



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Υγρή βιοψία στον καρκίνο του παγκρέατος -
Προβλεπτική αξία των εξωσωμάτων»

“Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer – Predictive Value
of Extracellular Vesicles”

Νικολαΐδου Ελένη του Ιωάννη Νικολαΐδη
Επιβλέπων Καθηγητής: Κωτσάκης Αθανάσιος
Λάρισα 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωτσάκης Αθανάσιος

Διευθυντής ογκολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τηλ: 30-2413502009

Email: thankotsakis@uth.gr

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τηλ: 30-2410-565206

Email: agiakountis@uth.gr

Ξαγαρά Αναστασία

Συμβασιούχος μεταδιδακτορική ερευνήτρια

Τηλ: 30-2410-685720

Email: xagaraa@hotmail.com

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια κα. Ξαγαρά για την πολύτιμη καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική τόσο στην οργάνωση όσο και στην ολοκλήρωση της έρευνάς μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Κωνσταντίνα Βασιλίου για την ουσιαστική βοήθεια και πρακτική καθοδήγηση στο εργαστήριο, η οποία διευκόλυνε σε μεγάλο βαθμό την υλοποίηση των πειραματικών διαδικασιών.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1.Εισαγωγή	8
1.1 Το πάγκρεας και η φυσιολογία του	8
1.1.1 Ανατομία του παγκρέατος	8
1.1.2 Φυσιολογία του παγκρέατος, εξωκρινής και ενδοκρινής μοίρα	8
1.2 Καρκίνος του παγκρέατος - παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα	9
1.2.1 Επιδημιολογία	9
1.2.2 Παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα PDAC	10
1.2.3 Σταδιοποίηση νόσου	10
1.2.4 Πρόγνωση και τρέχονοι τρόποι διάγνωσης	11
1.3 Υγρή βιοψία	12
1.3.1 Πλεονεκτήματα και προκλήσεις	14
1.3.2 Εφαρμογές στην ογκολογία	15
1.4 Εξωσώματα	15
1.4.1 Δομή, βιογένεση και λειτουργία των εξωσωμάτων	15
1.4.2 Προγνωστική και διαγνωστική αξία	18
1.4.3 Προβλεπτική αξία σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος	18
1.5 CD63	20
1.5.1 Προγνωστική αξία	20
1.5.2 Προγνωστική αξία για το καρκίνο του παγκρέατος	21
1.6 PD-1/PD-L1	21
1.6.1 Προγνωστική αξία	21
1.6.2 Προγνωστική αξία για το καρκίνο του παγκρέατος	22
1.7 Σκοπός	22
2.Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1 Επιλογή δειγμάτων	24
2.2 Απομόνωση πλάσματος μετά από αιμοληψία	24
2.3 Απομόνωση εξωσωμάτων	24
2.3.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με χημική καθίζηση	24
2.3.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με στήλες	25
2.4 Κυτταρομετρία ροής	25
2.4.1 Βαθμονόμηση του κυτταρόμετρου ροής	26

2.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων	26
2.5 Στατιστική ανάλυση	27
3. Αποτελέσματα	29
3.1 Περιγραφή δεδομένων ασθενών	29
3.2 Χαρακτηρισμός μεγέθους και ακεραιότητας εξωκυττάρων οργανιδίων στο κυτταρόμετρο ροής.....	31
3.3 Διερεύνηση ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών εξωκυττάρων οργανιδίων σε πρώιμο και μεταστατικό στάδιο PDAC	32
3.4 Μεγέθη εξωκυττάρων οργανιδίων ως εν δυνάμει δείκτες σταδιοποίησης	33
3.5 Κατανομή πρωτεϊνικών δεικτών ανάλογα με το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων	34
3.6 Συσχέτιση εξωκυττάρων οργανιδίων με την κλινική έκβαση (DFS/PFS και OS)	35
3.7 Συσχέτιση του μεγέθους και την έκφραση πρωτεϊνικών δεικτών εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση ασθενών πρώιμου και προχωρημένου σταδίου	38
3.8 Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους.....	41
4. Συζήτηση	46
4.1 Διερεύνηση ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών εξωκυττάρων οργανιδίων σε πρώιμο και μεταστατικό στάδιο PDAC	46
4.2 Μεγέθη εξωκυττάρων οργανιδίων ως εν δυνάμει δείκτες σταδιοποίησης	46
4.3 Κατανομή πρωτεϊνικών δεικτών ανάλογα με το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων	47
4.4 Συσχέτιση εξωκυττάρων οργανιδίων με την κλινική έκβαση (DFS/PFS και OS)	47
4.5 Συσχέτιση του μεγέθους και της έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση	48
4.6 Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους.....	48
5. Συμπεράσματα.....	50
Βιβλιογραφία.....	51

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε τη διαγνωστική και προγνωστική αξία των εξωκυττάρων οργανιδίων (εξωσωμάτων) στον καρκίνο του παγκρέατος, με έμφαση στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (PDAC). Σκοπός ήταν η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας ροής για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό εξωσωμάτων σε πλάσμα ασθενών, αξιολογώντας τα ως δυνητικούς βιοδείκτες.

Χρησιμοποιήθηκαν 85 δείγματα πλάσματος από 42 ασθενείς με PDAC και 14 υγιείς δότες. Η κυτταρομετρία ροής επέτρεψε την ανίχνευση εξωσωμάτων $<0,4\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$, ενώ αξιολογήθηκε η έκφραση CD63, PD-1 και PD-L1 ως υποψήφιοι βιοδείκτες.

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν αυξημένο αριθμό εξωσωμάτων σε ασθενείς με PDAC σε σύγκριση με υγιείς δότες, χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ πρώιμου και μεταστατικού σταδίου. Η CD63 ήταν αυξημένη σε πρώιμο στάδιο, ενώ η PD-L1 εμφανίστηκε υψηλή σε όλα τα στάδια, υποδηλώνοντας ενεργή ανοσοκατασταλτική σηματοδότηση από τα πρώτα στάδια της νόσου. Η ανάλυση μεγέθους έδειξε ότι μεγαλύτερα εξωσώματα (P3–P4) συσχετίζονται με προχωρημένη νόσο. Η συνολική ποσότητα εξωσωμάτων δεν συνδέθηκε με την επιβίωση, αλλά υποπληθυσμοί με υψηλή έκφραση PD-1 ή PD-L1 έδειξαν τάσεις προς μειωμένη πρόγνωση, υπογραμμίζοντας τη σημασία ποιοτικών χαρακτηριστικών.

Η μελέτη ανέπτυξε ένα καινοτόμο και αξιόπιστο πρωτόκολλο κυτταρομετρίας ροής για τον χαρακτηρισμό εξωσωμάτων, επιτρέποντας τη διερεύνηση νέων προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών στο PDAC. Τα αποτελέσματα ενισχύουν τη σημασία των εξωσωμάτων ως εργαλεία υγρής βιοψίας και θέτουν τη βάση για μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερα δείγματα, συνδυάζοντας την έκφραση PD-L1 σε εξωσώματα με PD-1 σε T-κύτταρα για καλύτερη εκτίμηση της ανοσοκατασταλτικής δραστηριότητας.

Abstract

This study investigated the diagnostic and prognostic value of extracellular vesicles (exosomes) in pancreatic cancer, with a focus on pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The aim was to develop and optimize a flow cytometry protocol for the detection and quantitative assessment of exosomes in patient plasma, evaluating them as potential biomarkers.

A total of 85 plasma samples from 42 PDAC patients and 14 healthy donors were used. Flow cytometry enabled the detection of exosomes sized $<0.4\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$, and the expression of CD63, PD-1, and PD-L1 was evaluated as potential biomarkers.

The results revealed an increased number of exosomes in PDAC patients compared to healthy donors, with no significant difference between early and metastatic stages. CD63 levels were elevated in early-stage disease, while PD-L1 was highly expressed across all stages, indicating active immunosuppressive signaling from the initial stages of the disease. Size analysis showed that larger exosomes (P3–P4) were associated with advanced disease. Although the total exosome quantity was not linked to survival, subpopulations with high PD-1 or PD-L1 expression exhibited trends toward poorer prognosis, highlighting the importance of qualitative characteristics.

The study developed an innovative and reliable flow cytometry protocol for exosome characterization, enabling the investigation of novel prognostic and diagnostic biomarkers in PDAC. The findings underscore the significance of exosomes as liquid biopsy tools and provide a foundation for future studies with larger cohorts, combining PD-L1 expression in exosomes with PD-1 expression in T cells for a more comprehensive assessment of immunosuppressive activity.

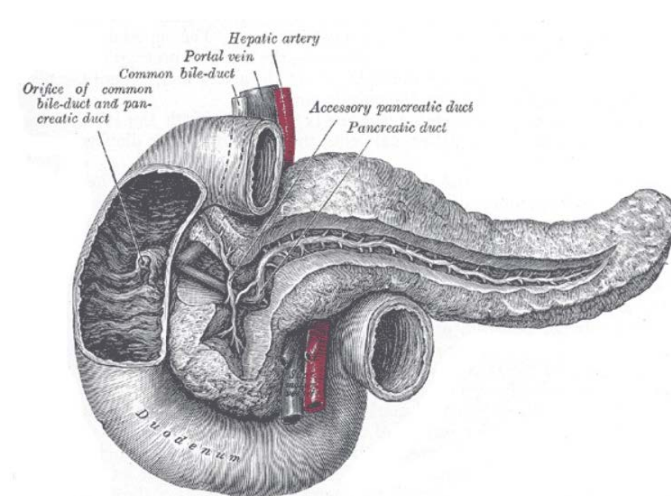
1.Εισαγωγή

1.1 Το πάγκρεας και η φυσιολογία του

Το πάγκρεας αποτελεί έναν ζωτικής σημασίας αδένα του ανθρώπινου σώματος. Το πάγκρεας έχει διπλή λειτουργία. Από την μία μεριά είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και έκκριση πεπτικών ενζύμων, ενώ παράλληλα έχει κύριο ρόλο στην έκκριση ορμονών με στόχο την ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα. Η σωστή λειτουργία του παγκρέατος είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης και την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού (Kamel-ElSayed & Mukherjee, 2025).

1.1.1 Ανατομία του παγκρέατος

Το πάγκρεας είναι ένας επιμήκης, επικουρικός αδένας του πεπτικού συστήματος που εντοπίζεται οπισθοπεριτοναϊκά, διασχίζοντας τα σώματα του 1ου και 2ου οσφυϊκού σπονδύλου



Εικόνα 1 Το πάγκρεας, ο παγκρεατικός πόρος, το στόμιο του χοληδόχου και του παγκρεατικού πόρου, καθώς και ο επικουρικός παγκρεατικός πόρος. Πηγή: Talathi et al. 2025

(O1–O2) στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Ανατομικά, χωρίζεται σε τέσσερα κύρια μέρη: την κεφαλή, τον αυχένα, το σώμα και την ουρά. Η ουρά εκτείνεται προς την πύλη του σπλήνα, ενώ πάνω από την κάτω κοίλη φλέβα και τη νεφρική φλέβα η κεφαλή του παγκρέατος περιβάλλεται από τη θηλιά (C) του δωδεκαδακτύλου. Η θέση του παγκρέατος το καθιστά σημαντικό για τη λειτουργική συνεργασία με άλλα όργανα του πεπτικού και ενδοκρινικού συστήματος (Talathi et al., 2025).

1.1.2 Φυσιολογία του παγκρέατος, εξωκρινής και ενδοκρινής μοίρα

Η εξωκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται κυρίως από αδενικά κύτταρα που παράγουν πεπτικά ένζυμα, όπως η αμυλάση, η λιπάση και οι πρωτεάσες. Αυτά τα ένζυμα εκκρίνονται

στον παγκρεατικό πόρο και μεταφέρονται στο δωδεκαδάκτυλο, όπου συμβάλλουν στη διάσπαση των θρεπτικών συστατικών της τροφής (StatPearls, 2023). Επιπλέον, το πάγκρεας εκκρίνει διττανθρακικά ιόντα, τα οποία εξουδετερώνουν το γαστρικό οξύ, προστατεύοντας το εντερικό επιθήλιο. Ο εξωκρινής παγκρεατικός ιστός αποτελεί το 80% του παγκρέατος (Talathi et al., 2025)

Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από τα νησίδια του Langerhans όπου περιλαμβάνονται διάφορων τύπου κυττάρων: τα α-κύτταρα που εκκρίνουν γλυκαγόνη, τα β-κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη, τα δ-κύτταρα που εκκρίνουν σωματοστατίνη και τα ε-κύτταρα που εκκρίνουν γκρελίνη (StatPearls, 2023). Η ισορροπία μεταξύ της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και κατ' επέκταση τη διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης (Jiang & Zhang, 2003)

1.2 Καρκίνος του παγκρέατος - παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί μία από τις πλέον επιθετικές και θανατηφόρες μορφές κακοήθειας, με υψηλή θνησιμότητα και εξαιρετικά περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma - PDAC) είναι η κυρίαρχη ιστολογική μορφή και συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση, κυρίως λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης και της ταχείας μετάστασης (Kleeff et al., 2016). Η σταδιοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου (PDAC) αποτελεί κρίσιμο βήμα για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και την πρόγνωση του ασθενούς. Η αξιολόγηση του μεγέθους του όγκου, της τοπικής διήθησης, της λεμφαδενικής συμμετοχής και της ύπαρξης απομακρυσμένων μεταστάσεων καθορίζει το στάδιο της νόσου σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια TNM (Tumor, Node, Metastasis) (Shin & Kim, 2020).

1.2.1 Επιδημιολογία

Το 2022 καταγράφηκαν παγκοσμίως περίπου 510.000 νέα περιστατικά καρκίνου του παγκρέατος, καθιστώντας τον 12ο συχνότερο καρκίνο ('Pancreatic Cancer Statistics', n.d.). Παρουσιάζει συνεχή αυξητική τάση παγκοσμίως, και υπολογίζεται ότι αποτελεί την έβδομη αιτία θανάτου από καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα. Η μέση ηλικία διάγνωσης κυμαίνεται μεταξύ 65 και 75 ετών. Παράγοντες κινδύνου που έχουν ενοχοποιηθεί περιλαμβάνουν το κάπνισμα, την παχυσαρκία, τη χρόνια παγκρεατίτιδα, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, καθώς

και γενετικά σύνδρομα όπως το σύνδρομο Peutz-Jeghers ή μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2 (Rawla et al., 2019). Ο επιπολασμός εμφανίζεται υψηλότερος στις ανεπτυγμένες χώρες. Το κάπνισμα εκτιμάται ότι ευθύνεται για περίπου το 25% των περιπτώσεων, ενώ ο διαβήτης σχετίζεται με διπλάσιο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης PDAC (*Global, Regional, and National Burden of Pancreatic Cancer from 1990 to 2021, Its Attributable Risk Factors, and Projections to 2050: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2021 | BMC Cancer | Full Text*, n.d.). Λιγότερο συχνές μορφές καρκίνου του παγκρέατος περιλαμβάνουν το νευροενδοκρινικό καρκίνωμα, το αδενοπλακώδες καρκίνωμα και το κυστεδένωμα, με διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά και θεραπευτικές προσεγγίσεις (Biankin et al., 2012).

1.2.2 Παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα PDAC

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (PDAC) αποτελεί το 85–90% των περιπτώσεων καρκίνου του παγκρέατος και προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των παγκρεατικών πόρων. Παρότι είναι ιστολογικά ομοιογενές, η μοριακή του ετερογένεια είναι αξιοσημείωτη, με διάφορους υποτύπους να εμφανίζουν διαφορετικά μοριακά προφίλ, επιδρώντας τόσο στην πρόγνωση όσο και στην ανταπόκριση στη θεραπεία (Biankin et al., 2012).

Σε μοριακό επίπεδο, η ταξινόμηση του PDAC έχει προχωρήσει μέσω της αναγνώρισης πέντε υποτύπων: basal-like A, basal-like B, classical A, classical B και hybrid. Οι τύποι αυτοί διαφέρουν σημαντικά ως προς την έκφραση γονιδίων και την κλινική τους συμπεριφορά. Ο basal-like τύπος, για παράδειγμα, σχετίζεται με ιδιαίτερα χαμηλή επιβίωση και μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Chan-Seng-Yue et al., 2020).

Ιστολογικά, το PDAC εμφανίζει διηθητικούς αδενικούς σχηματισμούς, με εκτεταμένη ίνωση του στρώματος και παρουσία κυτταρικής ατυπίας. Η εξάπλωση σε λεμφαδένες, το ήπαρ και τη περιτοναϊκή περιοχή εμφανίζονται συχνά ήδη από τη διάγνωση, περιορίζοντας σημαντικά τις δυνατότητες ριζικής εκτομής (Dhillon & Betancourt, 2020).

1.2.3 Σταδιοποίηση νόσου

Η σταδιοποίηση του PDAC είναι κρίσιμη για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και της πρόγνωσης του ασθενούς. Το σύστημα TNM, που αναπτύχθηκε από την American Joint Committee on Cancer (AJCC), χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της έκτασης της νόσου και περιλαμβάνει τρεις βασικές παραμέτρους:

- T (Tumor): Μέγεθος και έκταση του πρωτογενούς όγκου.
 - ο T1: Όγκος ≤ 2 cm
 - ο T2: Όγκος >2 cm και ≤ 4 cm
 - ο T3: Όγκος >4 cm
 - ο T4: Όγκος που επηρεάζει αγγεία όπως το ηλιακό πλέγμα ή την ανώτερη μεσεντερική αρτηρία .
- N (Nodes): Κατάσταση των περιφερικών λεμφαδένων.
 - ο N0: Χωρίς μεταστάσεις σε λεμφαδένες
 - ο N1: Μεταστάσεις σε 1–3 λεμφαδένες
 - ο N2: Μεταστάσεις σε ≥ 4 λεμφαδένες .
- M (Metastasis): Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων.
 - ο M0: Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
 - ο M1: Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων .

Η ακριβής σταδιοποίηση επιτρέπει την εξατομίκευση της θεραπείας και την εκτίμηση της πρόγνωσης του ασθενούς (Shin & Kim, 2020).

1.2.4 Πρόγνωση και τρέχουσι τρόποι διάγνωσης

Η πρόγνωση του PDAC παραμένει εξαιρετικά δυσοίωνη, με την πενταετή επιβίωση να είναι μικρότερη του 10%. Σε μόλις ένα μικρό ποσοστό των ασθενών (περίπου 15–20%), η νόσος εντοπίζεται σε χειρουργήσιμο στάδιο κατά τη διάγνωση. Οι απεικονιστικές τεχνικές, όπως η αξονική τομογραφία (CT), η μαγνητική τομογραφία (MRI), η ενδοσκοπική υπερηχογραφία (EUS) και η PET, χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για την ακριβή αποτύπωση της έκτασης της νόσου και την αναγνώριση πιθανών χειρουργικά αντιμετωπίσιμων περιπτώσεων. Η ακριβής σταδιοποίηση επιτρέπει την επιλογή μεταξύ χειρουργικής επέμβασης, χημειοθεραπείας ή συνδυαστικών θεραπειών και αποτελεί τη βάση για την εκτίμηση της πρόγνωσης. (Ballehaninna & Chamberlain, 2011).

Παράλληλα, βιοδείκτες όπως το CA 19-9 χρησιμοποιούνται ευρέως, παρότι η αξιοπιστία τους είναι περιορισμένη λόγω χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (Ballehaninna & Chamberlain, 2011). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο συνδυασμός του βιοδείκτη CA 19-9 με δείκτες πρωτεασικής δραστηριότητας, μέσω της μεθόδου PAC-MANN (Protease-Activated Circulating Marker Multiplex Nanosensor), βελτιώνει σημαντικά την ακρίβεια στην ανίχνευση πρώιμων σταδίων του παγκρεατικού καρκίνου, με ευαισθησία που φθάνει έως και το 85% (Montoya Mira et al., 2025). Οι σύγχρονες ερευνητικές προσεγγίσεις επικεντρώνονται στη

χρήση υγρών βιοψιών, όπως η ανάλυση εξωσωμάτων και κυκλοφορούντος DNA (ctDNA), για την πιο αξιόπιστη και πρόιμη ανίχνευση της νόσου, αλλά και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (Ballehaninna & Chamberlain, 2011).

1.3 Υγρή βιοψία

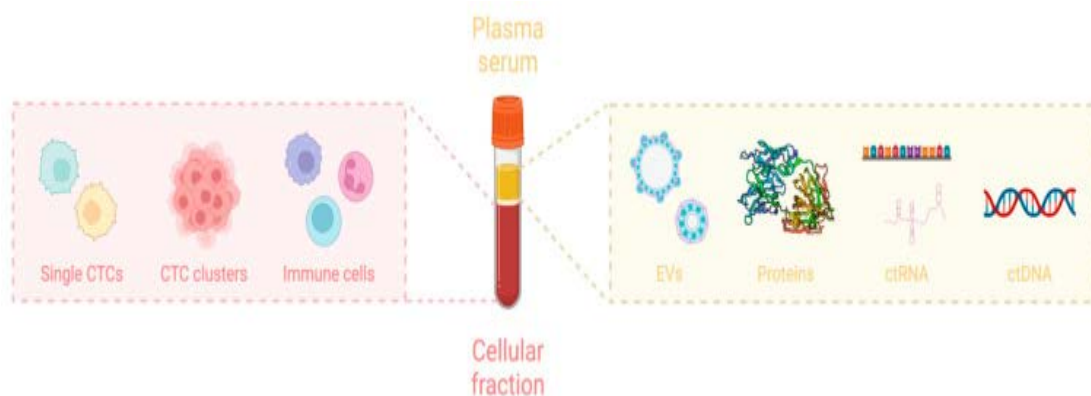
Η υγρή βιοψία είναι μια τεχνική ανάλυσης που βασίζεται στη λήψη και μελέτη σωματικών υγρών, κυρίως του αίματος, με σκοπό την άντληση πληροφοριών για την κατάσταση του οργανισμού, σε φυσιολογικά ή παθολογικά πλαίσια (Ge et al., 2024). Το αίμα αποτελείται από δύο βασικά συστατικά: το πλάσμα (ή τον ορό) και τα έμμορφα στοιχεία, που περιλαμβάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (Crowley et al., 2013). Τα ερυθροκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου μέσω της αιμοσφαιρίνης, τα λευκοκύτταρα εμπλέκονται στην ανοσολογική άμυνα, ενώ τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αιμόσταση (Pös et al., 2018).

Πέρα από τα κύτταρα, το πλάσμα περιέχει πλήθος διαλυμένων συστατικών όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, ηλεκτρολύτες (νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, φώσφορο), λιπίδια (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια), γλυκόζη, ορμόνες, βιταμίνες, και μεταβολικά προϊόντα (Schwarzenbach et al., 2011). Μέσω των βιοχημικών εξετάσεων αίματος μπορούν να εκτιμηθούν βασικές λειτουργίες των οργάνων, όπως η ηπατική και νεφρική λειτουργία, η ισορροπία ηλεκτρολυτών, η λιπιδαιμική κατάσταση, καθώς και σημεία φλεγμονής ή λοίμωξης (Heitzer et al., 2019). Παράλληλα, μέσω της γενικής αίματος αξιολογούνται τα μορφοποιημένα στοιχεία του αίματος (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, λευκά και αιμοπετάλια), ενώ με εξειδικευμένες μεθόδους μπορούν να εντοπιστούν μεταβολικές διαταραχές ή ενδείξεις αιματολογικών νοσημάτων (Wan et al., 2017).

Τα τελευταία χρόνια, η έννοια της υγρής βιοψίας έχει διευρυνθεί ώστε να περιλαμβάνει και την ανάλυση κυκλοφορούντων μορίων, τα οποία προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες σε διαγνωστικό και προγνωστικό επίπεδο. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται:

- Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (CTCs): Ανιχνεύονται στο αίμα και σχετίζονται με την μετάσταση και την υποτροπή του PDAC.
- Κυκλοφορούν DNA Όγκου (ctDNA): Περιέχει γενετικές μεταλλάξεις, όπως αυτές στο γονίδιο KRAS, που σχετίζονται με την ανάπτυξη του PDAC.
- Εξωσώματα (EVs): Μικρές κυστίδια που περιέχουν RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια, παρέχοντας πληροφορίες για την κυτταρική επικοινωνία και την εξέλιξη του όγκου.

- Μη Κωδικοποιούντα RNA (ncRNA): Περιλαμβάνουν microRNA και long non-coding RNA, τα οποία επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και σχετίζονται με την καρκινογένεση.
- Ελεύθερο Κυκλοφορούν RNA (cfRNA): Περιλαμβάνει mRNA και άλλους τύπους RNA που παρέχουν πληροφορίες για την έκφραση γονιδίων.
- Ογκο-εκπαιδευμένα αιμοπετάλια (TEPs): Εκπαιδευμένα από τον όγκο, συμμετέχουν στην ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου



Εικόνα 2 Κατηγοριοποίηση του πλάσματος σε ορό και κυτταρικά κλάσματα για τη μελέτη κυκλοφορούντων βιοδεικτών σε υγρή βιοψία, όπως εξωσώματα και κυτταρικό ελεύθερο DNA. Πηγή: Ho-Yin Ho et al., 2020.

(Rolfo et al., 2021). Το cfDNA προέρχεται από τη φυσιολογική απόπτωση κυττάρων, ενώ το ctDNA είναι ειδικότερα παράγωγο νεοπλασματικών κυττάρων, και παρέχει πληροφορίες για γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις (Siravegna et al., 2017). Τα εξωσώματα είναι νανοσωματίδια που εκκρίνονται από ποικίλα κύτταρα και περιέχουν ποικιλία βιομορίων όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, λειτουργώντας ως διαμεσολαβητές κυτταρικής επικοινωνίας (Díaz & Bardelli, 2014).

Η ανίχνευση αυτών των μορίων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τεχνικών υψηλής ευαισθησίας, όπως η PCR, η ψηφιακή PCR, η RT-PCR για το RNA, και η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) για τον μοριακό χαρακτηρισμό του δείγματος (Satelli et al., 2015). Η υγρή βιοψία, σε αυτή τη σύγχρονη εκδοχή της, δεν περιορίζεται μόνο στο αίμα, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα σωματικά υγρά, όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το ουροποιητικό σύστημα ή το πλευριτικό υγρό, αναλόγως της κλινικής περίπτωσης (Alix-Panabières & Pantel, 2017).

Αξιοποιώντας τόσο τις βασικές βιοχημικές εξετάσεις όσο και τις πιο εξελιγμένες μοριακές τεχνικές, η υγρή βιοψία αποτελεί ένα πολύπλευρο διαγνωστικό εργαλείο, που συνδυάζει την

καθημερινή κλινική πρακτική με τις εξελίξεις της μοριακής βιολογίας και της εξατομικευμένης ιατρικής (Kustanovich et al., 2019).

1.3.1 Πλεονεκτήματα και προκλήσεις

Η υγρή βιοψία παρουσιάζει μια σειρά από σημαντικά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ελκυστική εναλλακτική ή συμπληρωματική μέθοδο σε σχέση με τις παραδοσιακές ιστολογικές βιοψίες (Esposito et al., 2017). Πρώτον, πρόκειται για μια ελάχιστα επεμβατική διαδικασία, καθώς η λήψη δείγματος γίνεται κυρίως μέσω φλεβικής αιμοληψίας, γεγονός που συνεπάγεται μειωμένο κίνδυνο για τον ασθενή και χαμηλότερο κόστος (Alix-Panabières & Pantel, 2016). Επιπλέον, η δυνατότητα επαναλαμβανόμενων δειγματοληψιών επιτρέπει τη συνεχή παρακολούθηση της παθολογικής κατάστασης, διευκολύνοντας την αξιολόγηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης ή της εξέλιξης μιας νόσου σε πραγματικό χρόνο (Oellerich et al., 2017).

Η υγρή βιοψία παρέχει επίσης τη δυνατότητα για ανάλυση της ετερογένειας του οργανισμού σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, αφού το δείγμα περιέχει βιομόρια από πολλαπλούς ιστούς και όχι μόνο από ένα σημείο, όπως συμβαίνει με την ιστολογική βιοψία (Newman et al., 2014). Το γεγονός αυτό καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα πολύτιμη στην παρακολούθηση συστηματικών καταστάσεων ή νόσων που παρουσιάζουν μοριακή ετερογένεια (Merker et al., 2018).

Ωστόσο, παρά τα σημαντικά της πλεονεκτήματα, η υγρή βιοψία συνοδεύεται από προκλήσεις που περιορίζουν εν μέρει την εφαρμογή της στην κλινική πράξη. Ένα βασικό ζήτημα αφορά την ευαισθησία και ειδικότητα των διαγνωστικών τεχνικών, ιδιαίτερα όταν ανιχνεύονται εξαιρετικά μικρές ποσότητες βιομορίων, όπως το ctDNA ή τα exosomal RNA (Bronkhorst et al., 2015). Παρά την ανάπτυξη προηγμένων μεθόδων, όπως η ψηφιακή PCR ή η αλληλούχηση νέας γενιάς, τα όρια ανίχνευσης παραμένουν ένα σημαντικό εμπόδιο στην πρόωμη διάγνωση (Jahr et al., 2001).

Ένα ακόμα σημαντικό πρόβλημα είναι η τυποποίηση των μεθοδολογιών. Η υγρή βιοψία περιλαμβάνει πολυάριθμες τεχνικές εξαγωγής, απομόνωσης και ανάλυσης των βιοδεικτών, οι οποίες δεν είναι πλήρως εναρμονισμένες, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαφορές στην ακρίβεια και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων (Hayes et al., 2014). Τέλος, δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί διεθνώς αποδεκτά διαγνωστικά κατώφλια για πολλούς τύπους μορίων, γεγονός που δυσχεραίνει την ενσωμάτωση της υγρής βιοψίας στις διαγνωστικές κατευθυντήριες οδηγίες (Schwarzenbach, 2017).

1.3.2 Εφαρμογές στην ογκολογία

Στον ογκολογικό τομέα, η υγρή βιοψία προορίζεται για ευρεία εφαρμογή σε διαγνωστικό, θεραπευτικό και ερευνητικό επίπεδο. Αρχικά, στις στρατηγικές πρώιμης διάγνωσης, η υγρή βιοψία μπορεί να εντοπίσει χαρακτηριστικές μεταλλάξεις (π.χ. KRAS) ή επιγενετικές υπογραφές σε ctDNA ή exosomal DNA, ακόμη και πριν εμφανιστούν συμπτώματα ή ανιχνευθούν όγκοι με συμβατική απεικόνιση (Schwarzenbach et al., 2011). Αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες όπου το 80-90% των ασθενών με πρώιμη νόσο εντοπίστηκαν μέσω υγρής βιοψίας με αξιοπιστία >90% (X. Chen et al., 2024).

Επιπρόσθετα, ο έλεγχος θεραπευτικής απόκρισης καθίσταται δυνατός μέσω των μεταβολών των δεικτών στους βιολογικούς δείκτες (π.χ. πτώση ctDNA ή CTCs μετά χημειοθεραπεία υποδηλώνει επιτυχή ανταπόκριση), ενώ αντίθετα, αύξηση ή παραμονή των δεικτών συνδέεται με ανθεκτικότητα (X. Chen et al., 2024). Αυτή η δυναμική επιτρέπει έγκαιρες προσαρμογές στη θεραπεία.

Τέλος, η υγρή βιοψία παρέχει πλούσιο πεδίο για την έρευνα, την ανάπτυξη νέων βιοδεικτών και την εξατομίκευση της θεραπείας. Μέσα από έρευνες που αναλύουν εξωσωματικές πρωτεΐνες ή microRNA και συνδυάζουν ctDNA με επιγενετικούς δείκτες, προδιαγράφονται στοχευμένες θεραπευτικές στρατηγικές, ανοσοθεραπείες και νέες φαρμακευτικές στοχεύσεις (van der Pol & Mouliere, 2019; Wan et al., 2025). Μελλοντικά, οι εξελίξεις αναμένεται να οδηγήσουν σε δοκιμές προληπτικού ελέγχου σε άτομα υψηλού κινδύνου ή συμπληρωματικής παρακολούθησης μετά από χειρουργικές επεμβάσεις.

1.4 Εξωσώματα

Οι πρώτες αναφορές για εξωκυτταρικά κυστίδια προέκυψαν τη δεκαετία του 1960, ενώ το 1987 καθιερώθηκε η ονομασία και η κατηγοριοποίηση των εξωσωμάτων (Xie et al., 2022a). Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles – EVs), λοιπόν, αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μεμβρανωδών δομών και μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες κατηγορίες, εξωσώματα (exosomes, 30–150 nm), μικροκυστίδια (microvesicles, 100–1000 nm), αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies, >1000 nm). Οι κατηγορίες αυτές διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τον τρόπο βιογένεσης και τη βιολογική τους λειτουργία (Liu et al., 2024a).

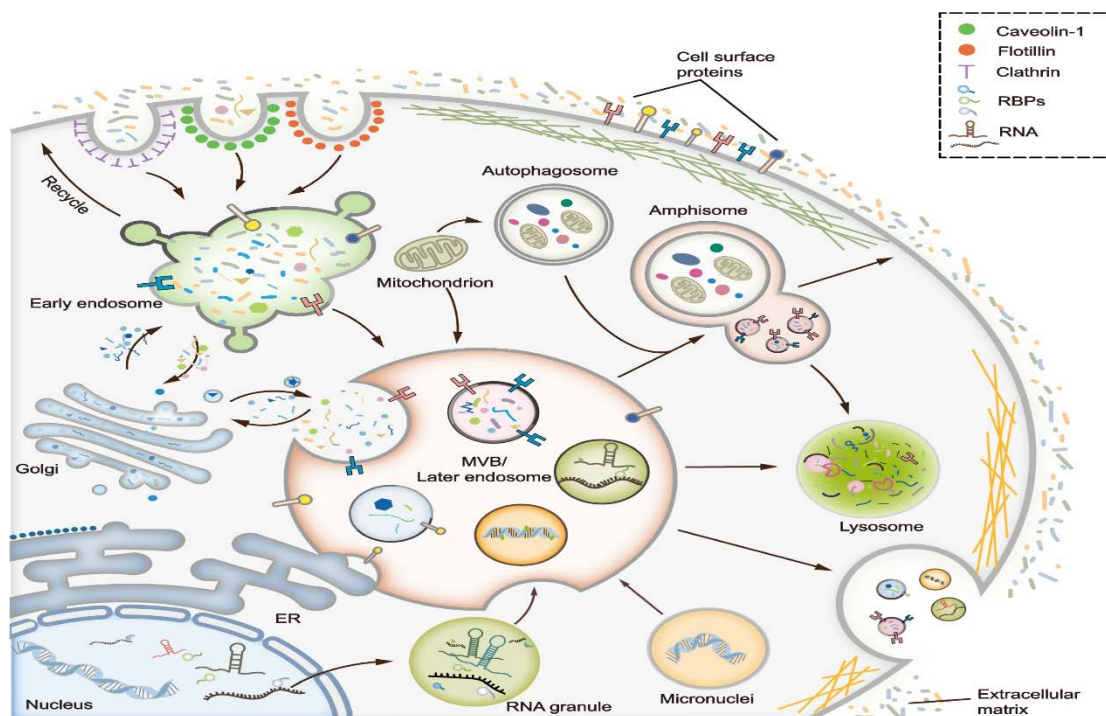
1.4.4 Δομή, βιογένεση και λειτουργία των εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα είναι μικρού μεγέθους, με διάμετρο 30 έως 150 nm, και ταξινομούνται ως μικρά εξωκυτταρικά κυστίδια (small EVs – sEVs) (Liu et al., 2024a). Πιο συγκεκριμένα, τα εξωσώματα σχηματίζονται μέσω των ενδοσωμικών μονοπατιών, σχηματίζονται μέσω της εσωτερίκευσης μεμβρανικών περιοχών και την ωρίμανση πρώιμα σε όψιμα ενδοσώματα, τα οποία μετατρέπονται σε πολυκυστικά σωμάτια (multivesicular bodies – MVBs). Αυτά, στη συνέχεια, συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνουν τα εξωσώματα στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Liu et al., 2024a). Η έκκρισή τους πραγματοποιείται από ποικίλα κύτταρα και ανιχνεύονται στο πλάσμα, στα ούρα, στο γάλα, στα αμνιακά υγρά και στον ασκίτη (Zeng et al., 2023). Ο χαρακτηρισμός τους, ωστόσο, παρουσιάζει δυσκολίες καθώς ακόμα και αν απομονωθούν από την ίδια κυτταρική σειρά, εμφανίζονται με διαφορετική μορφολογία και μέγεθος.

Η βιογένεση των εξωσωμάτων εντάσσεται στην ενδοσωματική οδό διακίνησης μεμβρανικών συστατικών και ξεκινά με τον σχηματισμό πρώιμων ενδοσωμάτων από ενδοκυττάρωση τμημάτων της πλασματικής μεμβράνης (Han et al., 2022a). Τα πρώιμα ενδοσώματα ωριμάζουν σε όψιμα ενδοσώματα και εξελίσσονται σε πολυκυστικά ενδοσώματα (multivesicular bodies, MVBs), στο εσωτερικό των οποίων δημιουργούνται ενδοαυλικά κυστίδια (intraluminal vesicles, ILVs) μέσω εσωτερικής εκβλάστησης της μεμβράνης. Η «διαλογή» και ενσωμάτωση του μοριακού φορτίου στα ILVs επιτελείται είτε μέσω του συστήματος ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, υπομονάδες ESCRT-0/-I/-II/-III με βοηθητικούς παράγοντες όπως TSG101, ALIX και την ATPάση VPS4, είτε μέσω ESCRT-ανεξάρτητων μηχανισμών που βασίζονται σε τετρασπανίνες (π.χ. CD9, CD63, CD81) και στη βιοσύνθεση κεραμιδίου από σφιγγομυελινάση, καθώς και σε μικροθραύσεις πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια (Liu et al., 2024b). Η τύχη των MVBs καθορίζεται από σηματοδοτικά και μεταβολικά ερεθίσματα: μπορούν να συγχωνευθούν με λυσοσώματα οδηγώντας σε αποδόμηση του περιεχομένου τους ή να στραφούν προς την εκκριτική οδό, όπου συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη και αποβάλλουν τα ILVs ως εξωσώματα στο εξωκυττάριο διάστημα. Η στοχευμένη μεταφορά, πρόσδεση (docking) και τελική σύντηξη των MVBs με την κυτταρική μεμβράνη, ρυθμίζονται από Rab GTPάσες (ενδεικτικά Rab27a/b, Rab11, Rab35) και τα αντίστοιχα effectors τους, σε συνεργασία με το κυτταροσκελετικό δίκτυο (ακτίνη, μικροσωληνίσκοι) και το σύστημα σύντηξης SNARE (Han et al., 2022b). Τα παραγόμενα εξωσώματα διατηρούν μεμβράνη πλούσια σε σφιγγολιπίδια, χοληστερόλη και φωσφατιδυλοσερίνη, που προσδίδει μηχανική σταθερότητα και προστασία στο φορτίο τους, το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες μεμβράνης και κυτοσωλικές πρωτεΐνες, καθώς και νουκλεϊκά οξέα (mRNA, miRNA, lncRNA, circRNA) και μεταβολίτες. Η σύνθεση και το προφίλ φορτίου

είναι έντονα εξαρτώμενα από τον κυτταρικό τύπο και το μικροπεριβάλλον (π.χ. υποξία, φλεγμονή, οξειδωτικό στρες), γεγονός που εξηγεί την ετερογένεια των εξωσωμάτων και τη λειτουργική τους εξειδίκευση στη διακυτταρική σηματοδότηση και ρύθμιση της ομοιόστασης (Liu et al., 2024c).

Τα εξωσώματα μεταφέρουν ποικίλο βιολογικό φορτίο, το οποίο περιλαμβάνει τόσο διαμεμβρανικά όσο και ενδοκυτταρικά μόρια. Το ενδοκυτταρικό τους φορτίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες, RNA, DNA, αμινοξέα, λιπίδια και μεταβολίτες, τα οποία συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών και στην βιογένεσή τους (Xie et al., 2022b). Η κύρια λειτουργία των εξωσωμάτων είναι η διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ απομακρυσμένων κυττάρων καθώς δρουν ως φορείς βιολογικά ενεργών ουσιών οι οποίες ασκούν ρυθμιστικές επιδράσεις (Zeng et al., 2023).



Εικόνα 3 Κεντρικό ρόλο στη βιογένεση των εξωσωμάτων διαδραματίζουν τα πολυκυστιδικά σωμάτια (*multivesicular bodies, MVBs*). Τα MVBs επικοινωνούν δυναμικά με άλλα οργάνδια και κυτταρικά διαμερίσματα, όπως το δίκτυο *trans*-Golgi (TGN), το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τα μιτοχόνδρια, τα φαγοσώματα, τα κοκκία RNA και τους μικροπυρήνες. Μέσα από αυτές τις αλληλεπιδράσεις, διαφορετικά φορτία —πρωτεΐνες, RNA, DNA και λιπίδια— διαχωρίζονται και εμπλουτίζουν τα MVBs.

Κατά την ωρίμανση των MVBs, αυτά μπορούν να ακολουθήσουν δύο κύριες πορείες: είτε να συγχωνευθούν με τα λυσοσώματα και να υποστούν αποικοδόμηση, είτε να συγχωνευθούν με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας τις ενδοαυλικές κυστίδια (*intraluminal vesicles, ILVs*) στο εξωκυττάριο περιβάλλον· σε αυτήν την περίπτωση τα ILVs ονομάζονται εξωσώματα. Επιπλέον, τα MVBs είναι δυνατόν να συγχωνευθούν με αυτοφαγοσώματα, σχηματίζοντας τα λεγόμενα αμφισώματα (*amphisomes*), τα οποία είτε κατευθύνονται προς

αποικοδόμηση μέσω λυσοσωμάτων είτε συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη για την έκκριση εξωσωμάτων.
Πηγή: Han et al., 2022

1.4.2 Προγνωστική και διαγνωστική αξία

Καθώς η επιστημονική κοινότητα άρχισε να αποκτά περισσότερες γνώσεις σχετικά με τη δομή, τη βιολογία και τη λειτουργία των εξωσωμάτων, αυξήθηκε παράλληλα και το ενδιαφέρον για τη χρήση τους ως διαγνωστικούς και προγνωστικούς δείκτες. Λόγω της ικανότητάς τους να μεταφέρουν ποικίλα μόρια, όπως miRNAs, πρωτεΐνες και λιπίδια, τα εξωσώματα αντανακλούν με ακρίβεια τη φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση του κυττάρου προέλευσης. Η σταθερότητα των φορτίων τους στο κυκλοφορικό σύστημα τα καθιστά ιδανικούς υποψήφιους βιοδείκτες για μη επεμβατικές διαγνωστικές προσεγγίσεις (Doyle & Wang, 2019).

Ενδεικτικά, σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, έχουν ανιχνευθεί εξωσώματα που φέρουν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη, προσφέροντας δυνατότητες πρόωμης διάγνωσης πριν την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων (Stuendl et al., 2016). Αντίστοιχα, στη νόσο Alzheimer, εξωσωματικά φορτία όπως η φωσφορυλιωμένη Tau και το Aβ42 έχουν συσχετιστεί με τα πρώιμα στάδια της νόσου, ενισχύοντας τη σημασία τους στην έγκαιρη ανίχνευση και στην παρακολούθηση της εξέλιξης (Goetzl et al., 2016).

Στον τομέα των μεταβολικών διαταραχών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, εξωσώματα που προέρχονται από ηπατικά ή λιπώδη κύτταρα περιέχουν χαρακτηριστικά μικροRNA (όπως το miR-122 και το miR-192), τα οποία σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη μεταβολική φλεγμονή (Thomou et al., 2017). Επιπλέον, σε καρδιαγγειακά νοσήματα, έχει παρατηρηθεί ότι εξωσωματικά miRNAs, όπως το miR-1, miR-133 και miR-208, αυξάνονται στο πλάσμα μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, και προτείνονται ως αξιόπιστοι πρώιμοι δείκτες βλάβης του καρδιακού μυός (Cheng et al., 2010).

Η ευρεία συμμετοχή των εξωσωμάτων σε διαφορετικά παθολογικά πλαίσια αναδεικνύει τη σημασία τους όχι μόνο για τη διάγνωση αλλά και για την παρακολούθηση της πορείας μιας ασθένειας ή της ανταπόκρισης σε θεραπεία. Συνεπώς, αποτελούν ένα υποσχόμενο εργαλείο στον τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής και της υγρής βιοψίας (*The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes* | Science, n.d.).

1.4.3 Προβλεπτική αξία σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος

Τα εξωσώματα, μέσω των μοριακών τους φορτίων όπως miRNAs, mRNAs και πρωτεϊνών, έχουν αναδειχθεί ως υποσχόμενα εργαλεία στην πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου, της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της πιθανότητας υποτροπής (Melo et al., 2015a).

Ένα από τα πρώτα σημαντικά ευρήματα προέρχεται από τους Melo και συνεργάτες (2015), οι οποίοι ταυτοποίησαν την γλυκοπρωτεΐνη GPC1 (glypican-1) σε εξωσώματα ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, δείχνοντας υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία. Το μόριο αυτό συνδέθηκε με το φορτίο του όγκου, την έκταση της νόσου και την επιβίωση των προ- και μετεγχειρητικών ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος σταδίου I–II, απουσιάζοντας από υγιείς δότες και ασθενείς με παγκρεατίτιδα (Melo et al., 2015a). Συμπληρωματικά, εξωσωματικές πρωτεΐνες όπως οι GPRC5C και EPS8 έχουν εντοπιστεί, επίσης, σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος σταδίου I–II, ακόμα και με απουσία CA19-9. Υγιείς δότες και ασθενείς με παγκρεατίτιδα ήταν αρνητικοί για τις πρωτεΐνες, αναδεικνύοντας και αυτές την διαγνωστική τους αξία σε πρώιμο στάδιο (Yoshioka et al., 2022).

Σε γονιδιωματικό επίπεδο, η έκφραση εξωσωματικών miRNAs έχει συνδεθεί με την πρόγνωση. Για παράδειγμα, τα αυξημένα επίπεδα του miR-21, το οποίο προωθεί την μετανάστευση των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων, έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση και αυξημένη πιθανότητα υποτροπής (Ma et al., 2020). Επίσης, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Kawamura S. και τους συνεργάτες του (2018) αναφέρει ότι τα αυξημένα επίπεδα των εξωσωματικών miR-451a και miR-21 στο πλάσμα της πυλαίας φλέβας (PVB) ασθενών με παγκρεατικό καρκίνωμα μπορεί να λειτουργούν ως δείκτες για τον εντοπισμό ασθενών με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και χαμηλή επιβίωση μετά από χειρουργική επέμβαση. Αυτό υποδηλώνει τη δυνητική τους χρήση για τη βελτίωση της πρόγνωσης στο μέλλον (Kawamura et al., 2019).

Πέραν των miRNA, πρωτεΐνες όπως ο υποδοχέας EphA2 στον ορό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, συμπληρώνοντας τους καθιερωμένους δείκτες CA 19-9 και CA 242, με στόχο τη βελτίωση της έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου του παγκρέατος (Wei et al., 2020).

Μία ακόμη σημαντική μελέτη των Allenson και συν. (2017) ανέδειξε την υψηλή συχνότητα ανίχνευσης μεταλλαγμένου γονιδίου KRAS σε DNA που προέρχεται από εξωσώματα και κυκλοφορεί στο αίμα ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος σε πρώιμα στάδια. Η ανάλυση έδειξε ότι η ανίχνευση του μεταλλαγμένου KRAS σε εξωσωματικό DNA μπορεί να ταυτοποιήσει ασθενείς που δεν εμφανίζουν ακόμη εκτεταμένη νόσο. Επιπλέον, τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο συνδυασμός της ανάλυσης εξωσωματικού DNA με άλλους καθιερωμένους δείκτες θα μπορούσε να βελτιώσει την ικανότητα πρόγνωσης και την επιλογή θεραπευτικής

στρατηγικής για ασθενείς υψηλού κινδύνου. Η μελέτη αυτή ενισχύει την άποψη ότι η μοριακή ανάλυση εξωσωμάτων αποτελεί πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την παρακολούθηση και την πρόγνωση της πορείας του καρκίνου του παγκρέατος (Allenson et al., 2017).

Συνολικά, τα εξωσώματα αποτελούν μια ελκυστική μη επεμβατική πλατφόρμα για την πρόγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου του παγκρέατος. Η χρήση πάνελ βιοδεικτών, αντί για μεμονωμένα μόρια, φαίνεται να προσφέρει υψηλότερη διαγνωστική και προγνωστική ακρίβεια, ενισχύοντας τη δυναμική τους στη στοχευμένη και εξατομικευμένη προσέγγιση των ασθενών (Makler & Asghar, 2020).

1.5 CD63

Η CD63 είναι μία τετρασπανίνη, μέλος της οικογένειας των tetraspanins, που εκφράζεται εκτενώς στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες και κυρίως στα πολυκυστιδικά σωματίδια (MVBs), αποτελώντας βασικό συστατικό των εξωσωμάτων (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Ο φυσιολογικός της ρόλος σχετίζεται με τη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης, τη διακίνηση πρωτεϊνών και την οργάνωση των μεμβρανικών μικροπεριβαλλόντων (tetraspanin-enriched microdomains, TEMs) (Pols & Klumperman, 2009). Λόγω της πλούσιας παρουσίας της στην επιφάνεια των εξωσωμάτων, η CD63 χρησιμοποιείται ευρέως ως καθολικός δείκτης εξωσωμάτων, συμβάλλοντας στην ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό τους σε πειραματικά και κλινικά δείγματα (Théry et al., 2018).

1.5.1 Προγνωστική αξία

Πέρα από τον ρόλο της ως δομικό μόριο των εξωσωμάτων, η CD63 έχει αναγνωριστεί ως διαγνωστικός ή προγνωστικός βιοδείκτης σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων. Έχει συσχετιστεί με την παθογένεση του μελανώματος, όπου ρυθμίζει την ενδοκυττάρια διακίνηση της πρωτεΐνης PMEL και τη δημιουργία μελανοσωμάτων (Raposo & Marks, 2007). Επίσης, έχει αναφερθεί αυξημένη παρουσία της CD63 σε εξωσώματα ασθενών με καρκίνο του μαστού και του προστάτη, υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο στη μετάδοση σηματοδοτικών μορίων που ευνοούν τη μετάσταση (Logozzi et al., 2009; Minciacchi et al., 2015). Επιπλέον, μεταβολές στην έκφραση της CD63 έχουν καταγραφεί σε φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, όπου φαίνεται να επηρεάζει τη διακυτταρική επικοινωνία μέσω εξωσωμάτων (Lu et al., 2021).

1.5.2 Προγνωστική αξία για το καρκίνο του παγκρέατος

Στον καρκίνο του παγκρέατος (PDAC), η CD63 μελετάται ως πιθανός βιοδείκτης πρώιμης διάγνωσης και πρόγνωσης. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα εξωσώματα πλούσια σε CD63 μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, προάγοντας την αγγειογένεση και την ανοσοδιαφυγή (Costa-Silva et al., 2015). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα CD63-θετικών εξωσωμάτων στον ορό ασθενών με PDAC έχουν συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια νόσου και χειρότερη συνολική επιβίωση (Madhavan et al., 2015). Αν και απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός, τα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η CD63 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόπιστο υγρό βιοδείκτη για τη βελτίωση της διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου (Odaka et al., 2022).

1.6 PD-1/PD-L1

Ο PD-1 (Programmed Death-1) είναι υποδοχέας ανοσορρύθμισης που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, B-κύτταρα και κύτταρα του μυελού, όπου λειτουργεί ως ανασταλτικό μόριο μειώνοντας την υπερβολική ενεργοποίηση και αποτρέποντας την αυτοανοσία (Francisco et al., 2010). Πέρα από τον κλασικό κυτταρικό εντοπισμό, πρόσφατες μελέτες έχουν καταγράψει ότι μοριακές μορφές του άξονα PD-1/PD-L1 βρίσκονται επίσης σε κυκλοφορούντα εξωσωματικά κλάσματα (EVs), υποδηλώνοντας ότι τα εξωσώματα μπορούν να μεσολαβήσουν στην έκταση της PD-1-σχετιζόμενης ανοσορρύθμισης σε απόσταση από τον πρωτογενή όγκο ή εστία (Serrati et al., 2022).

1.6.1 Προγνωστική αξία

Στην ογκολογία, εξωσωματικά μόρια που σχετίζονται με τον άξονα PD-1/PD-L1 έχουν προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC), η παρουσία εξωσωματικού PD-L1 έχει συσχετιστεί με αναστολή της T-κυτταρικής δραστηριότητας και μειωμένη ανταπόκριση σε ανοσοθεραπεία (*The Role of Exosomal PD-L1 in Tumor Progression and Immunotherapy* | *Molecular Cancer* | *Full Text*, n.d.; Zhou et al., 2020). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στο μελάνωμα, όπου τα εξωσώματα που φέρουν PD-1 ή PD-L1 προβλέπουν την αντίσταση στη θεραπεία με anti-PD-1 μονοκλωνικά

αντισώματα (Del Re et al., 2018). Τα κυκλοφορούντα EVs που φέρουν PD-1 (exo-PD-1), έχουν συνδεθεί με μηχανισμούς ανοχής στη θεραπεία σε ορισμένα μοντέλα όγκων, δείχνοντας ότι τόσο ο PD-1 όσο και ο PD-L1 σε εξωσώματα έχουν βιοδείκτες «υποσχόμενης» κλινικής αξίας σε διάφορες νόσους (Zhou et al., 2020).

1.6.2 Προγνωστική αξία για το καρκίνο του παγκρέατος

Για τον παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (PDAC) τα περισσότερα δεδομένα επικεντρώνονται στο εξωσωματικό PD-L1 (exo-PD-L1): κλινικές σειρές έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα exo-PD-L1 σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, και τα υψηλότερα επίπεδα συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση, γεγονός που υποστηρίζει τη δυνητική χρήση τους ως προγνωστικού δείκτη στον PDAC (*The Role of Exosomal PD-L1 in Tumor Progression and Immunotherapy | Molecular Cancer | Full Text*, n.d.). Σε μελέτη σε ασθενείς με PDAC βρέθηκε ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα exo-PD-L1 είναι υψηλότερα σε μεταστατικό συγκριτικά με το τοπικά προχωρημένο PDAC και σχετίζονται με δυσμενή αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι τα exo-PD-L1 μπορεί να αντανakλούν το φορτίο και την επιθετικότητα της νόσου. Αντίθετα, η μελέτη του exo-PD-1 στον PDAC είναι πολύ πιο περιορισμένη — δηλαδή δεν υπάρχουν ισχυρές, επαναλαμβανόμενες ενδείξεις για exo-PD-1 στον PDAC όπως συμβαίνει για το exo-PD-L1 — και επομένως απαιτούνται επιπλέον, καλά σχεδιασμένες μελέτες για να καθοριστεί αν ο exo-PD-1 μπορεί να λειτουργήσει ως διαγνωστικός ή προγνωστικός δείκτης στην κλινική πράξη του PDAC (Bunduc et al., 2022).

1.7 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των εξωκυτταρικών σωματιδίων σε πλάσμα ασθενών, μέσω της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής. Αν και η κυτταρομετρία ροής αποτελεί διαδεδομένη τεχνική, η εφαρμογή της στον συγκεκριμένο τομέα παραμένει περιορισμένη, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη διερεύνηση κατάλληλων παραμέτρων για την αξιόπιστη ανάλυση.

Για τον σκοπό αυτό, τα δείγματα πλάσματος προετοιμάστηκαν με τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις πριν από την εισαγωγή φθοριοχρωμάτων και την ανάλυση στο κυτταρόμετρο: (α) απομόνωση εξωσωμάτων μέσω χημικής καθίζησης, (β) χρήση στηλών αποκλεισμού μεγέθους,

και (γ) φυγοκέντριση χωρίς περαιτέρω κατεργασία. Αφού διαμορφώθηκε το πρωτόκολλο, αξιολογήθηκε ο αριθμός και η ποσότητα των παραγόμενων εξωκυτταρικών σωματιδίων ως πιθανοί βιοδείκτες για το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η συσχέτιση διαφορετικών μεγεθών εξωκυτταρικών σωματιδίων με το στάδιο της νόσου και το ποσοστό επιβίωσης όσο, τόσο σε ασθενείς με πρόιμη όσο και με μεταστατική μορφή.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την έκφραση τριών μορίων με καθιερωμένη ερευνητική αξία ως υποψήφιοι βιοδείκτες: CD63, PD-1 και PD-L1. Η μελέτη στοχεύει συνεπώς όχι μόνο στη δημιουργία ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό των εξωκυτταρικών σωματιδίων μέσω κυτταρομετρίας ροής, αλλά και στην ανάδειξη νέων προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών για το PDAC.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Επιλογή δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από πλάσμα ασθενών που συμμετείχαν στο πρόγραμμα ΕΔΙΜΟ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Στο πρόγραμμα συμμετείχαν ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, από τους οποίους επιλέχθηκαν εκείνοι που πληρούσαν τα εξής κριτήρια: διάγνωση με καρκίνο του παγκρέατος, ύπαρξη επαρκών κλινικών δεδομένων και συλλογή αίματος από περισσότερα του ενός χρονικά σημεία.

Συνολικά συμπεριλήφθηκαν 85 δείγματα πλάσματος από 42 ασθενείς εκ των οποίων οι 28 έχουν δύο σημεία αιμοληψίας, και από 14 υγιείς δότες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου.

2.2 Απομόνωση πλάσματος μετά από αιμοληψία

Μετά τη συλλογή του αίματος σε σωληνάρια EDTA, το πλάσμα απομονώθηκε με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (η πρώτη στα 1.000g για 10 λεπτά και η δεύτερη στα 2.000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Τα τελικά πλάσματα τοποθετήθηκαν σε cryovials και αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μελλοντική χρήση.

2.3 Απομόνωση εξωσωμάτων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δυο πρωτόκολλα απομόνωσης εξωκυττάρων οργανιδίων.

2.3.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με χημική καθίζηση

Για την απομόνωση των εξωσωμάτων από το πλάσμα του αίματος με χημική καθίζηση χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο EXO-Prep (HBM-EXP-B5, HansaBioMed Life Sciences ΟΥ) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα πλάσματος που είχαν αποθηκευτεί σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C , αποψύχθηκαν σε θερμοκοιτίδα. Μετά την πλήρη απόψυξη, τοποθετήθηκαν 100μl πλάσματος σε erendorf και υποβλήθηκαν σε

φυγοκέντρωση στις $10.000\times g$ για 30 λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και αιμοπεταλίων. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο και σε αυτά προστέθηκε το διάλυμα EXO-Prep σε αναλογία 1:4 (δηλαδή 25 μ l αντιδραστηρίου). Το μείγμα αναδεύτηκε καλά με πιπέτα και με ήπια ανακίνηση και επωάστηκε στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις $10.000\times g$, και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα, στο οποίο θεωρείται ότι εντοπίζονται τα εξωσώματα, υποβλήθηκε σε δεύτερη φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις $1.500\times g$, και το υπερκείμενο απορρίφθηκε εκ νέου. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μ l ρυθμιστικού διαλύματος PBS $1\times$ και αποθηκεύτηκε στους -20°C .

2.3.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με στήλες

Για την απομόνωση των εξωσωμάτων από το πλάσμα του αίματος με στήλες χρησιμοποιήθηκε το miniPURE-EVs (Size Exclusion Chromatography columns for Exosome and Microvesicle isolation) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα πλάσματος που είχαν αποθηκευτεί σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C , αποψύχθηκαν σε θερμοκοιτίδα. Μετά την πλήρη απόψυξη, τα δείγματα πλάσματος τοποθετήθηκαν σε ependorf και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση στις $10.000\times g$ για 30 λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και αιμοπεταλίων. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και χρησιμοποιήθηκε άμεσα για φόρτωση στη στήλη. Πριν από τη χρήση, η στήλη ανοίχθηκε (άνω και κάτω καπάκι) ώστε να αποστραγγιστεί το προϋπάρχον ρυθμιστικό διάλυμα, χωρίς όμως να αφηθεί η ρητίνη να στεγνώσει σε κάποιο στάδιο. Ακολούθησε πλύση της στήλης με τρεις κατ' όγκον διελεύσεις από PBS $1\times$ ($3 \times 4 \text{ mL}$) για την απομάκρυνση καταλοίπων buffer. Στη συνέχεια, φορτώθηκε προσεκτικά το δείγμα πλάσματος, χρησιμοποιήθηκαν 500 μ L από δύο υγιείς δότες, HD (Νίνα) και HD (Ιφη), και το πρώτο εκλούωμα των 100 μ L απορρίφθηκε. Μόλις το δείγμα εισήλθε πλήρως στη ρητίνη, προστέθηκε συνεχώς PBS $1\times$ για να διατηρείται η στήλη σε υγρή κατάσταση και να εξασφαλίζεται σταθερή ροή. Συλλέχθηκαν διαδοχικά 20 κλάσματα των 100 μ L· τα εξωσώματα αναμένονται τυπικά στα κλάσματα 7–14, τα οποία κρατήθηκαν για μεταγενέστερες αναλύσεις, ενώ τα υπόλοιπα κλάσματα απορρίφθηκαν.

2.4 Κυτταρομετρία ροής

Τα κυκλοφορούντα εξωσώματα (EVs) ανιχνεύθηκαν, αναλύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν απευθείας σε μη επεξεργασμένα δείγματα ολικού αίματος. Το βασικό πλεονέκτημα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι ότι δεν απαιτεί στάδιο προ-αναλυτικού εμπλουτισμού, καθιστώντας το έτσι μια γρήγορη και αξιόπιστη τεχνική για την ανίχνευση εξωσωμάτων μεγέθους 0,1–1 μm σε ακατέργαστα βιολογικά υγρά, εξασφαλίζοντας παράλληλα ακριβή αποτελέσματα στην καταμέτρησή τους (Marchisio et al., 2020).

2.4.1 Βαθμονόμηση του κυτταρόμετρου ροής

Αρχικά η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο BD FACSMelody™ Cell Sorter. Για τη βαθμονόμηση του κυτταρόμετρου ροής χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, Rosetta Calibration Beads οι οποίες επιτρέπουν τη μετατροπή των αυθαίρετων μονάδων σκέδασης φωτός που καταγράφει το κυτταρόμετρο σε πραγματικό μέγεθος σωματιδίων σε νανόμετρα (nm), αναφερόμενο στη διάμετρό τους. Αρχικά, 30 λεπτά πριν τη χρήση, το φιαλίδιο αναδεύτηκε έντονα για 10 δευτερόλεπτα και μία σταγόνα από το διάλυμα προστέθηκε σε κατάλληλο σωληνάριο ροής, όπου αραιώθηκε με απιονισμένο νερό. Το μείγμα ανακινήθηκε εκ νέου και χρησιμοποιήθηκε άμεσα, διασφαλίζοντας την ύπαρξη επαρκούς αριθμού (>1.000) φθορίζοντων beads για αξιόπιστη βαθμονόμηση.

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε ενεργοποιώντας το πιο ευαίσθητο κανάλι σκέδασης (SSC/SC/LALS). Τα Rosetta Calibration Beads και τα δείγματα μετρήθηκαν στις ίδιες ρυθμίσεις. Για βέλτιστη βαθμονόμηση, η στάθμη κατωφλίου (threshold) και η τάση του καναλιού σκέδασης ρυθμίστηκαν έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των μικρότερων beads του μίγματος, διατηρώντας ταυτόχρονα το μέγιστο δυναμικό εύρος. Η τάση του πιο ευαίσθητου πράσινου καναλιού φθορισμού (π.χ. FITC) ρυθμίστηκε ώστε να ανιχνεύεται τουλάχιστον ένας πληθυσμός θετικών beads. Κατά τη μέτρηση εξασφαλίστηκε ότι ο φωτεινότερος πληθυσμός θετικών beads περιείχε τουλάχιστον 1.000 μετρήσεις (counts). Η ταχύτητα της ανάλυσης ρυθμίστηκε στα 10.000 events. Τέλος, μετρήθηκε δείγμα απιονισμένου νερού με τις ίδιες ρυθμίσεις για επιβεβαίωση χαμηλού υποβάθρου.

Το πρόγραμμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η βαθμονόμηση είναι Rosetta Calibration Setup.exe.

2.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πλάσματος χρησιμοποιήθηκε το Custom kit της BD biosciences (Dyes for Integer EV detection Cat# 626267). Λόγο της μικρής διακριτικής ικανότητας του μηχανήματος χρησιμοποιήθηκε καθαρό PBS το οποίο υπέστη φυγοκέντρηση στα 13.000g για 10 λεπτά και φιλτράρισμα με φίλτρο 0,2nm. Στη συνέχεια τα δείγματα πλάσματος αποψύχθηκαν σε θερμοκοιτίδα, φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000 g για 10 λεπτά και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Για 5μl πλάσματος προστέθηκαν 195 μl PBS, 0,2 μl lipophilic cationic dye, 0,2 μl phalloidin FITC, 4 μl PE mouse antigen για την ανίχνευση CD63+ εξωσωμάτων (BD Pharmigens, cat: 561925), 4 μl PerCP/Cyanine5.5 antigene για την ανίχνευση PD-1+ εξωσωμάτων (BioLegend cat: 329914) και 4 μl Brilliant Violet 421TM για την ανίχνευση PD-L1+ εξωσωμάτων (BioLEGEND Cat: 329714). Τα διαλύματα επώστηκαν για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και μετά φυγοκεντρήθηκαν 13.000 g για 10 λεπτά. Επιπλέον, προετοιμάστηκαν και δείγματα controls τα οποία περιείχαν: α) μόνο φιλτραρισμένο PBS 100μl, β) φιλτραρισμένο PBS 95 μl, 0,2 μl lipophilic cationic dye και 0,2 μl phalloidin FITC, γ) φιλτραρισμένο PBS 95 μl και 4 μl PE mouse antigen, δ) φιλτραρισμένο PBS 95 μl και 4 μl PerCP/Cyanine5.5 antigene, ε) 4 μl Brilliant Violet 421TM και στ) μόνο πλάσμα 100μl από τυχαίο ασθενή. Τα δείγματα πλάσματος ασθενών και υγείων δοτών μαζί με τα controls μεταφέρθηκαν σε FACs tubes και μετρήθηκαν στο BD FACSMelodyTM Cell Sorter.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GraphPad Prism, έκδοση 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Η συνολική επιβίωση (OS) ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα από την ένταξη των ασθενών στη μελέτη έως τον θάνατο από οποιαδήποτε αιτία ή την τελευταία καταγεγραμμένη παρακολούθηση σε επιζώντες ασθενείς. Η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (DFS/PFS) ορίστηκε ως ο χρόνος από την ένταξη έως την πρώτη τεκμηριωμένη υποτροπή ή τον θάνατο, όποιο γεγονός προηγείτο.

Οι καμπύλες επιβίωσης δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο Kaplan–Meier και οι στατιστικές διαφορές μεταξύ ομάδων συγκρίθηκαν με το log-rank test. Οι συγκρίσεις ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων πραγματοποιήθηκαν με το μη παραμετρικό τεστ Mann–Whitney U, ενώ για την αξιολόγηση συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Spearman.

Για την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες «υψηλής» και «χαμηλής» έκφρασης, χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες ROC (Receiver Operating Characteristic) προκειμένου να καθοριστούν τα βέλτιστα όρια διαχωρισμού (cut-off values). Η προγνωστική αξία

κλινικοπαθολογικών παραμέτρων διερευνήθηκε μέσω αναλύσεων παλινδρόμησης Cox μονής και πολλαπλής μεταβλητής, με παρουσίαση των αντίστοιχων 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (CI).

Όλες οι δοκιμές ήταν διπλής όψης και τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για τιμές $p < 0,05$.

3. Αποτελέσματα

3.1 Περιγραφή δεδομένων ασθενών

42 ασθενείς με PDAC, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην “Ομάδα 1” 23 ασθενείς πρώιμου σταδίου από τους οποίους προέρχονται τα 39 από τα 85 δείγματα πλάσματος και στην “Ομάδα 2” εντάχθηκαν 19 ασθενείς με μεταστατική νόσο από τους οποίους προέρχονται τα 31 από τα 85 δείγματα πλάσματος. Στην ομάδα 1 μόνο οι 16 ασθενείς είχαν δύο σημεία αιμοληψίας ενώ στην ομάδα 2, 12 ασθενείς.

Πίνακας 1 Κλινικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης

	% των ασθενών		
	Σύνολο (N=42)	Ομάδα 1 (N=23)	Ομάδα 2 (N=19)
Ηλικία			
M.O. (εύρος)	68,7619 (50-87)	68,6087 (50-81)	68,94737 (52-87)
≤60	21,43% (9/42)	21,74% (5/23)	21,05% (4/19)
>60	78,57% (33/42)	78,25% (18/23)	78,95% (15/19)
≤65	38,10% (16/42)	39,13% (9/23)	36,84% (7/19)
>65	61,90% (26/42)	60,87% (14/23)	63,16% (12/19)
≤70	52,38% (22/42)	52,17% (12/23)	52,63% (10/19)
>70	47,62% (20/42)	47,83% (11/23)	47,37% (9/19)
Εντόπιση πρωτοπαθούς όγκου			
Κεφαλή	57,14% (24/42)	69,57% (16/23)	42,11% (8/19)
Αυχένας	0% (0/42)	0% (0/23)	0% (0/19)
Σώμα	9,52% (4/42)	13,04% (3/23)	5,26% (1/19)
Ουρά	11,90% (5/42)	4,35% (1/23)	21,05% (4/19)
2 σημεία	19,05% (8/42)	8,70% (2/23)	31,58% (6/19)
N/A	2,38% (1/42)	4,35% (1/23)	0% (0/19)
Φύλλο			
Γυναίκα	45,24% (19/42)	43,48% (10/23)	47,37% (9/19)

Ανδρας	54,76% (23/42)	56,52% (13/23)	52,63% (10/19)
Εργαστηριακοί Βιοδείκτες			
M.O. BIL Tot (εύρος)	1,738718 (0,1-11,7)	1,218 (0,1-11,3)	2,286842 (0,2-11,7)
M.O. CEA (εύρος)	16,45341 (09-115,9)	8,375652 (1-77)	26,775 (0,9-1159)
M.O. CA 19-9 (εύρος)	1274,645 (0-7218)	546,6491 (0-4073)	2204,861 (7-7218)

Από όλους τους ασθενείς της μελέτης (N=42), η μέση ηλικία ήταν τα 69 έτη με εύρος 50 έως 87 έτη. Το 21,43% (9/42) των ασθενών ήταν κάτω των 60 ετών ενώ το 78,57% (33/42) ήταν άνω των 60 ετών, το 38,10% (16/42) των ασθενών ήταν κάτω των 65 ετών ενώ το 61,90% (26/42) και τέλος το 52,38% (22/42) των ασθενών ήταν κάτω των 70 ετών ενώ το 47,62% (20/42) ήταν άνω των 70 ετών. Από τους ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα 1 (N=23), η μέση ηλικία ήταν 68 έτη με εύρος 50 έως 81 έτη ενώ από τους ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα 2 (N=19), η μέση ηλικία ήταν 69 έτη με εύρος 52 έως 87 έτη. Στην ομάδα 1 το 21,74% (5/23) ήταν κάτω των 60 ενώ το 78,25% (18/23) ήταν άνω των 60, το 39,13% (9/23) ήταν κάτω των 65 ενώ το 60,87% (14/23) ήταν άνω των 65 και τέλος το 52,17% (12/23) ήταν κάτω των 70 ενώ το 47,83% (11/23) ήταν άνω των 70. Στην ομάδα 2 το 21,05% (4/19) ήταν κάτω των 60 ενώ το 78,95% (15/19) ήταν άνω των 60, το 36,84% (7/19) ήταν κάτω των 65 ενώ το 63,16% (12/19) ήταν άνω των 65 και τέλος το 52,63% (10/19) ήταν κάτω των 70 ενώ το 47,37% (9/19) ήταν άνω των 70.

Το ποσοστό γυναικών-ανδρών που συμμετείχαν σε αυτή την έρευνα ήταν 45,24% (19/42) και 54,76% (23/42) αντίστοιχα. Στην ομάδα 1 το ποσοστό γυναικών-ανδρών ήταν 43,48% (10/23) και 56,52% (13/23) αντίστοιχα και στην ομάδα 2 47,37% (9/19) και 52,63% (10/19) αντίστοιχα. Από όλους (N=42) τους ασθενείς της μελέτης το 57,14% (24/42) εμφάνισαν πρωτοπαθή όγκο στην κεφαλή του παγκρέατος, το 0% (0/42) στον αυχένα, το 9,52% (4/42) στο σώμα, το 11,90% (5/42) στην ουρά και μόνο το 2,38% (1/42) δεν υπήρχε αναφορά στα κλινικά δεδομένα του ασθενή. Όσο αφορά την ομάδα 1, το 69,57% (16/23) εμφάνισαν πρωτοπαθή όγκο στην κεφαλή του παγκρέατος, το 13,04% (3/23) στο σώμα, το 4,35% (1/23) στην ουρά και το 4,35% (1/23) δεν υπήρχε αναφορά στα κλινικά δεδομένα του ασθενή. Όσον αφορά την ομάδα 2, το 42,11% (8/19) εμφάνισαν πρωτοπαθή όγκο στην κεφαλή του παγκρέατος, το 5,26% (1/19) στο σώμα

και το 21,05% (4/19) στην ουρά. Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν και ασθενείς με πάνω από δύο εστίες όγκου στο πάγκρεας των οποίων το ποσοστό ήταν 19,05% (8/42), με ποσοστό εμφάνισης 8,70% (2/23) στην ομάδα 1 και 31,58% (6/19) στην ομάδα 2.

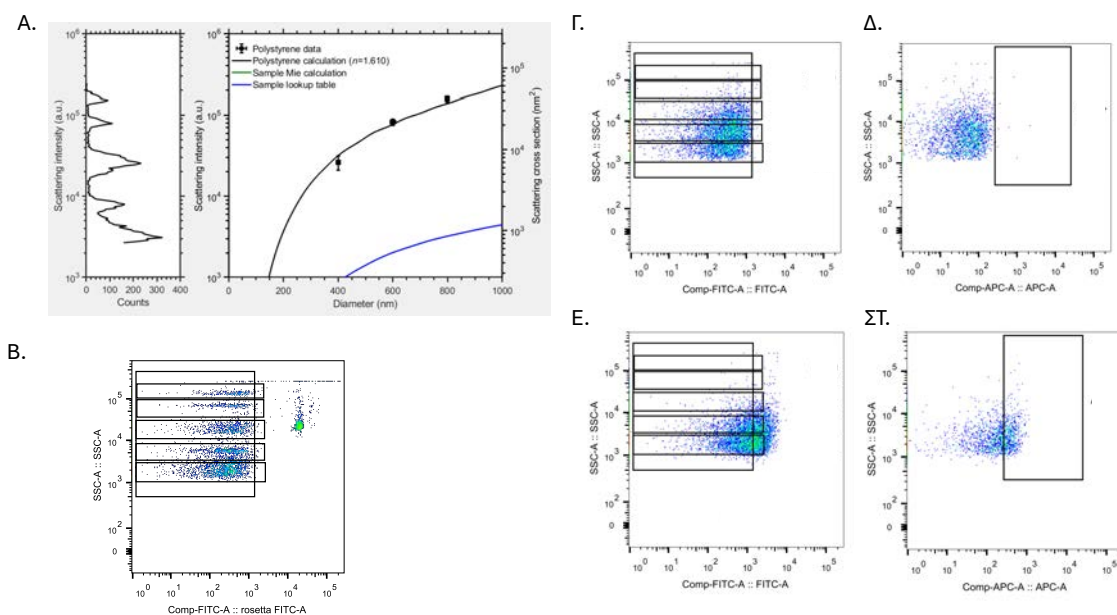
Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) των εργαστηριακών βιοδεικτών ολικής χολερυθρίνης (BIL Tot), καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και καρκινικού αντιγόνου 19-9 (CA 19-9) ήταν 1,738718 με εύρος 0,1 έως 11,7, 16,45341 με εύρος 09-115,9 και 1274,645 με εύρος 0 έως 7218 αντίστοιχα. Για την ομάδα 1 ο μέσος όρος των εργαστηριακών βιοδεικτών BIL Tot, CEA και CA 19-9 ήταν 1,218 με εύρος 0,1 έως 11,3, 8,375652 με εύρος 1 έως 77 και 546,6491 με εύρος 0 έως 4073 αντίστοιχα ενώ για την ομάδα 2 2,286842 με εύρος 0,2 έως 11,7, 26,775 με εύρος 0,9 έως 1159 και 2204,861 με εύρος 7 έως 7218 αντίστοιχα.

3.2 Χαρακτηρισμός μεγέθους και ακεραιότητας εξωκυττάρων οργανιδίων στο κυτταρόμετρο ροής

Για την ανάλυση των ποσοστών των ακέραιων εξωκυττάρων οργανιδίων εφαρμόστηκε στρατηγική «gating» βασισμένη στα Rosetta Calibration Beads και στις χρωστικές APC και FITC-A. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τον αξιόπιστο διαχωρισμό των εξωκυττάρων οργανιδίων από τα υπόλοιπα σωματίδια του πλάσματος, μέσω συνδυασμού πληροφοριών που αφορούν τόσο το μέγεθος όσο και την ακεραιότητα της μεμβράνης τους.

Μετά την εισαγωγή των Rosetta Calibration Beads στο κυτταρόμετρο ροής (FACS) μέσω του λογισμικού *Rosetta Calibration Setup.exe*, δημιουργήθηκε διάγραμμα (Εικ. 1Α) που επέτρεψε την εκτίμηση μεγεθών >200 nm. Βάσει αυτής της κατανομής διαμορφώθηκαν πέντε πύλες (P1–P5), οι οποίες αντιστοιχούν σε διακριτές κατηγορίες μεγέθους: από <400 nm (P1) έως περίπου 1.000 nm (P5), με τις ενδιάμεσες κατηγορίες (P2–P4) να καλύπτουν το υπόλοιπο εύρος (Εικ. 1Β).

Για την εκτίμηση της ακεραιότητας, χρησιμοποιήθηκαν δύο φθοριοχρωστικές: η APC, μια λιπόφιλη χρωστική που ενσωματώνεται στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα των μεμβρανικών σωματιδίων, και η FITC-A (Phalloidin), η οποία διεισδύει αποκλειστικά σε κατεστραμμένες μεμβράνες, δεσμευόμενη με την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Κατά συνέπεια, τα εξωκυττάρια οργανίδια που χαρακτηρίστηκαν ως APC⁺/FITC-A⁻ θεωρήθηκαν ακέραια. Τα όρια για τον χαρακτηρισμό των ακέραιων οργανιδίων ορίστηκαν με βάση control δείγμα (πλάσμα χωρίς χρωστική, unstained), όπως φαίνεται στην εικόνα 1Γ–Δ.



Εικόνα 1 Μεθοδολογία «gating» για την ανάλυση μεγέθους και ακεραιότητας εξωκυττάρων οργανιδίων. (A) Διάγραμμα από το Rosetta Calibration Setup.exe για τον προσδιορισμό μεγεθών >200 nm. (B) Στρατηγική «gating» για τον διαχωρισμό των οργανιδίων σε πέντε κατηγορίες μεγέθους (<400 – 1.000 nm) με βάση τα Rosetta Calibration Beads. (Γ–Δ) Control δείγμα (πλάσμα χωρίς χρωστικές) για τον καθορισμό των ορίων APC⁺/FITC-A⁺. (Ε–Ζ) Ανάλυση τυχαίου δείγματος πλάσματος με όλες τις χρωστικές για την εκτίμηση ακέραιων εξωκυττάρων οργανιδίων και την ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων.

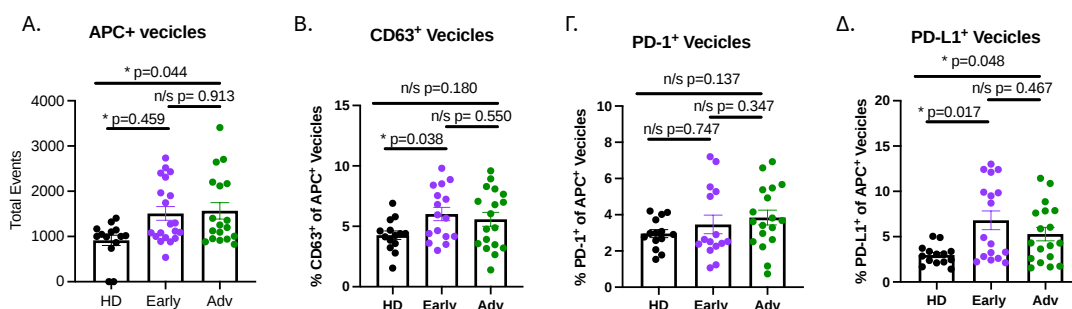
3.3 Διερεύνηση ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών εξωκυττάρων οργανιδίων σε πρώιμο και μεταστατικό στάδιο PDAC

Σκοπός της ανάλυσης ήταν να διερευνηθεί εάν ο αριθμός και η έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα εξωκυττάρια σωματίδια σχετίζονται με το στάδιο του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος και αν διαφοροποιούνται από τους υγιείς δότες.

Αρχικά, εξετάστηκε η συνολική ποσότητα των εξωκυττάρων οργανιδίων στο πλάσμα των συμμετεχόντων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με προχωρημένη νόσο παρουσίασαν σημαντικά αυξημένο αριθμό εξωκυττάρων οργανιδίων σε σύγκριση με τους υγιείς δότες ($p = 0,044$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών πρώιμου σταδίου και μεταστατικών ασθενών, ούτε μεταξύ υγιών δοτών και ασθενών πρώιμου σταδίου (Εικ. 2Α).

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν τα ποσοστά εξωκυττάρων οργανιδίων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες CD63, PD-1 και PD-L1. Για την CD63, ο αριθμός των εξωκυττάρων οργανιδίων που εκφράζουν την πρωτεΐνη ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς πρώιμου σταδίου σε

σύγκριση με τους υγιείς δότες ($p = 0,038$), χωρίς όμως διαφορές μεταξύ πρώιμου και μεταστατικού σταδίου, ούτε μεταξύ μεταστατικών ασθενών και υγιών δοτών. Αντίθετα, για την PD-1, δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Τέλος, για την PD-L1, τα ποσοστά των εξωκυττάρων οργανιδίων που εκφράζουν την πρωτεΐνη ήταν σημαντικά αυξημένα τόσο στους ασθενείς πρώιμου σταδίου ($p = 0,017$) όσο και στους μεταστατικούς ασθενείς ($p = 0,048$), συγκριτικά με τους υγιείς δότες, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών (Εικ. 2B-Γ).



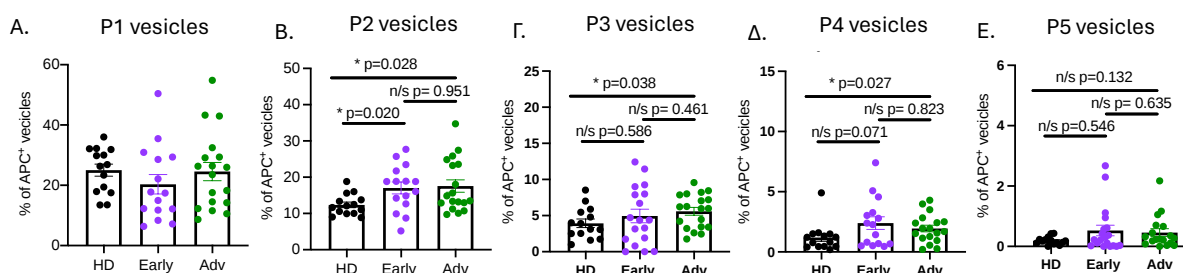
Εικόνα 2 Ποσοτική ανάλυση εξωκυττάρων οργανιδίων στο πλάσμα και έκφραση των πρωτεϊνών CD63, PD-1 και PD-L1. (Α) Συνολικός αριθμός εξωκυττάρων οργανιδίων σε υγιείς δότες (HD, $N=14$), ασθενείς πρώιμου σταδίου (Early) και μεταστατικούς ασθενείς (Advanced). (B-Δ) Ποσοστά εξωκυττάρων οργανιδίων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες CD63, PD-1 και PD-L1 στις ίδιες ομάδες. All PDAC: σύνολο ασθενών με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα ($N=42$). HD: Υγιείς δότες (healthy donors) ($N=14$); Early: Ομάδα 1 ($N=23$); Advanced: Ομάδα 2 ($N=19$); All PDAC: All patients ($N=42$).

3.4 Μεγέθη εξωκυττάρων οργανιδίων ως εν δυνάμει δείκτες σταδιοποίησης

Στόχος της παρούσας ανάλυσης ήταν να διερευνηθεί εάν το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων διαφοροποιείται μεταξύ υγιών δοτών και ασθενών με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, καθώς και αν σχετίζεται με το στάδιο της νόσου.

Ο αριθμός των οργανιδίων κατηγορίας P1 (<400 nm) δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Εικ. 3Α). Για τα οργανίδια κατηγορίας P2, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένος αριθμός στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς δότες ($p = 0,02$ και $p = 0,028$), χωρίς ωστόσο να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ ασθενών πρώιμου σταδίου και μεταστατικών ασθενών (Εικ. 3B). Στην κατηγορία P3, ο αριθμός των οργανιδίων ήταν σημαντικά αυξημένος στους μεταστατικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες ($p = 0,038$), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων συγκρίσεων (Εικ. 3Γ). Αντίστοιχα, για την κατηγορία P4, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των

οργανιδίων στους μεταστατικούς ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς δότες ($p = 0,027$), χωρίς όμως διαφορά μεταξύ πρώιμου και μεταστατικού σταδίου (Εικ. 3Δ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η τάση μείωσης του αριθμού των εξωκυττάρων οργανιδίων στους ασθενείς πρώιμου σταδίου σε σχέση με τους υγιείς δότες, η οποία προσέγγισε οριακά τη στατιστική σημαντικότητα ($p = 0,071$). Τέλος, η κατηγορία P5 (>1.000 nm) δεν συμπεριλήφθηκε περαιτέρω στην ανάλυση, καθώς ο αριθμός των οργανιδίων ήταν εξαιρετικά περιορισμένος (Εικ. 3Ε).



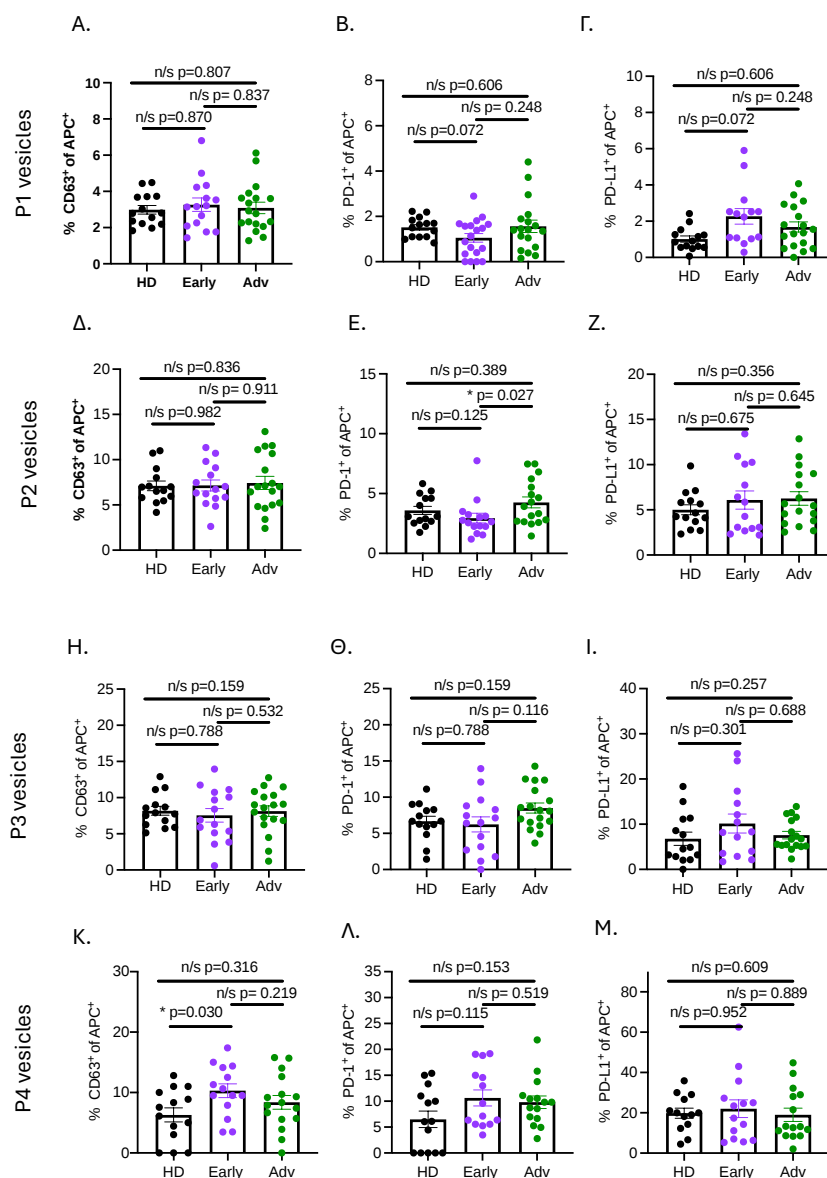
Εικόνα 3 Κατανομή διαφορετικών μεγεθών εξωκυττάρων οργανιδίων σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και υγιείς δότες. (Α–Ε) Διάγραμμα που απεικονίζει τα ποσοστά εξωκυττάρων οργανιδίων με διάμετρο <400 nm έως 1.000 nm (gates P1–P5). HD: Υγιείς δότες (healthy donors) ($N=14$); Early: Ομάδα 1 ($N=23$); Advanced: Ομάδα 2 ($N=19$); All PDAC: All patients ($N=42$).

3.5 Κατανομή πρωτεϊνικών δεικτών ανάλογα με το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των εξωκυττάρων οργανιδίων και της έκφρασης των πρωτεϊνών CD63, PD-1 και PD-L1 σε υγιείς δότες και ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα.

Για την κατηγορία οργανιδίων P1 (<400 nm), η ανάλυση έδειξε ότι τα ποσοστά CD63+, PD-1+ και PD-L1+ δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, καταγράφηκε μία τάση αυξημένης έκφρασης των πρωτεϊνών PD-1 και PD-L1 στους ασθενείς πρώιμου σταδίου συγκριτικά με τους υγιείς δότες ($p = 0,072$) (Εικ. 4, Α–Γ). Στην κατηγορία P2, η έκφραση των πρωτεϊνών CD63 και PD-L1 δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά, αλλά τα PD-1+ οργανίδια ήταν αυξημένα στους μεταστατικούς ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς πρώιμου σταδίου ($p = 0,027$) (Εικ. 4, Δ–Ζ). Για τα οργανίδια P3, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των CD63, PD-1 και PD-L1 μεταξύ των ομάδων (Εικ. 4, Η–Ι). Αντίθετα, στην κατηγορία P4, ο αριθμός των CD63+ οργανιδίων ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς πρώιμου σταδίου συγκριτικά με τους υγιείς δότες ($p =$

0,03), ενώ η έκφραση PD-1 και PD-L1 δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικ. 4, K–M).

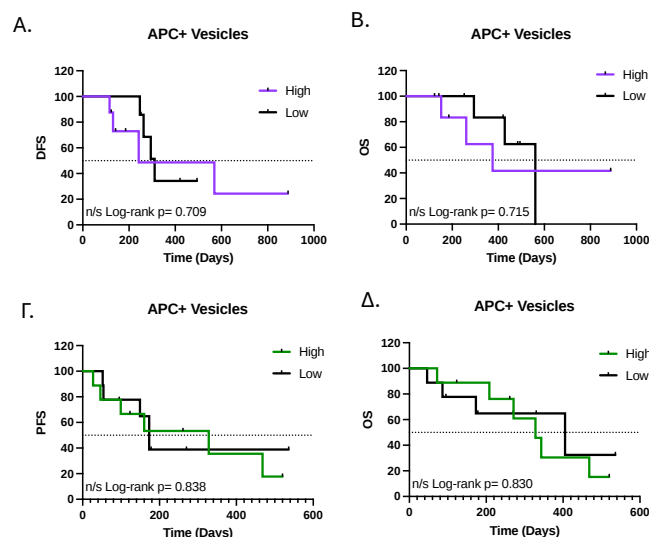


Εικόνα 4 Ποσοστά εξωκυττάρων οργανιδίων διαφορετικών μεγεθών με βάση την έκφραση των πρωτεϊνών CD63, PD-1 και PD-L1. (A-M) Τα διαγράμματα απεικονίζουν τα ποσοστά εξωκυττάρων οργανιδίων με διάμετρο <400 nm έως 1.000 nm (gates P1–P4) στους υγιείς δότες, ασθενείς πρώιμου σταδίου και μεταστατικούς ασθενείς. HD: Υγιείς δότες (healthy donors) (N=14); Early: Ομάδα 1 (N=23); Advanced: Ομάδα 2 (N=19); All PDAC: All patients (N=42).

3.6 Συσχέτιση εξωκυττάρων οργανιδίων με την κλινική έκβαση (DFS/PFS και OS)

Με βάση με τις καμπύλες ROC ορίστηκαν τα κατώφλια των υγείων δοτών και οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε αυτούς που φέρουν υψηλά και χαμηλά APC+ εξωκυττάρια οργανίδια. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των ποσοστών APC+ εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση χωρίς πρόοδο (PFS) και τη συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς με πρώιμη και με μεταστατική νόσο.

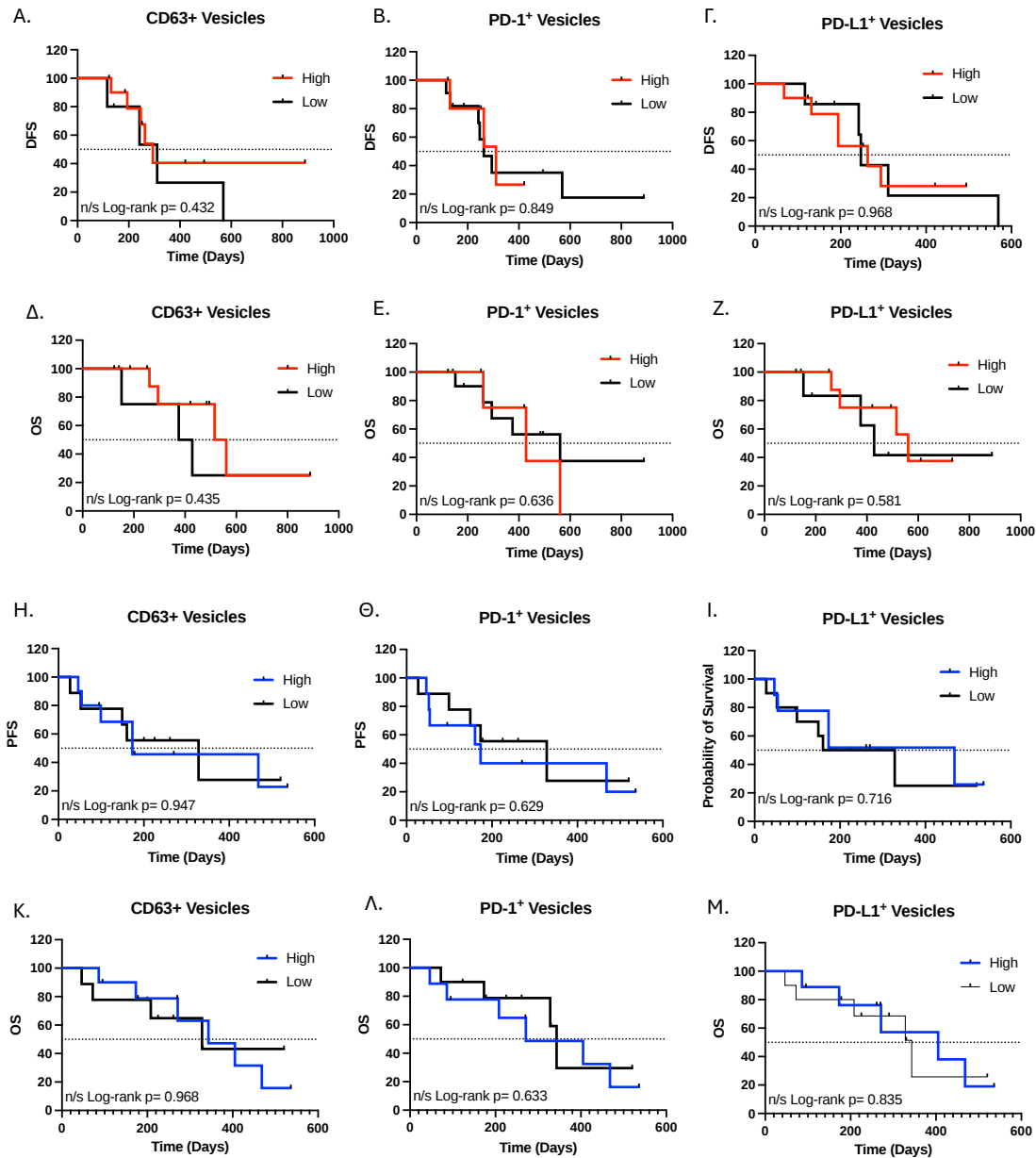
Η Kaplan–Meier ανάλυση έδειξε ότι, όταν οι ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα χωρίστηκαν σε ομάδες υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης APC+ εξωκυττάρων οργανιδίων, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στην επιβίωση χωρίς πρόοδο (DFS/PFS) ούτε στη συνολική επιβίωση (OS), τόσο για τους ασθενείς πρώιμου σταδίου όσο και για τους μεταστατικούς. Παρά την ύπαρξη μικρών τάσεων διαφοροποίησης στις καμπύλες, αυτές δεν ήταν αρκετές ώστε να καταδείξουν προγνωστική αξία. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η συνολική παρουσία APC+ εξωκυττάρων οργανιδίων, ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης για την έκβαση των ασθενών (Εικ. 5).



Εικόνα 5 Σύνολο ασθενών χωρισμένοι σε αυτούς που φέρουν υψηλά και χαμηλά APC⁺ εξωκυττάρια οργανίδια σε ασθενείς με πρώιμη και μεταστατική νόσο. Τα διαγράμματα (Α-Β) απεικονίζουν το σύνολο των ασθενών με πρώιμη νόσο ενώ τα διαγράμματα (Γ-Δ) με μεταστατική νόσο HD: Υγιείς δότες (healthy donors) (N=14); Early: Ομάδα 1 (N=23); Advanced: Ομάδα 2 (N=19); All PDAC: All patients (N=42).

Η ανάλυση των ασθενών με βάση τα ποσοστά εξωκυττάρων οργανιδίων που εκφράζουν CD63, PD-1 και PD-L1 δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην PFS ή OS, ούτε στην κατηγορία πρώιμου σταδίου ούτε στη μεταστατική νόσο. Σε ορισμένες περιπτώσεις φάνηκαν τάσεις προς μικρότερη ή μεγαλύτερη επιβίωση (όπως για PD-1 ή PD-L1 σε συγκεκριμένα υποσύνολα), ωστόσο οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά ισχυρές. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι,

τουλάχιστον στο πλαίσιο του παρόντος δείγματος, η έκφραση αυτών των τριών πρωτεϊνών στα εξωκυττάρια οργανίδια δεν σχετίζεται άμεσα με την κλινική έκβαση των ασθενών (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Σύνολο ασθενών χωρισμένοι σε αυτούς που φέρουν υψηλά και χαμηλά ποσοστά εξωκυττάρια οργανιδίων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες CD63, PD-1 και PD-L1 σε ασθενής με πρώιμη και μεταστατική νόσο. Τα διαγράμματα (Α-Ζ) απεικονίζουν το σύνολο των ασθενών με πρώιμη νόσο ενώ τα διαγράμματα (Ι-Μ) με μεταστατική νόσο HD: Υγιείς δότες (healthy donors) (N=14); Early: Ομάδα 1 (N=23); Advanced: Ομάδα 2 (N=19); All PDAC: All patients (N=42).

3.7 Συσχέτιση του μεγέθους και την έκφραση πρωτεϊνικών δεικτών εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση ασθενών πρώιμου και προχωρημένου σταδίου

Στόχος της ανάλυσης ήταν η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ του μεγέθους και της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών στα εξωκυττάρια οργανίδια με την επιβίωση χωρίς πρόοδο (DFS και PFS) και τη συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς με πρώιμη και με μεταστατική νόσο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ούτε το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων, ούτε οι υποκατηγορίες τους (P1–P4), συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με την επιβίωση χωρίς πρόοδο της νόσου (DFS) ή τη συνολική επιβίωση (OS). Παρόμοια, η έκφραση της πρωτεΐνης CD63 στα εξωκυττάρια οργανίδια δεν εμφάνισε σημαντική προγνωστική αξία, καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων με υψηλή και χαμηλή έκφραση.

Ωστόσο, καταγράφηκαν ορισμένες τάσεις που αξίζουν περαιτέρω διερεύνηση. Συγκεκριμένα, στην κατηγορία P3 τα PD-1+ οργανίδια εμφάνισαν τάση συσχέτισης με μειωμένη επιβίωση χωρίς πρόοδο ($p = 0,093$), ενώ στην ίδια κατηγορία παρατηρήθηκε παρόμοια τάση και για τη συνολική επιβίωση ($p = 0,105$). Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα δεν ξεπέρασαν το όριο της στατιστικής σημαντικότητας, η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πιθανό ρόλο των PD-1+ εξωκυττάρων οργανιδίων στην πρόγνωση των ασθενών πρώιμου σταδίου. Αντίθετα, η έκφραση PD-L1 δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα κλινικά δεδομένα επιβίωσης.

Πίνακας 2 Συσχέτιση του μεγέθους και της έκφρασης των εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση χωρίς πρόοδο (DFS) και τη συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς πρώιμου σταδίου παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές επιβίωσης (median days) και οι τιμές p για κάθε κατηγορία οργανιδίων και πρωτεϊνών (CD63, PD-1, PD-L1).

		Disease Free Survival		Overall Survival	
EVs		Median (days)	p value	Median (days)	p value
P1	High	569	0,310	NA	0,205
	Low	294		428	
P1 CD63+	High	294	0,884	561	0,982
	Low	311		428	
P1 PD1	High	569	0,4	561	0,589

	Low	294		428	
P1 PDL1	High	294	0,79	561	0,6482
	Low	311		428	
P2	High	311	0,588	561	0,949
	Low	294		389	
P2 CD63	High	294	0,621	561	0,765
	Low	311		428	
P2 PD1	High	294	0,641	428	0,25
	Low	569		NA	
P2 PD-L1	High	263	0,256	294	0,223
	Low	440		658	
P3	High	311	0,928	428	0,902
	Low	569		NA	
P3 CD63	High	569	0,412	561	0,376
	Low	294		428	
P3 PD1	High	247	0,093	375	0,105
	Low	569		NA	
P3 PD-L1	High	569	0,32	561	0,464
	Low	270,5		401,5	
P4	High	311	0,555	428	0,797
	Low	270,5		394	
P4 CD63	High	311	0,689	561	0,901
	Low	294		375	
P4 PD1	High	263	0,444	294	0,144
	Low	311		NA	
P4 PD-L1	High	569	0,185	NA	0,593
	Low	263		428	

Όσον αφορά τους ασθενείς με μεταστατική νόσο το μέγεθος των εξωκυτταρικών οργανιδίων (P1–P4) δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ούτε στην PFS ούτε στην OS. Όταν εξετάστηκαν οι υποκατηγορίες με βάση την έκφραση πρωτεϊνών, η CD63 δεν

εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε καμία από τις κατηγορίες μεγέθους (P1–P4). Για το P1 PD-1+, ασθενείς με υψηλά επίπεδα εξωκυττάρων οργανιδίων που εκφράζουν PD-1 παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη PFS (median 149 ημέρες έναντι 328, $p = 0,031$). Για τα οργανίδια μεγαλύτερου μεγέθους, P3, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη OS στους ασθενείς με υψηλή έκφραση PD-L1 (median 271 ημέρες έναντι 468, $p = 0,017$). Οι υπόλοιπες συγκρίσεις (PD-1 και PD-L1 στις κατηγορίες P2 και P4) δεν κατέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως P3 PD-L1 στην PFS καταγράφηκαν τάσεις που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης ($p = 0,031$).

Πίνακας 3 Συσχέτιση του μεγέθους και της έκφρασης των εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση χωρίς πρόοδο (PFS) και τη συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς με μεταστατικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές επιβίωσης (median days) και οι τιμές p για κάθε κατηγορία οργανιδίων και πρωτεϊνών (CD63, PD-1 και PD-L1).

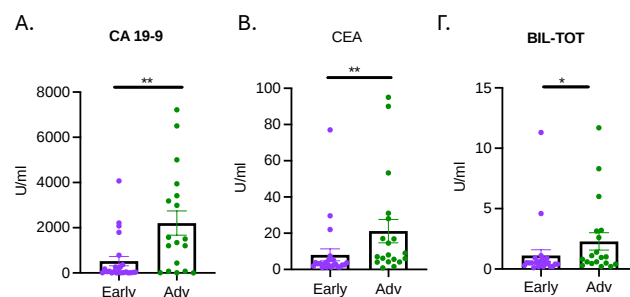
		Progresion Free Survival		Overall Survival	
EVs		Median (days)	p value	Median (days)	p value
P1	High	244	0,754	328	0,831
	Low	173		405	
P1 CD63+	High	173	0,944	468	0,637
	Low	173		343	
P1 PD1	High	149	0,031	271	0,472
	Low	328		343	
P1 PDL1	High	173	0,784	405	0,858
	Low	328		335,5	
P2	High	328	0,674	343	0,935
	Low	173		405	
P2 CD63	High	173	0,665	271	0,566
	Low	328		468	
P2 PD1	High	160	0,414	271	0,528
	Low	328		405	
P2 PD-L1	High	173	0,422	271	0,831
	Low	328		343	
P3	High	328	0,155	343	0,222

	Low	149		208	
P3 CD63	High	328	0,64	328	0,987
	Low	154,5		343	
P3 PD1	High	173	0,306	405	0,859
	Low	Undefined		343	
P3 PD-L1	High	173	0,119	271	0,017
	Low	468		468	
P4	High	173	0,836	343	0,922
	Low	328		405	
P4 CD63	High	468	0,634	271	0,994
	Low	166,5		343	
P4 PD1	High	320,5	0,636	271	0,654
	Low	173		343	
P4 PD-L1	High	320,5	0,868	271	0,936
	Low	173		343	

3.8 Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους

Με σκοπό να αποσαφηνιστεί η κλινική σημασία των ορολογικών δεικτών στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, διερευνήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων CA19-9, CEA και BIL-TOT με το στάδιο της νόσου. Η ανάλυση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για τη διάγνωση, την παρακολούθηση και την εκτίμηση της πρόγνωσης. Παράλληλα, εξετάστηκε η σχέση των εξωκυττάρων οργανιδίων τόσο με το σύνολο των παραγόμενων εξωσωμάτων (P0) και το μέγεθος τους (P1-P3) όσο και με την έκφραση των πρωτεϊνών CD63, PD-1 και PD-L1, προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα μόρια αυτά μπορούν να αποτελέσουν συμπληρωματικούς βιοδείκτες που αντανακλούν το φορτίο και την επιθετικότητα της νόσου.

Η ανάλυση φανέρωσε ότι τα επίπεδα CA19-9 ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με μεταστατική νόσο από ασθενείς πρώιμου σταδίου ($p < 0.01$) (Εικ. 7Α). Επίσης, καταγράφηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων PD-1 σε ασθενείς με μεταστατική νόσο ($p < 0.01$) (Εικ. 7Β). Τέλος, για τα επίπεδα BIL-TOT σε ασθενείς με μεταστατική νόσο είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με ασθενείς με πρώιμη νόσο ($p < 0.05$) (Εικ. 7Γ).



Εικόνα 7 Σύγκριση κλινικών παραμέτρων μεταξύ ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Το διάγραμμα (Α) παρουσιάζει τα επίπεδα του ορολογικού βιοδείκτη CA19-9, το διάγραμμα (Β) τα επίπεδα της πρωτεΐνης CEA, ενώ το διάγραμμα (Γ) τις τιμές της ολικής χολερυθρίνης (BIL-TOT). Early: Ομάδα 1 (N=23); Advanced: Ομάδα 2 (N=19); All PDAC: All patients (N=42).

Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των κλασικών ορολογικών δεικτών (CA 19-9, CEA, BIL-TOT) και των εξωκυτταρικών κυστιδίων διαφορετικού μεγέθους (P1–P3), καθώς και των υποπληθυσμών τους που εκφράζουν CD63, PD-1 και PD-L1, πραγματοποιήθηκε με τον συντελεστή Spearman. Η πλειονότητα των συσχετίσεων δεν ανέδειξε στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν τάσεις προς στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($0,05 < p < 0,1$), οι οποίες αξίζουν ιδιαίτερη αναφορά. Η ολική χολερυθρίνη (BIL-TOT) και P2 PD-L1+ σε ασθενείς με πρώιμη νόσο εμφάνισαν την ισχυρότερη θετική συσχέτιση στον πίνακα ($r=0,5111$) με τιμή $p=0,0637$. Η τιμή αυτή βρίσκεται πολύ κοντά στο όριο στατιστικής σημαντικότητας, γεγονός που υποδηλώνει τάση για συσχέτιση σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Στην ανάλυση της BIL-TOT και P1 PD-1+ σε ασθενείς με μεταστατική νόσο παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση ($r=-0,4050$) με $p=0,0955$, τιμή που επίσης εμπίπτει στο όριο της τάσης. Τέλος, για την BIL-TOT και P2 PD-1+ σε μεταστατικούς ασθενείς καταγράφηκε αρνητική συσχέτιση ($r=-0,3626$) με $p=0,1392$. Αν και δεν είναι κάτω από το όριο των 0,1, βρίσκεται σε σχετικά χαμηλή τιμή και καταγράφεται για πληρότητα, καθώς ενισχύει την εικόνα που παρουσιάζουν τα δεδομένα για τους υποπληθυσμούς PD-1+. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις (CA 19-9, CEA και BIL-TOT σε EARLY και META στάδια, έναντι P0–P3 και CD63+/PD-1+/PD-L1+), οι συσχετίσεις δεν έδειξαν στατιστική σημαντικότητα ($p > 0,1$) και δεν καταγράφηκαν σαφή μοτίβα συσχέτισης.

Πίνακας 4. Συσχέτιση ορολογικών δεικτών (CA19-9, CEA και ολικής χολερυθρίνης – BIL-TOT) με το μέγεθος του όγκου και το στάδιο νόσου σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα.

	CA 19-9
--	---------

		P0	P0 CD63+	P0 PD-1+	P0 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,01071	-0,1088	-0,03214	0,02451
	p- value	0,9744	0,6886	0,9132	0,9284
	95% CI	0,5167 to 0,5322	0,5843 to 0,4222	-0,5474 to 0,5008	-0,4737 to 0,5108
META	Spewrman r	-0,02698	0,00981	0,1852	-0,04047
	p- value	0,9189	0,9716	0,474	0,8779
	95% CI	0,5126 to 0,4718	0,4850 to 0,4999	-0,3381 to 0,6210	-0,5225 to 0,4612
CEA					
		P0	P0 CD63+	P0 PD-1+	P0 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,3857	0,02353	0,1571	-0,1079
	p- value	0,1566	0,9345	0,5756	0,6783
	95% CI	0,1740 to 0,7571	0,4901 to 0,5250	-0,4003 to 0,6297	-0,5701 to 0,4061
META	Spewrman r	-0,04438	0,06502	0,05057	0,06708
	p- value	0,8612	0,7977	0,8421	0,7914
	95% CI	0,5120 to 0,4435	0,4267 to 0,5271	-0,4385 to 0,5166	-0,4251 to 0,5286
BIL-TOT					
		P0	P0 CD63+	P0 PD-1+	P0 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	-0,09009	0,2861	-0,02703	0,2912
	p- value	0,7486	0,2805	0,9253	0,255
	95% CI	0,5869 to 0,4559	0,2592 to 0,6932	-0,5438 to 0,5046	-0,2350 to 0,6854
META	Spewrman r	0,1994	-0,3213	-0,4081	0,04649
	p- value	0,4277	0,1936	0,0928	0,8547
	95% CI	0,3085 to 0,6188	0,6932 to 0,1858	0,7417 to 0,08752	-0,4418 to 0,5136
CA 19-9					
		P1	P1 CD63+	P1 PD-1+	P1 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	-0,03571	0,2913	0,05357	0,06821
	p- value	0,9031	0,2899	0,8525	0,8167
	95% CI	0,5499 to 0,4981	0,2752 to 0,7077	-0,4845 to 0,5623	-0,4931 to 0,5894
META	Spewrman r	-0,2256	-0,1631	-0,2649	-0,08037
	p- value	0,381	0,5291	0,3019	0,7567
	95% CI	0,6463 to 0,3002	0,6068 to 0,3581	-0,6699 to 0,2617	-0,5510 to 0,4291
CEA					
		P1	P1 CD63+	P1 PD-1+	P1 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,2107	-0,09651	-0,3036	-0,0022
	p- value	0,4499	0,7309	0,2708	0,9967

	95% CI	0,3528 to 0,6620	0,5911 to 0,4508	-0,7143 to 0,2628	-0,5446 to 0,5415
META	Spewrman r	0,02167	0,3106	-0,07327	0,1425
	p- value	0,932	0,2096	0,7726	0,5727
	95% CI	0,4616 to 0,4950	0,1972 to 0,6870	-0,5331 to 0,4199	-0,3606 to 0,5813
	BIL-TOT				
		P1	P1 CD63+	P1 PD-1+	P1 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	-0,1081	0,09829	-0,2739	0,1519
	p- value	0,6999	0,7249	0,3208	0,6006
	95% CI	0,5987 to 0,4414	0,4494 to 0,5923	-0,6981 to 0,2926	-0,4263 to 0,6420
META	Spewrman r	0,218	-0,1694	-0,405	-0,2129
	p- value	0,3849	0,5015	0,0955	0,3963
	95% CI	0,2908 to 0,6307	0,5993 to 0,3363	0,7400 to 0,09120	-0,6275 to 0,2957
	CA 19-9				
		P2	P2 CD63+	P2 PD-1+	P2 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	-0,2071	0,4107	0,2393	0,0308
	p- value	0,4578	0,1297	0,3892	0,9187
	95% CI	0,6599 to 0,3560	0,1450 to 0,7695	-0,3261 to 0,6786	-0,5209 to 0,5644
META	Spewrman r	0,1422	-0,04782	0,2563	-0,02085
	p- value	0,5835	0,8556	0,3184	0,9379
	95% CI	0,3766 to 0,5932	0,5279 to 0,4554	-0,2703 to 0,6648	-0,5081 to 0,4765
	CEA				
		P2	P2 CD63+	P2 PD-1+	P2 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,3321	0,08214	0,08214	0,3366
	p- value	0,2264	0,7728	0,7728	0,2376
	95% CI	0,2329 to 0,7295	0,4623 to 0,5816	-0,4623 to 0,5816	-0,2525 to 0,7437
META	Spewrman r	-0,05676	0,1703	0,05676	0,09598
	p- value	0,823	0,4993	0,823	0,7048
	95% CI	0,5211 to 0,4335	0,3355 to 0,5999	-0,4335 to 0,5211	-0,4009 to 0,5492
	BIL-TOT				
		P2	P2 CD63+	P2 PD-1+	P2 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	-0,01802	0,2541	0,01261	0,5111
	p- value	0,9511	0,3581	0,9665	0,0637
	95% CI	0,5374 to 0,5113	0,3120 to 0,6870	-0,5153 to 0,5336	-
META	Spewrman r	0,2107	-0,3254	-0,3626	0,04418 to 0,8251

	p- value	0,4012	0,1876	0,1392	0,1966
	95% CI	0,2978 to 0,6261	0,6956 to 0,1813	-0,7167 to 0,1402	-0,6920 to 0,1880
	CEA				
		P3	P3 CD63+	P3 PD-1+	P3 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,2786	-0,2964	0,3679	0,03736
	p- value	0,3139	0,2827	0,1779	0,9035
	95% CI	0,2880 to 0,7007	0,7105 to 0,2701	-0,1941 to 0,7480	-0,5161 to 0,5688
META	Spewrman r	-0,195	0,3003	0,3137	-0,06708
	p- value	0,438	0,226	0,2197	0,7914
	95% CI	0,6160 to 0,3126	0,2081 to 0,6809	-0,2114 to 0,6983	-0,5286 to 0,4251
	BIL-TOT				
		P3	P3 CD63+	P3 PD-1+	P3 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,2252	-0,1586	0,001802	-0,07088
	p- value	0,4166	0,5699	0,9974	0,8098
	95% CI	0,3393 to 0,6705	0,6306 to 0,3991	-0,5232 to 0,5258	-0,5911 to 0,4910
META	Spewrman r	-0,01343	-0,01756	-0,3117	-0,1343
	p- value	0,9578	0,9449	0,2219	0,5952
	95% CI	0,4888 to 0,4681	0,4919 to 0,4648	-0,6971 to 0,2136	-0,5758 to 0,3678
	CEA				
		P3	P3 CD63+	P3 PD-1+	P3 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,2536	0,05004	0,0352	-0,0989
	p- value	0,3607	0,8598	0,9066	0,7385
	95% CI	0,3125 to 0,6867	0,4872 to 0,5598	-0,5177 to 0,5674	-0,6092 to 0,4693
META	Spewrman r	-0,06295	0,1768	0,3259	0,1065
	p- value	0,804	0,4827	0,1869	0,674
	95% CI	0,5256 to 0,4284	0,3295 to 0,6042	-0,1808 to 0,6959	-0,3919 to 0,5566
	BIL-TOT				
		P3	P3 CD63+	P3 PD-1+	P3 PD-L1+
EARLY	Spewrman r	0,1892	-0,2633	0,1375	-0,1351
	p- value	0,4965	0,3397	0,6357	0,6431
	95% CI	0,3722 to 0,6493	0,6922 to 0,3030	-0,4383 to 0,6332	-0,6318 to 0,4402
META	Spewrman r	-0,2614	-0,1749	-0,3775	-0,1625
	p- value	0,2948	0,4875	0,1225	0,5194
	95% CI	0,6576 to 0,2482	0,6030 to 0,3313	-0,7250 to 0,1232	-0,5948 to 0,3426

4. Συζήτηση

4.1 Διερεύνηση ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών εξωκυττάρων οργανιδίων σε πρώιμο και μεταστατικό στάδιο PDAC

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ανέδειξαν αυξημένο αριθμό εξωκυττάρων οργανιδίων στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο PDAC συγκριτικά με υγιείς δότες, ενώ δεν καταγράφηκε διαφορά μεταξύ πρώιμου και μεταστατικού σταδίου. Το εύρημα αυτό συνάδει με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η συνολική παραγωγή εξωκυττάρων οργανιδίων αντανάκλα την αυξημένη καρκινική δραστηριότητα και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Becker et al., 2016a; Melo et al., 2015b). Η απουσία διαφορών μεταξύ πρώιμου και μεταστατικού σταδίου ενδεχομένως να υποδεικνύει ότι η αυξημένη παραγωγή εξωκυττάρων οργανιδίων αποτελεί χαρακτηριστικό που εμφανίζεται ήδη σε προχωρημένη κακοήγη υπερπλασία, χωρίς να διαφοροποιείται περαιτέρω κατά την εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι η έλλειψη ευρημάτων σχετίζεται με τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, γεγονός που μπορεί να έχει επηρεάσει τη στατιστική ισχύ της ανάλυσης.

Η ανάλυση των επιφανειακών δεικτών ανέδειξε διαφοροποιήσεις με πιθανή βιολογική σημασία. Η αύξηση των CD63+ οργανιδίων σε πρώιμο στάδιο συγκριτικά με τους υγιείς δότες υποδηλώνει ενίσχυση της βιογένεσης των εξωσωμάτων στα αρχικά στάδια του όγκου (Kowal et al., 2016). Δεδομένου ότι η CD63 αποτελεί κλασικό δείκτη εξωσωμάτων, τα ευρήματα αυτά πιθανόν να αντικατοπτρίζουν πρώιμη αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας επικοινωνίας που συμβάλλει στη δημιουργία προ-μεταστατικού μικροπεριβάλλοντος.

Αντίθετα, η PD-1 δεν παρουσίασε διαφοροποιήσεις, γεγονός που εναρμονίζεται με δεδομένα που δείχνουν χαμηλή ή μη σταθερή έκφραση του δείκτη αυτού σε εξωκυττάρια οργανίδια από όγκους του παγκρέατος (G. Chen et al., 2018a). Αντιθέτως, η PD-L1 ήταν σημαντικά αυξημένη τόσο σε πρώιμο όσο και σε μεταστατικό στάδιο, υποδεικνύοντας ότι η ανοσοκατασταλτική σηματοδότηση μέσω EVs ξεκινά ήδη από τα αρχικά στάδια της νόσου (Ricklefs et al., 2018a; Theodoraki et al., 2018a; Xu et al., 2018). Η παρουσία PD-L1 σε EVs έχει δειχθεί ότι προάγει την ανοσοδιαφυγή μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σε διάφορα νεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένου του PDAC (Theodoraki et al., 2018a).

4.2 Μεγέθη εξωκυττάρων οργανιδίων ως εν δυνάμει δείκτες σταδιοποίησης

Η ποσοτική κατανομή διαφορετικών μεγεθών εξωκυττάρων οργανιδίων κατέδειξε ότι οι κατηγορίες P2–P4 ήταν αυξημένες στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες, με έμφαση στους μεταστατικούς ασθενείς. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με δεδομένα ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν εξωκυττάρια οργανίδια μεγαλύτερου μεγέθους λόγω ενισχυμένων διεργασιών ενδοκυττάρωσης και απελευθέρωσης μικροσωματιδίων (Yáñez-Mó et al., 2015). Η αύξηση στις κατηγορίες P3 και P4 ειδικά στους μεταστατικούς ασθενείς πιθανώς αντανακλά πιο επιθετική νόσο, καθώς εξωκυττάρια οργανίδια μεγαλύτερου μεγέθους έχουν συσχετιστεί με ενισχυμένη μεταφορά ογκογονικών φορτίων (miRNAs, πρωτεΐνες) και προαγωγή της μετάστασης (Wortzel et al., 2019a).

Ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε η τάση μείωσης εξωκυττάρων οργανιδίων στους ασθενείς πρώιμου σταδίου σε σύγκριση με τους υγιείς δότες, το οποίο ενδεχομένως υποδηλώνει διαφορετικό προφίλ εξωσωματικής επικοινωνίας στην έναρξη της καρκινογένεσης. Το γεγονός αυτό αξίζει περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.

4.3 Κατανομή πρωτεϊνικών δεικτών ανάλογα με το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων

Η διαφοροποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης με βάση το μέγεθος των εξωκυττάρων οργανιδίων προσέφερε πρόσθετες πληροφορίες. Η αύξηση PD-1+ οργανιδίων στην κατηγορία P2 στους μεταστατικούς ασθενείς υποδηλώνει εμπλοκή μεγαλύτερων εξωκυττάρων οργανιδίων στη ρύθμιση ανοσοκατασταλτικών μηχανισμών σε προχωρημένη νόσο. Παράλληλα, η αύξηση CD63+ οργανιδίων στην κατηγορία P4 σε πρώιμο στάδιο πιθανώς αντικατοπτρίζει πρώιμες μεταβολές στη βιογένεση μεγάλων εξωσωμάτων, πριν την εγκατάσταση μεταστατικής δραστηριότητας.

Συνολικά, τα δεδομένα αναδεικνύουν ότι τόσο η ποσοτική κατανομή όσο και η ποιοτική σύνθεση των εξωκυττάρων οργανιδίων διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο του PDAC, με τη PD-L1 να αποτελεί τον πιο σταθερό ανοσοκατασταλτικό δείκτη. Η ανάλυση αυτή ενισχύει τη σημασία των εξωκυττάρων οργανιδίων ως υγρών βιοψιών για τη διάγνωση, σταδιοποίηση και πιθανή παρακολούθηση της θεραπευτικής απόκρισης σε PDAC.

4.4 Συσχέτιση εξωκυττάρων οργανιδίων με την κλινική έκβαση (DFS/PFS και OS)

Η ανάλυση Kaplan–Meier έδειξε ότι τα APC+ οργανίδια δεν παρουσίασαν συσχέτιση με την PFS ή την OS, ανεξαρτήτως σταδίου νόσου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι το συνολικό φορτίο εξωκυττάρων οργανιδίων δεν επαρκεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. Η παρατήρηση συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες όπου η ποιοτική και όχι η ποσοτική ανάλυση των εξωκυττάρων οργανιδίων, δηλαδή το φορτίο σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή miRNAs, σχετίστηκε με την έκβαση (Becker et al., 2016b; Melo et al., 2015c).

Η περαιτέρω αξιολόγηση δεικτών (CD63, PD-1 και PD-L1) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την PFS/OS. Παρόλα αυτά, τάσεις διαφοροποίησης σε ορισμένα υποσύνολα δείχνουν ότι οι ανοσορυθμιστικοί δείκτες σε εξωκυττάρια οργανίδια ίσως σχετίζονται με την κλινική πορεία, αλλά απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα για επιβεβαίωση. Η βιβλιογραφία καταδεικνύει ότι η εξωκυττάρια PD-L1 μπορεί να επηρεάζει αρνητικά την πρόγνωση μέσω αναστολής των T-κυττάρων (G. Chen et al., 2018b; Theodoraki et al., 2018b), ωστόσο στην παρούσα μελέτη το μέγεθος του δείγματος και η μεθοδολογία διχοτόμησης πιθανόν μείωσαν τη στατιστική ισχύ.

4.5 Συσχέτιση του μεγέθους και της έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών εξωκυττάρων οργανιδίων με την επιβίωση

Η ανάλυση κατέδειξε ότι ούτε το συνολικός πληθυσμός ούτε οι υποκατηγορίες εξωκυττάρων οργανιδίων (P1–P4) συνδέθηκαν με την DFS/PFS/OS. Η CD63 επίσης δεν παρουσίασε προγνωστική σημασία, υποδεικνύοντας ότι οι κλασικοί δείκτες εξωσωμάτων δεν επαρκούν για να αποτυπώσουν την επιβίωση σε PDAC.

Ωστόσο, καταγράφηκαν τάσεις που αξίζουν περαιτέρω διερεύνηση. Στην κατηγορία P3, τα PD-1+ οργανίδια εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση με την DFS και OS σε πρώιμο στάδιο, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρόλο των ανοσοκατασταλτικών EVs στην πρώιμη εξέλιξη του όγκου. Στη μεταστατική νόσο, η υψηλή έκφραση PD-1 σε P1 οργανίδια σχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη PFS, ενώ η υψηλή PD-L1 σε P3 οργανίδια με μειωμένη OS. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι οι ανοσοκατασταλτικοί δείκτες σε EVs μπορούν να επηρεάσουν την πορεία των ασθενών με PDAC, σε συμφωνία με προκλινικά και κλινικά δεδομένα (G. Chen et al., 2018b; Ricklefs et al., 2018b; Wortzel et al., 2019b).

4.6 Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους

Η παρούσα ανάλυση ανέδειξε ότι οι κλασικοί ορολογικοί δείκτες, όπως το CA19-9 και η ολική χολερυθρίνη, διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με το στάδιο της νόσου, επιβεβαιώνοντας τον καθιερωμένο ρόλο τους στην κλινική πράξη. Παράλληλα, η αυξημένη έκφραση του PD-1 σε μεταστατικούς ασθενείς υπογραμμίζει τη δυνητική συμμετοχή ανοσολογικών μηχανισμών στην εξέλιξη του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (G. Chen et al., 2018b).

Αν και η συσχέτιση των εξωκυτταρικών κυστιδίων με τους κλασικούς δείκτες δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικά ευρήματα, οι τάσεις που παρατηρήθηκαν σε επιμέρους υποπληθυσμούς (ιδίως σε συνδυασμό με PD-1 και PD-L1) υποδηλώνουν ότι τα μόρια αυτά ενδέχεται να αποτελούν συμπληρωματικούς βιοδείκτες. Η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερα δείγματα καθίσταται εμφανής, ώστε να αποσαφηνιστεί ο πιθανός ρόλος τους στη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου.

5. Συμπεράσματα

Συνολικά, η παρούσα εργασία κατόρθωσε να αναπτύξει και να εφαρμόσει ένα απαιτητικό και καινοτόμο πρωτόκολλο κυτταρομετρίας ροής, το οποίο επέτρεψε τον αξιόπιστο χαρακτηρισμό εξωκυττάρων οργανιδίων διαφορετικού μεγέθους. Η δυνατότητα αξιοποίησης sorter κυτταρομέτρου παρέχει επιπλέον προοπτικές για περαιτέρω μοριακή διερεύνηση αυτών των υποπληθυσμών, καθώς και για την απομόνωσή τους με σκοπό τη λεπτομερή ανάλυση του φορτίου τους. Η ύπαρξη τάσεων δείχνει ότι η μελλοντική εστίαση σε υποπληθυσμούς εξωκυττάρων οργανιδίων συγκεκριμένων μεγεθών/φορτίου θα μπορούσε να αναδείξει νέους προγνωστικούς δείκτες σε PDAC. Επιπλέον, η μελλοντική αύξηση του αριθμού των ασθενών αναμένεται να ενισχύσει τη στατιστική ισχύ των ευρημάτων και να συμβάλει στην αναγνώριση πιο αξιόπιστων προγνωστικών δεικτών. Τέλος, ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατεύθυνση για μελλοντική έρευνα αποτελεί η συνδυαστική μελέτη της έκφρασης PD-L1 στα εξωκυττάρια οργανίδια με την PD-1 έκφραση στα T-κύτταρα, ώστε να αποτυπωθεί πληρέστερα ο ρόλος των ανοσοκατασταλτικών αξόνων στην εξέλιξη και την πρόγνωση του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος.

Βιβλιογραφία

- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery*, 6(5), 479–491.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2017). Characterization of single circulating tumor cells. *FEBS Letters*, 591(15), 2241–2250. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12662>
- Allenson, K., Castillo, J., San Lucas, F. A., Scelo, G., Kim, D. U., Bernard, V., Davis, G., Kumar, T., Katz, M., Overman, M. J., Foretova, L., Fabianova, E., Holcatova, I., Janout, V., Meric-Bernstam, F., Gascoyne, P., Wistuba, I., Varadhachary, G., Brennan, P., ... Alvarez, H. (2017). High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(4), 741–747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx004>
- Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
- Ballehaninna, U. K., & Chamberlain, R. S. (2011). Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer-A Comprehensive Review. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 2(2), 88–100.
<https://doi.org/10.1007/s13193-011-0042-1>
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016a). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30(6), 836–848.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016b). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30(6), 836–848.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>
- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A.-M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song,

- S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., ... Grimmond, S. M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491(7424), 399–405. <https://doi.org/10.1038/nature11547>
- Bronkhorst, A. J., Aucamp, J., & Pretorius, P. J. (2015). Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 450, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.028>
- Bunduc, S., Gede, N., Váncsa, S., Lillik, V., Kiss, S., Juhász, M. F., Erőss, B., Szakács, Z., Gheorghe, C., Mikó, A., & Hegyi, P. (2022). Exosomes as prognostic biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinoma—A systematic review and meta-analysis. *Translational Research*, 244, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.01.001>
- Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O’Kane, G. M., Connor, A. A., Denroche, R. E., Grant, R. C., McLeod, J., Wilson, J. M., Jang, G. H., Zhang, A., Dodd, A., Liang, S.-B., Borgida, A., Chadwick, D., Kalimuthu, S., Lungu, I., ... Notta, F. (2020). Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nature Genetics*, 52(2), 231–240. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0566-9>
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., Xia, H., Man, Q., Zhong, W., Antelo, L. F., Wu, B., Xiong, X., Liu, X., Guan, L., Li, T., ... Guo, W. (2018a). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., Xia, H., Man, Q., Zhong, W., Antelo, L. F., Wu, B., Xiong, X., Liu, X., Guan, L., Li, T., ... Guo, W. (2018b). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>

- Chen, X., Hu, X., & Liu, T. (2024). Development of liquid biopsy in detection and screening of pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1415260>
- Cheng, Y., Tan, N., Yang, J., Liu, X., Cao, X., He, P., Dong, X., Qin, S., & Zhang, C. (2010). A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 119(2), 87–95.
<https://doi.org/10.1042/CS20090645>
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.-M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.-L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 10(8), 472–484.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>
- Del Re, M., Marconcini, R., Pasquini, G., Rofi, E., Vivaldi, C., Bloise, F., Restante, G., Arrigoni, E., Caparello, C., Bianco, M. G., Crucitta, S., Petrini, I., Vasile, E., Falcone, A., & Danesi, R. (2018). PD-L1 mRNA expression in plasma-derived exosomes is associated with response to anti-PD-1 antibodies in melanoma and NSCLC. *British Journal of Cancer*, 118(6), 820–824. <https://doi.org/10.1038/bjc.2018.9>
- Dhillon, J., & Betancourt, M. (2020). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Monographs in Clinical Cytology*, 26, 74–91. <https://doi.org/10.1159/000455736>
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(6), 579–586. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>

- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727.
<https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Esposito, A., Criscitiello, C., Trapani, D., & Curigliano, G. (2017). The Emerging Role of ‘Liquid Biopsies,’ Circulating Tumor Cells, and Circulating Cell-Free Tumor DNA in Lung Cancer Diagnosis and Identification of Resistance Mutations. *Current Oncology Reports*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0564-y>
- Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 236, 219–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>
- Ge, Q., Zhang, Z.-Y., Li, S.-N., Ma, J.-Q., & Zhao, Z. (2024). Liquid biopsy: Comprehensive overview of circulating tumor DNA (Review). *Oncology Letters*, 28(5), 548.
<https://doi.org/10.3892/ol.2024.14681>
- Global, regional, and national burden of pancreatic cancer from 1990 to 2021, its attributable risk factors, and projections to 2050: A systematic analysis of the global burden of disease study 2021 | BMC Cancer | Full Text.* (n.d.). Retrieved 30 August 2025, from <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-025-13597-z>
- Goetzl, E. J., Mustapic, M., Kapogiannis, D., Eitan, E., Lobach, I. V., Goetzl, L., Schwartz, J. B., & Miller, B. L. (2016). Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer’s disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(11), 3853–3859. <https://doi.org/10.1096/fj.201600756R>
- Han, Q.-F., Li, W.-J., Hu, K.-S., Gao, J., Zhai, W.-L., Yang, J.-H., & Zhang, S.-J. (2022a). Exosome biogenesis: Machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*, 21(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>

- Han, Q.-F., Li, W.-J., Hu, K.-S., Gao, J., Zhai, W.-L., Yang, J.-H., & Zhang, S.-J. (2022b). Exosome biogenesis: Machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*, 21(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
- Hayes, D. F., Markus, H. S., Leslie, R. D., & Topol, E. J. (2014). Personalized medicine: Risk prediction, targeted therapies and mobile health technology. *BMC Medicine*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-37>
- Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E. S., & Speicher, M. R. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews. Genetics*, 20(2), 71–88. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0071-5>
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D., & Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research*, 61(4), 1659–1665.
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 284(4), E671–678. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002>
- Kamel-ElSayed, S. A., & Mukherjee, S. (2025). Physiology, Pancreas. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
- Kawamura, S., Iinuma, H., Wada, K., Takahashi, K., Minezaki, S., Kainuma, M., Shibuya, M., Miura, F., & Sano, K. (2019). Exosome-encapsulated microRNA-4525, microRNA-451a and microRNA-21 in portal vein blood is a high-sensitive liquid biomarker for the selection of high-risk pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 26(2), 63–72. <https://doi.org/10.1002/jhbp.601>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>

- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968-977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy*, 20(8), 1057–1067. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
- Liu, M., Wen, Z., Zhang, T., Zhang, L., Liu, X., & Wang, M. (2024a). The role of exosomal molecular cargo in exosome biogenesis and disease diagnosis. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1417758>
- Liu, M., Wen, Z., Zhang, T., Zhang, L., Liu, X., & Wang, M. (2024b). The role of exosomal molecular cargo in exosome biogenesis and disease diagnosis. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1417758>
- Liu, M., Wen, Z., Zhang, T., Zhang, L., Liu, X., & Wang, M. (2024c). The role of exosomal molecular cargo in exosome biogenesis and disease diagnosis. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1417758>
- Logozzi, M., Milito, A. D., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M. L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., & Fais, S. (2009). High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin-1 in Plasma of Melanoma Patients. *PLOS ONE*, 4(4), e5219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005219>
- Lu, M., DiBernardo, E., Parks, E., Fox, H., Zheng, S.-Y., & Wayne, E. (2021). The Role of Extracellular Vesicles in the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Disorders. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.566299>

- Ma, Q., Wu, H., Xiao, Y., Liang, Z., & Liu, T. (2020). Upregulation of exosomal microRNA-21 in pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration and enhances Ras/ERK pathway activity. *International Journal of Oncology*, 56(4), 1025–1033.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2020.4986>
- Madhavan, B., Yue, S., Galli, U., Rana, S., Gross, W., Müller, M., Giese, N. A., Kalthoff, H., Becker, T., Büchler, M. W., & Zöller, M. (2015). Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *International Journal of Cancer*, 136(11), 2616–2627.
<https://doi.org/10.1002/ijc.29324>
- Makler, A., & Asghar, W. (2020). Exosomal biomarkers for cancer diagnosis and patient monitoring. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20(4), 387–400.
<https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1731308>
- Marchisio, M., Simeone, P., Bologna, G., Ercolino, E., Pierdomenico, L., Pieragostino, D., Ventrella, A., Antonini, F., Del Zotto, G., Vergara, D., Celia, C., Di Marzio, L., Del Boccio, P., Fontana, A., Bosco, D., Miscia, S., & Lanuti, P. (2020). Flow Cytometry Analysis of Circulating Extracellular Vesicle Subtypes from Fresh Peripheral Blood Samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 48.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010048>
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnicka-Worms, D., & Kalluri, R. (2015a). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), 177–182.
<https://doi.org/10.1038/nature14581>
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnicka-Worms, D., & Kalluri, R. (2015b). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects

early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), 177–182.

<https://doi.org/10.1038/nature14581>

Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnicka-Worms, D., & Kalluri, R. (2015c). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), 177–182.

<https://doi.org/10.1038/nature14581>

Merker, J. D., Oxnard, G. R., Compton, C., Diehn, M., Hurley, P., Lazar, A. J., Lindeman, N., Lockwood, C. M., Rai, A. J., Schilsky, R. L., Tsimberidou, A. M., Vasalos, P., Billman, B. L., Oliver, T. K., Bruinooge, S. S., Hayes, D. F., & Turner, N. C. (2018). Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(16), 1631–1641.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.8671>

Minciacchi, V. R., Freeman, M. R., & Di Vizio, D. (2015). Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>

Montoya Mira, J. L., Quentel, A., Patel, R. K., Keith, D., Sousa, M., Minnier, J., Kingston, B. R., David, L., Esener, S. C., Sears, R. C., Lopez, C. D., Sheppard, B. C., Demirci, U., Wong, M. H., & Fischer, J. M. (2025). Early detection of pancreatic cancer by a high-throughput protease-activated nanosensor assay. *Science Translational Medicine*, 17(785), eadq3110. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adq3110>

Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C. W., Modlin, L. A., Liu, C. L., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Merritt, R. E., Shrager, J. B., Loo, B. W., Alizadeh, A. A., & Diehn, M. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*, 20(5), 548–554. <https://doi.org/10.1038/nm.3519>

- Odaka, H., Hiemori, K., Shimoda, A., Akiyoshi, K., & Tateno, H. (2022). CD63-positive extracellular vesicles are potential diagnostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Gastroenterology*, 22(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02228-7>
- Oellerich, M., Schütz, E., Beck, J., Kanzow, P., Plowman, P. N., Weiss, G. J., & Walson, P. D. (2017). Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(3), 205–218. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1299683>
- Pancreatic cancer statistics. (n.d.). *World Cancer Research Fund*. Retrieved 30 August 2025, from <https://www.wcrf.org/preventing-cancer/cancer-statistics/pancreatic-cancer-statistics/>
- Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
- Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. (2018). Circulating cell-free nucleic acids: Characteristics and applications. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 26(7), 937–945. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0132-4>
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes—Dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 786–797. <https://doi.org/10.1038/nrm2258>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Ricklefs, F. L., Alayo, Q., Krenzlin, H., Mahmoud, A. B., Speranza, M. C., Nakashima, H., Hayes, J. L., Lee, K., Balaj, L., Passaro, C., Rooj, A. K., Krasemann, S., Carter, B. S., Chen, C. C., Steed, T., Treiber, J., Rodig, S., Yang, K., Nakano, I., ... Chiocca, E. A. (2018a). Immune

- evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Science Advances*, 4(3), eaar2766. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2766>
- Ricklefs, F. L., Alayo, Q., Krenzlin, H., Mahmoud, A. B., Speranza, M. C., Nakashima, H., Hayes, J. L., Lee, K., Balaj, L., Passaro, C., Rooj, A. K., Krasemann, S., Carter, B. S., Chen, C. C., Steed, T., Treiber, J., Rodig, S., Yang, K., Nakano, I., ... Chiocca, E. A. (2018b). Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Science Advances*, 4(3), eaar2766. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2766>
- Rolfo, C., Mack, P., Scagliotti, G. V., Aggarwal, C., Arcila, M. E., Barlesi, F., Bivona, T., Diehn, M., Dive, C., Dziadziuszko, R., Leighl, N., Malapelle, U., Mok, T., Peled, N., Raez, L. E., Sequist, L., Sholl, L., Swanton, C., Abbosh, C., ... Gandara, D. (2021). Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 16(10), 1647–1662. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.06.017>
- Satelli, A., Mitra, A., Brownlee, Z., Xia, X., Bellister, S., Overman, M. J., Kopetz, S., Ellis, L. M., Meng, Q. H., & Li, S. (2015). Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(4), 899–906. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0894>
- Schwarzenbach, H. (2017). Clinical Relevance of Circulating, Cell-Free and Exosomal microRNAs in Plasma and Serum of Breast Cancer Patients. *Oncology Research and Treatment*, 40(7–8), 423–429. <https://doi.org/10.1159/000478019>
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews. Cancer*, 11(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>

- Serrati, S., Guida, M., Di Fonte, R., De Summa, S., Strippoli, S., Iacobazzi, R. M., Quarta, A., De Risi, I., Guida, G., Paradiso, A., Porcelli, L., & Azzariti, A. (2022). Circulating extracellular vesicles expressing PD1 and PD-L1 predict response and mediate resistance to checkpoint inhibitors immunotherapy in metastatic melanoma. *Molecular Cancer*, 21(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01490-9>
- Shin, D. W., & Kim, J. (2020). The American Joint Committee on Cancer 8th edition staging system for the pancreatic ductal adenocarcinoma: Is it better than the 7th edition? *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 9(1), 98–100. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2019.08.06>
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(9), 531–548. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
- Stuendl, A., Kunadt, M., Kruse, N., Bartels, C., Moebius, W., Danzer, K. M., Mollenhauer, B., & Schneider, A. (2016). Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain: A Journal of Neurology*, 139(Pt 2), 481–494. <https://doi.org/10.1093/brain/awv346>
- Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2025). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532912/>
- The biology, function, and biomedical applications of exosomes* | Science. (n.d.). Retrieved 5 September 2025, from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau6977>
- The role of exosomal PD-L1 in tumor progression and immunotherapy* | *Molecular Cancer* | Full Text. (n.d.). Retrieved 30 August 2025, from https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-1074-3?utm_source=chatgpt.com
- Theodoraki, M.-N., Yerneni, S. S., Hoffmann, T. K., Gooding, W. E., & Whiteside, T. L. (2018a). Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients.

- Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(4), 896–905. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2664>
- Theodoraki, M.-N., Yerneni, S. S., Hoffmann, T. K., Gooding, W. E., & Whiteside, T. L. (2018b). Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(4), 896–905. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2664>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T. N., Winnay, J. N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S. K., Gorden, P., & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, 542(7642), 450–455. <https://doi.org/10.1038/nature21365>
- van der Pol, Y., & Mouliere, F. (2019). Toward the Early Detection of Cancer by Decoding the Epigenetic and Environmental Fingerprints of Cell-Free DNA. *Cancer Cell*, 36(4), 350–368. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.09.003>
- Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., Pacey, S., Baird, R., & Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews. Cancer*, 17(4), 223–238. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7>

- Wan, J. C. M., Sasieni, P., & Rosenfeld, N. (2025). Promises and pitfalls of multi-cancer early detection using liquid biopsy tests. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 22(8), 566–580.
<https://doi.org/10.1038/s41571-025-01033-x>
- Wei, Q., Zhang, J., Li, Z., Wei, L., & Ren, L. (2020). Serum Exo-EphA2 as a Potential Diagnostic Biomarker for Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 49(9), 1213–1219.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001660>
- Wortzel, I., Dror, S., Kenific, C. M., & Lyden, D. (2019a). Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Developmental Cell*, 49(3), 347–360.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.011>
- Wortzel, I., Dror, S., Kenific, C. M., & Lyden, D. (2019b). Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Developmental Cell*, 49(3), 347–360.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.011>
- Xie, S., Zhang, Q., & Jiang, L. (2022a). Current Knowledge on Exosome Biogenesis, Cargo-Sorting Mechanism and Therapeutic Implications. *Membranes*, 12(5), 498.
<https://doi.org/10.3390/membranes12050498>
- Xie, S., Zhang, Q., & Jiang, L. (2022b). Current Knowledge on Exosome Biogenesis, Cargo-Sorting Mechanism and Therapeutic Implications. *Membranes*, 12(5), 498.
<https://doi.org/10.3390/membranes12050498>
- Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D. W., & Simpson, R. J. (2018). Extracellular vesicles in cancer—Implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 15(10), 617–638. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0036-9>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O.

- (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yoshioka, Y., Shimomura, M., Saito, K., Ishii, H., Doki, Y., Eguchi, H., Nakatsura, T., Itoi, T., Kuroda, M., Mori, M., & Ochiya, T. (2022). Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer. *Cancer Science*, 113(10), 3498–3509. <https://doi.org/10.1111/cas.15500>
- Zeng, H., Guo, S., Ren, X., Wu, Z., Liu, S., & Yao, X. (2023). Current Strategies for Exosome Cargo Loading and Targeting Delivery. *Cells*, 12(10), 1416. <https://doi.org/10.3390/cells12101416>
- Zhou, K., Guo, S., Li, F., Sun, Q., & Liang, G. (2020). Exosomal PD-L1: New Insights Into Tumor Immune Escape Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 569219. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.569219>