, η διαφορική (differential) και η φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας (density gradient). Η απομόνωση των εξωσωμάτων μέσω της διαφορικής υπερφυγοκέντρωσης συνήθως περιλαμβάνει μία σειρά από κύκλους φυγοκέντρωσης με διαφορετικές φυγόκεντρες δυνάμεις και διαφορετική διάρκεια ώστε να απομονωθούν τα εξωσώματα με βάση την πυκνότητα και το μέγεθος. Στην υπερφυγοκέντρωση η φυγόκεντρος δύναμη

(centrifugal force) κυμαίνεται περίπου 100,000 – 120,000 * g. Προτού ξεκινήσει η διαδικασία ένα βήμα για τον καθαρισμό του πλάσματος/ορού από σωματίδια διεξάγεται στο δείγμα με τον εμπλουτισμό του δείγματος με αναστολείς πρωτεασών, ώστε να αποτραπεί η απορρύθμιση των εξωσωμικών πρωτεϊνών. Μεταξύ των φυγόκεντρων κύκλων, το υπερκείμενο εξαρτάται από τη φυγόκεντρο δύναμη που



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση απομόνωσης εξωσωμάτων με διαφορετική υπερφυγοκέντρωση. Τα εξωσωμάτια τα οποία απομονώνονται, αναστέλλονται και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι περαιτέρω ανάλυση. Όλες οι φυγοκεντρήσεις εκτελούνται στους 4°C (Pin Li, 2017).

χρησιμοποιείται και αναστέλλεται με κατάλληλο μέσο όπως το PBS (Phosphate buffered saline) και έπειτα υπόκειται σε κύκλους φυγοκεντρήσεων με αυξανόμενη φυγόκεντρο δύναμη (Pin Li, 2017). Η παραπάνω εικόνα αναπαριστά την διαφορετική υπερφυγοκέντρωση.

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της υπερφυγοκέντρωσης όπως είναι η υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας (density gradient), η οποία διακρίνεται σε δύο τεχνικές, την ισοπυκνική (isopycnic) και την moving-zone υπερφυγοκέντρωση. Η υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας είναι ιδιαίτερα δημοφιλής τεχνική για την απομόνωση εξωσωμάτων και βασίζεται στο μέγεθος, τη μάζα και την πυκνότητα, σε ένα προκατασκευασμένο μέσο βαθμιδωτής πυκνότητας σε φυγόκεντρο σωληνάριο, με σταδιακά μειωμένη πυκνότητα από την κορυφή έως τον πυθμένα του. Το δείγμα στρώνεται σαν μία στενή ζώνη στην κορυφή του μέσου και υπόκειται σε παρατεταμένη υπερφυγοκέντρωση. Εφαρμόζοντας φυγόκεντρο δύναμη, οι διαλυμένες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων, κινούνται ως αυτόνομες ζώνες μέσα στο μέσο, οδηγώντας στη δημιουργία διακριτών ζωνών. Τα απομονωμένα εξωσώματα μπορούν να συλλεχθούν με απλή συλλογή κλάσματος (Pin Li, 2017).

Στην ισοπυκνική υπερφυγοκέντρωση η απομόνωση των εξωσωμάτων εξαρτάται από τη διαφορά της πυκνότητάς τους από τις υπόλοιπες διαλυμένες ουσίες του μέσου, εφόσον έχει πραγματοποιηθεί μία κατάλληλη περίοδος φυγοκέντρωσης. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης, τα εξωσώματα σχηματίζουν ιζήματα στην

περιοχή του μέσου στην οποία έχουν την ίδια πυκνότητα – ισοπυκνική θέση. Εφόσον τα εξωσώματα έχουν φτάσει σε αυτή τη θέση, η φυγόκεντρος δύναμη τα ωθεί στο σχηματισμό ζωνών και τα κρατά εκεί. Στην υπερφυγοκέντρωση moving-zone ένα δείγμα το οποίο περιέχει εξωσώματα, τοποθετείται ως μία λεπτή ζώνη στην κορυφή ενός μέσου βαθμίδωσης πυκνότητας, το οποίο έχει χαμηλότερη πυκνότητα από όλες τις διαλυμένες ουσίες. Τα εξωσώματα σε αυτή την τεχνική διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και τη μάζα και δεν εξαρτώνται από την πυκνότητα. Όλες οι διαλυμένες ουσίες, αφού η περίοδος της φυγοκέντρωσης ολοκληρωθεί, θα καθιζάνουν. Για να αποφευχθεί η καθίζηση των εξωσωμάτων, τοποθετείται στον πυθμένα του σωληναρίου ένα ειδικό υλικό υψηλής πυκνότητας ([Pin Li, 2017](#)).

Εξαιτίας της ετερογένειας των εξωσωμάτων και της διαφοράς του μεγέθους των εξωκυττάρων κυστιδίων, η διαφορική υπερφυγοκέντρωση καταλήγει σε απώλειες εξωσωμάτων. Συνηθέστερες μέθοδοι υπερφυγοκέντρωσης είναι η ισοπυκνική και η moving-zone, καθώς επιτρέπουν στα εξωσώματα χαμηλής πυκνότητας να σχηματίσουν ζώνες και να αναλυθούν περαιτέρω. Η τεχνική αυτή φαίνεται να βελτιώνει την ποσότητα των εξωσωμάτων που απομονώνονται. Έπειτα από την απομόνωση τα εξωσώματα αραιώνονται με φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) και υποβάλλονται σε ένα ακόμη γύρο υπερφυγοκέντρωσης στα 100,000 * g για την απόδοση καθαρών εξωσωμάτων και εκτενέστερη ανάλυση ([Pin Li, 2017](#)).

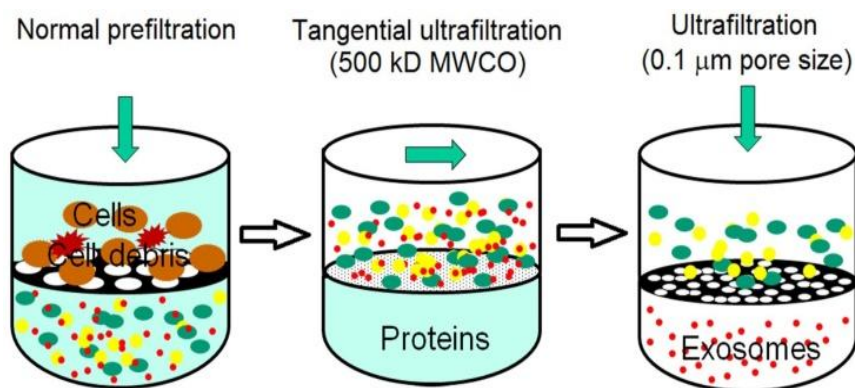
6.2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ (Size based isolation techniques)

Η υπερδιήθηση θεωρείται ως μία από τις δημοφιλέστερες τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων με βάση το μέγεθος. Η απομόνωση των σωματιδίων ή των πολυμερών εξαρτάται από το μέγεθος ή το μοριακό τους βάρος. Με βάση το μέγεθος, τα εξωσώματα απομονώνονται χρησιμοποιώντας μεμβρανικά φίλτρα με προκαθορισμένο μοριακό βάρος ή όρια αποκλεισμού μεγέθους. Η υπερδιήθηση είναι πιο γρήγορη τεχνική από την υπερφυγοκέντρωση και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Ωστόσο, η χρήση δύναμης μπορεί να οδηγήσει σε αποδιοργάνωση μεγάλων κυστιδίων, πράγμα που μπορεί να αλλάξει την πορεία της μετέπειτα ανάλυσης ([Pin Li, 2017](#)).

Για δείγματα όπως τα ούρα, ο ορός, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και μέσα με πληθυσμούς κυττάρων, χρησιμοποιούνται τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων και εκχύλισης RNA, μέσω της ταχείας κλασματοποίησης με χρήση φίλτρου, κατά την οποία εξωσώματα και άλλα εξωκυτταρικά κυστίδια παγιδεύονται. Δύο μεμβράνες βρίσκονται ρυθμισμένες στο φίλτρο, έτσι ώστε τα εξωσώματα να παγιδεύονται στη χαμηλότερη μεμβράνη, ενώ τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σωματίδια, όπως τα αποπτωτικά σώματα και τα μικροκυστίδια, να παραλαμβάνονται από την υψηλότερη μεμβράνη, όταν το δείγμα περνά μέσα από αυτές. Το RNA το οποίο βρίσκεται στα εξωσώματα απελευθερώνεται όταν τα παγιδευμένα εξωσώματα λύονται με τη χρήση υγρών εκχύλισης στη χαμηλότερη μεμβράνη. Επομένως η ανίχνευση και το προφίλ έκφρασης του miRNA επιτυγχάνεται με τη χρήση q RT-PCR (quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction) ([Pin Li, 2017](#)).

Η τεχνική διαδοχικής διήθησης χρησιμοποιείται για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπερκείμενα κυτταρικών καλλιιεργειών, όπως φαίνεται στην

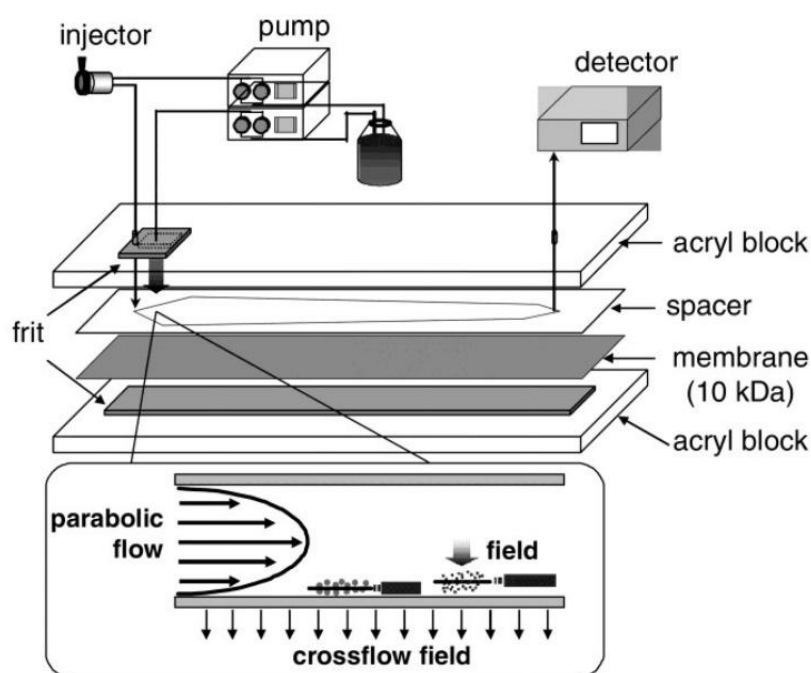
εικόνα που ακολουθεί. Αρχικά, με τη χρήση μεμβρανικών φίλτρων 100 nm, στη φυσιολογική διήθηση εξαλείφονται μεγάλα κυτταρικά κομμάτια και κύτταρα τα οποία επιπλέουν. Μεγάλα συστατικά των εξωσωμάτων κατακρημνίζονται, όμως τα μεγάλα εύκαμπτα συστατικά διαπερνούν το φίλτρο ακόμη και αν είναι μεγαλύτερα σε διάμετρο από τα 100 nm. Δεύτερον, το διήθημα υποβάλλεται σε διήθηση εφαπτόμενης ροής με αποκοπή 500 k Da μοριακού βάρους ινών. Το συμπυκνωμένο διήθημα διηθείται επιπλέον για την εξάντληση περαιτέρω συστατικών. Τρίτον, το δείγμα διηθείται με 100nm φίλτρο χάραξης πορείας. Για τη μεγιστοποίηση της απομόνωσης των εξωσωμάτων, τα φίλτρα πλένονται στο τέλος κάθε σταδίου και η μεμβρανική πίεση επιβλέπεται και διατηρείται κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου σταδίου. Τέλος, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επαληθεύει τη μορφολογία και τη φασματομετρία μάζας, που αποδεικνύουν την παρουσία εξωσωμικών πρωτεϊνών (Pin Li, 2017).



Εικόνα 23 : Σχηματική αναπαράσταση διαδοχικής διήθησης. Στην αρχή αφαιρούνται μεγάλα κυτταρικά υπολείμματα, στη συνέχεια ελεύθερες πρωτεΐνες διηθούνται και το δείγμα συμπυκνώνεται και τέλος, εξωκυτάρια κυστίδια μεγαλύτερα των 100 nm αφαιρούνται μέσω υπερδιήθησης (Pin Li, 2017).

Ακόμη μία τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων είναι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC). σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιείται μια πορώδης στατική φάση, η οποία ταξινομεί τα μακρομόρια και τα σωματίδια ανάλογα με το μέγεθός τους. Συστατικά του δείγματος με μικρή υδροδυναμική ακτίνα διαπερνούν τους πόρους, ενώ τα συστατικά με μεγάλη υδροδυναμική ακτίνα, όπως είναι τα εξωσώματα, δεν διαπερνούν τους πόρους. Έχει παρατηρηθεί πως τα απομονωμένα εξωσώματα παραμένουν δομικά άθικτα, όπως εξετάστηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης. Το μέγεθος των απομονωμένων εξωσωμάτων μετρήθηκε με δυναμική σκέδαση φωτός και με την παρακολούθηση της ανάλυσης των νανοσωματιδίων, όπου τα εξωσώματα φωτίζονται με λέιζερ ως μεμονωμένα σημεία υπό την κίνηση Brownian και το μέγεθος υπολογίζεται από την ταχύτητά τους. Επίσης για να εκτιμηθεί η ποσότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων χρησιμοποιείται και η τεχνική Western Blot. Η τεχνική SEC έχει χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με άλλες, παραδείγματος χάρη, υπερφυγοκέντρηση και έπειτα SEC (Pin Li, 2017).

Μία σχετικά καινούργια τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων είναι η F4 (Field-Flow fractionation). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ένα ορθογώνιο κανάλι πόρων (εικόνα). Καθώς μία παραβολική ροή διατρέχει τον άξονα του καναλιού, μεταφέρει το δείγμα προς το τέλος, ένα κύλινδρος κατά μήκος του καναλιού ελέγχει την παραμονή του δείγματος στο κανάλι. Τα μικρά σωματίδια διαχέονται περαιτέρω από το τοίχωμα του καναλιού και έτσι τα συστατικά τους αφαιρούνται νωρίτερα από ότι τα μεγάλα σωματίδια. Το σύστημα αυτό είναι ικανό να απομονώνει ταχέως εξωσώματα, για το λόγο αυτό έχουν γίνει μελέτες στην απομόνωση εξωσωμάτων από καλλιέργειες νευρικών βλαστοκυττάρων (Pin Li, 2017).



Εικόνα 24 : Τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων F4. Εφόσον το δείγμα εισέλθει στο κανάλι, το διαπερνά μια παραβολική ροή ώσπου να φθάσει στο τέλος του άξονα του καναλιού και να γίνει η ανίχνευση (detector) (Pin Li, 2017).

6.2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΣΥΓΓΕΝΕΙΑ (Immunoaffinity capture based isolation techniques)

Η παρουσία αναρίθμητων πρωτεϊνών και υποδοχέων στην επιφάνεια των εξωσωμάτων προσφέρει μία εξαιρετική ευκαιρία για την ανάπτυξη τεχνικών υψηλής ευαισθησίας για την απομόνωση εξωσωμάτων, εκμεταλλευόμενοι τις ανοσογονικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών (αντιγόνα) και των αντισωμάτων τους και επίσης, τις ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων και των προσδετών τους. Ιδανικά, οι εξωσωμικοί δείκτες προς απομόνωση βρίσκονται προσδεμένοι στη μεμβράνη, χωρίς διαλυτά ομόλογα και εκφράζονται μεμονωμένα ή βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην επιφάνεια των εξωσωμάτων, σε συγκεκριμένες βιολογικές πηγές (Pin Li, 2017).

Παράδειγμα, η ανοσοπροσροφητική δοκιμασία ELISA αναπτύχθηκε για την απομόνωση και την ποσοτικοποίηση εξωσωμάτων από το πλάσμα, τον ορό και τα

ούρα. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν ως τιμές απορρόφησης, ώστε να γίνει σύγκριση της έκφρασης γνωστών βιοδεικτών επιφάνειας. Οι τιμές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των απομονωμένων εξωσωμάτων μέσω βαθμίδωσης με τη χρήση μέσων (standards) με γνωστές εξωσωμικές μετρήσεις. Η τεχνική της ELISA δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την υπερφυγοκέντρωση με πολύ μικρότερο όγκο δείγματος, δείχνοντας έτσι την ανωτερότητα της τεχνικής αυτής. Επιπλέον αυτού, το ποσοστό του RNA, το οποίο απεγκλωβίστηκε από τα απομονωμένα εξωσώματα με την τεχνική της ELISA, ήταν υψηλότερο απ' ό,τι με την υπερφυγοκέντρωση ([Pin Li, 2017](#)).

Η επιστημονική ομάδα Zaroni et al. ανέπτυξε μαγνητικά σωματίδια κάτω του 1 μm για τη χρήση αυτών σε δοκιμασίες απομόνωσης με βάση την ανοσοσυγγένεια. Με όγκο κυτταρικής καλλιέργειας όσο 1.0 μL, η αποτελεσματικότητα της τεχνικής φάνηκε να είναι κοντά σε αυτή της υπερφυγοκέντρωσης. Όσον αφορά τη χρήση της τεχνικής σε πλάσμα, η επιτευχθείσα απόδοση φάνηκε να είναι 10-15 φορές υψηλότερη από την απόδοση της υπερφυγοκέντρωσης, πράγμα το οποίο ελέγχθηκε με Western Blot ([Pin Li, 2017](#)).

Σε μία πρόσφατη αναφορά ο Nakai και οι συνεργάτες του, περιέγραψαν μία διαδικασία σύλληψης ανοσοσυγγένειας για την απομόνωση εξωσωμάτων, αξιοποιώντας ένα μόριο πρόσδεσης αυτών, όπως η πρωτεΐνη Tim4. Φάνηκε μία ασβεστοεξαρτώμενη πρόσδεση της Tim4 με την φωσφατιδυλοσερίνη. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, οι οποίες ακινητοποιούνται στα μαγνητικά σφαιρίδια, με τα μόρια της φωσφατιδυλοσερίνης, στην επιφάνεια των εξωσωμάτων, οδηγεί στην αποτελεσματική απομόνωση των εξωσωμάτων από τα δείγματα. Επιπλέον, η απελευθέρωση των εγκλωβισμένων εξωσωμάτων από τα μαγνητικά σφαιρίδια μπορεί να επιτευχθεί μέσω της απομάκρυνσης του ασβεστίου με τη χρήση ενός παράγοντα ([Pin Li, 2017](#)).

Μία λεπτομερής έρευνα πρότεινε την τεχνική απομόνωσης με βάση την ανοσοσυγγένεια ως την καταλληλότερη και ανώτερη, όσον αφορά πληθυσμούς κυττάρων σε καρκίνο του παχέος εντέρου, συγκριτικά με την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης. Μαγνητικά σφαιρίδια εμπλουτισμένα με αντισώματα στοχεύουν το μόριο προσκόλλησης επιθηλιακού κυττάρου CD326, το οποίο υπερεκφράζεται σε καρκινικά εξωσώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται. Η μικροσκοπία και οι δοκιμασίες Western Blot ήταν θετικές όσον αφορά τη μορφολογία των εξωσωμάτων και των βιοδεικτών και η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την επιτυχή απομόνωση των εξωσωμάτων ([Pin Li, 2017](#)).

Η εφαρμογή της ανοσοσυγγένειας στη διαγνωστική του καρκίνου επετεύχθη με τη χρήση ενεργοποιημένων μαγνητικών κυττάρων διαλογής. Δείγματα ορού από φυσιολογικούς ελέγχους, ασθενείς χωρίς νόσο ή καλοήγη νόσο, και ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, εμπλουτίστηκαν με μαγνητικά σφαιρίδια εμπλουτισμένα με αντί-επιθηλιακά μόρια προσκόλλησης, τα οποία είχαν βρεθεί πως εκφράζονται στα εξωσώματα που προέρχονται από επιθηλιακούς όγκους. Ο έλεγχος με ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης έδειξε κυστιδιακές δομές χαρακτηριστικές των εξωσωμάτων. Η φύση των εξωσωμάτων ελέγχθηκε περαιτέρω με Western Blot. Σημαντικό εύρημα είναι πως τα εξωσωμικά miRNA's από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, κατείχαν διαφορετικό προφίλ από εκείνα σε ασθενείς με καλοήγη νόσο, ενώ εξωσωμικά miRNA's δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν σε φυσιολογικούς

ελέγχους. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν τη χρησιμότητα των εξωσωμικών miRNA's ως δείκτες διάγνωσης για τον καρκίνο των ωοθηκών ([Pin Li, 2017](#)).

Για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της τεχνικής ανίχνευσης με ανοσοσυγγένεια, πραγματοποιήθηκε σύζευξή της με την τεχνική φασματομετρία μάζας (mass spectrometry immunoassay). Για τη σύλληψη των εξωσωμάτων, αντισώματα ακινητοποιήθηκαν πάνω σε υψηλή πορώδη μονολιθική μικροπιπέτα και ως αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε το CD9, για το λόγο πως βρίσκεται σε αφθονία στην επιφάνεια των εξωσωμάτων με διαφορετικές προελεύσεις. Ένα αυτοματοποιημένο σύστημα καναλιών με πιπέτα επιτρέπει την απομόνωση εξωσωμάτων από 12 διαφορετικά δείγματα μέσα σε 10 λεπτά. Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε στη μελέτη του γενομικού προφίλ του καρκίνου του πνεύμονα και υπέδειξε το CD91 ως βιοδείκτη ([Pin Li, 2017](#)).

Για την ενίσχυση της υψηλής ειδικότητας, τα εξωσώματα που απομονώνονται με άλλες τεχνικές μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω με βάση την ανοσοσυγγένεια. Παραδείγματος χάρη, ενεργοποιημένα μαγνητικά κύτταρα διαλογής χρησιμοποιώντας αντί-επιθηλιακά μόρια προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση καρκινικών εξωσωμάτων τα οποία απομονώθηκαν με την τεχνική SEC. Το RNA αφαιρέθηκε από τα απομονωμένα εξωσώματα και χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή του miRNA από μικρο-δοκιμασίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το miRNA μπορεί να βρεθεί χρήσιμο στη μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα. Ακόμη ένα παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός υπερφυγοκέντρωσης, υπερδιήθησης και τεχνικής ανοσοσυγγένειας στην απομόνωση εξωσωμάτων σε μέσο κυτταρικών καλλιέργειών καρκίνου του παχέος εντέρου. Έπειτα από τη χρήση των τριών τεχνικών και την ταυτοποίησή τους με Western Blot και ηλεκτρονική μικροσκοπία, επιβεβαιώθηκε η ταυτότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων. Αργότερα, τα εξωσώματα εμπλουτίστηκαν με μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία είχαν εμποτιστεί με το ειδικό επιθηλιακό αντίσωμα παχέος εντέρου A33. Η πρωτεομική ανάλυση αναγνώρισε διάφορες πρωτεΐνες ως πιθανούς διαγνωστικούς βιοδείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου ([Pin Li, 2017](#)).

6.2.4 ΔΙΗΘΗΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ (Exosome precipitation)

Αλλάζοντας τη διαλυτότητα ή τη διασπορά, τα εξωσώματα μπορούν να απομονωθούν από τα βιολογικά υγρά. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η οποία είναι πολυμερές, χρησιμοποιείται για τη δέσμευση μορίων νερού και τον εξαναγκασμό των λιγότερο διαλυτών συστατικών έξω από το διάλυμα. Γενικώς, τα δείγματα επωάζονται για μία νύχτα στους 4°C, σε ένα διάλυμα κατακρήμνισης μοριακού βάρους 8000 Da. Έπειτα το ίζημα, το οποίο περιέχει εξωσώματα απομονώνεται είτε με φυγοκέντρωση χαμηλής ταχύτητας είτε με διήθηση. Η διήθηση των εξωσωμάτων είναι εύκολη στη χρήση και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. Ένα πλεονέκτημα είναι το μεγάλο μέγεθος δειγμάτων που μπορεί να εξεταστεί ([Pin Li, 2017](#)).

Πρόσφατα, αρκετές έτοιμες τεχνικές για τη διήθηση των εξωσωμάτων έγιναν διαθέσιμες και είναι συμβατές με βιολογικά υγρά συμπεριλαμβανομένων των πλάσματος, ορού, ασκίτη, ούρων, εγκεφαλονωτιαίου υγρού και καλλιέργειες κυττάρων. Ωστόσο, πριν τη διήθηση θα πρέπει το δείγμα να έχει καθαριστεί από

κύτταρα και κομμάτια κυττάρων. Έχει αποδειχθεί πως η διήθηση εξωσωμάτων από ούρα με αυτές τις τεχνικές, πέτυχε την υψηλότερη απόδοση σε σχέση με τη διαφορική υπερφυγοκέντρωση. Οι πολυμερείς ενώσεις οι οποίες σχηματίζουν δίκτυα από την Tamm-Horsfall πρωτεΐνη στα ούρα, ελαττώνονται από τη dithiothreitol, για την αποφυγή τυχόν εγκλωβισμού των εξωσωμάτων κατά τη διάρκεια της προεργασίας των ούρων με φυγοκέντρωση χαμηλής ταχύτητας. Έπειτα, τα εξωσώματα μπορούν να υπολογιστούν με CD9 ELISA. Οι εξωσωμικές πρωτεΐνες μπορούν να εκτιμηθούν με Western Blot και το RNA να ποσοτικοποιηθεί με τη μέθοδο της qRT – PCR ([Pin Li, 2017](#)).

6.2.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΤΑ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΑ (Microfluidics based isolation techniques)

Η τεχνολογία έχει προσφέρει ευκαιρίες στην εφεύρεση συσκευών βασισμένων στα μικρορευστά (Microfluidics), για τη γρήγορη απομόνωση εξωσωμάτων σύμφωνα με τις φυσικές και βιοχημικές ιδιότητές τους. Καινοτόμοι μηχανισμοί διαλογής όπως η ακουστική, ηλεκτροφορητική και ηλεκτρομαγνητική μπορούν να εφαρμοστούν. Με τη χρήση τέτοιου είδους συσκευών υπάρχουν προσδοκίες όσον αφορά την υπερκατανάλωση αντιδραστηρίων, τη μείωση του όγκου δείγματος και το χρόνο που χρειάζεται για την απομόνωση ([Pin Li, 2017](#)).

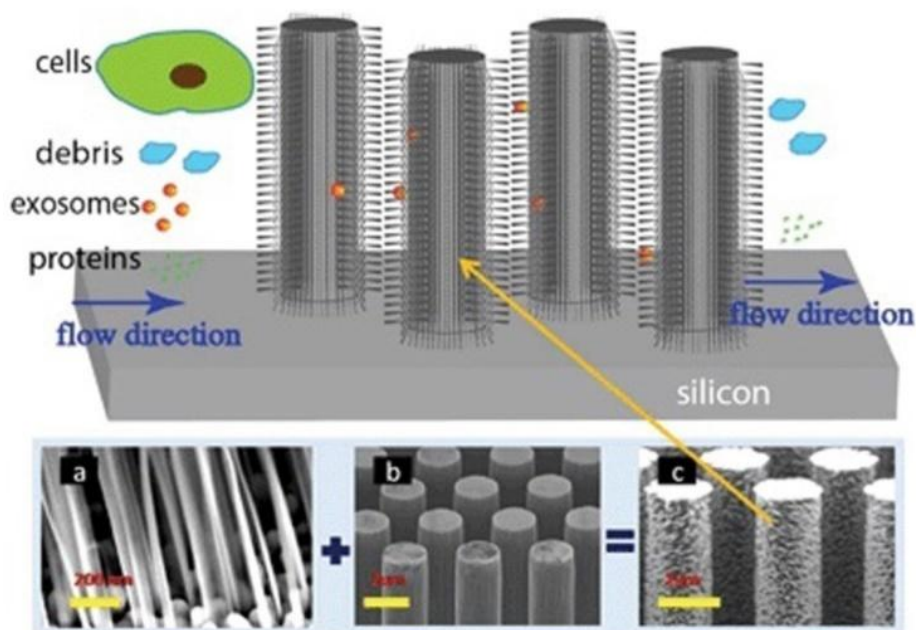
Ένα παράδειγμα της χρήσης αυτής της μεθόδου αναφέρει ο Lee και οι συνεργάτες του. Ένα ακουστικό νανοφίλτρο χρησιμοποιεί υπέρηχα κύματα για να διαχωρίσει συστατικά ενός δείγματος με βάση το μέγεθος και την πυκνότητα. Τα μεγάλα σωματίδια δέχονται ισχυρότερη ενέργεια και προχωρούν γρηγορότερα προς την κατεύθυνση της πίεσης. Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε σε καλλιέργειες κυττάρων και προϊόντα ερυθροκυττάρων ([Pin Li, 2017](#)).

Οι μικρομετρικές διαστάσεις των μικρορευστών και ο έλεγχος των αντικειμένων που προσφέρει η μικροκλίμακα, κατέχουν τη δυνατότητα για τη βελτίωση της απομόνωσης των εξωσωμάτων και γενικότερα, των μικροκυστιδίων. Τα τελευταία χρόνια, νέες προσεγγίσεις αναδύθηκαν με σκοπό να ενσωματώσουν τις τεχνικές των μικρορευστών στη νανοκλίμακα. Εξαιρετικό παράδειγμα σύγχρονης προσέγγισης είναι το ειδικά σχεδιασμένο τσιπ που περιέχει μικρο-ίνες (ciliated nanowire-on-micropillar), οι οποίες παγιδεύουν τα εξωσώματα, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα αφαιρούνται από τα “μαξιλαράκια” που περιέχει το τσιπ. Καθώς αυτή η συσκευή λειτουργεί με μικροκλίμακα, το δείγμα που απαιτείται είναι μικρό. Επίσης, λόγω των πολλών μικρο ινών που περιέχει η συσκευή, καθίσταται δύσκολο να υπάρξει κάποια θρόμβωση, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα επιθυμητή ([Jina Ko, 2017](#)).

Η επιστημονική ομάδα Lee και Weissleder του Γενικού Νοσοκομείου της Μασαχουσέτης ανέπτυξαν μία πλατφόρμα βασισμένη σε πυρηνική μαγνητική τομογραφία, για ευαίσθητη μέτρηση εξωσωμάτων. Αρχικά, η πλατφόρμα αυτή, χρησιμοποιήθηκε με εξαιρετική επιτυχία, για τις μετρήσεις σπάνιων κυττάρων, βακτηρίων, διαλυτών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Η υιοθέτηση της πλατφόρμας για την ανίχνευση των εξωσωμάτων, έγινε αρκετά προκλητική, λόγω του πολύ μικρότερου μεγέθους τους, συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα. Για να ξεπεράσει αυτό το εμπόδιο, η Weissleder/Lee ομάδα, ανέπτυξε μία πλατφόρμα μικρορευστών ενσωματωμένη με το σύστημα του πυρηνικού μαγνητικού

τομογράφου, ώστε να συγκεντρώνει και να καθαρίζει τα προς μέτρηση εξωσώματα και να ενισχύει και το σήμα (Jina Ko, 2017).

Η τεχνική των Weissleder/Lee είχε πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από τις συμβατικές μεθόδους ανίχνευσης. Για να παρουσιάσουν την κλινική χρησιμότητα, χρησιμοποίησαν τη συσκευή για την διαφοροποίηση εξωσωμάτων πολυμορφικού γλοιοβλαστώματος (GBM), από τα υγιή εξωσώματα. Σε αυτή τη μικροσυσκευή, χαρακτήρισαν την έκφραση της πρωτεΐνης των εξωσωμάτων που προέρχονται από το γλοιοβλάστωμα, δείχνοντας πως μπορούν να ανιχνεύσουν καρκινικές μεταλλάξεις, οι οποίες συσχετίζονται με τις διαθέσιμες θεραπείες του γλοιοβλαστώματος (Jina Ko, 2017).

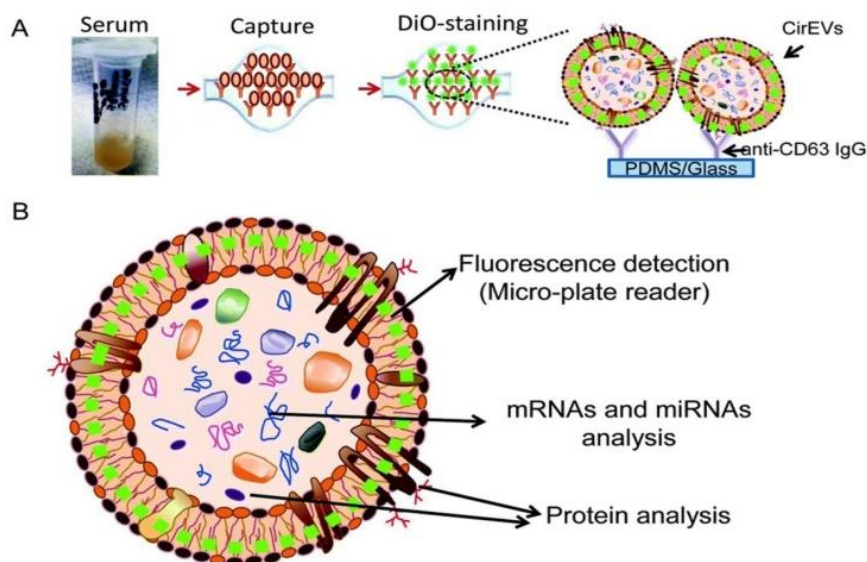


Εικόνα 25: Συσκευή Nanowire-on-micropillar. Πριν την είσοδο στα micropillars αφαιρούνται τα κύτταρα. Οι μικροίνες (Nanowires), παγιδεύουν τα εξωσώματα Α. Μικροίνες (Nanowires) Β. Micropillars C. Ολοκληρωμένο σύστημα (Pin Li, 2017).

Άλλη μία συσκευή, η οποία αναπτύχθηκε από την ομάδα των Weissleder/Lee, είναι η nPLEX, η οποία είναι ένας αισθητήρας εξωσωμάτων βασισμένος σε τομογράφο επιφανειακού πλασμονίου (Surface Plasmon Resonance). Η συσκευή αυτή αποτελείται από μία σειρά από νάνο-σωλήνες, κάθε ένας από τους οποίους είναι εμποτισμένος με υποδοχείς συγγενείας, ώστε να συλλαμβάνουν συγκεκριμένο τύπο εξωσωμάτων. Όταν ένα εξώσωμα προσδεθεί σε ένα από τους νάνο-σωλήνες, προκαλείται μία φασματική μετατόπιση στην οπτική μετάδοση του νάνο-πόρου. Συνδυάζοντας αυτή τη συσκευή νάνο-σωλήνων με μία συσκευή απεικόνισης, η ομάδα Weissleder/Lee έδειξε ότι η νάνο-συσκευή τους, μπορεί να κλιμακωθεί για μαζικές παράλληλες μετρήσεις. Για να παρουσιάσουν την κλινική χρησιμότητα της nPLEX, δείγματα από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών μετρήθηκαν και μπόρεσαν εύκολα να διαφοροποιηθούν από τους υγιείς ελέγχους. Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ήταν μόλις 0,3μl (Jina Ko, 2017).

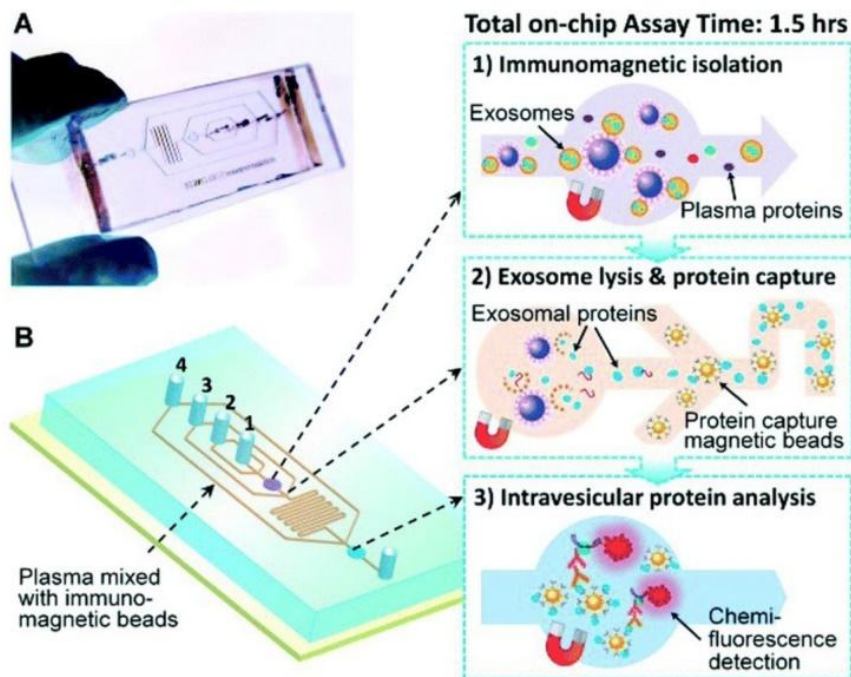
Για την ενίσχυση της ειδικότητας και την εισαγωγή της ικανότητας να μπορούν να ανιχνευθούν οι υπότυποι των εξωσωμάτων, ο Chen και οι συνεργάτες του

πρώτοι προσπάθησαν την απομόνωση συγκεκριμένων εξωσωμάτων με ένα μικροτσιπ με τη μέθοδο της ανοσοσυγγένειας. Παρόμοια τεχνική με αυτές που αναλύθηκαν παραπάνω με βάση την ανοσοσυγγένεια, βρίσκεται η ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών που βρίσκονται στη μεμβράνη (αντιγόνα) και των αντισωμάτων τους, τα οποία ακινητοποιούνται πάνω στο τσιπ, γεγονός που επιτρέπει την απομόνωση συγκεκριμένων υποτύπων των εξωσωμάτων. Επιπλέον λειτουργίες οι οποίες ρυθμίζονται στην συσκευή μικροτσιπ οδηγούν στην εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων. Η ποσότητα που απαιτείται για την διεξαγωγή ενός κύκλου 60 min είναι μόνο 400 μL . Σε αυτή την κατεύθυνση βασίζεται το Exochip, το οποίο είναι ένα ανοσοchip που λειτουργεί με anti-CD63, ένα αντιγόνο το οποίο υπερεκφράζεται στα εξωσώματα. Μία φθορίζουσα ουσία, carbocyanine ([Umberto Malapelle](#)), εμβαπτίζει τα εξωσώματα, τα οποία ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας αναγνώστη πλάκας. Το Exochip απομονώνει εξωσώματα με άθικτο το RNA για την ανάλυση του εξωσωμικού miRNA ([Pin Li, 2017](#)). Η συσκευή παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 26: Πειραματική στρατηγική με τη χρήση του Exochip. Α. Ο ορός διαπερνάται με αντίσωμα CD63 Exochip. Τα εγκλωβισμένα εξωσώματα εμποτίζονται με τη χρωστική DiO Β. Τα εξωσώματα μετρώνται με αναγνώστη πλάκας και τα συστατικά τους αναλύονται με τη χρήση Western Blot για τις πρωτεΐνες και qRT-PCR για το RNA ([Pin Li, 2017](#)).

Ένα άλλο ανοσοτσιπ συνδύασε την απομόνωση των εξωσωμάτων με τον εμπλουτισμό, τη χημική λύση, την πρωτεϊνική ανοσοδιήθηση και την ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας, με ακόμη λιγότερο όγκο δείγματος (30 μL) και χρόνο κύκλου κάτω από 100min. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί, στον πρώτο θάλαμο δείγμα πλάσματος αναμιγνύεται με μαγνητικά σφαιρίδια αντισωμάτων. Έπειτα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων. Στο δεύτερο θάλαμο, μαγνητικά σφαιρίδια αντισωμάτων προστίθενται στο διάλυμα το οποίο έχει υποστεί λύση, ώστε να συλλάβουν ενδοκυτικές πρωτεΐνες. Αντισώματα ανίχνευσης και αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας προστίθενται στο τέλος ([Pin Li, 2017](#)).



Εικόνα 27: Ανάλυση εξωσωμάτων με βάση τα μικρορευστά. Α. Συσκευή τσίπ με μικροκανάλια Β. Διαχείριση εργασίας: ανοσομαγνητική απομόνωση, χημική λύση, ανάλυση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. 1-4: είναι οι είσοδοι για τα σφαιρίδια σύλληψης των εξωσωμάτων, για το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, για τα σφαιρίδια σύλληψης των πρωτεϊνών και τα αντιδραστήρια της ELISA (Pin Li, 2017).

6.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ-ΔΕΙΚΤΕΣ

Ορισμένες έτοιμες δοκιμασίες (kits) οι οποίες αναπτύχθηκαν, για την ολική απομόνωση των εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά, προσφέρουν αντιδραστήρια για τα βιολογικά υγρά που έχουν αναφερθεί, αλλά και για το πλάσμα. Το ολικό RNA και η πρωτεΐνη μπορούν να απομονωθούν με άλλη δοκιμασία. Η δοκιμασία αυτή καθιστά ικανή την ταυτοποίηση τριών εξωσωμικών miRNA δεικτών για τον καρκίνο του προστάτη. Τα εξωσώματα μετρώνται και ποσοτικοποιούνται με την ανάλυση ανίχνευσης νανοσωματιδίων. Το απομονωμένο miRNA αναλύεται περαιτέρω με qRT –PCR. Ένα σοβαρό μειονέκτημα είναι η ταυτόχρονη διήθηση μη εξωσωμικών συστατικών, όπως πρωτεΐνες και πολυμερείς ενώσεις. Αυτό το θέμα φέρνει στην επιφάνεια κάποια βήματα τα οποία πρέπει να τηρηθούν. Πριν την απομόνωση κρίνεται αναγκαία η αφαίρεση υποκυτταρικών ενώσεων όπως οι λιποπρωτεΐνες, ενώ μετά την απομόνωση αφαιρούνται πολυμερείς ενώσεις με τη χρήση Sephadex G25 (Pin Li, 2017).

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την απομόνωση των miRNAs από τα εξωσώματα, συμπεριλαμβανομένων των έτοιμων δοκιμασιών kit, του χλωροφορμίου και της μεθόδου απομόνωσης τριζόλης. Ωστόσο αρκετές μελέτες χρησιμοποιούν έτοιμες δοκιμασίες (kit), καθώς εξοικονομούν χρήματα, χρόνο, παρέχουν υψηλή αποτελεσματικότητα, αλλά και υψηλή απόδοση. Παρόλα αυτά, χρησιμοποιούνται για μία αντίδραση. Συνεπώς, πρωταρχικό μέλημα στις έρευνες

είναι να μειωθούν οι αντιδράσεις στο ελάχιστο και αυτό θα πετύχει με τη μείωση της αποικοδόμησης του miRNA στο ελάχιστο, ώστε να βελτιωθεί η απόδοση από κάθε αντίδραση ([Lei Zhao, 2017](#)).

ExoRNeasy Serum/plasma RNA kit

Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή μιας έρευνας και στατιστικής ανάλυσης μεταξύ των miRNAs που ανιχνεύονται σε μικροκυτταρικό και μη καρκίνο του πνεύμονα. Εξωσωμικό RNA εξήχθη από 500 μ L ορού με τη χρήση exoRNeasy serum/plasma kit, το οποίο χρησιμοποιείται για την εξαγωγή και έκλυση του RNA από τα εξωσώματα είτε άλλα εξωκυτταρικά κυστίδια σε ορό και πλάσμα. Η προετοιμασία, όπως και η δημιουργία συμπλέγματος και η αλληλούχιση, διενεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή του kit (Digital Gene Expression for small RNA, Illumina, San Diego, CA, USA). Για κάθε δείγμα 5μ L του ολικού εξωσωμικού RNA το οποίο έχει απομονωθεί από τον ορό, χρησιμοποιείται για την προετοιμασία της συλλογής του RNA προς αλληλούχιση (Library preparation). Μικρά RNAs συλλέγονται σύμφωνα με το μέγεθος μεταξύ 17 και 52 nt., σύμφωνα με το μονόκλωνο δείκτη DNA στο μικρό kit αλληλούχισης RNA (Illumina). Η συλλογή αυτή ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας picoGreen, q PCR. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον εξοπλισμό της Illumina ([Valeriy Poroyko, 2018](#)).

Η έρευνα που διεξήχθη έδειξε πως 11 τύποι miRNAs εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και της ομάδας ελέγχου-υγιής πληθυσμός. Το αποτέλεσμα της θεραπείας των ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα χαρακτηρίζεται από 7 μοναδικούς τύπους miRNA. Μόνο 5 τύποι miRNA, από συνολικά 36, βρέθηκαν κοινοί μεταξύ ασθενών με μικροκυτταρικό και μη καρκίνο πνεύμονα, γεγονός που αποδεικνύει πως το miRNA είναι ειδικός δείκτης ([Valeriy Poroyko, 2018](#)).

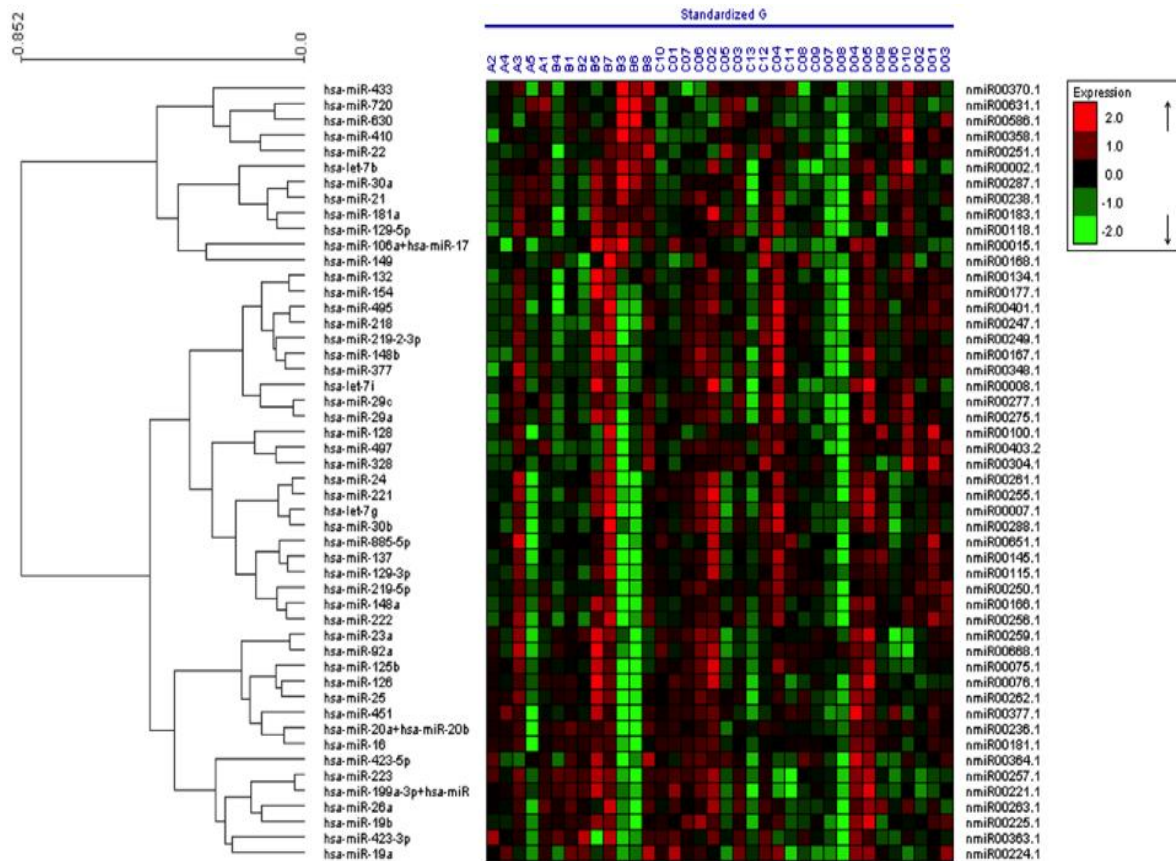
Πραγματοποιήθηκαν αρκετές αναλύσεις και τεστ μεταξύ των τύπων miRNA, ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο, με μικροκυτταρικό καρκίνο και σε ασθενείς υγιείς, οι οποίοι εκφραζόταν διαφορετικά μεταξύ αυτών των τριών γκρουπ. Οι αναλύσεις αυτές αποκάλυψαν 7 τύπους miRNA με εξαιρετική ακρίβεια πρόγνωσης, οι οποίοι μπορούν να διακρίνουν μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και δείγματα της ομάδας ελέγχου (hsa-miR-451a, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-16-2-3p), 1 miRNA που διαχωρίζει το μικροκυτταρικό καρκίνο με την ομάδα ελέγχου (hsa-miR-1180) και 3 miRNAs τα οποία διαχωρίζουν το μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα πριν και μετά τη θεραπεία (hsa-miR-221-3p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-125b-5p). Η σύγκριση μεταξύ των miRNAs που συλλέχθηκαν από ασθενείς με μικροκυτταρικό και μη καρκίνο του πνεύμονα πριν τη θεραπεία αποκάλυψε 13 τύπους ικανούς να διαχωρίζουν τους ασθενείς αυτούς. Από αυτούς οι 3 τύποι (hsa-miR-331-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-363-3p) χαρακτηρίστηκαν από 100% ευαισθησία και ειδικότητα, υπερκαλύπτοντας την πιθανότητα να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για τη διάκριση μικροκυτταρικού και μη καρκίνου πνεύμονα ([Valeriy Poroyko, 2018](#)).

Human V1 miRNA assay kit / Agilent 2100 Bioanalyzer / RNA 6000 Pico kit

Ο καρκίνος του δέρματος είναι ο πιο κοινός καρκίνος, με αυτόν του μελανώματος να χαρακτηρίζεται ως ο πιο επιθετικός καρκίνος. Το γονίδιο το οποίο προδιαθέτει για εμφάνιση μελανώματος με υψηλή διείσδυση είναι ο αναστολέας κινάσης εξαρτώμενος από κυκλίνη 2A, CDKN2A, ο οποίος κωδικοποιεί δύο ανεξάρτητα γονίδια, τα CDKN2A/p16 και CDKN2A/ARF. Μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού βρίσκονται στο 20-40% των περιπτώσεων μελανώματος. Το γονίδιο CDKN2A παράγει δύο πρωτεΐνες τις p14, p16. Η p16 πρωτεΐνη προσδένεται στα γονίδια CDK4, CDK6 αναστέλλοντας την ικανότητά τους να φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Η p14 σταθεροποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Τα γονίδια αυτά παίζουν πιθανότατα κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση ([Susan R. Pfeiffer, 2015](#)).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ερευνάται η πιθανότητα τα εξωσωμικά miRNAs στο πλάσμα συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών μέσα στην οικογένεια, να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί προγνωστικοί βιοδείκτες για τον προσδιορισμό ατόμων υψηλού κινδύνου ως προς την εμφάνιση μελανώματος. Συνολικά μελετήθηκαν 36 δείγματα και δημιουργήθηκαν 4 ομάδες ασθενών. Στη ομάδα A τοποθετήθηκαν 8 κλινικά προσβεβλημένα άτομα από μεγάλη οικογένεια, οι οποίοι εμφάνιζαν μετάλλαξη στο γονίδιο CDKN2A/p16 και ήταν άνευ ασθένειας την ώρα της αιμοληψίας. Στην ομάδα B τοποθετήθηκαν 5 άτομα από την ίδια οικογένεια και με τα ίδια στοιχεία της ομάδας A αλλά χωρίς ιστορικό μελανώματος κατά τη μελέτη. Στην ομάδα C τοποθετήθηκαν 13 σύντροφοι, με τα ίδια χαρακτηριστικά όπως οι ομάδες A, B. Στην ομάδα D τοποθετήθηκαν 10 ασθενείς δίχως συγγένεια με μεταστατικό μελάνωμα με ενεργή νόσο τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο ([Susan R. Pfeiffer, 2015](#)).

Η έκφραση των miRNAs από τα 36 δείγματα αναλύθηκε με το λογισμικό nSolver για την ανίχνευση αλλαγών στην έκφραση του miRNA. Από τα 700 miRNAs τα οποία εξετάστηκαν, τα 75 ανιχνεύθηκαν στα εξωσώματα του πλάσματος σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς. Τα 50 miRNAs που βρέθηκαν σε αφθονία στα εξωσώματα των 36 δειγμάτων ασθενών, υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ιεραρχική συσσώματωση με χάρτες θερμικής έκφρασης των δειγμάτων των ασθενών, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Τα 20 μεταβλητά miRNAs μεταξύ όλων των δειγμάτων επικυρώθηκαν μέσω της ανάλυσής τους με q PCR ώστε να εξεταστεί η διαφορική έκφραση μεταξύ των 4 ομάδων ασθενών. Από τις αναλύσεις που έγιναν, βρέθηκε πως η έκφραση του miR-125b ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με μετάλλαξη της p16 χωρίς υποψία μελανώματος, από ότι σε ασθενείς με μετάλλαξη και ιστορικό της ασθένειας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η έκφραση των δεικτών miR-17, miR-19a, miR-21, miR-126 και miR-149, οι οποίοι εκφράζονται περισσότερο σε άτομα με μεταστατικό μελάνωμα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ([Susan R. Pfeiffer, 2015](#)).



Εικόνα 28: Χαρακτηρισμός της έκφρασης των miRNAs στα εξωσώματα του πλάσματος από άτομα με γενετική προδιάθεση σε μελάνωμα, ελέγχους συζύγων και ασθενείς με σποραδικό μεταστατικό μελάνωμα. Το RNA απομονώθηκε από εξωσώματα του πλάσματος των ασθενών των 4 ομάδων και η ανάλυση της έκφρασης του miRNA πραγματοποιήθηκε στο σύστημα ανάλυσης nCounter, χρησιμοποιώντας το human V1 miRNA assay kit (Susan R. Pfeffer, 2015).

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ.

Πλάσμα αναμιγμένο με κιτρικό νάτριο επωάστηκε στους 37°C για 15 min με Thromboplastin-D για την αφαίρεση των παραγόντων πήξης, και φυγοκεντρήθηκε (8000 * g για 15 min στους 22°C). Το υπερκείμενο (1.2 mL) αναμίχθηκε με 140 μL διαλύματος ExoQuick καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Το μίγμα έπειτα φυγοκεντράται (1500 * g για 15 min στους 22°C) και το εξωσωμικό ίζημα εκλούζεται με PBS δύο φορές. Το ίζημα υποβάλλεται σε 700 μL Qiazol (το οποίο περιλαμβάνει 0.05 fmol/mL Cell39 για ομαλοποίηση του miRNA), και επωάζεται για 5 min στους 22°C (Susan R. Pfeffer, 2015).

ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ MIRNA.

Η ανάλυση της μικροσυστοιχίας του miRNA από εξωσώματα του πλάσματος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το human V1 miRNA assay kit (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA), το οποίο περιέχει περίπου 700 ανθρώπινα miRNAs. Η ακεραιότητα και η ποσότητα του RNA αξιολογήθηκαν με τη χρήση των

Agilent 2100 Bioanalyzer και RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Εν συντομία, το ολικό RNA αναμίχθηκε με ζεύγη αναλυτών, υβριδοποιήθηκε στο nCounter Prep Station, και τα καθαρά σύμπλοκα ποσοτικοποιήθηκαν στο nCounter digital analyzer. Για να ληφθούν υπόψη οι διαφορές στην υβριδοποίηση και την κάθαρση, τα δεδομένα ομαλοποιήθηκαν σύμφωνα με το μέσο όρο σε όλα τα δείγματα και αναλύθηκαν με το nSolver λογισμικό ([Susan R. Pfeffer, 2015](#)).

QIAamp Circulating Nucleid Acid kit / Agilent high sensitivity DNA kit / Qubit ds DNA HS assay kit / Invitrogen Total Exosome isolation kit

Αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια για τον προσδιορισμό των συστατικών των εξωσωμάτων, τα οποία προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, διεξήχθη ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων και ανακαλύφθηκε πως περισσότερο από το 90% του cfDNA εντοπίζεται στα εξωσώματα του πλάσματος ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Δείγματα αίματος ελήφθησαν από πιστοποιημένους δότες στο πανεπιστήμιο της Νεμπράσκα από το κέντρο Ερυθρού Σταυρού της Αμερικής. Το αίμα ελήφθη με φλεβοκέντηση σε φιαλίδιο συλλογής 10m L εμβαπτισμένο με K3EDTA ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 22°C σε 1600 * g για 10 min. το πλάσμα αφαιρέθηκε προσεκτικά και εισήχθη σε καινούργιο σωληνάριο και φυγοκεντρήθηκε στους 22°C σε 16000 * g για 10 min, ώστε να απομακρυνθούν αποπτωτικά κύτταρα, θραύσματα κυττάρων και πυρηνίσκοι ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΑ ΑΝΕΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα εξωσώματα απομονώθηκαν από το πλάσμα χρησιμοποιώντας το Invitrogen Total Exosome Isolation kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, 0.5 m L πλάσματος τοποθετήθηκε σε σωλήνα Eppendorf και αναμίχθηκε με 0.25 m L PBS. Το πλάσμα αυτό έπειτα εμπλουτίστηκε με πρωτεΐνωση K 25 μ L και επωάστηκε στους 37°C για 10 min. Έπειτα κάθε δείγμα πλάσματος συνδυάστηκε με 150μ L αντιδραστηρίου του kit και αναμίχθηκαν ώσπου να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 30 min και μετά φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε 10000 * g για 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο καθαρό σωληνάριο και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρήση. Το εξωσωμικό ίζημα αραιώνεται πάλι σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και αποθηκεύεται στους 4°C για 1-7 ημέρες, ενώ στους -20 μακροπρόθεσμα ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

Η ταξινόμηση και ποσοτικοποίηση των εξωσωμάτων πραγματοποιείται με τον εξοπλισμό NanoSight NS300 (UK), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο εξοπλισμός χρησιμοποιεί μια πηγή φωτός λέιζερ, με σκοπό να φωτίσει νανοσωματίδια (10-1000 nm), τα οποία φαίνονται μεμονωμένα καθώς κινούνται σύμφωνα με την κίνηση Brownian. Τα μονοπάτια του σημείου διασκορπίζονται ή τα σωματίδια, μετρώνται για τον υπολογισμό της ταχύτητας, η οποία χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί το μέγεθος, ανεξάρτητα της πυκνότητας. Το λογισμικό απεικονιστικής ανάλυσης NTA συνδυάζει τις πληροφορίες και επιτρέπει στο χρήστη αυτόματα να υπολογίζει το μέγεθος και τον αριθμό των νανοσωματιδίων. Ο εξοπλισμός αυτός διαθέτει επίσης φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες όταν χρησιμοποιούνται μόνο τα σωματίδια που εκπέμπουν φθορισμό μπορούν να μετρηθούν. Ο συνολικός αριθμός σωματιδίων μπορεί να μετρηθεί και να συγκριθεί με τη συγκέντρωση των φθορίζόντων σωματιδίων. Τα εξωσώματα που βρίσκονται αραιωμένα σε PBS, επαναραιώνονται 5 φορές σε PBS ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή συγκέντρωση για την ομαλή λειτουργία του εξοπλισμού (NanoSight NS300). Η βαφή ExoFITC περιέχει φθορίζοντα μόρια συζευγμένα με πρωτεΐνη γνωστή στην ικανότητα να προσδένεται στα εξωσώματα. Τα εξωσώματα σημαίνονται με το σύμπλοκο και ξεκινά η ποσοτικοποίηση και ταξινόμηση με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα εξωσώματα του πλάσματος τα οποία αραιώθηκαν με PBS, επωάζονται με Quant-iT PicoGreen dsDNA αντιδραστήριο για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και αναλύονται έπειτα στο NanoSight NS300 ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

Το QIAamp Circulating Nucleid Acid kit (Qiagen, Santa Clarita, CA), χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA από το πλάσμα, από τα εξωσώματα του πλάσματος και από το υπερκείμενο έπειτα από τη διήθηση των εξωσωμάτων. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA περιλάμβανε κενά όπου PBS χρησιμοποιούνταν αντί για δείγμα. Το DNA εκπλύθηκε με 50μ L ρυθμιστικού διαλύματος και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΞΩΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ AGILENT BIOANALYZER

Το DNA το οποίο απομονώθηκε με τις μεθόδους που έχουν αναφερθεί, εμπλουτίστηκε με RNase, με τη μέθοδο διαχωρισμού με τζελ αгарόζης, και αναλύθηκε με τη χρήση Agilent High Sensitivity DNA kit, σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Το συγκεκριμένο kit αναλύει το προφίλ του DNA κάθε δείγματος αυτόματα και απεικονίζει το ηλεκτροφερογράφημα κάθε δείγματος ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

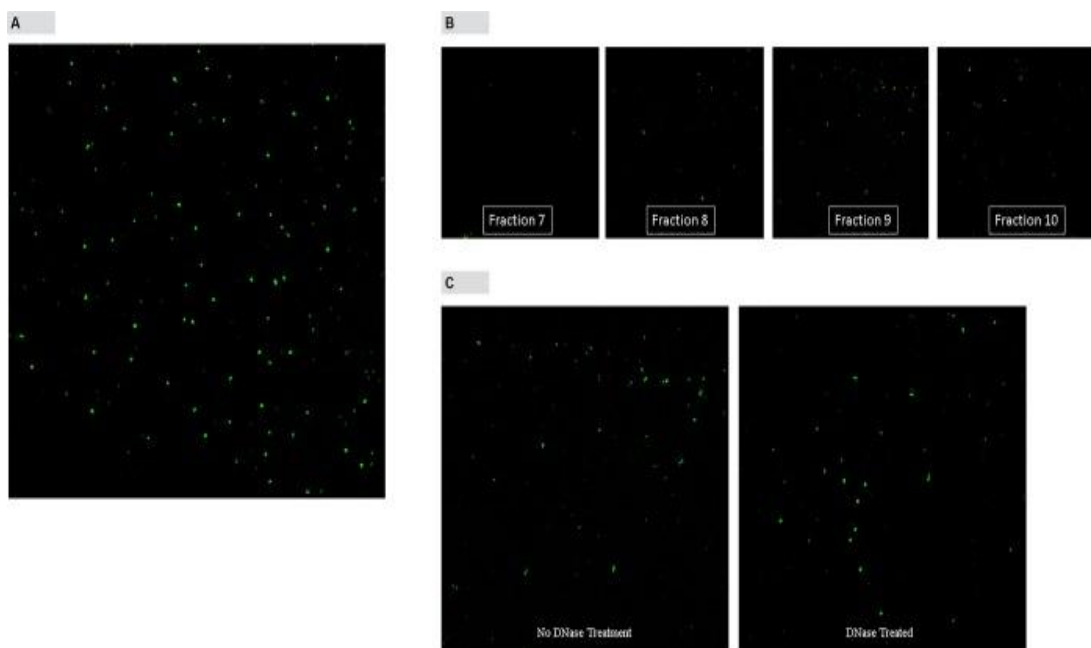
Το Qubit ds DNA HS assay kit χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του RNA το οποίο απομονώθηκε από τα εξωσώματα. Το επόμενο βήμα είναι η διαδικασία της ddPCR (Quantitative droplet digital PCR) ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

Στη συνέχεια ακολούθησε η σύγκριση της συγκέντρωσης του DNA σε πλάσμα και εξωσώματα, αφού το πλάσμα διαχωρίστηκε με την τεχνική που περιγράφηκε παραπάνω. Έπειτα χωρίστηκε σε δύο ομάδες, στην ομάδα 1 επρόκειτο να απομονωθεί το DNA άμεσα από το πλάσμα, ενώ στην ομάδα 2 από τα εξωσώματα. Τέλος, το απομονωμένο DNA ποσοτικοποιήθηκε με τις μεθόδους ddPCR, Qubit ds DNA HS assay kit ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με τη χρήση των παραπάνω μεθόδων και με την τεχνική Western Blot καθώς και την απεικονιστική ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, ανακαλύφθηκε η παρουσία των ακόλουθων πρωτεϊνών στα εξωσώματα 4 υγιών ατόμων: CD9, CD63, Hsp70. Επίσης, ακολούθησε η ανάλυση για την εύρεση των CD41, CD45, ωστόσο δεν βρέθηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες στα εξωσώματα. Τα εξωσώματα τα οποία εμβαπτίστηκαν με πράσινη φθορίζουσα χρωστική, αναλύθηκαν κάτω από συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) και διαπιστώθηκε η παρουσία dsDNA (double-stranded) στο εσωτερικό των εξωσωμάτων (εικόνα 29) ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

Μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση του DNA σε ίζημα εξωσωμάτων, έδειξαν πως το 90% του συνολικού cfDNA και το 93% του συνόλου στο πλάσμα εντοπίζεται στα εξωσώματα. Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε πως το cfDNA του πλάσματος βρίσκεται στα εξωσώματα τα οποία προσδένονται στη μεμβράνη και προστατεύουν το DNA από νουκλεάσες που θα το διασπάσουν. Επίσης, αποδείχθηκε πως η αποθήκευση των δειγμάτων αίματος μετά τη φλεβοκέντηση, οδηγούσε σε αύξηση των εξωσωμάτων του πλάσματος και της συγκέντρωσης του DNA, γεγονός που υποδηλώνει απελευθέρωση των εξωσωμάτων από τα ερυθρά κύτταρα του αίματος κατά τη συντήρηση. Επιπρόσθετα, η ανάλυση των εξωσωμάτων με Western Blot έδειξε πως οι συγκεντρώσεις των τετρασπανίνων CD63, CD9, οι οποίες βρίσκονται στα εξωσώματα, αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου. Η τετρασπανίνη CD243a είναι αρκετά χαμηλή στα δείγματα αίματος όταν αυτά ελήφθησαν. Όμως, όσο ο χρόνος περνούσε η συγκέντρωσή της αυξανόταν, υποδεικνύοντας πως τα ερυθροκύτταρα παράγουν εξωσώματα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).



Εικόνα 29: Φθορίζουσα απεικόνιση εξωσωμάτων με τη χρήση αντιδραστηρίου Quant-It PicoGreen dsDNA κάτω από συνεστιακό μικροσκόπιο. Α. Φωτεινά πράσινα φθορίζουσα εξωσώματα δηλώνουν την παρουσία dsDNA Β. Συνεστιακή απεικονιστική ανάλυση εξωσωμάτων σε κλάσματα, η οποία λαμβάνεται με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας C. Συνεστιακά απεικονιστική ανάλυση εξωσωμάτων με ή χωρίς τοποθέτηση DNAase. Διαπιστώθηκε πως ακόμη και μετά την εισαγωγή DNAase, το dsDNA παραμένει ανιχνεύσιμο, εφόσον τα εξωσώματα φθορίζουν ([M. Rohan Fernando, 2017](#)).

ExoQuick - TC kit / QIAamp Minikit / MagMax cell free DNA isolation kit

Τα εξωσώματα που προέρχονται από τα ούρα είναι επίσης πηγή καρκινικού DNA και απελευθερώνονται από κύτταρα σε διάφορα βιολογικά υγρά συμπεριλαμβανομένων του αίματος και των ούρων. Ενώ πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην απομόνωση του miRNA, τα εξωσώματα περιέχουν θραύσματα dsDNA, και γονιδιακές αλλαγές έχουν ταυτοποιηθεί στο εξωσωμικό DNA (exoDNA). Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η παρουσία και ο προσδιορισμός cfDNA των ούρων και εξωσωμικού DNA, στην υγρή βιοψία για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο οποίος θεωρείται ως ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος όσον αφορά τις κακοήθεις νόσους του ουροποιητικού συστήματος, με μεγάλο αριθμό γενετικών αλλαγών ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

Η μελέτη περιλάμβανε 9 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή για καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Δείγματα ούρων και αίματος συλλέχθηκαν πριν την χειρουργική εκτομή και ο καρκινικός ιστός αποθηκεύτηκε μετά την εκτομή του. Τα δείγματα των ούρων χωρίστηκαν σε 2 κλάσματα για την απομόνωση cfDNA και exoDNA σε κάθε δείγμα των εννέα ασθενών ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ exoDNA ΑΠΟ ΤΑ ΟΥΡΑ

Για την απομόνωση των εξωσωμάτων των ούρων χρησιμοποιήθηκε έτοιμο αντιδραστήριο διήθησης εξωσωμάτων, ExoQuick TC kit (System Biosciences, Mountain View, CA). Εξωσώματα απομονώθηκαν από 10-20 ml ούρων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, τα δείγματα των ούρων φυγοκεντρήθηκαν 2000 * g στους 4°C για 15 min, ώστε να αφαιρεθούν τα κύτταρα και έπειτα προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα αντιδραστηρίου. Το διάλυμα επωάστηκε στους 4°C για όλη τη νύχτα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε 1500 * g για 30 min. Μετά την αναρρόφηση του υπερκείμενου, τα υπολείμματα του διαλύματος φυγοκεντρήθηκαν 1500 * g για 5 min. Το ίζημα που δημιουργήθηκε εμπλουτίστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

Για τον καθορισμό του μεγέθους των εξωσωμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα NanoSight LM10 και το λογισμικό ανάλυσης παρακολούθησης νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis). Τα δείγματα εξετάστηκαν επίσης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης και για την επικύρωση της παρουσίας των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε Western Blot ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ DNA

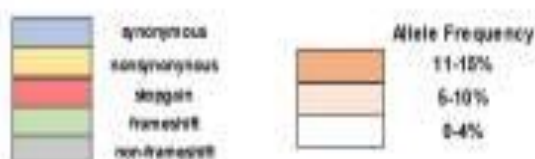
Το DNA από τον ιστό και τα δείγματα αίματος απομονώθηκε με τη χρήση του QIAamp DNA minikit (Qiagen, Valencia, CA). Το εξωσωμικό DNA απελευθερώθηκε από τα εξωσώματα του ούρων χρησιμοποιώντας το ίδιο kit, ενώ για την απομόνωση του cfDNA από τα ούρα χρησιμοποιήθηκε το MagMax Cell-Free DNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific), το οποίο χρησιμοποιεί τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

Μετά την απομόνωση των εξωσωμάτων και του DNA, ακολούθησε η αλληλούχιση 9 γονιδίων, τα οποία σε προηγούμενες μελέτες φάνηκαν συχνά μεταλλαγμένα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Τα γονίδια αυτά είναι : ARID1A, PIK3CA, FGFR3, HRAS, KMT2D, RB1, TP53, KDM6A και STAG2. Για την αλληλούχιση των γονιδίων στόχων, πραγματοποιήθηκε η αλληλούχιση του cfDNA και exoDNA των ούρων ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τη στοχευμένη αλληλούχιση των 9 γονιδίων στο cfDNA και το exoDNA των ούρων, ταυτοποιήθηκαν 11 σωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες βρίσκονται στο DNA των ούρων. Οι 6 από αυτές μπορούν να εντοπιστούν ταυτόχρονα στο cfDNA και το exoDNA των ούρων όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το exoDNA των ούρων, από τη μελέτη αυτή, φάνηκε να είναι μία ακόμη πηγή ταυτοποίησης όγκων της ουροδόχου κύστης, αλλά και άλλων κακοηθειών, με τη μέθοδο της υγρής βιοψίας. Αφού πραγματοποιήθηκε WGS (Whole Genome Sequencing), βρέθηκε πως το cfDNA και το exoDNA των ούρων είναι αντιπροσωπευτικά ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος και επομένως κατάλληλα για χαρακτηρισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

Patient	Location	gene	cDNA (Allele frequency)	exoDNA (Allele frequency)	exon number	aa change	Seq change	COSMIC
BC1	12: 49445351	KMT2D	0%	5.90%	exon10	p.R96_705del	c.2068_2114del	-
BC2	1: 27022939	ARD1A	4.10%	5.20%	exon1	p.Y5_16del	c.46_48del	-
BC3	1: 27097801	ARD1A	5.00%	10.60%	exon8	p.I113Q	c.C2632T	3
BC3	1: 27089676	ARD1A	5.40%	6.10%	exon12	p.Q878X	c.C3392T	-
BC3	1: 27022939	ARD1A	5.70%	4.20%	exon1	p.Y5_16del	c.46_48del	-
BC3	1: 27023615	ARD1A	5.20%	8.00%	exon1	p.S241_245del	c.722_735del	-
BC3	3: 178936082	PKCJA	10.00%	10.70%	exon10	p.E542K	c.G1624A	89
BC3	12: 49437700	KMT2D	11.90%	6.30%	exon22	p.R1757Q	c.G5270A	-
BC4	17: 7579642	TP53	5.00%	3.90%	exon6	p.Q205E	c.C613G	-
BC6	13: 49547515	RBI1	14.70%	10.90%	exon24	p.E837X	c.G2509T	-
BC6	13: 49355524	RBI1	12.70%	4.80%	exon17	p.I547fs	c.1641dupA	-



Εικόνα 30: Μεταλλάξεις οι οποίες ταυτοποιούνται μόνο σε cfDNA και exoDNA των ούρων ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

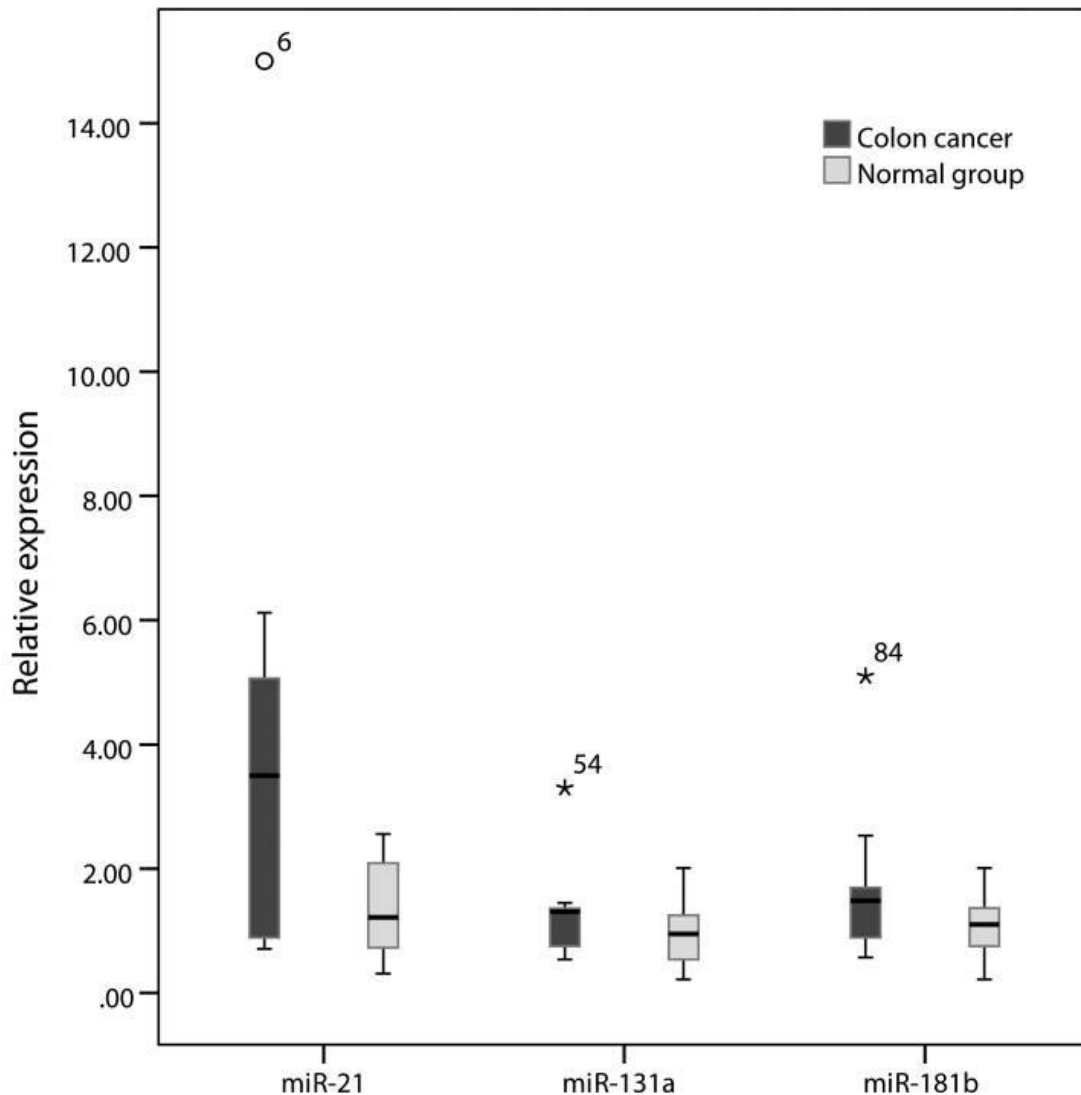
TagMan MicroRNA Reverse Transcription kit / Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) kit

Το ExoQuick TC isolation kit χρησιμοποιήθηκε σε ακόμη μία μελέτη των Lei Zhao et al. για την απομόνωση και ταυτοποίηση των miRNAs που βρίσκονται στα εξωσώματα 20 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε αυτή τη μελέτη αναλύθηκαν όλα τα ειδικά miRNAs των εξωσωμάτων, το μέγεθος και η μορφολογία. Η παρατήρηση των εξωσωμάτων, αφού ολοκληρώθηκε η απομόνωσή τους, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης. Έπειτα από την απομόνωση των εξωσωμάτων ακολούθησε η εξαγωγή των RNAs με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Η μελέτη έγινε με αυτή ακριβώς τη σειρά βημάτων, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα εξωσώματα προσδίδουν σταθερότητα και ακεραιότητα στα miRNAs που βρίσκονται στο εσωτερικό τους, προστατεύοντας τα από ένζυμα και άλλους παράγοντες που θα τα διασπάσουν ([Lei Zhao, 2017](#)).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ miR-21, miR-131a, miR-181b

Τα εξωσωμικά miRNAs εφαρμόζονται ως πρότυπο και με τη χρήση του TagMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies Corp, USA) γίνεται η μετατροπή του miRNA σε cDNA. Ο προσδιορισμός των δεικτών έγινε με τη μέθοδο της RT-qPCR, με τη χρήση του kit. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα επίπεδα των τριών δεικτών ήταν εμφανώς αυξημένα και στους 20 ασθενείς της μελέτης, με

ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον miR-21, του οποίου η αύξηση ήταν δραματική, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί ([Lei Zhao, 2017](#)).



Εικόνα 31: Έκφραση των miR-21, miR-131a και miR-181b σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και σε υγιείς ομάδες. Διαπιστώνεται πως η έκφραση των δεικτών είναι εμφανώς αυξημένη στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί ο miR-21 ([Lei Zhao, 2017](#)).

ExoLution Plus Isolation kit / ddPCR Screening Kit

Μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, BRAF, EGFR είναι παρούσες σε πολλούς τύπους καρκίνου και μπορούν να προβλέψουν τα αποτελέσματα αρκετών στοχευμένων θεραπειών. Σκοπός της μελέτης ήταν να συγκρίνει την αξιολόγηση κοινών μεταλλάξεων των παραπάνω γονιδίων, με τη χρήση αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) των απομονωμένων exoNA (exosomal Nucleid Acid) και με τη χρήση ddPCR, BEAMing PCR για την ανάλυση του cfDNA. Συνολικά 43 ασθενείς με προχωρημένη νόσο πήραν μέρος στη μελέτη ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *exoNA*, *cfDNA*

Με τη χρήση του *exoLution Plus isolation kit* (Exosome Diagnostics, Waltham, MA), απομονώθηκε το *exoNA* του πλάσματος, το οποίο περιέχει εξωσωμικό DNA, RNA και επιπλέον *cfDNA*. Μία ποσοτική μέθοδος NGS χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνεύσει μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF στο εξώνιο 15, του KRAS στο εξώνιο 2 και του EGFR στα εξώνια 19-21. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης είναι η συχνότητα μετάλλαξης αλληλόμορφων (MAF) 0.05% στα αγρίου τύπου αλληλόμορφα ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

Το *cfDNA* του πλάσματος απομονώθηκε με το QIAamp Circulating Nucleid Acid kit και 16 ng αυτού αξιολογήθηκαν για μεταλλάξεις BRAF ή KRAS με τη χρήση ddPCR Screening kit ή για τον υποδοχέα EGF. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος BEAMing PCR. Εν συντομία, μεμονωμένα μόρια DNA συνδέθηκαν σε μαγνητικά σφαιρίδια σε γαλακτώματα *water-in-oil* και κατόπιν υποβλήθηκαν διαμερισματικά σε PCR. Η μετάλλαξη του DNA, το οποίο ήταν προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, προσδιορίστηκε με υβριδοποίηση σε φθορίζοντες ανιχνευτές ειδικών αλληλόμορφων ή αλληλόμορφων άγριου τύπου του γονιδίου ενδιαφέροντος. Η ποσοτικοποίηση του μεταλλαγμένου DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 43 ασθενείς, οι 41 είχαν μετάλλαξη του ενδιαφέροντος της μελέτης στους καρκινικούς ιστούς τους και συγκεκριμένα, οι 20 μετάλλαξη στο BRAF γονίδιο, οι 17 μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS και 4 με μετάλλαξη του υποδοχέα του γονιδίου EGF. Οι περισσότεροι ήταν καυκάσιοι και άνδρες με μέση ηλικία τα 57 έτη. Οι πιο κοινί καρκινικοί τύποι ήταν ο καρκίνος παχέος εντέρου στους 20 ασθενείς, μελάνωμα σε 8 ασθενείς και μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα σε 6 ασθενείς ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

Με την μέθοδο ανίχνευσης NGS προσδιορίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF σε 19 από τις 20 υπάρχουσες μεταλλάξεις, σε 3 από τους 4 ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο EGFR και σε όλους τους ασθενείς με KRAS μετάλλαξη, με ευαισθησία 95%. Με τη μέθοδο ddPCR για την ανάλυση μεταλλαγών στο *cfDNA*, προσδιορίστηκαν 17 από τους 19 ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF, 2 από τους 3 ασθενείς με EGFR μετάλλαξη και όλοι οι ασθενείς με KRAS μετάλλαξη. Η μέθοδος αυτή είχε συνολική ευαισθησία 92%. Τέλος με τη μέθοδο BEAMing PCR, προσδιορίστηκαν 13 από τους 14 ασθενείς με BRAF μετάλλαξη και όλοι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, EGFR, με συνολική ευαισθησία 97%. Αποδείχθηκε έτσι πως η τεχνική BEAMing PCR για την αξιολόγηση μεταλλάξεων στο *cfDNA* είχε την υψηλότερη ευαισθησία από τις τρεις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν και ακόμη προσδιόρισε τις περισσότερες μεταλλάξεις, οι οποίες δεν είχαν προσδιοριστεί στον αρχικό ιστό (εικόνα 32) ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

Discrepancies between mutation testing of archival tumor tissue and plasma exosomal nucleic acid (exoNA) and cell-free DNA (cfDNA)

Characteristic	exoNA	cfDNA ddPCR	cfDNA BEAMing
Samples with tumor tissue mutations	41	39	35
Tissue mutations not detected in plasma			
Appendiceal cancer	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Not done	<i>BRAF</i> ^{V600E}
Non-small cell lung cancer		<i>EGFR</i> ^{19del}	
Non-small cell lung cancer	<i>EGFR</i> ^{L858R}		
Rectal cancer		<i>BRAF</i> ^{V600E}	
Erdheim-Chester histiocytosis		<i>BRAF</i> ^{V600E}	
Plasma mutations not detected in tissue			
Prostate cancer		<i>KRAS</i> ^{G12/G13}	<i>KRAS</i> ^{G12/G13}
Ovarian cancer			<i>KRAS</i> ^{G12/G13}

Abbreviations: ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction

Εικόνα 32: Διαφορές μεταξύ προσδιορισμού μεταλλάξεων σε αρχικό ιστό και σε exoNA, cfDNA ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

6.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΞΩΣΩΜΙΚΟΥ ΠΕΡΙΧΟΜΕΝΟΥ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

6.4.1 ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ miRNAs

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μελέτες πάνω στην ανάλυση των εξωσωμάτων και των περιεχομένων τους, καθώς παίρνουν μέρος στην καρκινογένεση, τη μετάσταση και την αντίσταση σε αντικαρκινικές θεραπείες. Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιήσιμα RNAs που αναφέρονται και ως ρυθμιστές του γονιδιώματος και συχνά απορρυθμίζονται στον καρκίνο. Το μέγεθός τους είναι μεταξύ 19-22 ζεύγη βάσεων. Τα miRNAs στοχεύουν την 3' περιοχή του mRNA (messengerRNA) και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σε μεταγραφικό και μεταμεταγραφικό επίπεδο. Σε καρκινικό επίπεδο λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά αλλά και ως ογκογονίδια ([Valeriy Poroyko, 2018](#)). Η παρουσία τους στο εσωτερικό των εξωσωμάτων οδήγησε στη βαθύτερη εξερεύνησή τους ως δείκτες και μόρια σηματοδότησης. Με τον όρο exomiRs περιγράφονται τα miRNAs, τα οποία εκλεκτικά πακετάρονται, εκκρίνονται και μεταφέρονται μεταξύ κυττάρων στα εξωσώματα ([Rahul Bhome, 2018b](#)).

6.4.1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (NSCLC, SCLC) ΚΑΙ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα θεωρείται ως η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Συνήθως η διάγνωσή του γίνεται σε προχωρημένο στάδιο με ποσοστό 5ετούς επιβίωσης στο 15%, καθώς οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται θεωρούνται ανακριβείς. Πολλές μελέτες έχουν επισημάνει τη σημασία των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων και των miRNAs στην πρώιμη διάγνωση, τη διάκριση μεταξύ των ιστοτύπων, την ανάπτυξη και την πρόγνωση του καρκίνου. Επιπλέον έχει αποδειχθεί πως τα κύτταρα παράγουν συγκεκριμένα miRNAs ως απάντηση στα ερεθίσματα ή τα μηνύματα των γειτονικών κυττάρων ([Riccardo Cazzoli, 2013](#)).

Ο Valeriy Poroyko και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μία μελέτη για τη συσχέτιση των miRNAs μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και τις βιολογικές λειτουργίες που παίρνουν μέρος, αλλά και το διαχωρισμό των ασθενών με NSCLC, SCLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν εξαιρετική ακρίβεια και ειδικότητα και έτσι έχουν την δυνατότητα να εκπληρώνουν την ανάγκη για πρώιμη διάγνωση. Παραδείγματος χάριν, τα επίπεδα των miR-21, miR-126, miR-210 και miR-486 στο πλάσμα, συσχετίζονται με καρκίνο του πνεύμονα σταδίου 1. Επίσης, διαφορετικά miRNAs είναι ικανά να διαχωρίζουν τους υπότυπους μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα (NSCLC). Υψηλά επίπεδα του miR-205 έχουν βρεθεί σε πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα, διαχωρίζοντας αυτούς τους ασθενείς από αυτούς με άλλους υποτύπους του NSCLC ([Valeriy Poroyko, 2018](#)).

Τα γενετικά προφίλ των miRNAs έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως προγνωστικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο του πνεύμονα. Ένα σύνολο από 34 miRNAs που προσδιορίστηκαν στον ορό του αίματος μπορούν να διακρίνουν ασυμπτωματικά άτομα με πρώιμου σταδίου καρκίνο πνεύμονα, που βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν προχωρημένου σταδίου. Επιπλέον, η έκφραση διαφόρων miRNAs (let-7, miR-221, miR-137, miR-372 και miR-182) έδειξε θετική συσχέτιση με το ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. Στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα, ένα σύνολο 32 miRNAs υπερεκφράζονταν στον καρκινικό ιστό, συγκεκριμένα ο let-73, miR-25, miR-191, miR-34a, miR-34c συσχετίστηκαν με την πρόγνωση. Τέλος, ο miR-21 και ο miR-24 φάνηκαν υποσχόμενοι δείκτες για καρκινική υποτροπή ([Valeriy Poroyko, 2018](#)).

Πέρα από τη σύγκριση των δεικτών, η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρθηκε στις μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες παίρνουν μέρος τα miRNAs. Οι 5 πρώτες λειτουργίες για τον NSCLC είναι ο κυτταρικός κύκλος, ο κυτταρικός θάνατος και η επιβίωση, η κυτταρική αύξηση και ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική ανάπτυξη, η αναδιάρθρωση και η επιδιόρθωση και η αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά τα δείγματα του SCLC, οι 5 πρώτες λειτουργίες στις οποίες παίρνουν μέρος τα miRNAs είναι η κυτταρική λειτουργία και συντήρηση, η κυτταρική κίνηση, η μορφολογία του κυττάρου, η κυτταρική ανάπτυξη και η κυτταρική συγκέντρωση και οργάνωση ([Valeriy Poroyko, 2018](#)).

Ακόμη μία μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον Riccardo Cazzoli και τους συνεργάτες του με σκοπό την ανακάλυψη δύο τεστ, βασιζόμενων στα miRNAs, για την παρακολούθηση και τη διάγνωση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα. Σε αυτή τη μελέτη έγινε ευρεία ανάλυση 742 miRNAs και κατέληξαν σε 14 γνωστά miRNAs για τις διαφορετικές λειτουργίες τους. Ο miR-200b-5p χρησιμοποιούνταν για την εκτίμηση της υποτροπής έπειτα από χειρουργική εκτομή σε SCLC. Οι miR-100, miR-378a, miR-629 ρύθμιζαν την έκφραση δύο βασικών ογκογονιδίων στον

καρκίνο του παχέος εντέρου και το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Ο miR-30a συμμετέχει στη μετάσταση και την κυτταρική εισβολή. Ο miR-151a-5p συμμετέχει στη μετανάστευση των κυττάρων και την εισβολή σε άλλους ιστούς και η απάντησή του στην ακτινοβολία ποικίλει. Τέλος, ο miR-379 έχει ισχυρή σχέση με τα γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, τα οποία είναι σημαντικά όσον αφορά την απόκριση του ασθενούς στη θεραπεία και τη δημιουργία αντίστασης ([Riccardo Cazzoli, 2013](#)).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως τα miR-378a, miR-379, miR-139-5p, miR-200b-5p μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την παρακολούθηση του αδενοκαρκινώματος, καθώς και τη διάκρισή του από υγιείς πρώην καπνιστές. Επίσης, το διαγνωστικό τεστ περιλαμβάνει 8 miRNAs miR-17, miR-30a-3p, miR-378a, miR-151a-5p, miR-502-5p, miR-154-3p, miR-100, miR-139-5p ([Riccardo Cazzoli, 2013](#)). Τα χαρακτηριστικά του τεστ παρατίθενται στην εικόνα που ακολουθεί.

Tests characteristics overview

Table shows the tests characteristics: sensibility, specificity, positive predictive value, negative predictive value and AUCROC. It also shows the tests algorithms.

Test	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive value	Negative Predictive value	AUCROC
Screening Test	97.5%	72%	92%	90%	90.8%
Screening Algorithm	$\alpha = 0.86 + (\text{miR}378a)(-0.3) + (\text{miR}379)(0.19) + (\text{miR}139-5p)(0.37) + (\text{miR}200b-5p)(-0.17)$				
Diagnostic Test	96%	60%	80%	90%	76%
Diagnostic Algorithm	$\alpha = -0.89 + (\text{miR}151a-5p)(-0.15) + (\text{miR}200b-5p)(0.07) + (\text{miR}30a-3p)(0.05) + (\text{miR}629)(-0.17) + (\text{miR}100)(0.04) + (\text{miR}154-3p)(-0.05)$				

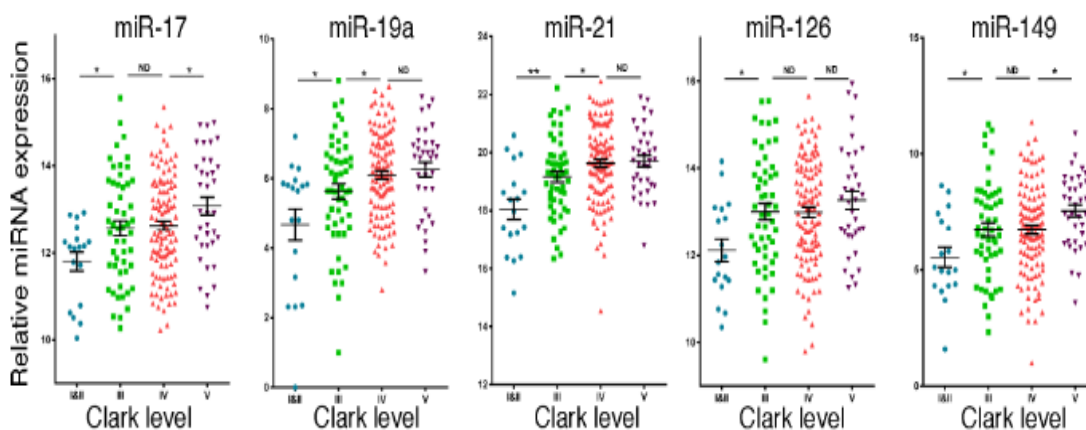
Εικόνα 33: Χαρακτηριστικά των τεστ που δημιουργήθηκαν στη μελέτη. Αναφέρονται η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική διαγνωστική αξία και η αρνητική διαγνωστική αξία ([Riccardo Cazzoli, 2013](#)).

6.4.1.2 ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Ο καρκίνος του δέρματος είναι ένας από τους συχνότερους καρκίνους στον άνθρωπο. Το μελάνωμα θεωρείται από τους πιο επιθετικούς και θανατηφόρους καρκίνους του δέρματος με ποσοστό 80% θανάτων στην Αμερική. Στη μελέτη της Susan Pfeffer και των συνεργατών της ανακαλύφθηκαν αρκετά miRNAs τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν ως βιοδείκτες προδιάθεσης και πιθανοί στόχοι χημειοπροφύλαξης. Σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των miR-17, miR-19a, miR-21, miR-126, miR-149, τα οποία υπερεκφράζονταν στα

εξωσώματα ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα, πράγμα το οποίο υποδηλώνει τη σημασία για την κλινική τους εφαρμογή ([Susan R. Pfeffer, 2015](#)).

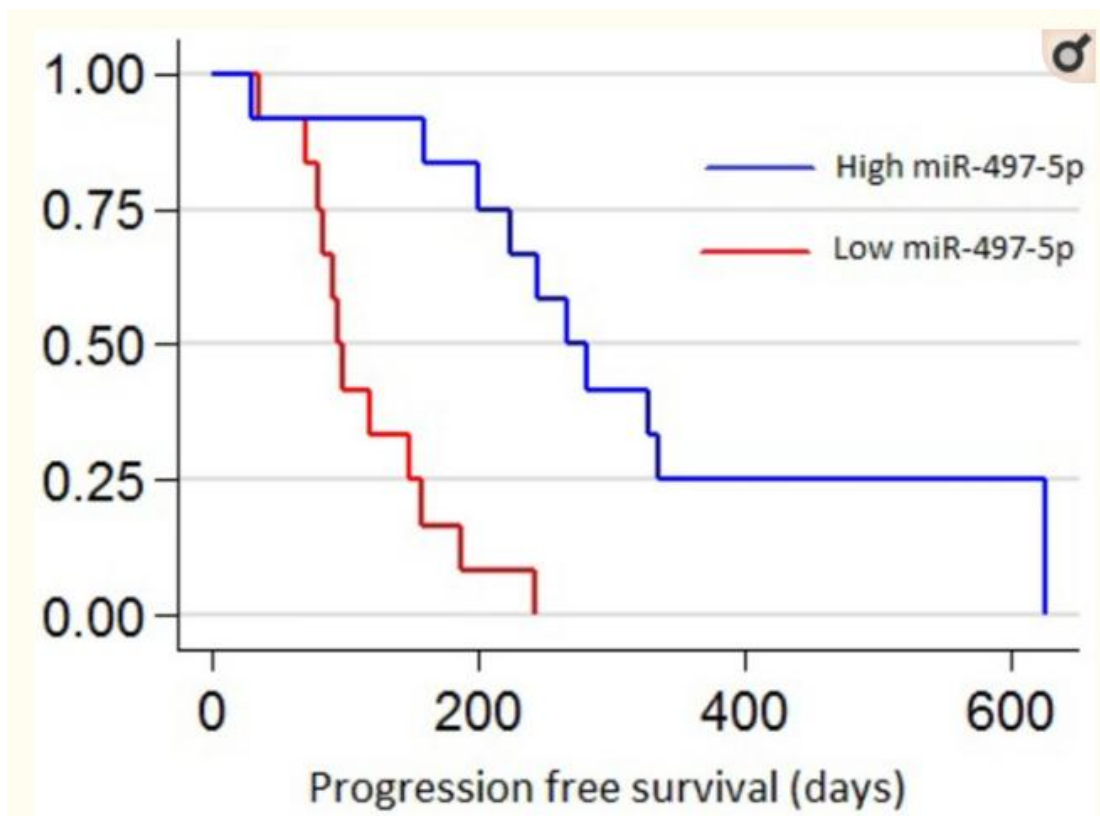
Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των μελετών, η μελέτη συνεχίστηκε για τον προσδιορισμό της πιθανότητας τα εξωσώματα του πλάσματος των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα, να εκφράζονται διαφορετικά στον καρκινικό ιστό. Εξετάστηκε, στη συνέχεια, η έκφραση των miRNAs σε 216 δείγματα μελανώματος και ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το επίπεδο Clark, όπου τα επίπεδα 1, 2 αντιστοιχούν σε λιγότερο διηθητικούς όγκους, ενώ το επίπεδο 5 αντιστοιχεί στην πιο διηθητική μορφή καρκίνου. Χαμηλή έκφραση των miR-17, miR-19a, miR-21, miR-126, miR-149 βρέθηκε στο λεπτότερο μελάνωμα, το οποίο αντιστοιχεί σε επίπεδο Clark 1-2, ενώ υψηλή έκφραση των miRNAs βρέθηκε στο πυκνό μελάνωμα, το οποίο αντιστοιχεί σε επίπεδο Clark 5, όπως φαίνεται στην εικόνα. Τα αποτελέσματα αυτά παρείχαν επιπλέον στοιχεία πως τα συγκεκριμένα exomiRNAs σχετίζονται με την εμφάνιση μελανώματος *in situ*. Τέτοια δείγματα περιλαμβάνουν καρκινικά κύτταρα, όπως επίσης κύτταρα στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, τα οποία ρυθμίζουν την καρκινογένεση ([Susan R. Pfeffer, 2015](#)).



Εικόνα 34: Η υπερέκφραση των εικονιζόμενων miRNAs σχετίζεται με το στάδιο του μελανώματος, σύμφωνα με τα επίπεδα Clark. Στο επίπεδο 1 βρίσκεται ο λιγότερο επιθετικός καρκίνος, ενώ στο 5 ο πιο επιθετικός ([Susan R. Pfeffer, 2015](#)).

Το 50% του μεταστατικού δερματικού κακοήθους μελανώματος (CMM) οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου BRAF. Η αντιμετώπιση αυτού του τύπου με MAPKis (Mitogen Activated Protein Kinase pathway inhibitors) θεραπεία δε φέρει μεγάλης διάρκειας αποτελέσματα, λόγω αντίστασης. Στη μελέτη αυτή οι ερευνητές εκτίμησαν τα επίπεδα των miRNAs με σκοπό την ταυτοποίηση προγνωστικών βιοδεικτών στο πλάσμα των δειγμάτων ασθενών με κακοήθες μελάνωμα με μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF, οι οποίοι αντιμετωπίζονταν με θεραπεία MAPKis. Οι ασθενείς στους οποίους βρέθηκαν υψηλά ποσοστά εξωκυττάρων κυστιδίων let-7g-5p είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα ελέγχου της νόσου. Ασθενείς με υψηλά επίπεδα του miR-497-5p είχαν μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου. Αυτό το αποτέλεσμα είναι μία πρώτη αναφορά της σχέσης μεταξύ των επιπέδων των miRNAs και του αποτελέσματος της θεραπείας του δερματικού κακοήθους μελανώματος ([Fernanda Costa Svedman, 2018](#)).

Η υψηλή έκφραση του miR-497-5p δείχνει να αναστέλλει τις πρωτεΐνες MEK1, ERK1, RAF1, επομένως να λειτουργεί ογκοκατασταλτικά. Σε μετεγχειρητικές μεταστάσεις από ασθενείς με τύπους 3, 4 CMM, αυξημένα επίπεδα του συγκεκριμένου miRNA συσχετίζονται με παρατεταμένη επιβίωση ύστερα από επανεμφάνιση, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί. Επιπλέον, μία αύξηση των επιπέδων του miR-497 έχει συσχετιστεί με ευαισθησία στη χημειοθεραπεία στις κυτταρικές σειρές του οστεοσαρκώματος. Από την άλλη χαμηλή έκφραση ίσως οδηγεί σε αντίσταση στη θεραπεία των καρκινικών κυτταρικών σειρών του πνεύμονα και της στομάχου. Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη ο miR-497-5p ταυτοποιήθηκε ως προγνωστικός δείκτης της θεραπείας των ασθενών με CMM με MAPKis ([Fernanda Costa Svedman, 2018](#)).



Εικόνα 35: Ανάλυση Kaplan-Meier που αναπαριστά τη σχέση μεταξύ των επιπέδων του miR-497-5p με την επιβίωση άνευ εξέλιξης νόσου, κατά τη διάρκεια της θεραπείας με MAPKis, σε 25 ασθενείς με CMM ([Fernanda Costa Svedman, 2018](#)).

6.4.1.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΩΟΘΗΚΩΝ

Η ομάδα του Taylor ήταν η πρώτη που απεικόνισε τη σημασία των exomiRs ως διαγνωστικούς βιοδείκτες για τον καρκίνο των ωοθηκών. Χρησιμοποιώντας 8 ήδη επικυρωμένα miRNAs (miR-21, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-141, miR-205, miR-214), έδειξαν τη συσχέτισή τους με καρκινικά miRNAs, καθώς και την ικανότητά τους να διαχωρίσουν τις καλοήθειες νόσους των ωοθηκών από το θηλωματώδες αδενοκαρκίνωμα των ωοθηκών ([Rahul Bhome, 2018b](#)).

Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, η Hannafon και οι συνεργάτες της, περιέγραψαν κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων θηλαστικών (MCF10A) και

πολλαπλές σειρές καρκινώματος μαστού (MCF7, MDA231), δείχνοντας πως ο miR-1246 ήταν εμπλουτισμένος σε εξωσώματα προερχόμενα από τον όγκο. Με τη χρήση xenografts απέδειξαν ότι ο miR-1246 βρισκόταν σε αφθονία στο πλάσμα των εμφυτευμένων επίμυων από ότι στον έλεγχο, συμπεραίνοντας ότι τα εξωσώματα που προέρχονται από τον όγκο συμβάλλουν με τη σειρά τους σε όλα τα κυκλοφορούντα εξωσώματα, τα οποία μπορούν εύκολα να απομονωθούν. Ο Eichelser και οι συνεργάτες του, έδειξαν πως το εξωσωμικό miR-373 στον ορό ήταν εξαιρετικά υψηλό σε επιθετικούς τύπους καρκίνου (triple/negative tumors), σε σχέση με τους ορμονοεξαρτώμενους όγκους (Luminal tumors) και την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η μεταμόσχευση του πλασμιδίου που κωδικοποιεί τον miR-373 στα MCF7 κύτταρα, οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ένα λειτουργικό εξωσωμικό δείκτη ([Rahul Bhome, 2018b](#)).

6.4.1.4 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Έχει βρεθεί πως ο miR-141 βρίσκεται αυξημένος στον ορό των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη. Ο Li και οι συνεργάτες του έδειξαν πως ο συγκεκριμένος δείκτης βρισκόταν σε αφθονία στα εξωσώματα του ορού από ότι σε όλο τον ορό και πως τα επίπεδά του ήταν τέσσερις φορές υψηλότερα στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη υπερτροφία του προστάτη και την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, ο miR-141 είναι ικανός να διαχωρίσει τη μεταστατική νόσο από την εντοπισμένη με ευαισθησία και ειδικότητα που ξεπερνούν το 80% ([Rahul Bhome, 2018b](#)).

Ο Huang, ανακάλυψε τη σχέση του εξωσωμικού miR-1290 και του miR-375, με τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ανθεκτικό καρκίνο του προστάτη έπειτα από ολική εκτομή του, δημιουργώντας ένα μοντέλο παρακολούθησης περιλαμβάνοντας τα συγκεκριμένα exomiRs και το PSA (Prostate Specific Antigen) και το χρόνο αποτυχίας της ορμονοθεραπείας. Παρομοίως, ο Bryant ανακάλυψε πως τα exomiRs του πλάσματος μπορούν να προβλέψουν την επανεμφάνιση της νόσου έπειτα από ολική προστατεκτομή. Σε αυτή τη μελέτη ο miR-141 και ο miR-375 βρίσκονταν αυξημένοι στα εξωσώματα και τα μικροκυστίδια του πλάσματος ([Rahul Bhome, 2018b](#)).

6.4.1.5 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ / ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος στις γυναίκες παγκοσμίως και ο τρίτος πιο συχνός στους άντρες. Η πρόγνωση σχετίζεται με το στάδιο όταν γίνεται η διάγνωση, με το 90% των θανάτων να έχουν προληφθεί ένα η διάγνωση είχε γίνει σε πρώιμο στάδιο. Παρόλο που τα ποσοστά επιβίωσης από καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν βελτιωθεί λόγω πρώιμης διάγνωσης, η έλλειψη υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, καθώς και η επεμβατικότητα και το κόστος των εξετάσεων (πχ κολονοσκόπηση), κρίνουν απαραίτητη την εύρεση δεικτών μη επεμβατικών με υψηλή ειδικότητα, οι οποίοι να προσδιορίζουν τον καρκίνο στα πρώιμα σταδιά του ([Xiangxiang Liu, 2018](#)).

Ο Liu και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν μία μελέτη για την ανακάλυψη ειδικών βιοδεικτών στο περιφερικό αίμα, με σκοπό την πρώιμη διάγνωση και πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Έπειτα από την απομόνωση και την επιλογή οκτώ miRNAs, δύο μόνο βρέθηκαν απορυθμισμένα μεταξύ ασθενών με καρκίνο και υγιούς ομάδας ελέγχου. Ο miR-27a και ο miR-130a φάνηκαν να σχετίζονται με τη διάγνωση πολλών τύπων καρκίνου όπως το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του μαστού, όμως έδειξαν να είναι και πιθανοί διαγνωστικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, πράγμα το οποίο μετέπειτα επικυρώθηκε ([Xiangxiang Liu, 2018](#)).

Πιο συγκεκριμένα, ανακαλύφθηκε πως ο miR-27a προάγει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την επεμβατικότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επίσης, ο miR-130a βρέθηκε αυξημένος στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και φάνηκε να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη και την κινητικότητα. Πέρα από την πρώιμη διάγνωση που παρέχουν, είναι ικανοί για πρόγνωση της επιβίωσης, καθώς τα αυξημένα επίπεδά τους στο πλάσμα συσχετίστηκαν με φτωχή πρόγνωση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου ([Xiangxiang Liu, 2018](#)).

miRNA	Supporting evidence	Limitations	Source
Colorectal cancer			
miR-21	<ul style="list-style-type: none"> • One of the most abundant miRNAs 	<ul style="list-style-type: none"> • Not cancer specific 	Serum, Plasma
	<ul style="list-style-type: none"> • Highly upregulated miRNAs in solid tumors 	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulated by inflammation 	
	<ul style="list-style-type: none"> • One of the most studied diagnostic circulating miRNAs 	<ul style="list-style-type: none"> • Affected by hemolysis 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Suitable for early diagnosis 		

miR-29a	<ul style="list-style-type: none"> • Unaffected by hemolysis 		Serum, Plasma
	<ul style="list-style-type: none"> • Suitable for early diagnosis 		
miR-92a	<ul style="list-style-type: none"> • One of the most abundant miRNAs 	<ul style="list-style-type: none"> • Influenced by hemolysis 	Serum, Plasma
Gastric cancer			
miR-21	<ul style="list-style-type: none"> • Same as above 	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulated by <i>H. pylori</i> infection 	Serum, Plasma
miR-27a	<ul style="list-style-type: none"> • Well-established oncogene 	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulated by <i>H. pylori</i> infection 	Serum, Plasma
	<ul style="list-style-type: none"> • Unaffected by hemolysis 		
Hepatocellular carcinoma			

miR-21	• Same as above	• Upregulated by hepatitis virus infection	Serum, Plasma, Exosome
miR-192	• Suitable for early diagnosis	• Upregulated by hepatitis virus infection	Serum, Plasma
Pancreatic cancer			
miR-21	• Same as above	• Same as above	Serum, Plasma, Exosome
miR-223	• Unaffected by hemolysis	• Influenced by aspirin	Plasma, Whole blood
	• Overexpressed in early stage pancreatic cancer		

Πίνακας 3: Οι σημαντικότεροι miRNA δείκτες και η διαγνωστική τους αξία στους όγκους του γαστρεντερικού συστήματος, καθώς και οι περιορισμοί στη χρήση τους ([Kunitoshi Shigeyasu, 2017](#)).

Δύο ακόμη βιοδείκτες με μεγάλες προσδοκίες είναι ο miR-125a-3p και ο miR-320c. Σε μία μελέτη η οποία διεξήχθη με σκοπό τον προσδιορισμό δεικτών, οι οποίοι μπορούν να διαγνώσουν τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σε πρώιμα στάδια, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως αυτοί οι δύο δείκτες βρίσκονταν σταθερά αυξημένοι στους ασθενείς με καρκίνο και συνεπώς είναι ικανοί να διαχωρίσουν τον υγιή πληθυσμό. Ο miR-125a-3p είναι ένας miRNA δείκτης του οποίου η έκφραση εντοπίστηκε με διακυμάνσεις σε πολλές ασθένειες, όπως στον συστηματικό ερυθρεματοειδή λύκο, τη νόσο μογατογοα, τον καρκίνο του παγκρέατος και

τον καρκίνο της χοληφόρου οδού. Επίσης, μία ακόμη ιδιαιτερότητα του δείκτη είναι η πρόκληση ενίσχυσης της διαγνωστικής δύναμης του CEA για το πρώιμο στάδιο του καρκίνου του παχέος εντέρου ([Lei Zhao, 2017](#)).

Early stage colon cancer relevant miRNA markers (Stage I and Stage II compared with normal controls).

Column ID	p-value	Mean (CC)	Mean (N)	MeanRatio (CC/N)	Description
miR-1343	0.001229	6.36552	6.597	0.851758	Down
miR-125a-5p	0.002274	10.5739	10.8508	0.825371	Down
miR-376a-3p	0.002799	4.32724	4.56082	0.850522	Down
miR-381-3p	0.003413	12.8012	12.9714	0.888673	Down
miR-543	0.003669	8.78779	9.00972	0.857414	Down
miR-128	0.004384	15.7208	15.9592	0.847689	Down
miR-139-5p	0.0045	9.85424	10.0315	0.884386	Down
miR-9-5p	0.039994	14.2345	14.4432	0.865361	Down
miR-125a-3p	0.003511	9.13797	8.99687	1.10275	Up
miR-320c	0.007102	8.53069	8.28988	1.18166	Up
miR-320d	0.0084	6.94879	6.70643	1.18292	Up
miR-4792	0.0088	5.25523	5.02512	1.17293	Up
miR-320b	0.009362	10.8133	10.584	1.17228	Up
miR-320a	0.009647	15.325	15.0996	1.16913	Up
miR-378d	0.024233	8.18391	8.01852	1.12146	Up
miR-378a-3p	0.028654	13.6745	13.5519	1.08872	Up
miR-1246	0.030753	6.43356	6.16737	1.20263	Up
miR-378c	0.03253	8.58289	8.42201	1.11797	Up

CC = Colon Cancer; N = Normal Control.

Εικόνα 37: MiRNA δείκτες που σχετίζονται με τη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο στάδιο, καθώς και η σύγκριση των τιμών με τον υγιή πληθυσμό.

CC : καρκίνος του παχέος εντέρου, N : φυσιολογικός πληθυσμός ([Lei Zhao, 2017](#)).

6.4.2 ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ lncRNAs

Τα lncRNAs (long non-coding RNAs) είναι αντίγραφα μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία λειτουργούν χωρίς εμφανή λειτουργία κωδικοποίησης πρωτεϊνών. Τα lncRNAs είναι παρών στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, DNA, RNA. Έχει αποδειχθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες μέσω άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης

με την έκφραση των γονιδίων σε πολλούς καρκίνους. Παραδείγματος χάρη, το lncEGFR προωθεί τη διαφυγή του ανοσοποιητικού στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα διεγείρωντας τη διαφοροποίηση των T-ρυθμιστικών κυττάρων. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός πως λειτουργούν ως αγγελιαφόροι στην επικοινωνία των κυττάρων. Πρόσφατα, τα lncRNAs έχει αποδειχθεί να λειτουργούν ως ρυθμιστές της απόπτωσης, της διαφοροποίησης και της μετανάστευσης και επιπλέον φαίνεται να διεγείρουν την αγγειογένεση. Συνεπώς η απορύθμιση αυτών των γονιδίων πιθανότατα επηρεάζει το μικροπεριβάλλον του όγκου και ίσως να μπορεί να ρυθμίσει κρίσιμες συμπεριφορές του όγκου ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).

Τα εξωσώματα ρυθμίζουν τη διαφυγή καρκινικών κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού εκλύοντας ανοσορυθμιστικά μόρια, όπως TGFβ, FasL, HSP72. Το lncARSR υπερεκφράζεται στα RCC (καρκινικά νεφρικά κύτταρα) ανθεκτικά σε sunitinib κύτταρα, και έτσι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταδώσουν ικανότητες επιβίωσης σε άλλα κύτταρα μέσω εξωσωμάτων, τα οποία περιέχουν αυτό το μόριο. Το γεγονός αυτό αποκάλυψε πως τα lncRNAs (lncUCA1, lncROR) μπορούν να ασκήσουν κρίσιμες λειτουργίες στη διαδικασία της καρκινικής μετάστασης ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).

Εξωσωμικό lncRNA και αγγειογένεση

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, τα εξωσώματα τα οποία απελευθερώνονται από τα διαφορετικά κύτταρα, έχουν φανεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της καρκινικής αγγειογένεσης. Τα lncRNAs τα οποία εκκρίνονται από τα εξωσώματα του όγκου, μπορούν να ρυθμίσουν τα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα, αυξάνοντας την έκφραση των μεμβρανικών μορίων και των διαλυτών παραγόντων τους. Για παράδειγμα, το lncRNA HOTAIR υπερεκφράζεται στα κύτταρα του γλοιώματος. Το συγκεκριμένο RNA εισέρχεται στα εξωσώματα που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του γλοιώματος και έπειτα μεταφέρεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στη συνέχεια ρυθμίζει την αγγειογένεση μέσω της αύξησης της έκφρασης του παράγοντα VEGFA. Το lncRNA H19 έχει συνδεθεί με ηπατική καρκινογένεση, μετάσταση και αγγειογένεση. Στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα CD90, το H19 βρίσκεται σε αφθονία στο εσωτερικό των εξωσωμάτων. Στη συνέχεια μεταφέρεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγοντας αγγειογενετικό φαινότυπο, με την αύξηση της παραγωγής και της απελευθέρωσης του παράγοντα της αγγειογένεσης VEGFA. Παρόμοια, τα lncRNAs HOTAIR, MALAT1 αυξάνονται στα εξωσώματα από την αιθανόλη, συμπεραίνοντας πως ίσως πρόκειται για την αγγειογένεση που προκαλείται από το αλκοόλ ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).

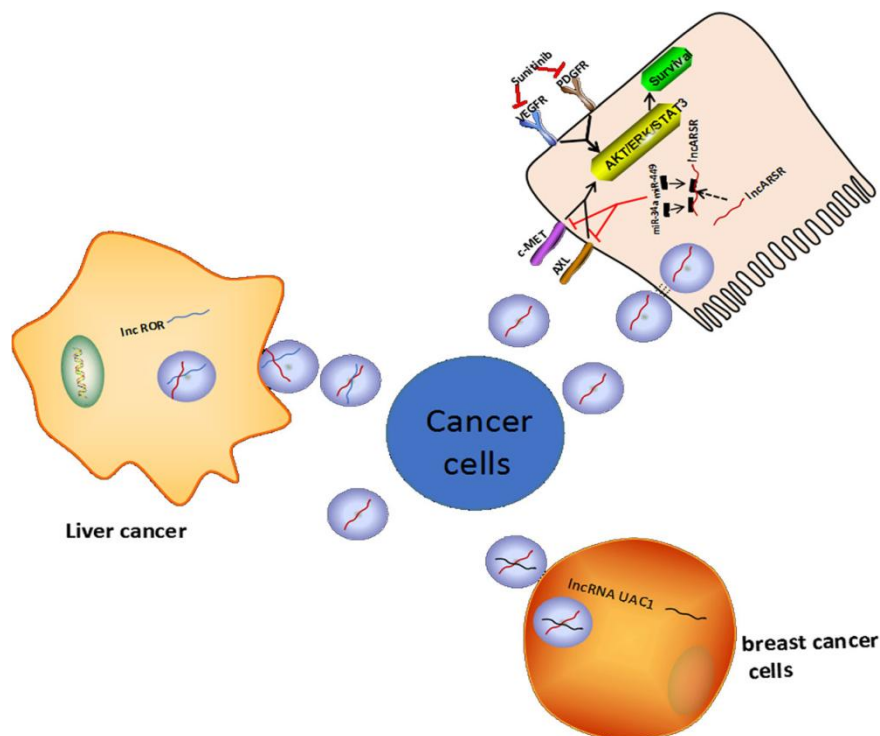
Εξωσωμικό lncRNA και μετάσταση

Η εμπλοκή των εξωσωμάτων τα οποία προέρχονται από τον όγκο έχει αποδειχθεί από επιστημονικές μελέτες. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταστατικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντός τους μέσω εξωσωμάτων που περιέχουν lncRNA, έχουν αποδειχθεί. Παραδείγματος χάριν, το lncRNA MALAT1 υπερεκφράζεται σε ασθενείς με NSCLC και το εξωσωμικό MALAT1 σχετίζεται με το στάδιο του καρκίνου και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις. Στις κυτταρικές σειρές του καρκίνου του πνεύμονα, το συγκεκριμένο γονίδιο επάγει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει την απόπτωσή τους. Το ίδιο φαινόμενο

παρατηρείται και στο γαστρικό καρκίνο, όπου η υπερέκφραση του ZFAS1 σχετίζεται με το στάδιο και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις. Το ZFAS1 παραλαμβάνεται από τα εξωσώματα, αυξάνοντας τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).

Εξωσωμικό lncRNA και αντίσταση στην αντικαρκινική θεραπεία

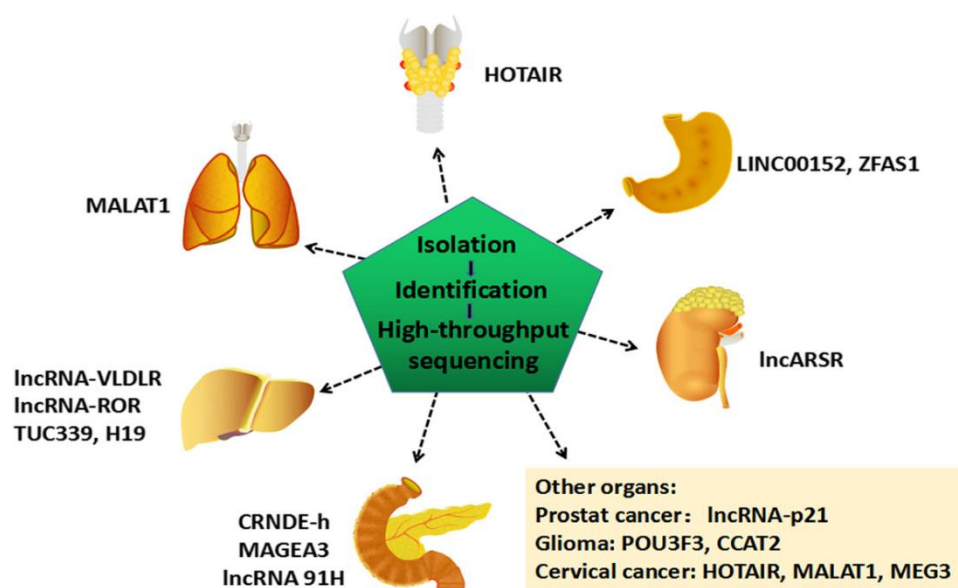
Η αντίσταση στη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου νεφρικών κυττάρων με sunitinib αποτελεί πρόβλημα. Παρατηρήθηκε υπερέκφραση του lncARSR στα καρκινικά νεφρικά κύτταρα (RCC) με αντίσταση στη συγκεκριμένη ουσία, σε σχέση με τα ευαίσθητα. Το εξωσωμικό lncARSR δεσμεύει τα miR-34, miR-449 οδηγώντας σε ενεργοποίηση του μονοπατιού της AKT, EKT, STAT3. Το μονοπάτι αυτό οδηγεί σε αποκατάσταση της μεταγραφής του lncARSR και με τη σειρά του σε θετική ανατροφοδότηση. Όσον αφορά το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ([Fernanda Costa Svedman](#)), το lncVLDLR έχει βρεθεί να ευθύνεται για την αντίσταση σε χημειοθεραπείες, ωστόσο ο μηχανισμός παραμένει ακόμη άγνωστος. Ο παράγοντας TGFβ μπορεί να μειώσει την ευαισθησία HCC κυττάρων σε sorafenib, doxorubicin και το εξωσωμικό lncROR βοηθά τα κύτταρα παραλήπτες να αποκτήσουν χημειοαντίσταση, ενεργοποιώντας το TGFβ μονοπάτι σηματοδότησης ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).



Εικόνα 38: Το lncARSR εισέρχεται στα εξωσώματα και εκκρίνεται από ανθεκτικά σε sunitinib καρκινικά νεφρικά κύτταρα, μεταφέροντας την αντίσταση στα κύτταρα παραλήπτες. Στον καρκίνο του μαστού υπεύθυνο μόριο για την αντίσταση στην θεραπεία με tamoxifen είναι το lncUAC1 ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).

Τα εξωσωμικά lncRNAs ως νέοι πιθανοί καρκινικοί βιοδείκτες

Με την απόδειξη των αποτελεσμάτων των lncRNAs στα καρκινικά κύτταρα και γενικότερα στην εξέλιξη του καρκίνου, τα εξωσώματα αναδείχθηκαν ως πολύτιμος βιοδείκτης. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, αναδύθηκαν αρκετοί lncRNA βιοδείκτες, όπως ο MAGEA3. Επίσης, τα επίπεδα του CRNDE συσχετίστηκαν με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και με κακή κλινική έκβαση. Επιπρόσθετα, υψηλά επίπεδα του συγκεκριμένου μορίου σχετίζονται με προχωρημένο στάδιο, λεμφικές μεταστάσεις ή απομακρυσμένες. Στον καρκίνο του στομάχου, βρέθηκε το LINC00152, ενώ στην ομάδα ελέγχου δεν εντοπίστηκε. Επιπλέον, μία παρόμοια μελέτη έδειξε πως το ZFAS1 υπερεκφράζεται στα εξωσώματα του ορού των ασθενών με καρκίνο του στομάχου και η υπερέκφραση του σχετίζεται με το στάδιο και λεμφικές μεταστάσεις (εικόνα) ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).



Εικόνα 39: Εξωσωμικά lncRNAs τα οποία εκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και συνιστούν πιθανό βιοδείκτη για τη διάγνωση, αλλά και την πρόγνωση ([Zhenqiang Sun, 2018](#)).

6.4.3 ΕΞΩΣΩΜΙΚΟ DNA (exoDNA)

Πηγές DNA και RNA στη μικροκυκλοφορία έχουν βρεθεί στο εσωτερικό των εξωσωμάτων. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν τη χρησιμότητα του exoDNA στην ανίχνευση μεταλλαγών και την πρώιμη διάγνωση γνωστών καρκίνων. Οι επιστήμονες πιστεύουν πως τα εξωσώματα προστατεύουν το περιεχόμενο του DNA από τη διάσπασή του μέσω των νουκλεασών στο πλάσμα, γεγονός που οδηγεί στην ύπαρξη του DNA σε υψηλό μοριακό βάρος, σε σχέση με το ctDNA το οποίο ανιχνεύεται σε 170 ζεύγη βάσεων. Αυτό επιτρέπει μεγαλύτερη ανάλυση και ευαισθησία του μοριακού προφίλ του υψηλής ποιότητας υλικού ([Vincent Bernard, 2019](#)). Εδώ και χρόνια οι επιστήμονες ασχολούνται με την ύπαρξη δίκλωνου DNA στο εσωτερικό των εξωσωμάτων. Για πρώτη φορά εντοπίστηκε δίκλωνο DNA, στη μελέτη των Kumar Thakur και των συνεργατών του, στο εσωτερικό των εξωσωμάτων και το οποίο αντιπροσωπεύει ολόκληρο το γονιδίωμα, καθιστώντας το

πολύτιμο εργαλείο για την πρόωπη διάγνωση κακοηθειών, καθώς και των μεταστάσεων ([Basant Kumar Thakur, 2014](#)).

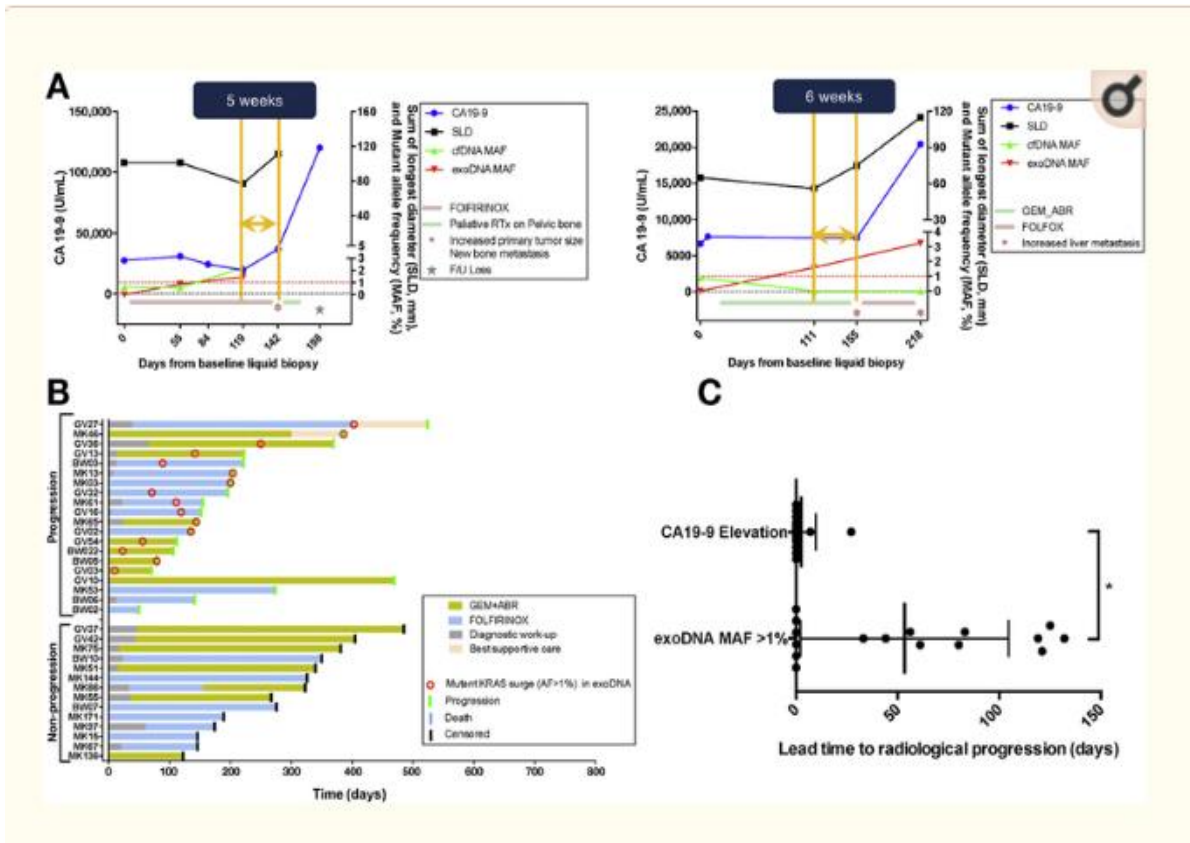
Η μελέτη του Bernard και των συνεργατών του είχε σκοπό τη διερεύνηση της κλινικής χρησιμότητας των exoDNA, ctDNA στον καρκίνο του παγκρέτος. Το exoDNA και το ctDNA εξετάστηκαν για μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS, σε μεταστατικούς αλλά και σε εντοπισμένους όγκους. Πέρα όμως από τη διαγνωστική αξία σε υποβόσκοντες όγκους, μελετήθηκε το exoDNA, καθώς και το ctDNA, όσον αφορά και την προγνωστική τους αξία. Σε μελέτες που έγιναν για την ανίχνευση μεταλλάξεων οδηγών (driver mutations), τα exoDNA, ctDNA συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση, OS (Overall Survival), ωστόσο μόνο το exoDNA αποτέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα έπειτα από πολυπαραγοντική ανάλυση. Στη συγκεκριμένη μελέτη οι ερευνητές προσπάθησαν να συνδιάσουν το exoDNA ή το ctDNA με το CA19-9, ώστε να δείξουν πως η πολυπαραγοντική προσέγγιση εμφανίζει αξιόπιστα αποτελέσματα. Πράγματι, οι βιοδείκτες αυτοί έδειξαν σημαντική κλινική χρησιμότητα ως προγνωστικοί παράγοντες. Η παρουσία τους υποδηλώνει πως οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά και να αντιμετωπίζονται με πιο επιθετική θεραπεία ([Vincent Bernard, 2019](#)).

Πλεονέκτημα των βιοδεικτών της υγρής βιοψίας είναι η δυνατότητα μακροπρόθεσμης παρακολούθησης των ασθενών που βρίσκονται σε θεραπευτική αγωγή. Παρόλο που στη μελέτη δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της εξέλιξης του όγκου και μεταβολών του ctDNA, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του exoDNA KRAS MAF και ενδεχόμενης εξέλιξης (εικόνα). Συγκεκριμένα, ασθενείς με exoDNA KRAS MAF > 1% είχαν 100% πιθανότητες εξέλιξης του όγκου μέσα σε ένα διάστημα των 50 ημερών. Ασθενείς στους οποίους το exoDNA KRAS MAF είναι κάτω του 1%, είχαν 90% πιθανότητες μη εξέλιξης του όγκου μέσα σε ένα έτος. Πιστεύεται πως το ποσοστό του μεταλλαγμένου exoDNA αντιπροσωπεύει την εξέλιξη ενός καλά κρυμμένου όγκου. Τέλος, αποδείχθηκε ο ρόλος του exoDNA, ως πιθανό βιοδείκτη για την παρακολούθηση της κατάστασης της νόσου, έπειτα από πρωταρχική θεραπευτική προσέγγιση (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, αντικαρκινικά) ([Vincent Bernard, 2019](#)).

Στη μελέτη του Mohrman και των συνεργατών του, χρησιμοποιήθηκαν exoNA και cfDNA για την ανίχνευση κοινών μεταλλάξεων των γονιδίων KRAS, BRAF, EGFR. Η ευαισθησία και η ειδικότητα ήταν αρκετά υψηλές, έπειτα από ανάλυση των exoNA, παρόμοιες βέβαια με τις παραμέτρους έπειτα από ανάλυση του cfDNA. Βρέθηκε πως οι ασθενείς με χαμηλή ποσότητα των μεταλλαγμένων exoNA του πλάσματος, είχαν μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης από εκείνους με υψηλή ποσότητα των μεταλλαγμένων. Το ίδιο βέβαια ίσχυε και έπειτα από την ανάλυση του cfDNA. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή η ανάλυση του exoNA καθίσταται πιο εύκολη από ότι η ανάλυση του cfDNA, καθώς το πρώτο προέρχεται από ζώντα καρκινικά κύτταρα ([Lino Möhrmann, 2018](#)).

Στη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε επίσης, πως οι ασθενείς με χαμηλή ποσότητα μεταλλαγμένων exoNA είχαν μεγαλύτερο χρόνο αποτυχίας θεραπείας, TTF (Time to Treatment Failure). Τα αποτελέσματα αυτά ίσχυαν και για το cfDNA. Ο Allenson και οι συνεργάτες του απέδειξαν πως η ποσότητα των μεταλλαγμένων exoNA μπορεί να προβλέψει την επιβίωση άνευ νόσου των ασθενών με εντοπισμένο καρκίνο παγκρέατος. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε πως ασθενείς που είχαν λάβει συστηματική θεραπεία και είχαν σταθερή νόσο (Stable Disease) ή μερική ανταπόκριση (Partial Response) πάνω από 6 μήνες, είχαν μικρότερη μέση

ποσότητα των μεταλλαγμένων exoNA, από ότι εκείνοι χωρίς PS ή SD >6 μήνες. Αυτό το αποτέλεσμα δε φάνηκε με την ανάλυση του cfDNA. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε πως τα επίπεδα των μεταλλαγμένων exoNA πριν τη θεραπεία, σχετίζονται με τη μετέπειτα ανταπόκριση του ασθενούς στη συστημική θεραπεία ([Lino Möhrmann, 2018](#)).



Εικόνα 40: Α Παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου με τη χρήση υγρής βιοψίας. Φαίνεται συσχέτιση μεταξύ του exoDNA KRAS (κόκκινη γραμμή) και της εξέλιξης του όγκου (μαύρη γραμμή). Με τη μπλέ γραμμή απεικονίζεται ο CA19-9, ο οποίος είναι κοινός βιοδείκτης για τον καρκίνο του παγκρέατος, και με την πράσινη γραμμή απεικονίζεται ο ctDNA KRAS για σύγκριση. Η παρακολούθηση 34 ασθενών έδειξε την ικανότητα του exoDNA >1 (κόκκινος κύκλος), να προβλέπει εξέλιξη του όγκου (πράσινοι ράβδοι). C Οι exoDNA KRAS MAF κορυφές δείχνουν μεγαλύτερο χρόνο παραγωγής στην πρόβλεψη εξέλιξης μέσα σε 50 ημέρες, από τη στιγμή κλινικός εμφανούς όγκου με CT scan, σε σχέση με το CA19-9 ([Vincenz Bernard, 2019](#)).

Ακόμη μία μελέτη έδειξε την παρουσία cfDNA στο εσωτερικό των εξωσωμάτων από τα ούρα, η οποία διεξήχθη για την ανίχνευση μεταλλάξεων που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Συμπέρασμα της μελέτης είναι πως το exoDNA από τα ούρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο της υγρής βιοψίας για τη διάγνωση του καρκίνου ουροδόχου κύστης αλλά και για άλλες κακοήθειες. Υπάρχει βέβαια αντιπαράθεση σχετικά με το εάν το DNA βρίσκεται στο εσωτερικό των εξωσωμάτων ή στην επιφάνεια, όμως παρέχει πληροφορίες σχετικά με γενετικές αλλαγές του όγκου και συνεπώς αποτελεί χρήσιμη πηγή. Επίσης, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το 90% του exoDNA των ούρων

ταιριάζει με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς, οδηγώντας στο ότι προέρχεται από κύτταρα ξενιστή ([Dong Hyeon Lee, 2018](#)).

Υγρή βιοψία : εξωσώματα. Ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Ναστούλη Αναστασία

Η πλειοψηφία των βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας, βοηθούν στην παρακολούθηση και τη λήψη αποφάσεων όσον αφορά τον καρκίνο, βασιζόμενοι στην ανάλυση από την πρωτοπαθή εστία ή μετάσταση. Ωστόσο, ο καρκίνος εξελίσσεται συνεχώς σε μοριακό επίπεδο καθιστώντας ιδιαίτερα προκλητική την παρακολούθηση της εξέλιξής του. Λύση στο πρόβλημα της ετερογένειας μιας νεοπλασίας, φαίνεται πως δίνει η μέθοδος της υγρής βιοψίας. Πέρα από την απομόνωση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, η ανίχνευση ctDNA και εξωσωμάτων, έρχονται στο προσκήνιο δυναμικά. Κατά τη διάρκεια της επόμενης δεκαετίας, η χρήση των παραπάνω βιοδεικτών θα οδηγήσει στην εφαρμογή της αναφερόμενης ως Ιατρικής Ακρίβειας σε πραγματικό χρόνο (*real-time precision medicine*) ([William L Hwang, 2016](#)).

Η εφαρμογή της υγρής βιοψίας και συγκεκριμένα η ανάλυση των εξωσωμάτων, βασίζεται στην ανάλυση υποκυτταρικών κυστιδίων και στα συστατικά που περιέχουν. Σε σύγκριση με άλλα κυστίδια, όπως τα αποπτωτικά σωματίδια και τα μικροκυστίδια, τα εξωσώματα είναι περισσότερο ομογενή ως προς το μέγεθος και την εμφάνιση, γεγονός που τα κάνει εύκολα ανιχνεύσιμα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των εξωσωμάτων σε σύγκριση με άλλα σωματίδια είναι πως βρίσκονται σε σχεδόν κάθε βιολογικό υγρό και είναι επίσης σταθερά στην κυκλοφορία. Έτσι, μπορούν με τις κατάλληλες μεθόδους να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικό εργαλείο. Σε αυτό παίρνει μέρος και η έκφραση των δεικτών που περιέχουν στην επιφάνειά τους, οι οποίοι τα κάνουν να ξεχωρίσουν από άλλα σωματίδια. Τέλος, σημαντικό είναι το περιεχόμενο των νουκλεϊκών οξέων, τα οποία δείχνουν την κατάσταση των μεταλλαγών στο πρωτότυπο κύτταρο.

Τα εξωσώματα αναφέρονται ως εξαιρετικά σημαντικός βιοδείκτης, λόγω του περιεχομένου του και ειδικότερα του mRNA το οποίο προάγει την αγγειογένεση και τη μετάσταση. Απομονώνοντας εξωσώματα από διάφορα βιολογικά υγρά παρέχεται η δυνατότητα ανάλυσης των συγκεκριμένων σωματιδίων και έτσι η ανίχνευση μεταλλάξεων, παραλλαγών ματίσματος και συγχωνεύσεων γονιδίων, όπως επίσης ο χαρακτηρισμός της έκφρασης των γονιδίων. Σε σύγκριση με τα θραύσματα του ctDNA, από τα οποία μόνο δύο αντίγραφα είναι ουσιαστικά παρόντα στο καρκινικό κύτταρο προέλευσης, το mRNA το οποίο προέρχεται από γονίδιο το οποίο υπερεκφράζεται, μπορεί να έχει χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο και να περιέχεται στην κυκλοφορία σε υψηλές συγκεντρώσεις. Έτσι η ανάλυση του mRNA αποτελεί πλεονέκτημα, ειδικότερα σε ασθενείς με ελάχιστες ποσότητες ανιχνεύσιμου ctDNA ([Giulia Siravegna, 2017](#)).

Σημαντικό πλεονέκτημα της ανάλυσης των εξωσωμάτων έναντι των CTCs και του ctDNA είναι πως μέσα σε αυτά τα μικρά κυστίδια βρίσκονται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες που χρειάζονται για μία μελέτη. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες, στο εσωτερικό των εξωσωμάτων ανιχνεύονται μεγάλες συγκεντρώσεις ctDNA. Ωστόσο, υπάρχουν πάντα προκλήσεις όσον

αφορά τη μεταφορά των *in vitro* αποτελεσμάτων σε *in vivo*. Οι περισσότερες μελέτες που γίνονται χρησιμοποιούν κυτταρικές καλλιέργειες και τα εξωσώματα λαμβάνονται από την επεξεργασία αυτών. Ο πληθυσμός αυτός όμως είναι ομογενής σε σχέση με τον ετερογενή πληθυσμό εξωσωμάτων, τα οποία παράγονται από διαφορετικά είδη κυττάρων στο εσωτερικό του οργανισμού, οδηγώντας σε δυσκολία ερμηνείας των αποτελεσμάτων ([Jadwiga Jablonska, 2019](#)).

Μελέτες οι οποίες αναλύουν τον ορό ασθενών είναι εξαιρετικά σπάνιες. Αυτό προκύπτει καθώς δεν υπάρχουν δείκτες, οι οποίοι να επιτρέπουν την ασφαλή ταυτοποίηση των εξωσωμάτων τα οποία προέρχονται από τον όγκο, με εξαίρεση το μελάνωμα. Παρόλα αυτά, συνεχίζουν να κινούν το ενδιαφέρον και να αποτελούν ιδανικούς βιοδείκτες για τη διάγνωση, και όχι μόνο, του καρκίνου. Επιπρόσθετα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά εμβόλια κατά του καρκίνου ή συστήματα μεταφοράς φαρμάκων στη θεραπεία κατά του καρκίνου. Στοχοποιώντας τα εξωσώματα που προέρχονται από τον όγκο ή αναστέλλοντας την απελευθέρωσή τους ίσως να παρέχει μία σημαντική θεραπευτική προσέγγιση ([Jadwiga Jablonska, 2019](#)).

Πολλά από τα καινούργια υποψήφια φάρμακα, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, είναι αρκετά ασταθή στο εσωτερικό του οργανισμού, συνεπώς δημιουργείται πρόκληση για μία επιτυχημένη θεραπεία. Ωστόσο τα εξωσώματα μιμούνται τα φυσιολογικά συστήματα μεταφοράς ουσιών, επιτρέποντας έτσι τη μεταφορά αυτών των βιολογικών μορίων. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους και της σύστασης τους μπορούν να αποφύγουν τη φαγοκύτωση ή την αποδιοργάνωση τους από τα μακροφάγα και επίσης να κυκλοφορούν στον οργανισμό για μεγάλη χρονική περίοδο. Αντίθετα από άλλα συστήματα νανοκυστιδίων, όπως τα λιποσώματα, είναι ικανά να αποφύγουν τα λυσοσώματα και να μεταφέρουν ουσίες απευθείας στο κυτταρόπλασμα. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των εξωσωμάτων είναι η ικανότητά τους να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood Brain Barrier). Ο εντοπισμός και η ανίχνευση τους *in vivo* αποτελεί ανάγκη για την κατανόησή τους, σχετικά με τον αντίκτυπο που έχουν στα όργανα στόχους ([Dinh Ha, 2016](#)).

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει τεχνική απομόνωσης των εξωσωμάτων με υψηλή ευκρίνεια. Οι μέθοδοι απομόνωσης προσφέρουν χαμηλές ποσοότητες εξωσωμάτων και η μεγάλη κλίμακα παραγωγής τους για κλινικές δοκιμασίες και έγκριση φαρμάκων είναι ακριβή. Είναι αρκετά πιθανό στο μέλλον η κλινική χρήση των εξωσωμάτων να απαιτεί την δημιουργία υβριδικού τύπου κυστιδίων, με πιθανότατα ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Για να σχεδιαστούν τέτοιου είδους συστήματα θα πρέπει να έχουν μελετηθεί λεπτομερώς η κλινική αποτελεσματικότητα, καθώς και οι παράμετροι ασφαλείας. Για να γίνουν επίσης λειτουργικά τα εξωσώματα πρέπει να μελετηθούν συνδυαστικές ουσίες και μέθοδοι για την ενεργή στόχευση μορίων. Ακόμη και εάν η βιολογία των εξωσωμάτων είναι γνωστή, περιλαμβάνουν ετερογενή συστατικά, τα οποία μπορούν να εμφανίσουν ανοσογονικά (ανοσοδιέγερση ή ανοσοκαταστολή) αποτελέσματα βασιζόμενα στη φύση του κυττάρου δότη. Ο ρόλος των εξωσωμάτων στην εξέλιξη του όγκου αποτελεί τεράστια πρόκληση. Μία από τις πολλές προσεγγίσεις είναι ο σχεδιασμός μιμητών των εξωσωμάτων με την ικανότητα να ξεπερνούν οποιοδήποτε μειονέκτημα, όπως τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις του ανοσοποιητικού ([Dinh Ha, 2016](#)).

Liquid Biopsy : exosomes. Their role in the confrontation of cancer.

Nastouli Anastasia

Nowadays, the majority of the biomarkers that are being used, help into monitoring and coming into decision for cancer treatment, based on the analysis of primary region or metastasis. Although, cancer is continuously evolving in molecular level, leading to difficulties as for monitoring of its progression. The solution of this problem is given by the method of liquid biopsy. Despite of the isolation of circulating tumour cells, the capture of circulating tumour DNA and exosomes, comes to the surface dynamically. During the next decade the use of the previously reported biomarkers will lead to the application of the real time precision medicine.

The application of liquid biopsy and more specifically the analysis of exosomes is based on the analysis of subcellular vesicles and their ingredients. Compared with other vesicles, such as apoptotic bodies and microvesicles, exosomes are more homogenic as their size and appearance, thus they are easily detected by electronic microscope. Another advantage of exosomes is that are tend to be found in almost every biological fluids and are steady in the circulation. So that with the right methods they can be isolated and used as diagnostic tools. The expression of their surface markers takes place in that, as they make the exosomes stand out of other vesicles. Last but not least, the content of nucleid acids is important as they show the condition of mutations in the primary cell.

Exosomes seems to be extremely important biomarkers, because of their contents and especially mRNA that induces angiogenesis and metastases. Isolating exosomes from biological fluids provides the possibility of analysis of these exact vesicles and thus the detection of mutations, splice variants and gene fusions, as well as gene expression profiling. In comparison with ctDNA fragments, of which only two copies are actually present in cancer cell, mRNA that originates from the overexpressed gene could have thousands of copies per cell and be present into circulation in high concentrations. In conclusion, analysis of exosomal mRNA might have advantages, especially in patients with limited amounts of detectable ctDNA.

One of the most important advantages of the analysis of exosomes, against the analysis of CTCs or ctDNA, is that inside those small vesicles are being hidden all the important informations that are needed for a study. According to recent studies inside of exosomes are being detected high amounts of ctDNA. Although, there are many limitations concerning the transportation of the results in vivo. Most of the

studies use cell cultures and the exosomes result from the elaboration of them. This cell culture is homogenic in comparison with exosomes that are being heterogenous, as a consequence of their production from different cell types inside the organism, leading to the misunderstanding of the results.

Studies that analyse patients' serum are extremely rare, because there are not markers that allow the safe identification of tumour-originate exosomes, except melanoma. Nevertheless, are being reported as ideal biomarkers of cancer diagnosis. Also, they could be useful as potential vaccines against cancer or drug transfer system in cancer therapy. Targeting tumour-originate exosomes or inhibiting their release, might lead to an important therapeutic approach.

Many of the newly candidate drugs, such as proteins and nucleid acids, are extremely unstable inside of the organism, thus a challenge is created for a succesful approach. Although, exosomes are imitating psysiological drug transfer systems, allowing the transfer of these biological molecules. Due to their small size and composition, they could avoid phagocytosis or their disruption by macrophages and also they could circulate for a long period. Unlike other nanovesicles systems, such as liposomes, exosomes are capable of the avoidance of lysosomes and tranfer substances into the cytoplasm. One of their most important advantage is their capability to penetrate the blood brain barrier. Their localization and detection in vivo are urgent for their understanding, concerning their impact on target organs.

Until now there is not an isolation technique with high clearance. The isolation methods are giving low amount of exosomes and their large production scale for trials and drug approval is too expensive. Its possible in the future exosomes use into practice to demand the creation of hybrid vesicles with possible side effects. For the design of such systems, clinical effectiveness has to be studied in detail, as well safety parameters. Also, methods and combinatorial substances for the active target of molecules must be studied for the exosomes to be operational. Even if the biology of exosomes is known, they are full of heterogeneous components that could create immunogenic results, based on the nature of donor cell. The role of exosomes in tumour evolution is a challenge. One of many approaches is the design of exosomes imitators, that could avoid any disadvantage, such as adverse immune reactions.

*BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***Uncategorized References**

- (GCO) GCO. 2018. In: Organisation WH, editor.
- Aanei YAFaC. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research* 7(5):1016–1036.
- Aditi P. Singh SLaHC. 2017. Circulating DNA in EGFR-mutated lung cancer. *Annals of translational medicine* 5(18):379.
- Alfredo Tartarone RL, Maria Grazia Rodriquez, Giuseppina Mambella, Giuseppe Calderoni, Giovanni Bozza and Michele Aieta. 2017. Molecular characterization and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic disease* 9(13):1359–S1363.
- Attardi AMKaLD. 2018. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death and Differentiation* 25(1):93–103.
- Bardelli A, Pantel K. 2017. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell* 31(2):172-179.
- Basant Kumar Thakur HZ, Annette Becker, Irina Matei, Yujie Huang, Bruno Costa-Silva, Yan Zheng, Ayuko Hoshino, Helene Brazier, Jenny Xiang, Caitlin Williams, Ruth Rodriguez-Barrueco, Jose M Silva, Weijia Zhang, Stephen Hearn, Olivier Elemento, Navid Paknejad, Katia Manova-Todorova, Karl Welte, Jacqueline Bromberg, Héctor Peinado and David Lyden. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research* 24(6): 766–769.
- Charles C. 2010. CECIL ΒΑΣΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ 664 p.
- Dinh Ha NYaVN. 2016. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* 6(4):287–296.
- Dong Hyeon Lee HY, Sanghui Park, Jeong Seon Kim, Young-Ho Ahn, Kihwan Kwon, Donghwan Lee and Kwang Hyun Kim. 2018. Urinary Exosomal and cell-free

DNA Detects Somatic Mutation and Copy Number Alteration in Urothelial Carcinoma of Bladder. *Scientific Reports* 8.

Douglas S. Micalizzi SMADAH. 2017. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Development* 31(18):1827–1840.

Fabiana Henriques Machado de Melo JSO, Viviani Olivastro Bressani Sartorelli, and Wagner Ricardo Montor. 2018. Cancer Chemoprevention: Classic and Epigenetic Mechanisms Inhibiting Tumorigenesis. What Have We Learned So Far? *Frontiers in Oncology* 8:644.

Fernanda Costa Svedman WL, Matteo Bottai, Suzanne Egyhazi Brage, Enikő Sonkoly, Johan Hansson, Andor Pivarcsi and Hanna Eriksson 2018. Extracellular microvesicle microRNAs as predictive biomarkers for targeted therapy in metastatic cutaneous malignant melanoma. *PLoS One* 13(11).

Giulia Siravegna SM, Salvatore Siena and Alberto Bardelli. 2017. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Clinical Oncology* 14:531-548.

Hala Fawzy MKaHSABA-A. 2017. Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics*.

Hall Ga. 2008. *Ιατρική Φυσιολογία*. 1267 p.

Imyanitov APSaEN. 2018. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5:76.

Irma G. Domínguez-Vigil AKM-M, Julia Y. Wang, Michael H.A. Roehrl and Hugo A. Barrera-Saldaña. 2018. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*:2912–2922.

Jadwiga Jablonska MP, Sonja Ludwig, Stephan Lang and Basant Kumar Thakur 2019. Challenges in the Isolation and Proteomic Analysis of Cancer Exosomes—Implications for Translational Research. *Proteomes* 7(2).

Ji-Young Choi SK, Hyo-Bum Kwak, Dong-Ho Park, Jae-Hyoung Park, Jeong-Seon Ryu, Chang-Shin Park and Ju-Hee Kang. 2017. Extracellular Vesicles as a Source of Urological Biomarkers: Lessons Learned From Advances and

Challenges in Clinical Applications to Major Diseases. *International Neurourology Journal* 21(2):83-96.

Jina Ko ECaDI. 2017. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst* 141(2):450-460.

Johnny C. Akers DG, Ryan Kim, Bob S. Carter and Clark C. Chen. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113(1):1-11.

Julie A. Vendrell FTM-T, Benoît Béganton, Sylvain Godreuil, Peter Coopman and Jérôme Solassol. 2017. Circulating Cell Free Tumor DNA Detection as a Routine Tool for Lung Cancer Patient Management. *International journal of Molecular Sciences* 18(2):264.

Kunitoshi Shigeyasu ST, Timothy J. Zumwalt, Yoshinaga Okugawa, and Ajay Goel. 2017. Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers. *Clin Cancer Res* 23(10):2391-2399.

Lei Zhao JY, Jing Wang, Huihui Li, Juanjuan Che, and Bangwei Cao. 2017. Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *Journal of cancer* 8(7):1145–1152.

Li Y LJ, Zhao Z, Wen L, Li H, Ren J, Liu H. 2018. Correlation between circulating endothelial progenitor cells and serum carcinoembryonic antigen level in colorectal cancer. *Acta Biochimica et biophysica Sinica*.

Lino Möhrmann HJH, David S. Hong, Apostolia M. Tsimberidou, Siqing Fu, Sarina A. Piha-Paul, Vivek Subbiah, Daniel D. Karp, Aung Naing, Anne Krug, Daniel Enderle, Tina Priewasser, Mikkel Noerholm, Erez Eitan, Christine Coticchia, Georg Stoll, Lisa-Marie Jordan, Cathy Eng, E. Scott Kopetz, Johan Skog, Funda Meric-Bernstam and Filip Janku. 2018. Liquid Biopsies Using Plasma Exosomal Nucleic Acids and Plasma Cell-Free DNA Compared with Clinical Outcomes of Patients with Advanced Cancers. *Clin Cancer Res* 24(1):181-188.

Loffler G. 2007. Βασικές αρχές βιοχημείας: Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης. 537 p.

- López-Lázaro M. 2010. A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy. *Molecular Medicine* 16(3-4):144–153.
- Luis A. Diaz JaAB. 2014. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of clinical oncology* 32(6): 579–586.
- M. Rohan Fernando CJ, Gary D. Krzyzanowski and Wayne L. Ryan. 2017. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One* 12(8).
- Max Roser HR. 2019. Cancer. [OurWorldInData.org](https://www.ourworldindata.org).
- Mohammed H. Rashed EB, Gouda K. Helal, Mohamed F. Abd-Ellah, Paola Amero, Arturo Chavez-Reyes and Cristian Rodriguez-Aguayo. 2017. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *International journal of Molecular Sciences* 18(3):538.
- Niall J. Lennon caVAA, and Stacey B. Gabriel. 2016. Technological considerations for genome-guided diagnosis and management of cancer. *Genome Medicine* 8:112.
- Nicolas Goossens SN, Xiaochen Sun and Yujin Hoshida. 2015. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res* 4(3):256–269.
- Pantel CA-PaK. 2016. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery* 6(5).
- Pin Li MK, Sze Han Lee, Justin Yao and Zhiqiang Gao. 2017. Progress in Exosome Isolation Techniques *Theranostics* 7(3):789-804.
- Rahul Bhome FDV, Gui-Han Lee, Marc D. Bullock, John N. Primrose, A. Emre Sayan, Alex H. Mirnezami. 2018a. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Letters* 420:228-235.
- Rahul Bhome FDV, Gui Han Lee, Marc D. Bullock, John N. Primrose, A. Emre Sayan, Alex H. Mirnezami. 2018b. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *cancer letters*:228-235.
- Riccardo Cazzoli FB, Marta Di Nicola, Sara Malatesta, Antonio Marchetti and Harvey I. Pass. 2013. MicroRNAs derived from circulating exosomes as non-invasive

- biomarkers for screening and diagnose lung cancer. *J Thorac Oncol* 8(9):1156-1162.
- Saini S. 2016. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular oncology*. p 97-106.
- Shiyu Jia RZ, Ziyang Li and Jinming Li. 2017. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget* 8(33):55632–55645.
- Sidransky D. 2002. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2(3):210-219.
- Speicher SPaMR. 2017. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Medicine*.
- Stefan Holdenrieder LP, David Morgenstern, and Farshid Dayyani 2016. Clinically Meaningful Use of Blood Tumor Markers in Oncology. *Biomed Research International*.
- Stefania Benini GG, Stefania Cocchi, Jessica Garbetta, Laurent Alberti, Alberto Righi, Marco Gambarotti, Piero Picci and Stefano Ferrari. 2018. Detection of circulating tumor cells in liquid biopsy from Ewing sarcoma patients. *Cancer management and research* 10:49-60.
- Susan R. Pfeffer KFG, Pamela B. Cassidy, Chuan He Yang, Meiyun Fan, Levy Kopelovich, Sancy A. Leachman and Lawrence M. Pfeffer. 2015. Detection of Exosomal miRNAs in the Plasma of Melanoma Patients. *journal of clinical medicine* 4:2012–2027.
- Umberto Malapelle PP, Danilo Rocco, Riccardo Smeraglio, Maria di Spirito, Claudio Bellevicine, and Giancarlo Troncone. 2016. Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients. *Translational Lung Cancer Research* 5(5):505–510.
- Valeriy Poroyko TM, Arin Nam, Isa Mambetsariev, Bolot Mambetsariev, Xiwei Wu, Aliya Husain, Everett E. Vokes, Deric L. Wheeler and Ravi Salgia. 2018. Exosomal miRNAs species in the blood of small cell and nonsmall cell lung cancer patients. *Oncotarget* 9(28): 19793-19806.

- Veronika Vymetalkova KC, Linda Bartu and Pavel Vodicka. 2018. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* 19(11).
- Vincent Bernard DUK, F. Anthony San Lucas, Jonathan Castillo, Kelvin Allenson, Feven C. Mulu, Bret M. Stephens, Jonathan Huang, Alexander Semaan, Paola A. Guerrero, Nabiollah Kamyabi, Jun Zhao, Mark W. Hurd, Eugene J. Koay, Cullen M. Taniguchi, Joseph M. Herman, Milind Javle, Robert Wolff, Matthew Katz, Gauri Varadhachary, Anirban Maitra and Hector A. Alvarez. 2019. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 156(1):108-118.
- Wang ZSLWLDX. 2018. Emerging role of exosome signalling in maintaining cancer stem cell dynamic equilibrium. *Journal of cellular and molecular medicine* 22(8):3719-3728.
- Weinberg DHARA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5):646-674.
- William L Hwang KLHaDTM. 2016. The promise of circulating tumor cells for precision cancer therapy. *Biomarkers in medicine* 10(12):1269–1285.
- Xiangxiang Liu BP, Li Sun, Xiaoxiang Chen, Kaixuan Zeng, Xiuxiu Hu, Tao Xu, Mu Xu and Shukui Wang. 2018. Circulating Exosomal miR-27a and miR-130a Act as Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 27(7):746-754.
- Yunho Jin YHea. 2017. Molecular Interactions of Autophagy with the Immune System and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Yutaka Naito YY, Yusuke Yamamoto, and Takahiro Ochiya. 2017. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular life sciences* 74(4):697–713.
- Zanotti L PA, Piazza C, Pagan E, Bignotti E, Romani C, Bandiera E, Calza S, Del Bon F, Nicolai P, Ravaggi A. 2017. Epidermal growth factor receptor detection in serum and saliva as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *Laryngoscope*.

Zhenqiang Sun SY, Quanbo Zhou, Guixian Wang, Junmin Song, Zhen Li, Zhiyong Zhang, Jizhong Xu, Kunkun Xia, Yuan Chang, Jinbo Liu and Weitang Yuan. 2018. Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment. *Molecular Cancer* 17.

Εγγανονηλίδου Α. 2014. Τι είναι οι κυτταρολογικές εξετάσεις;. Ελληνική Αντικαρκινική Εταιρεία.

Μαρμάρα-Λαμπροπούλου ΒΜΜ. 2005. Βιολογία κυττάρου μοριακή προσέγγιση. Πάτρα: Τυροραμα. 455 ρ.

Νακοπούλου Λ. 2017. ΔΙΗΘΗΣΗ-ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ [Μεταγράφημα παρουσίασης]: Παναγιωτάκης Ζάχος.

Niall J. Lennon caVAA, and Stacey B. Gabriel. 2016. Technological considerations for genome-guided diagnosis and management of cancer. *Genome Medicine* 8:112.

Pantel CA-PaK. 2016. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery* 6(5).

Saini S. 2016. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular oncology*. p 97-106.

Shiyu Jia RZ, Ziyang Li and Jinming Li. 2017. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget* 8(33):55632–55645.

Speicher SPaMR. 2017. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Medicine*.

Stefan Holdenrieder LP, David Morgenstern, and Farshid Dayyani 2016. Clinically Meaningful Use of Blood Tumor Markers in Oncology. *Biomed Research International*.

Stefania Benini GG, Stefania Cocchi, Jessica Garbetta, Laurent Alberti, Alberto Righi, Marco Gambarotti, Piero Picci and Stefano Ferrari. 2018. Detection of circulating tumor cells in liquid biopsy from Ewing sarcoma patients. *Cancer management and research* 10:49-60.

Umberto Malapelle PP, Danilo Rocco, Riccardo Smeraglio, Maria di Spirito, Claudio Bellevicine, and Giancarlo Troncone. 2016. Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients. *Translational Lung Cancer Research* 5(5):505–510.

Weiling Hu WZ, Qifang Liu, Hua Chu, Shujie Chen, John J. Kim, Jiaguo Wu, and Jianmin Si. 2017. Diagnostic accuracy of DNA methylation in detection of gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*.

William L Hwang KLHaDTM. 2016. The promise of circulating tumor cells for precision cancer therapy. *Biomarkers in medicine* 10(12):1269–1285.

Yunho Jin YHea. 2017. Molecular Interactions of Autophagy with the Immune System and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*.

Zanotti L PA, Piazza C, Pagan E, Bignotti E, Romani C, Bandiera E, Calza S, Del Bon F, Nicolai P, Ravaggi A. 2017. Epidermal growth factor receptor detection in serum and saliva as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *Laryngoscope*.

Zerbino DD. 1994. Biopsy: its history, current and future outlook. *Likars'ka Sprava*.

Γεράσιμος Μπονάτσος ΙΚ, Βασίλειος Γολεμάτης. 2006. Χειρουργική Παθολογία: Π.Χ.Πασχαλίδης. 820 p.

Κωνσταντίνιδης ΧΔ. 2017. Θωρακοσκοπική Χειρουργική, Λαπαροσκοπική Χειρουργική, Ρομποτική χειρουργική Da Vinci.