



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ – ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ»

ΚΑΛΛΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE

POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING ”

MASTER’S THESIS
«THE ROLE OF LIQUID BIOPSY IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER»

KALLI KONSTANTINA

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ -ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	
1.1 Τι είναι ο καρκίνος;.....	8
1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου	8
1.3 Παθοφυσιολογία κυττάρων	9
1.3.1 Βιολογία των φυσιολογικών κυττάρων	10
1.3.1.1 Χαρακτηριστικά των φυσιολογικών κυττάρων	10
1.3.2 Βιολογία των παθολογικών κυττάρων	11
1.3.2.1 Χαρακτηριστικά καλοηθών νεοπλασματικών κυττάρων	11
1.3.2.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ	
2.1 Μοριακή βάση της καρκινογένεσης.....	13
2.2 Διαδικασία της μετάστασης.....	14
2.3 Τύποι των καρκινικών όγκων	16
2.4 Αιτιολογικοί παράγοντες	17
2.5 Μοριακή διάγνωση του καρκίνου.....	17
2.5.1 Τεχνικές μοριακής διάγνωσης.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ	
3.1 Βιοψία ιστού	21
3.2 Ιστορική αναδρομή-Ορισμός υγρής βιοψίας.....	22
3.3 Εφαρμογή υγρής βιοψίας.....	23
3.4 Συστατικά υγρής βιοψίας	24
3.4.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, CTCs	26
3.4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	26
3.4.1.2 Απομόνωση και ανάλυση των CTCs.....	27
3.4.1.3 Εφαρμογή CTCs στην Ογκολογία.....	29
3.4.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά νουκλεϊκά οξέα.....	30
3.4.2.1 Ελεύθερο DNA (cfDNA).....	30
3.4.2.1.1 Ελεύθερο καρκινικό DNA	32
3.4.2.1.2 Απομόνωση και ανάλυση του ελεύθερου καρκινικού DNA.....	35
3.4.2.1.3 Εφαρμογή του ctDNA στην Ογκολογία	36
3.4.2.2 Ελεύθερο RNA (cfRNA)	37
3.4.2.2.1 Κωδικοποιητικά RNAs	37
3.4.2.2.2 Μη κωδικοποιητικά RNAs.....	38

3.4.3	Εξωσώματα.....	41
3.4.3.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	41
3.4.3.2	Βιογένεση και απελευθέρωση εξωσωμάτων.....	43
3.4.3.3	Απομόνωση και ανάλυση των εξωσωμάτων	44
3.4.3.4	Εφαρμογές εξωσωμάτων στην Ογκολογία	46
3.4.4	Μικροσωματίδια	47
3.4.5	Αιμοπετάλια	47
3.5	Πλεονεκτήματα υγρής βιοψίας	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ		
4.1	Κατηγοριοποίηση με βάση τον τύπο του υλικού.....	49
4.1.1	Ανάλυση καρκινικών κυττάρων	49
4.1.2	Ανάλυση ελεύθερου DNA.....	49
4.1.3	Ανάλυση εξωσωμικού DNA.....	49
4.1.4	Ανάλυση miRNAs.....	50
4.2	Κατηγοριοποίηση με βάση τον τύπο ανάλυσης.....	50
4.2.1	Ανάλυση μεταλλάξεων μικρής κλίμακας και στοχευμένη βαθιά αλληλούχιση.....	50
4.2.2	Ανάλυση δομικών αλλαγών.....	51
4.2.3	Ανάλυση μεταλλάξεων μεγάλης κλίμακας με αλληλούχιση επόμενης γενιάς.....	51
4.2.4	Ανάλυση αλλαγών αριθμού αντιγράφων.....	51
4.3	Χρήση υγρής βιοψίας.....	51
4.4	Σύγκριση υγρής βιοψίας και βιοψίας ιστού.....	52
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	54
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Δήμα Κωνσταντίνο για το αμέριστο ενδιαφέρον και τις εύστοχες υποδείξεις του σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της εργασίας αυτής. Οι εποικοδομητικές συζητήσεις μας με οδήγησαν σε ένα σωστό τρόπο σκέψης και εξομούναν τη συγγραφή της εργασίας.

Θα ήθελα να απευθύνω ειλικρινείς ευχαριστίες σε όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών: Γενετική Ανθρώπου - Γενετική Συμβουλευτική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τα σημαντικά εφόδια που μου προσέφεραν.

Ένα τμήμα του ευχαριστηρίου λόγου μου οφείλω να αποδώσω στους φίλους μου για την ενθάρρυνση και την προθυμία τους να με βοηθήσουν και να με στηρίξουν ψυχολογικά.

Δράττομαι της ευκαιρίας που μου δίδεται μέσω αυτής της πτυχιακής και εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την οικονομική και ηθική στήριξη. Οι θυσίες, η υπομονή και η εμπιστοσύνη τους στάθηκαν αρωγοί ώστε να επιτύχω τους στόχους μου. Με πολλή αγάπη, τους αφιερώνω την παρούσα πτυχιακή διατριβή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με εκτιμήσεις Globocan το 2008 παρατηρήθηκαν σχεδόν 12,7 εκατ. περιπτώσεις καρκίνου και 7,6 εκατομμύρια θάνατοι από την νόσο αυτή σε όλον τον κόσμο. Τα ποσοστά επιβίωσης μπορεί να βελτιώνονται, γεγονός που βασίζεται στην πρόληψη. Παρόλα αυτά, πάνω από μισό εκατομμύριο άνθρωποι πεθαίνουν από καρκίνο κάθε χρόνο στις ΗΠΑ (Jemal et al., 2011).

Η πρόληψη έχει την δύναμη να περιορίσει τη θνησιμότητα (Siegel et al., 2011). Κάποιες εξετάσεις ελέγχουν ανωμαλίες κι επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, με σκοπό μια επιτυχή θεραπεία. Για την έγκαιρη διάγνωσή του απαιτείται ο προληπτικός έλεγχος και η άμεση αναγνώριση των προειδοποιητικών συμπτωμάτων της νόσου. Σε περίπτωση που ο ιατρός αντιληφθεί ότι υπάρχει υπόνοια καρκίνου, εξαιτίας εργαστηριακών ευρημάτων ή συμπτωμάτων, προχωράει στην διαδικασία της βιοψίας (Anand et al., 2008). Η βιοψία χαρακτηρίζεται ως μια εξέταση, κατά την οποία πραγματοποιείται δειγματοληψία κυττάρων ή ιστών για εξέταση με σκοπό να προσδιοριστεί η ασθένεια. Ωστόσο, όταν ο ιστός εντοπίζεται σε απροσπέλαστο σημείο, τότε η βιοψία ιστού δεν είναι εφικτή. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται και η υγρή βιοψία. Πρόκειται για μια μη-επεμβατική μέθοδο, για την εξέταση όλων των τύπων καρκίνου, την ποσοτικοποίηση και το χαρακτηρισμό των βιολογικών υλικών (DNA, RNAs, πρωτεϊνών) που προέρχονται από καρκινικούς ιστούς. Αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο της επεμβατικής βιοψίας ιστού και της ιστολογικής αξιολόγησής του. Η υγρή βιοψία μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου και πληροφορήσει για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε περίπτωση όπου χορηγείται (Palmirotta et al., 2018). Η μέθοδος αυτή έχει την δυνατότητα να παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές μεταβολές του όγκου, έτσι ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Η συγκεκριμένη εξέταση βασίζεται στο γεγονός ότι στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά μπορεί να ανιχνεύσει καρκινικά κύτταρα, DNA ή RNA με την χρήση τεχνικών (PCR ή NGS) με σκοπό την ενημέρωση για νόσους όπως ο καρκίνος. Η υγρή βιοψία στοχεύει στην αναζήτηση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, στον εντοπισμό μεταλλάξεων και γενετικών τροποποιήσεων στο εξωκυττάριο καρκινικό DNA, στον έλεγχο κυκλοφορούντων microRNAs καθώς και στην απομόνωση και εξέταση εξωκυτταρικών σωματιδίων (exosomes) (Mattox et al., 2019).

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον ρόλο της υγρής βιοψίας στην διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου.

Λέξεις-κλειδιά: βιολογικά υγρά, καρκίνος, υγρή βιοψία, βιοδείκτες, εξατομικευμένη ιατρική

ABSTRACT

According to Globocan estimates, in 2008 there were almost 12.7 million cases of cancer and 7.6 million deaths from this disease worldwide. The survival rates can be improved, based on prevention. However, more than half a million people die from cancer every year in the United States (Jemal et al., 2011).

Prevention has the power to reduce mortality (Siegel et al., 2011). Some tests control abnormalities and allow early diagnosis of cancer, with the aim of a successful treatment. Early diagnosis requires preventive screening and immediate recognition of the warning signs of the disease. If the doctor realizes that there is a risk of cancer, due to results or symptoms, he is led to the procedure of biopsy (Anand et al., 2008). A biopsy is a test in which cells or tissues are sampled for testing to determine the disease. However, when the tissue is inaccessible, then tissue biopsy is not possible. For this reason, liquid biopsy is also used. It is a non-invasive blood sample, capable of analyzing tumor DNA, which has been isolated from the plasma of people suffering from cancer. It is an alternative method of invasive tissue biopsy η method and its histological evaluation. Liquid biopsy serves in the early diagnosis of cancer and informs about the effective treatment in case it is administered (Palmirotta et al., 2018). This method can provide information about the molecular changes of the tumor, so that it is possible to monitor the evolution of the tumor in real time. This test is based on the fact that in the blood and in other extracellular fluids can be detected cancer cells DNA or RNA using techniques (PCR or NGS) that may provide significant informations about diseases such as cancer. Liquid biopsy aims at the search and molecular characterization of circulating cancer cells, the detection of mutations and genetic modifications in extracellular tumor DNA, in the control of circulating microRNAs as well as in the isolation and examination of extracellular particles (Mattox et al., 2019).

The aim of this dissertation is the review of the literature on the role of liquid biopsy in the diagnosis and treatment of cancer.

Keywords: biofluids, tumor, liquid biopsy, biomarkers, personalized (precision) medicine

Γενικό μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ;

Ο όρος «καρκίνος» και «καρκίνωμα» χρησιμοποιήθηκε από τον ιατρό Έλληνα Ιπποκράτη, γνωστό ως «πατέρα της ιατρικής» για να περιγράψει όγκους που παρουσίαζαν έλκη και διογκώσεις. Στην Ελληνική γλώσσα οι όροι αυτοί παραπέμπουν στα καβούρια, επειδή οι ακτινωτές μεταστάσεις καρκινικών κυττάρων, προσομοιάζουν με τα πόδια και τις δαγκάνες των συγκεκριμένων μαλακοστράκων. Με την λέξη καρκίνο εννοούμε μία ασθένεια των κυττάρων, της βάσης της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης της ζωής. Ο ανθρώπινος οργανισμός απαρτίζεται από κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά αναπτύσσονται και διαιρούνται για να προκύψουν θυγατρικά κύτταρα. Σε αρκετές περιπτώσεις, η διαδικασία αυτή διαταράσσεται, με σκοπό να προκύπτουν νέα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα τα παλιά κύτταρα δεν πεθαίνουν. Άρα, η υπερβολική και μη προγραμματισμένη ανάπτυξη των κυττάρων έχει ως συνέπεια την πρόκληση μάζας, τον λεγόμενο όγκο (Weinberg, 2014). Όταν τα καρκινικά αυτά κύτταρα «αποδράσουν» από την πρωτογενή εστία προσβάλλουν ένα απομακρυσμένο όργανο κι οδηγήσουν στην δημιουργία ενός νέου όγκου (Bunkusi, 2012).

Η ασθένεια αυτή δεν έχει μόνο μία μορφή, καθώς δεν επηρεάζει ένα μόνο όργανο. Τα είδη καρκίνου ποικίλλουν και ξεπερνούν τα 200. Καθένα από αυτά έχει τον δικό του τρόπο αντιμετώπισης (Dewit, 2009).

Οι όγκοι διακρίνονται σε καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι παρουσιάζουν αργή ανάπτυξη, δεν είναι διηθητικοί και μεταστατικοί, σε αντίθεση με τους κακοήθεις που είναι απειλητικοί για τη ζωή ενός ατόμου (Mulita, 2020).

Οι καρκίνοι είναι πιθανό να προκαλέσουν θάνατο, σε περίπτωση που δεν θεραπευθούν. Τα τελευταία χρόνια η επιβίωση αυτών των ασθενών έχει βελτιωθεί σε σημαντικό βαθμό.

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Οι μη μεταδοτικές ασθένειες όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος, οι χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού και ο διαβήτης είναι τώρα υπεύθυνες για την πλειονότητα των παγκόσμιων θανάτων. Κατά τον 21^ο αιώνα, ο καρκίνος αναμένεται να καταταχθεί ως η κύρια αιτία

θανάτου και το μοναδικό σημαντικότερο εμπόδιο στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε κάθε χώρα του κόσμου. Ο καρκίνος απασχολεί ιδιαίτερα τον κόσμο και την επιστημονική κοινότητα καθώς εξαπλώνεται σαν επιδημία και απειλεί όλους τους ανθρώπους ανεξαρτήτως ηλικίας και καταγωγής. Οι λόγοι διαφέρουν και αντανακλούν την αύξηση του πληθυσμού αλλά και την κατανομή των κύριων παραγόντων κινδύνου για καρκίνο και τις αλλαγές στον επιπολασμό (Bray et al., 2018). Ειδικότερα, στους παράγοντες κινδύνου για καρκίνο περιλαμβάνονται η χρήση ουσιών, καπνού και αλκοόλ, το άγχος, περιβαλλοντολογικοί παράγοντες, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η υποκατανάλωση λαχανικών και φρούτων. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου είναι συνάρτηση της ηλικίας, ενώ η νόσος απαντάται σε μεγαλύτερη συχνότητα στις αναπτυγμένες χώρες (World Cancer Report, 2014).

Πριν από περίπου μια δεκαετία, 14,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου παρατηρήθηκαν σε παγκόσμιο επίπεδο. Σχεδόν 8,2 εκατομμύρια θάνατοι σημειώθηκαν. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως το 2016 οι θάνατοι από καρκίνο στον πνεύμονα, την τραχεία και τους βρόγχους ξεπέρασαν τους 1,7 εκατομμύρια κατά την διάρκεια ενός έτους. Ο καρκίνος του στομάχου, του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του ήπατος με 830.000 θανάτους ακολούθησαν (Roser, 2019). Το ποσοστό θανάτου από καρκίνο αυξήθηκε μέχρι το 1991 και στη συνέχεια παρουσίαζε συνεχή μείωση έως το 2017, με αποτέλεσμα μια συνολική μείωση 29% που μεταφράζεται σε περίπου 2,9 εκατομμύρια λιγότερους θανάτους από καρκίνο από ό, τι θα είχαν συμβεί αν τα υψηλά ποσοστά είχαν διατηρηθεί. Αυτή η πρόοδος οφείλεται σε μακροχρόνιες μειώσεις των ποσοστών θανάτου για τους 4 κύριους καρκίνους (πνεύμονα, μαστού, παχέος εντέρου, προστάτη). Ωστόσο, ο καρκίνος του πνεύμονα προκάλεσε περισσότερους θανάτους το 2017 συγκριτικά με τους καρκίνους του μαστού, του προστάτη, του εγκεφάλου και του παχέος εντέρου. Οι πρόσφατες μειώσεις της θνησιμότητας ήταν επίσης δραματικές για το μελάνωμα του δέρματος μετά την έγκριση της Αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για νέες θεραπείες για μεταστατική νόσο (Siegel et al., 2020).

1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κύτταρα και ιστοί αναπτύσσονται κατά τη βρεφική και παιδική ηλικία και σταματούν να αυξάνονται με κυτταρικές διαιρέσεις μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα κύτταρα του μυοκαρδίου που σταματούν να διαιρούνται μετά την περίοδο της εμβρυϊκής ζωής ώστε ο αριθμός τους να είναι καθορισμένος κατά τη στιγμή της γέννησης. Το αυξημένο μέγεθος του οργάνου είναι συνάρτηση της ηλικίας του ατόμου και

οφείλεται στο αυξημένο μέγεθος του κυττάρου κι όχι σε αύξηση του αριθμού τους. Κάποια άλλα που εντοπίζονται σε ιστούς όπου είναι πιθανή η φθορά ή καταστροφή, συνεχίζουν να υφίστανται κυτταρική διαίρεση για μεγάλο διάστημα μετά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης. Αυτή η συνεχής κυτταρική ανάπτυξη είναι απαραίτητη για την αντικατάσταση των νεκρών ιστών. Τα κύτταρα των μαλλιών, του δέρματος, των βλεννογόνων, του μυελού των οστών και των ενδοθηλίων οργάνων όπως τα έντερα, οι πνεύμονες, το στομάχι και η μήτρα μεταξύ άλλων, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου.

Οποιαδήποτε νέα ή συνεχιζόμενη κυτταρική αύξηση που δεν απαιτείται για τη φυσιολογική ανάπτυξη ή για την αντικατάσταση κατεστραμμένων ή νεκρών ιστών καλείται νεοπλασία. Ανεξάρτητα με το αν τα νέα κύτταρα είναι καλοήγη ή κακοήγη, όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα προέρχονται από φυσιολογικούς προγόνους, ανεξαιρέτως καλοήθειας ή κακοήθειας. Οι αυστηρές διαδικασίες ελέγχου και λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων δεν υφίστανται. Η λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων αποτελεί τη βάση για την κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των καρκινικών κυττάρων (Chabner et al., 2011).

1.3.1 Βιολογία των φυσιολογικών κυττάρων

Πολλά διαφορετικά φυσιολογικά κύτταρα λειτουργούν συντονισμένα έτσι ώστε να μπορεί το σώμα να εκπληρώνει το σκοπό του.

1.3.1.1 Χαρακτηριστικά των φυσιολογικών κυττάρων

- διαιρούνται είτε για να σχηματίσουν φυσιολογικούς ιστούς είτε για να αντικαταστήσουν απολεσθέντες ή κατεστραμμένους φυσιολογικούς ιστούς
- έχουν πεπερασμένο χρόνο ζωής, καθώς το μήκος των τελομερών βραχύνεται με κάθε κύκλο κυτταρικής διαίρεσης, ούτως ώστε όταν αυτό το τμήμα του DNA χαθεί τελείως, το κύτταρο δέχεται μηνύματα για προγραμματισμένο θάνατο, απόπτωση
- διαθέτουν συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως ευδιάκριτη και ξεχωριστή εμφάνιση, σχήμα και μέγεθος
- εκτελούν τουλάχιστον μια εξειδικευμένη λειτουργία συνεισφέροντας έτσι στην ομοιόσταση του σώματος

- παράγουν πρωτεΐνες, αγκυροβολημένες στην επιφάνειά τους, που επιτρέπουν την στενή σύνδεση με άλλα φυσιολογικά κύτταρα
- δεν μεταναστεύουν από τον έναν ιστό στον άλλο λόγω της στενής αυτής σύνδεσης (με εξαίρεση τα αιμοσφαίρια)
- αυξάνονται με ελεγχόμενο τρόπο, αφού διαιρούνται μόνο σε ιδανικές για αύξηση συνθήκες και με πολύ συγκεκριμένο τρόπο
- δεν μπορούν να διαιρεθούν όταν βρίσκονται σε άμεση επαφή με άλλα κύτταρα σε όλο το μήκος της επιφάνειάς του με αποτέλεσμα την αναστολή εξ επαφής της κυτταρικής διαίρεσης
- είναι ευπλοειδικά, με τα περισσότερα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού να διαθέτουν 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, αριθμός φυσιολογικός για τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα.

Κάθε φυσιολογικό, ώριμο κύτταρο διαθέτει συγκεκριμένη δομή και λειτουργία, ενώ τα διάφορα φυσιολογικά ώριμα κύτταρα έχουν διαφορετική μορφολογία και λειτουργίες δεδομένου ότι όλοι οι άνθρωποι προέρχονται από ένα μοναδικό κύτταρο. Η γνώση σχετικά με αυτές τις διαφορές έχει βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών του καρκίνου (Chabner et al., 2011; Mc Ardle et al., 2010; Κωστάκης, 2015).

1.3.2 Βιολογία των παθολογικών κυττάρων

Τα σωματικά κύτταρα είναι εκτεθειμένα σε διάφορες συνθήκες ικανές να τροποποιήσουν την ανάπτυξη και την λειτουργία τους και να θεωρηθούν παθολογικά.

1.3.2.1 Χαρακτηριστικά καλοηθών νεοπλασματικών κυττάρων

Μιλώντας για καλοήθη νεοπλασματικά κύτταρα εννοούνται τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε λάθος χρόνο ή μέρος. Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται οι ινωματώδεις όγκοι της μήτρας, οι σπίλοι, τα σημάδια στο δέρμα, η ενδομητρίωση και οι ρινικοί πολύποδες.

Τα καλοήθη νεοπλάσματα:

- εμφανίζουν συγκεκριμένη μορφολογία και χαρακτηριστικά ιστών από τους οποίους προέρχονται
- παρουσιάζουν ακατάλληλη ή συνεχή ανάπτυξη
- επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες
- παρουσιάζουν μικρή αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα
- συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους, καθώς παράγουν φμπρονεκτίνη απαραίτητη για την προσκόλληση αυτή
- δεν διαθέτουν ικανότητα μετάστασης
- αναπτύσσονται με συστηματικό τρόπο, αν και δεν χρειάζονται στο σώμα
- είναι ευπλοειδικά με 23 ζευγάρια χρωμοσωμάτων, αριθμός χαρακτηριστικός για τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα (Καβαντζάς, 2000; Κωστάκης, 2015).

1.3.2.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα είναι παθολογικά και δεν εξυπηρετούν κάποια χρήσιμη λειτουργία.

Τα κακοήθη καρκινικά κύτταρα αρκετές φορές:

- διαιρούνται διαρκώς ή ταχύτατα
- στις κυτταρικές αυτές σειρές επανενεργοποιείται η τελομέραση, ένζυμο που αποκαθιστά το DNA των τελομερών για να μην αντιδρούν τα καρκινικά κύτταρα σε μηνύματα απόπτωσης και να ζουν επ' αόριστο
- αποβάλλουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων πατρικής γενιάς και εμφανίζονται αναπλαστικά, μικρότερα και σφαιρικά
- παρουσιάζουν μεγάλη αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, αφού το καρκινικό κύτταρο είναι μικρότερο και ο πυρήνας ενός καρκινικού κυττάρου είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τον πυρήνα ενός φυσιολογικού

- δεν εξυπηρετούν κάποιο χρήσιμο σκοπό, εφόσον αλλαγή της μορφολογίας τους συνεπάγεται απώλεια εξειδικευμένων λειτουργιών που επιτελούσαν προηγουμένως
- συνδέονται μεταξύ τους χαλαρά, γιατί δεν παράγουν φιμπροεκτίνη που απαιτείται για ισχυρή σύνδεση
- διαθέτουν ικανότητα μετάστασης και μπορούν να διαφεύγουν διαμέσου των αγγείων και ιστών από την πρωτοπαθή εστία του όγκου σε πολλά σημεία του σώματος εξαιτίας της απουσίας στενής σύνδεσης μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και της μη παρουσίας σημαντικού αριθμού ενζύμων στην επιφάνειά τους
- επεκτείνονται σε άλλους ιστούς εγγύτερους ή απομακρυσμένους από την κύρια περιοχή του όγκου με εισβολή και αυξάνονται συνεχώς
- συνεχίζουν να διαιρούνται ακόμα και αν βρίσκονται σε πλήρη επαφή με άλλα γειτονικά κύτταρα, που σημαίνει ότι η ανάπτυξή τους δεν αναστέλλεται εξ επαφής
- είναι ανευπλοειδικά, καθώς τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ολοένα και πιο κακοήθη, χάνουν ή κερδίζουν χρωμοσώματα, ώστε τα ζεύγη να υπερβαίνουν ή να υπολείπονται των 23 (Mc Ardle et al., 2010; Καβαντζάς, 2000; Κωστάκης, 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

2.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Κάθε καρκίνος χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα. Περιορισμένος αριθμός κρίσιμων γεγονότων οδηγούν το καρκινικό κύτταρο και τους απογόνους του σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και εισβολή (Evan et al., 2001). Η καρκινογένεση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία μπορεί να απαιτεί δύο, τρεις ή και περισσότερες δεκαετίες από την εμφάνιση της πρώτης γενετικής ανωμαλίας μέχρι την κλινική εμφάνιση της νόσου. Ένα φυσιολογικό κύτταρο είναι δυνατό να μετατραπεί σε καρκινικό κύτταρο αν η πρώτη γενετική ανωμαλία δεν αντιμετωπιστεί από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου οδηγώντας σε συσσώρευση διαδοχικών αλλοιώσεων (Κιτράκη et al., 2006). Διάφορα μοντέλα καρκινογένεσης έχουν προταθεί με αυτό που προτάθηκε

από τους Hanahan και Weinberg το 2000 να επικρατεί (Hanahan et al., 2000). Το μοντέλο αυτό αποδεικνύει το γεγονός ότι η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που απαιτεί χρόνο για την κλινική έκφραση. Πρόκειται για ένα μοντέλο καρκινογένεσης έξι κρίσιμων βημάτων-αλλοιώσεων που είναι τα ακόλουθα:

1. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
2. Αναισθησία σε αντι-αυξητικά σήματα
3. Αποφυγή απόπτωσης
4. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
5. Συνεχής αγγειογένεση
6. Ικανότητα για διήθηση/μετάσταση

Αυτά τα βήματα απαιτούνται για την καρκινογένεση σε όλους τους τύπους ιστών με τον αριθμό ή η χρονική σειρά των αλλοιώσεων πιθανώς να διαφέρει (Weinberg, 2014; Κιτράκη et al., 2006).

Τις δύο κατηγορίες γονιδίων υπεύθυνων για την καρκινογένεση αποτελούν τα πρωτοογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά. Τα πρωτοογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια ικανά να ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαίρεση των κυττάρων (Loffler, 2007). Διάφορα είδη μεταλλάξεων που μπορεί να προκληθούν από μεταλλαξιόγόνους παράγοντες μπορούν να μετατρέψουν τα πρωτοογκογονίδια σε ογκογονίδια τα οποία υπερλειτουργούν και οδηγούν το κύτταρο σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και πρόκληση καρκίνου. Αντιθέτως τα ογκοκατασταλτικά συμμετέχουν στην καταστολή της αύξησης και της διαίρεσης των κυττάρων, όταν υπάρχει βλάβη στο γενετικό υλικό (Loffler, 2007).

Η καρκινογένεση είναι απόρροια διαταραχής της αύξησης, της διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου.

2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ

Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης γενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες μπορεί να είναι επίκτητες ή κληρονομούμενες. Οι αλλοιώσεις αυτές επηρεάζουν τα ογκογόνα, τα γονίδια καταστολής όγκων ή τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, με σκοπό τα κύτταρα να διαφύγουν των μηχανισμών ελέγχου και να οδηγηθούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Αν οι απόγονοι του

καρκινικού κυττάρου υποστούν περαιτέρω μεταλλάξεις, επέρχεται η κλωνική επέκταση, η οποία αν συνεχιστεί παρατηρείται μετάσταση (Arneth, 2018). Η απόδραση, δηλαδή, των καρκινικών κυττάρων από την πρωτογενή εστία του όγκου (μέρος όπου ξεκινά ο καρκίνος, όπου το πρώτο κύτταρο χάνει τον έλεγχο του), προσβάλλουν ένα απομακρυσμένο όργανο και προξενούν τη δημιουργία ενός νέου όγκου, γεγονός που καλείται μετάσταση. Μερικές φορές ο καρκίνος στην πρωταρχική εστία είναι μη ανιχνεύσιμος ή πολύ μικρός. Όλοι οι κακοήθεις καρκίνοι έχουν δυνατότητα μετάστασης.

Το συγκεκριμένο σημείο καθορίζεται από τον τύπο των κυττάρων, ενώ το μέγεθος του βοηθά στον προσδιορισμό της πρόγνωσης και τις θεραπευτικές επιλογές (Runge et al., 2012; Παπαλάμπρος, 2012).

Λίγα μόνο κύτταρα είναι ικανά να επιβιώσουν σχηματίζοντας αποικίες στο νέο όργανο-στόχο, παρά το γεγονός ότι πολλά προχωρούν σε μετάσταση από τον πρωτοπαθή όγκο. Πρόκειται για πολυσταδιακή διαδικασία και εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του όγκου και του ξενιστή, όπως επίσης και τους φραγμούς του οργανισμού. Δεν είναι τυχαίο, ότι οι περισσότερες μεταστάσεις εγκαθίσταται σε πνευμονικούς ή ηπατικούς ιστούς.

Επιγραμματικά η πορεία της διήθησης και της μετάστασης, μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω στάδια.

1. Εισβολή και διήθηση των παρακείμενων ιστών συμπεριλαμβανομένων αγγειακών και λεμφικών
2. Απελευθέρωση διασπειρόμενων καρκινικών κυττάρων είτε ως μονήρη κύτταρα είτε σε συστάδες στην κυκλοφορία
3. Επιβίωση και μεταφορά στην κυκλοφορία
4. Προσβολή του τριχοειδούς δικτύου απομακρυσμένων οργάνων-Εξαγγείωση
5. Εγκατάσταση στο όργανο και έκτοπη ανάπτυξη των διασπειρόμενων καρκινικών κυττάρων σε νέους όγκους (Νακοπούλου, 2017)

Οι μεταστάσεις μπορούνε να γίνουν αντιληπτές, ανάλογα με το σημείο που εντοπίζονται, από διάφορα τοπικά συμπτώματα. Έτσι, οι οστικές μεταστάσεις μπορεί να προκαλέσουν πόνο σε αρθρώσεις και οστά, οι μεταστάσεις στον εγκέφαλο προκαλούν ζαλάδες, ναυτία, πονοκέφαλους,

παράλυση, οι μεταστάσεις στον πνεύμονα μπορούν να προκαλέσουν πόνο στο στήθος, βήχα με αιματηρά πτύελα ή δύσπνοια (Runge et al., 2012).

Η ταυτόχρονη ανάπτυξη καρκίνου σε διάφορα σημεία του σώματος είναι πολύ σπάνια. Συνήθως, ο καρκίνος εντοπίζεται σε συγκεκριμένο σημείο, από όπου μερικά κύτταρα μεταναστεύουν σε γειτονικά ή απομακρυσμένα σημεία, δημιουργώντας νέες εστίες νόσου (Παπαλάμπρος, 2012).

Στους βασικούς μηχανισμούς μετάστασης, συμπεριλαμβάνονται, η απευθείας εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, κατά την οποία ο καρκίνος πολλαπλασιάζεται και επεκτείνεται εισβάλλοντας σε γειτονικούς ιστούς και όργανα. Η μεταφορά των καρκινικών κυττάρων με τη βοήθεια του αίματος και της λέμφου, ανήκει στους μηχανισμούς μετάστασης, αφού στην αιματογενή διασπορά οι όγκοι τροφοδοτούνται με αίμα όπως οι κανονικοί ιστοί και μερικές φορές κάποια κύτταρα αποσπώνται από την καρκινική μάζα και εξαπλώνονται, με τη βοήθεια του αίματος, σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος. Στη λεμφική διασπορά, σκοπός του λεμφικού συστήματος είναι η απομάκρυνση των τοξικών και άχρηστων ουσιών από τον οργανισμό, οι οποίες παγιδεύονται σε συγκεκριμένα σημεία, τους λεμφαδένες. Τα καρκινικά κύτταρα επεκτείνονται ταχύτατα δια μέσου του λεμφικού συστήματος. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθεί η διασπορά των καρκινικών κυττάρων με εμφύτευση ως συνέπεια μηχανικής απόσπασης κακοήθων κυττάρων από την επιφάνεια του όγκου (Ardle et al., 2010).

2.3 ΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Υπάρχουν περισσότεροι από 200 τύποι καρκίνων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υπέρμετρη αύξηση των κυττάρων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται με συγκεκριμένο τρόπο με σκοπό να αντικαθιστούν τα κύτταρα που πεθαίνουν. Όμως όταν διαταραχθεί αυτή η φυσιολογική διαδικασία, ο οργανισμός παράγει μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων από εκείνα που χρειάζεται στην πραγματικότητα. Έτσι, τα αυτά συσσωρεύονται στην περιοχή σχηματίζοντας τον όγκο.

Οι όγκοι είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι σχηματίζονται από πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα λόγω κάποιου ερεθισμού. Αυτοί δεν μπορούν να είναι επεκτατικοί, αδυνατούν να εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και να σχηματίσουν νέους όγκους σε άλλα σημεία του σώματος. Σπάνια προκαλούν σοβαρή βλάβη στο σώμα. Προβλήματα προκαλούν μόνο σε περίπτωση που αλλοιωθεί η μορφή τους, ασκήσουν πίεση σε άλλα όργανα και εκκρίνουν ορμόνες που έχουν επιρροή σε λειτουργίες του σώματος.

Οι κακοήθεις όγκοι σχηματίζονται με παρόμοιο τρόπο με τους καλοήθεις όγκους. Η μορφολογία είναι διαφορετική σε σχέση με τα φυσιολογικά και μπορούν να εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς (Mulita, 2020).

Υπάρχουν και αιματολογικοί όγκοι εκτός από τους συμπαγείς. Σε τέτοιους τύπους καρκίνου, τα καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται στο σώμα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Οι ποικίλοι τύποι καρκίνου συμπεριφέρονται διαφορετικά ανάλογα με τα διαφοροποιημένα κύτταρα του ιστού απ' όπου δημιουργούνται. Επομένως, τα συμπτώματα σε κάθε ασθενή διαφοροποιούνται αναλόγως με το σημείο του σώματος που έχει προσβληθεί. Η ταχύτητα με την οποία αναπτύσσονται οι καρκίνοι, η επίδρασή τους στον οργανισμό (λόγω έκκρισης ουσιών στο αίμα), η τάση εξάπλωσης μέσω της κυκλοφορίας καθώς και η ανταπόκριση στα φάρμακα ποικίλουν (Κωστάκης, 2015).

2.4 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι αιτίες που προκαλούν καρκίνο και έχουν περιγραφεί έως σήμερα είναι πολλές και μπορεί να είναι χημικές, ιογενείς και άλλες όπως για παράδειγμα η κληρονομικότητα, οι προκαρκινικές κακώσεις και τα τραύματα. Ειδικότερα, η πιο συχνή αιτία εμφάνισης καρκίνου είναι το κάπνισμα (22% των θανάτων από καρκίνο) (2018). Επιπλέον, η παχυσαρκία, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η φτωχή διαίτα όπως και η κατανάλωση αλκοόλ (10%), ενώ κι άλλοι παράγοντες όπως μολύνσεις, έκθεση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία και ρύποι ενοχοποιούνται για την νόσο αυτή (Anand, 2008). Αυτοί οι παράγοντες δρουν, τουλάχιστον εν μέρει, μεταβάλλοντας τα γονίδια ενός κυττάρου (World Cancer Report, 2014).

Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα μιας σειράς γενετικών αλλαγών στα κύτταρα που οδηγούν σε παρουσία νέων χαρακτηριστικών στο ανθρώπινο σώμα εξαιτίας μη ελεγχόμενης λειτουργίας και ανάπτυξης με συνέπεια την δημιουργία όγκου.

2.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η διάγνωση προσδιορίζει τον τύπο του καρκίνου από τον οποίο έχει προσβληθεί ο ασθενής. Η οριστική διάγνωση του καρκίνου ολοκληρώνεται έπειτα από μελέτη κυττάρων από το συγκεκριμένο ιστό στο μικροσκόπιο σε συνδυασμό με άλλες ειδικές εργαστηριακές ή κλινικές εξετάσεις στις περισσότερες περιπτώσεις. Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρία υπάρχουν εφτά πρώιμα συμπτώματα η εμφάνιση των οποίων πρέπει να οδηγεί σε επίσκεψη σε

ειδικό γιατρό. Όμως, πρέπει να διευκρινιστεί και να τονιστεί ότι η παρουσία αυτών δεν σημαίνει ότι υπάρχει απαραίτητα η ανάπτυξη καρκίνου, αφού απαντώνται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Τα σημεία είναι τα εξής:

- σκλήρυνση ή διόγκωση στο μαστό ή άλλο όργανο
- βραχνάδα στη φωνή ή επίμονος βήχας
- δυσκολία στην κατάποση ή δυσπεψία
- φλεγμονή του φάρυγγα που δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία
- ασυνήθιστες πληγές και εκκρίματα που δεν επουλώνονται, αναίτιες αιμορραγίες
- αλλαγές στην ούρηση ή την κένωση του εντέρου
- αλλαγή μιας ελιάς στο μέγεθος, το σχήμα ή την όψη

Η απόφαση για επίσκεψη στο γιατρό με την εμφάνιση των σημείων ενδέχεται να προλάβει ή και να σταματήσει την ανάπτυξη κάποιου όγκου που συνοδεύεται από ορισμένες καταστάσεις:

- πρόκληση πίεσης ή πόνου όταν ο όγκος πιέζει γειτονικούς ιστούς και όργανα
- πρόκληση αιμορραγίας όταν ο όγκος προκαλεί ρήξη γειτονικών αγγείων
- δυνατότητα ψηλάφησης με τα χέρια (περιπτώσεις καρκίνου του μαστού) όταν ο όγκος έχει μεγάλο μέγεθος
- δυσκολία στην αναπνοή (περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα) όταν ο όγκος προκαλεί.

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορεί κανείς να καταλάβει ότι προσβλήθηκε από καρκίνο. Η αρχική διάγνωση είναι πολύ σημαντική και αποτελεί το κλειδί για τον προσδιορισμό των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών στην κάθε περίπτωση ασθενή. Για τη διάγνωση του καρκίνου μια ή περισσότερες προσεγγίσεις ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν και αναλύονται παρακάτω:

Φυσική εξέταση. Ο γιατρός μπορεί να αισθανθεί περιοχές του σώματός για εξογκώματα που μπορεί να υποδηλώνουν όγκο. Κατά τη διάρκεια μιας φυσικής εξέτασης, μπορεί να αναζητηθούν ανωμαλίες, όπως αλλαγές στο χρώμα του δέρματος ή διεύρυνση ενός οργάνου, που μπορεί να υποδηλώνουν την παρουσία καρκίνου.

Εργαστηριακές δοκιμές. Εργαστηριακές εξετάσεις, όπως εξετάσεις ούρων και αίματος, μπορεί να βοηθήσουν στον εντοπισμό ανωμαλιών που μπορεί να προκληθούν από καρκίνο.

Εξετάσεις απεικόνισης. Οι εξετάσεις απεικόνισης επιτρέπουν την εξέταση οστών και εσωτερικών οργάνων με μη επεμβατικό τρόπο. Οι εξετάσεις απεικόνισης που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του καρκίνου μπορεί να περιλαμβάνουν σάρωση τομογραφίας με υπολογιστή (CT), σάρωση οστών, απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), σάρωση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET), υπερήχους και ακτίνες X, μεταξύ άλλων.

Νεοπλασματικοί δείκτες, δηλαδή ουσίες, ανιχνευόμενες στο αίμα ή σε βιολογικά υγρά, που δείχνουν την παρουσία ή την απουσία καρκίνου. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι πρωτεΐνες ή ένζυμα στα σωματικά υγρά, ορμόνες, οι οποίες είτε εκκρίνονται από τον οργανισμό ως απάντηση στη δημιουργία μιας νεοπλασίας, είτε εκκρίνονται από τον ίδιο τον όγκο ως αντιγόνα, τα οποία εκφράζονται στις επιφάνειες των κυττάρων, ογκογονίδια και προϊόντα τους και νευροδιαβιβαστές. Οι καρκινικοί δείκτες, από την άλλη, αντιπροσωπεύουν τους ειδικούς δείκτες για έναν συγκεκριμένο καρκινικό όγκο (Constâncio et al., 2020; Kamel et al., 2017). Κάποιοι από αυτούς είναι οι: CEA (καρκίνος γαστρεντερικού και άλλα αδενοκαρκινώματα), AFP (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, όγκοι γεννητικών κυττάρων), hCG (NSGCT, χοριοκαρκινώματα, σεμινώματα, όγκοι εκ γεννητικών κυττάρων), CA 19.9 (καρκίνος παγκρέατος), CA 15-3 (καρκίνος του μαστού), CA 125 (καρκίνος των ωοθηκών). Εκτός από τους καρκινικούς δείκτες σε βιολογικά υγρά, μελετώνται και οι «μοριακοί δείκτες» σε περίπτωση όγκου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν: HER2/neu (καρκίνος του μαστού, γαστρικός καρκίνος, καρκίνος του οισοφάγου), ER (καρκίνος του μαστού), EGFR μετάλλαξη (μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του παχέος εντέρου), K-RAS μετάλλαξη (καρκίνος του παχέος εντέρου, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα), χιμαιρικό γονίδιο BCR-ABL (χρόνια μυελοειδής λευχαιμία).

Βιοψία. Κατά τη διάρκεια μιας βιοψίας δείγμα ιστού συλλέγεται για έλεγχο στο εργαστήριο. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι συλλογής δείγματος.

2.5.1 Τεχνικές μοριακής διάγνωσης

Οι βιοδείκτες του καρκίνου αποτελούν έναν από τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους τομείς στην κλινική διάγνωση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο ασυμπτωματικών ατόμων στο γενικό πληθυσμό, για την έγκαιρη διάγνωση σε ύποπτες περιπτώσεις, την πρόγνωση, την απόκριση στη θεραπεία και τέλος για την παρακολούθηση ασθενών μετά από θεραπεία.

Η μοριακή διαγνωστική βασίζεται στην ανίχνευση τέτοιων βιολογικών μορίων και είναι προϊόν εξέλιξης μεθόδων μοριακής ανάλυσης όπως η μικροσυστοιχία, η φασματομετρία μάζας και η αυτοματοποιημένη αλληλούχιση DNA. Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ήταν μια σημαντική ανακάλυψη για τον έλεγχο του γενετικού υλικού σε κλινικό επίπεδο.

Η ανοσοϊστοχημεία (IHC) είναι μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση ειδικού αντιγόνου με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων μέσα στον ιστό. Τα κοινά ανοσοϊστοχημικά πάνελ που χρησιμοποιούνται είναι η κυτοκερατίνη για επιθηλιακές κακοήθειες, πρωτεΐνη S-100 για νευρική και νευροεκτοδερμική διαφοροποίηση, κοινό αντιγόνο λευκοκυττάρων για λεμφώματα, HMB-45 για μελανώματα, δεσμίνη και βιμεντίνη για όγκους που εμφανίζουν μυϊκή και μεσεγχυματική διαφοροποίηση αντίστοιχα. Η ανοσοϊστοχημεία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον προσδιορισμό της κατάστασης των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και Her-2 neu στον καρκίνο του μαστού στην πρόβλεψη της απόκρισης στη θεραπεία. Δομικές ανωμαλίες όπως και αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης του καρκινικού κυττάρου μελετώνται. Οι προκύπτουσες ανωμαλίες του κυτταρικού κύκλου οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Τα λεμφώματα και οι λευχαιμίες διακρίνονται από εξαιρετικά ειδικές κυτταρογενετικές και μοριακές γενετικές αναδιατάξεις, ενώ οι συμπαγείς όγκοι χαρακτηρίζονται από πολλαπλές ειδικές και μη ειδικές αλλαγές. Οι αλλαγές εντοπίζονται ύστερα από ανάλυση χρωμοσωμάτων, DNA ή RNA. Χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες συναντώνται συχνά σε κακοήγη κύτταρα και συχνά χαρακτηρίζουν για έναν συγκεκριμένο τύπο όγκου. Η ταυτοποίησή των ανευπλοειδιών προκύπτει έπειτα από εφαρμογή της τεχνικής του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) και της συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδοποίησης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, πολλές μεταλλάξεις δεν είναι διακριτές σε κυτταρογενετικό επίπεδο. Τότε απαιτείται ταυτοποίηση του υπεύθυνου για τη νόσο γονιδίου. Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και του Southern Blot συνεπάγεται την ανάλυση του κυτταρικού DNA. Ταυτόχρονα, τεχνικές όπως στύπωμα Northern, αντίστροφη μεταγραφή-PCR (RT-PCR) και υβριδοποίηση *in situ* χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου RNA σε ένα μείγμα RNAs.

Σχετικά νεότερες τεχνικές όπως η μικροσυστοιχία, επιτρέπουν τη μέτρηση της διαφορικής έκφρασης ενός γονιδίου σε διαφορετικούς τύπους και στάδια του καρκίνου (Bhardwaj et al., 2005). Οι μοριακές εξετάσεις έχουν γίνει μέρος της διαχείρισης των ασθενών, επειδή μπορούν να ταυτοποιήσουν τα κληρονομικά νεοπλάσματα, αλλά να συμβάλλουν στην επιλογή της πιο αποτελεσματικής θεραπείας, βασιζόμενη στα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινικών ιστών, είτε σε άλλες βιολογικές παραμέτρους της νεοπλασίας (Sokolenko et al., 2018).

Ειδικό μέρος

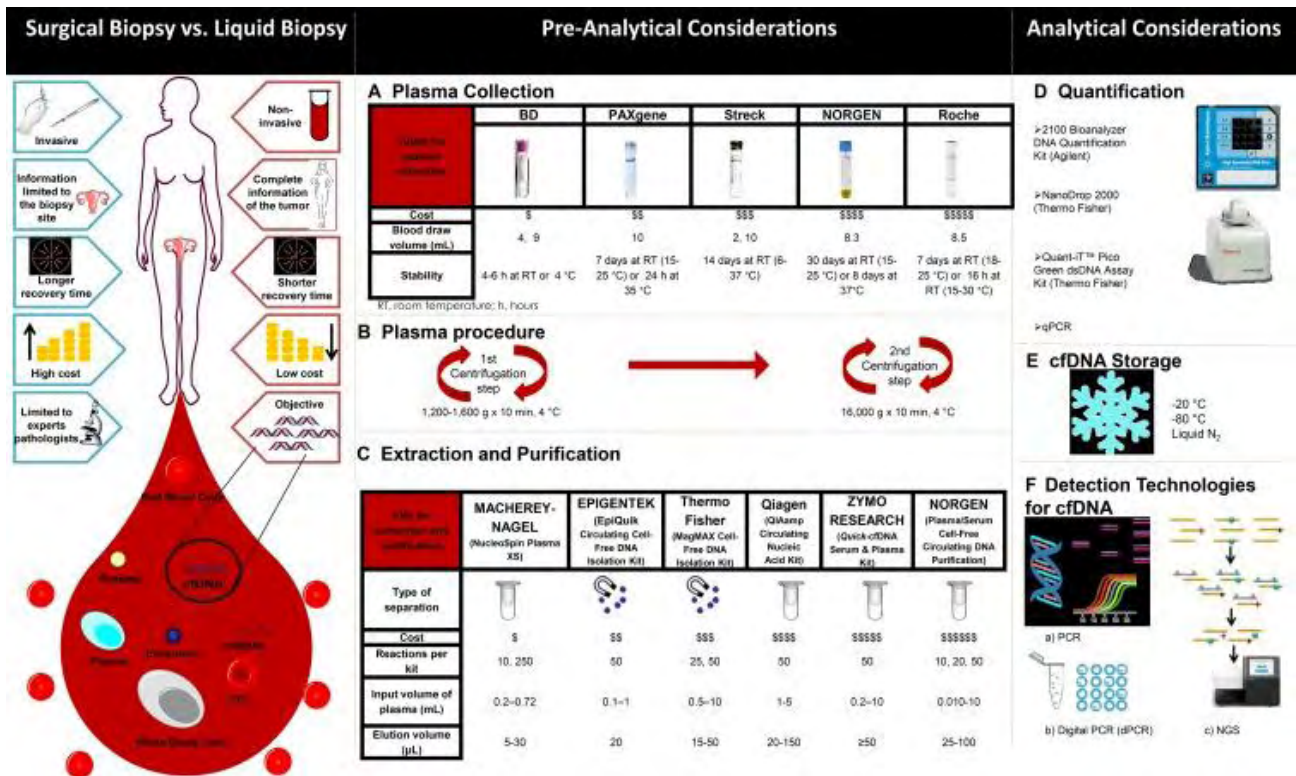
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

3.1 ΒΙΟΨΙΑ ΙΣΤΟΥ

Ο καρκίνος βρίσκεται συχνά σε ιστούς ή όργανα του σώματος που δεν είναι εύκολα προσβάσιμα, όπως ο εγκέφαλος, οι ωοθήκες και το πάγκρεας. Βιοδείκτες που σχετίζονται με τέτοιες νεοπλασματικές νόσους δεν είναι πάντα εύκολο να μετρηθούν ή μπορεί να παρουσιάσουν σημαντικό κλινικό κίνδυνο, όπως αιμορραγία ή μόλυνση (Domínguez-Vigil et al., 2017).

Η ιστική βιοψία αποτελεί το χρυσό κανόνα για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η χρήση της όμως ενέχει αρκετούς περιορισμούς. Η αιμορραγία, οι λοιμώξεις, ο πόνος, η ρήξη σπλάχνου, το κόστος αποτελούν κάποιους από τους περιοριστικούς παράγοντες. Αρχικά, απαιτεί δείγμα του όγκου. Με άλλα λόγια, είναι μια επεμβατική τεχνική η οποία απαιτεί ένα μικρό χειρουργείο το οποίο προκαλεί δυσφορία στον ασθενή. Όπως όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις, η βιοψία ιστού ίσως να μην αποτελεί την καλύτερη επιλογή για ορισμένους ασθενείς σε ευαίσθητη κατάσταση ή σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας. Άλλος ένας περιορισμός είναι πως ο ιστός που έχει επιλεγεί για βιοψία μπορεί να μην είναι ο καταλληλότερος. Επίσης, ίσως να μην είναι σχετικός με τη γενικότερη αξιολόγηση του όγκου, με αποτέλεσμα αδυναμία ταυτοποίησης και αντιμετώπισης της νόσου (Wills et al., 2018). Η κλασική βιοψία αποτυπώνει τη μοριακή φύση του όγκου σε δεδομένη στιγμή και στο υπό εξέταση τμήμα του ιστού, γεγονός που μπορεί να μην αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην αντιμετώπιση των νεοπλασμάτων λόγω ετερογένειας του όγκου. Το γενετικό προφίλ του όγκου αποτελεί μια δυναμική και συνεχώς μεταβαλλόμενη κατάσταση και οφείλεται στην εξελικτική πίεση που ασκείται από το μικροπεριβάλλον και τους θεραπευτικούς χειρισμούς (Rothé et al., 2014). Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός βιοδεικτών ανακαλύφθηκε και έστρεψε την προσοχή των επιστημόνων, στην ανάλυση δεικτών που μπορούν να προσδιοριστούν, με την ελάχιστη δυνατή επεμβατικότητα, με απλή λήψη περιφερικού αίματος και την μετέπειτα ανάλυσή του. Η τεχνική αυτή ονομάζεται υγρή βιοψία.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1) συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά της υγρής βιοψίας και της βιοψίας ιστού.



Εικόνα 1: Σύγκριση χαρακτηριστικών μεταξύ χειρουργικών (βασισμένων σε ιστούς) και υγρών βιοψιών (αριστερά) και επισκόπηση των διαφόρων στοιχείων της ροής εργασίας υγρής βιοψίας (A-F, δεξιά) (Domínguez-Vigil et al., 2017).

3.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Πριν από σχεδόν 150 χρόνια το 1869, ο παθολόγος Thomas Ashworth κατείχε στοιχεία για την παρουσία κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) στο αίμα ενός ασθενή με μεταστατικό καρκίνο και, ως εκ τούτου, περιέγραψε για πρώτη φορά το φαινόμενο που σήμερα θεωρείται υγρή βιοψία και φαίνεται να χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές απεικόνισης και βιοψίας (Zhang et al., 2017; Arneth, 2018).

Η υγρή βιοψία είναι η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων, DNA αλλά και RNA σε βιολογικά υγρά (περιφερικό αίμα, ούρα, σάλιο κι άλλα σωματικά υγρά) με τη βοήθεια τεχνικών όπως η PCR ή η NGS προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες για ασθένειες όπως ο καρκίνος. Όπως και η παραδοσιακή βιοψία ιστού, η υγρή βιοψία χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνο με το σημαντικό πλεονέκτημα ότι είναι μη επεμβατική. Κατά την διάρκεια αυτής το βιολογικό υλικό αφότου απομονωθεί, επεξεργάζεται για περαιτέρω ανάλυση (Arneth, 2018).

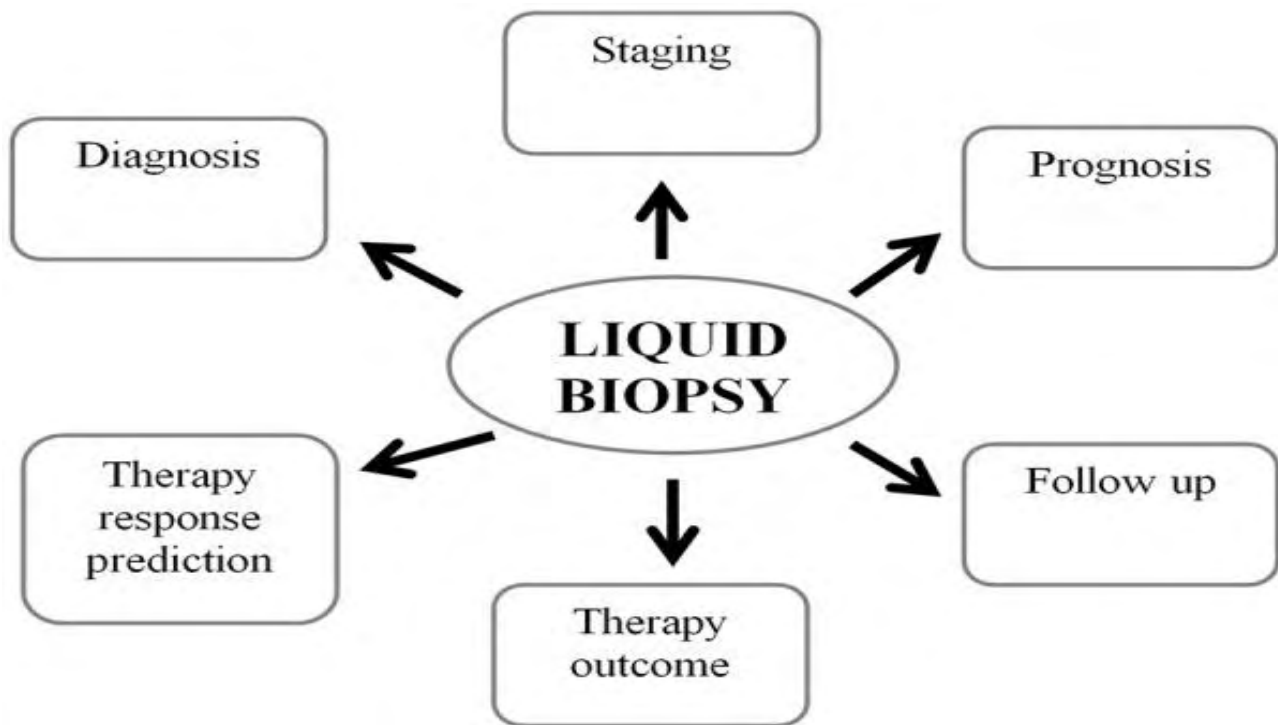
Σκοπός της εν λόγω διαδικασίας είναι η ταυτοποίηση των μοριακών χαρακτηριστικών των συμπαγών όγκων (Fici, 2019; Yamada et al., 2019).

3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Η ανάλυση των παραμέτρων που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της υγρής βιοψίας έχει ανοίξει νέους διαγνωστικούς ορίζοντες καθώς μειώνουν σημαντικά τους κινδύνους που σχετίζονται με τις περισσότερες κλασικές βιοψίες. Η υγρή βιοψία έχει κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των επιστημόνων με την προοπτική να αντικαταστήσει τη βιοψία ιστού στο μέλλον.

Η υγρή βιοψία θεωρητικά είναι ένας απλός και λιγότερο επεμβατικός τρόπος για την εξέταση όλων των τύπων καρκίνου, την ποσοτικοποίηση και το χαρακτηρισμό των βιολογικών υλικών (DNA, RNAs, πρωτεϊνών) που προέρχονται από καρκινικούς ιστούς (Fici, 2019).

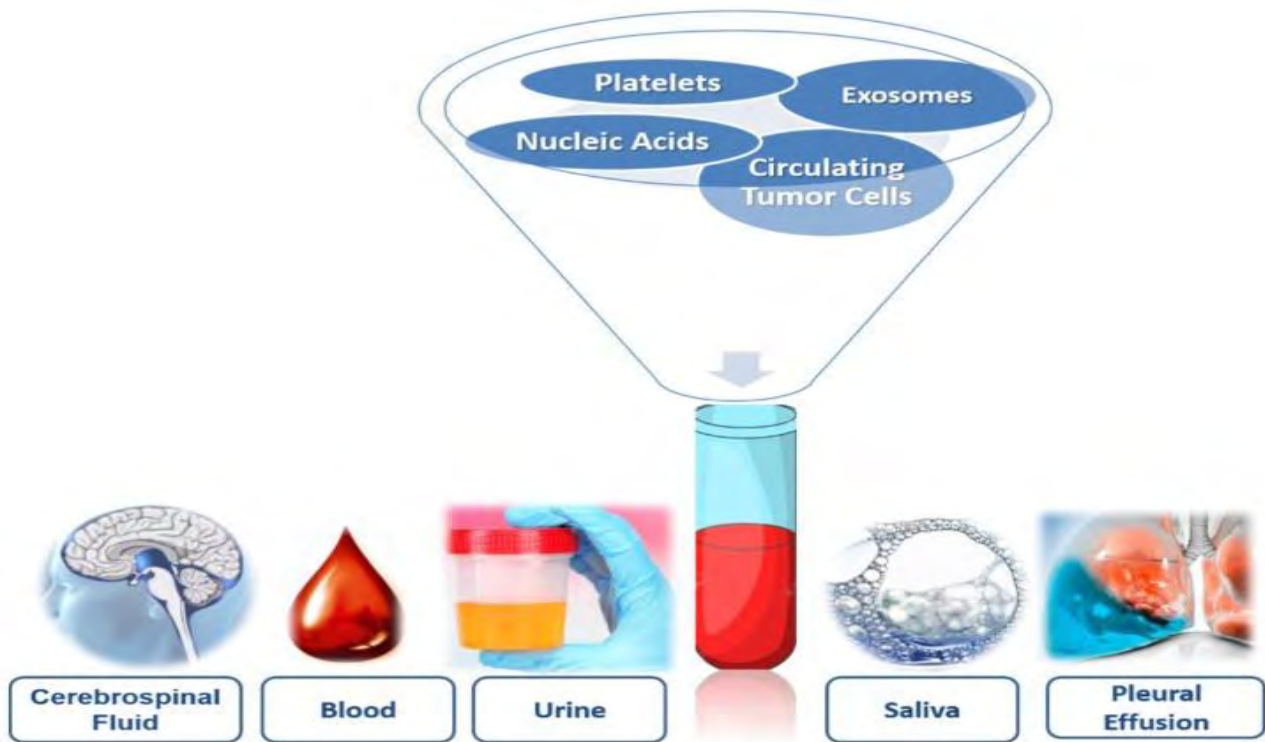
Υγρές βιοψίες έχουν εισαχθεί για τη διαχείριση του καρκίνου, με τις εξετάσεις αίματος να εμφανίζονται ως μια ιδιαίτερα ευαίσθητη εναλλακτική εξέταση (Cohen et al., 2018). Το αίμα θεωρείται μια πηγή πληροφοριών με σκοπό την ανίχνευση συμπαγών καρκινικών όγκων. Οι εφαρμογές υγρών βιοψιών είναι πολλές. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2 οι υγρές βιοψίες παρέχουν επίσης ακριβείς πληροφορίες για το μικροπεριβάλλον του όγκου και επιτρέπουν (1) έγκαιρη ανίχνευση, (2) πρόγνωση (3) σταδιοποίηση του όγκου (4) αναγνώριση στόχων για εξατομικευμένη θεραπεία, (5) πρόβλεψη απόκρισης στη θεραπεία, (6) παρακολούθηση υποτροπής της νόσου και των μεταστάσεων της (Izzotti et al., 2016; Johann et al, 2018; Rofi et al., 2018).



Εικόνα 2: Η υγρή βιοψία είναι η ανάλυση σε βιολογικά υγρά κυκλοφορούντων κυττάρων ή άλλων κυτταρικών συστατικών, όπως miRNA, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εμφάνιση και την ανάπτυξη καρκίνου σε ιστούς στόχους. Η υγρή βιοψία στην ογκολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έγκαιρη διάγνωση (δευτερογενής πρόληψη), σταδιοποίηση του καρκίνου, πρόγνωση, πρόβλεψη της απόκρισης σε μια συγκεκριμένη θεραπεία, αξιολόγηση του αποτελέσματος της θεραπείας και παρακολούθηση του ασθενούς για εξατομίκευση των πρώιμων υποτροπών (τριτοβάθμια πρόληψη) (Izzotti et al., 2016).

3.4 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ - ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Η μέθοδος της υγρής βιοψίας υπόσχεται πολλά, όσον αφορά την ανίχνευση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη μιας πιθανής απάντησης του όγκου στη θεραπεία. Οι μελέτες της υγρής βιοψίας μπορεί να διεξαχθούν στο αίμα καθώς και σε άλλα βιολογικά υγρά όπως ούρα, σάλιο, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) ή υπεζωκοτική συλλογή, μεταξύ άλλων (Εικόνα 3).

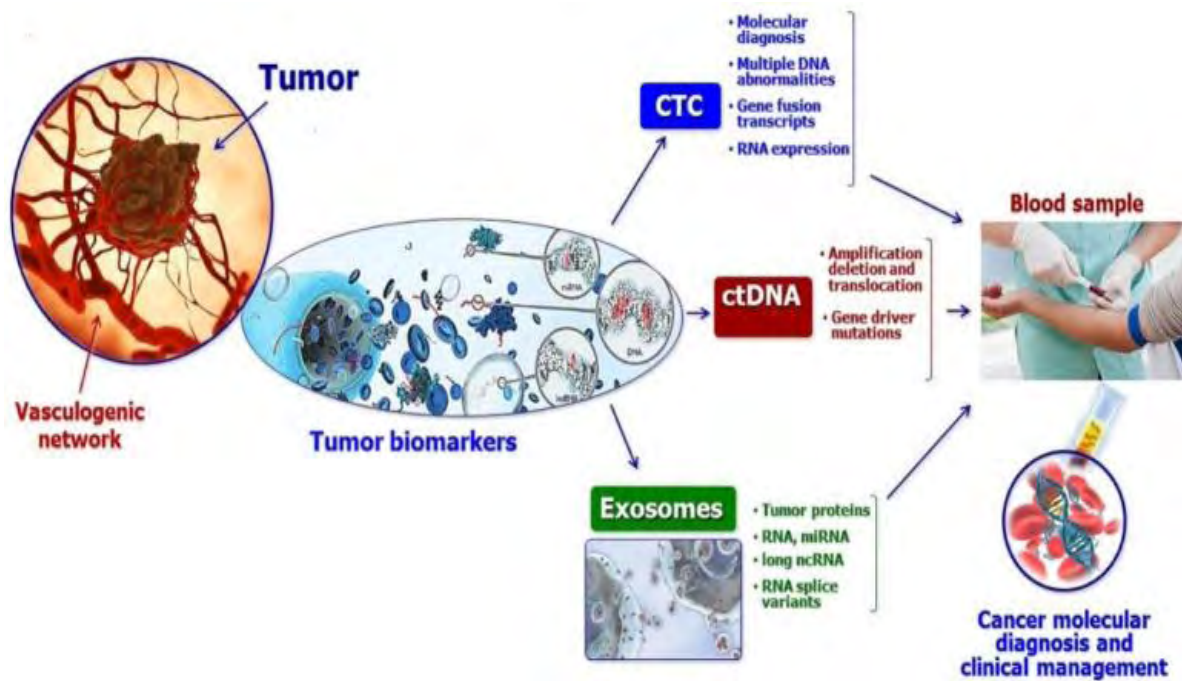


Εικόνα 3: Συστατικά υγρής βιοψίας (Fernández-Lázaro et al, 2020).

Οι βιοδείκτες που βασίζονται στη μέθοδο της υγρής βιοψίας, είναι αρκετοί, όμως αυτοί που ξεχωρίζουν είναι: ελεύθερα καρκινικά κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα κυρίως ctDNA ή ctRNA, CTCs (circulating tumor cells), εξωσώματα, συστατικών των οποίων πραγματοποιείται γονιδιωματική ή πρωτεομική εκτίμηση όπως αναφέρεται στην Εικόνα 4 (Alimirzaie et al., 2019; Palmirotta et al., 2018; Sol et al., 2017).

Η υγρή βιοψία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση microRNAs, μικροσωματιδίων και αιμοπεταλίων τα οποία βρίσκονται ή απελευθερώνονται στο περιφερικό αίμα (Domínguez-Vigil et al., 2017; Sol et al., 2017).

Όλα τα παραπάνω σχετίζονται με τον όγκο και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά μιας νεοπλασματικής νόσου. Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς όπως και για την παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και την εξέλιξη της νόσου.



Εικόνα 4: Μοριακές εφαρμογές κυκλοφορούντων κυττάρων όγκου (CTCs), κυκλοφορούμενου όγκου DNA (ctDNA) και εξωσωμάτων ως υγρή βιοψία για εξατομικευμένη ιατρική (Palmirotta et al., 2018).

3.4.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs)

3.4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η ετερογένεια του καρκίνου θέτει σημαντικές παθολογικές, διαγνωστικές και θεραπευτικές προκλήσεις τόσο για τους κλινικούς όσο και για τους επιστήμονες. Οι υγρές βιοψίες μπορεί δυνητικά σε ορισμένες περιπτώσεις να αντικαταστήσουν ή να συμπληρώσουν βιοψίες ιστών για να επιτύχουν ακριβή και έγκαιρη ανίχνευση ενός καρκίνου, υποτροπής ή εξέλιξης, να παρέχουν πληροφορίες για εξατομικευμένες θεραπείες και να ξεπεράσουν τις προκλήσεις που προκαλεί η ετερογένεια του όγκου. Κάθε δείγμα αίματος που περιέχει καρκινικά κύτταρα, προσφέρει ένα στιγμιότυπο του συνολικού επιθετικού φορτίου του καρκίνου, αποκαλύπτοντας την ετερογένεια.

Η ιδέα των CTCs, όπως ήδη αναφέρθηκε, εισήχθη για πρώτη φορά από τον Asworth το 1869, με την παρατήρηση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από κύτταρα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο στο μικροσκόπιο (Imamura et al., 2016; Miller et al., 2010).

Ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα εννοούνται συνήθως επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία εντοπίζονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο (Tartarone et al., 2017). Πρόκειται για κύτταρα με στρογγυλή ή οβάλ μορφολογία, δηλαδή στρογγυλούς ή ωοειδείς πυρήνες μέσα στο

κυτταρόπλασμα. Έχουν αποκοπεί από έναν πρωτογενή όγκο και και κυκλοφορούν στην κυκλοφορία του αίματος (Balic et al., 2013; Burz et al., 2018).

Τα CTCs χαρακτηρίζονται από ετερογένεια επειδή αποτελούνται από μείγμα υποπληθυσμών με διαφορετικά φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Διαφορές στα κυτταρικά χαρακτηριστικά και τη μορφολογία μπορεί να είναι σημαντικές για τον προσδιορισμό των προγνωστικών και θεραπευτικών επιπτώσεων για την ασθένεια (Balic et al, 2013; Chen et al, 2018; Domínguez Vigil et al., 2018).

Ο χρόνος κατά τον οποίο τα CTCs βρίσκονται στην αιματική κυκλοφορία είναι σύντομος και ο χρόνος ημιζωής τους κυμαίνεται από 1-2,4 ώρες (Alix-Panabières et al., 2016).

Κυκλοφορούν μέσω του αίματος σε πιθανές μεταστατικές θέσεις, είτε ως ένα μόνο κύτταρο είτε σε συστάδες, ώστε να θεωρούνται σπόροι για την ανάπτυξη επιπλέον όγκων (μεταστάσεις) σε διαφορετικούς ιστούς και όργανα (Balic et al., 2013; Sundling et al., 2019).

Η συνολική επιβίωση και η επιθετικότητα του όγκου μπορεί να υπολογιστεί με βάση το ποσοστό των CTCs (Jia et al., 2017). Ωστόσο, ο προσδιορισμός του φορτίου των CTCs και μόνο παρέχει περιορισμένες πληροφορίες. Περαιτέρω χαρακτηρισμός με φαινοτυπικές και γονιδιωματικές αναλύσεις CTCs παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία της μετάστασης και τους μηχανισμούς αντοχής στη θεραπεία, πληροφορίες σχετικά με τους βιοδείκτες που προβλέπουν την ευαισθησία στα φάρμακα και τον προσδιορισμό των θεραπευτικών στόχων. Ο χαρακτηρισμός και ο προσδιορισμός του φορτίου των CTCs έχει γίνει σε σε διαφορετικούς τύπους καρκίνων, όπως ωοθηκών, μαστού, προστάτη, πνεύμονα, λαιμού και κεφαλής, μελανώματος, ουροδόχου κύστης, ορθοκολικού, ηπατοκυτταρικού και παγκρεατικού (Nurwidya et al., 2016).

Σε γενικές γραμμές, οι στόχοι των μελετών για CTCs σε συμπαγή όγκο περιλαμβάνουν (α) την πρόβλεψη του κινδύνου για μεταστατική εξέλιξη και υποτροπή, (β) τη σταδιοποίηση και παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο της ανταπόκρισης σε θεραπείες, (γ) τον εντοπισμό θεραπευτικών στόχων και μηχανισμών αντίστασης και (δ) την κατανόηση της διαδικασίας μετάστασης σε ασθενείς με συμπαγή όγκο (Dizdar et al., 2019; Jia et al., 2017; Nurwidya et al., 2016).

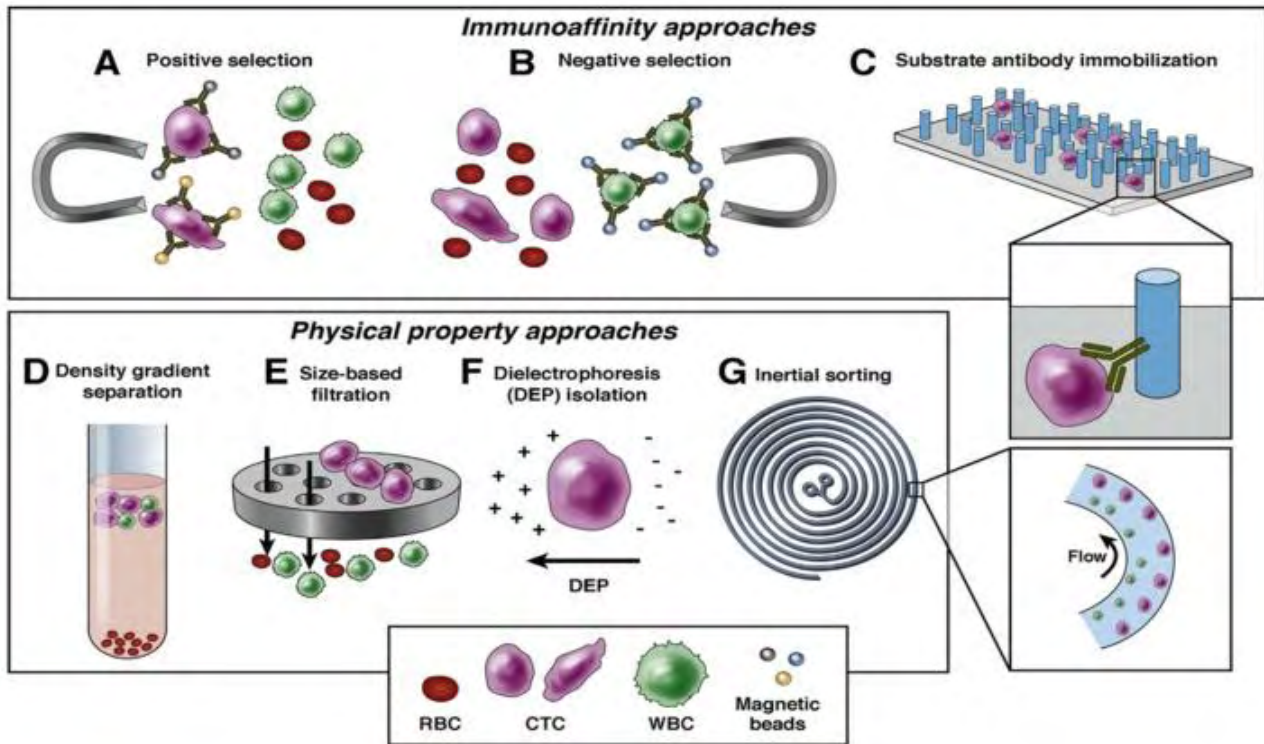
3.4.1.2 Απομόνωση και ανάλυση των CTCs

Βασικός περιορισμός στην ανάλυση των CTCs είναι ο μικρός αριθμός τους στο περιφερικό αίμα των ασθενών και συνεπώς ο δύσκολος εντοπισμός τους σε σύγκριση με τα εκατομμύρια άλλων

αιμοποιητικών κυττάρων. Επομένως, απαιτεί εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές μεθόδους ανάλυσης, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη συλλογή CTCs. Οι σύγχρονες τεχνικές εμπλουτισμού και απομόνωσης των CTCs βασίζονται στα φυσικά ή βιολογικά χαρακτηριστικά τους και συνήθως έχουν υψηλή απόδοση, παρά τους περιορισμούς που παρουσιάζονται εξαιτίας της ετερογένειας των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 5) (Chen et al., 2018; Marrugo-Ramirez et al., 2018; Micalizzi et al., 2017).

Η απομόνωση και ο προσδιορισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ξεκινά με προεργασίες όπως η λήψη του δείγματος σε κατάλληλα φιαλίδια συλλογής, η φυγοκέντρηση και η αποθήκευση των δειγμάτων σε κατάλληλες συνθήκες. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και τα βήματα περιγράφονται αναλυτικά ως εξής:

1. αρχικά πραγματοποιείται λύση των ερυθροκυττάρων
2. γίνεται εμπλουτισμός των κυττάρων με μαγνητική σήμανση, αφού τα κυκλοφορούντα καρκινικά σημαίνονται με αντισώματα
3. διατήρηση των κυττάρων με μαγνητική σήμανση εντός των στηλών διαχωρισμού
4. απομάκρυνση της στήλης και έκλυση των μαγνητικώς σημασμένων κυττάρων
5. εξέταση του RNA από τα CTCs για την παρουσία γονιδίων σύντηξης με τη χρήση της μεθόδου ποσοτικής αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (real-time quantitative reverse transcription PCR) και την digital reverse transcription PCR (Benini et al., 2018).



Εικόνα 5: Μέθοδοι εμπλουτισμού και ανίχνευσης των CTCs (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

3.4.1.3 Εφαρμογές CTCs στην Ογκολογία

Αναφέρεται ότι ένας μέσος ασθενής με μεταστατικό καρκίνο έχει μεταξύ 5 και 50 CTCs για περίπου κάθε 7,5 mL αίματος (<1 έως> 5 CTCs / mL). Έχει τονιστεί πως τα CTCs μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για τη σύνθεση του όγκου, τη διεισδυτικότητα, την ευαισθησία στα φάρμακα και την αντίσταση στη θεραπεία που χρησιμοποιείται. Η ανίχνευση των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο λοιπόν, συνδέεται με κακή ανταπόκριση στη θεραπεία, μείωση του συνολικού ποσοστού επιβίωσης χωρίς νόσο, υποδεικνύει πιθανά πιο επιθετική ασθένεια και μετάσταση. Επομένως, τα CTCs είναι βιοδείκτες της υγρής βιοψίας που είναι δυνητικά ικανοί να εφαρμοστούν σε όλα τα στάδια του καρκίνου (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Πλεονεκτήματα:

- ✓ μη επεμβατική
- ✓ υψηλή ειδικότητα
- ✓ εκτίμηση μη κωδικών RNA, DNA, πρωτεϊνών

Μειονεκτήματα:

- ✓ Χαμηλή συγκέντρωση
- ✓ Απαιτούν εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές αναλυτικές μεθόδους
- ✓ Πιθανότητα ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων
- ✓ Ετερογένεια του CTC πληθυσμού
- ✓ Πληθώρα μεθόδων απομόνωσης
- ✓ Έλλειψη προτυποποίησης μεθόδων

3.4.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά νουκλεϊκά οξέα (ctNAs)

Οι περισσότερες από τις αναφορές σχετικά με τα cfNAs ασχολούνται μόνο με DNA, μόνο λίγα με RNAs (microRNA (miRNA), μη κωδικοποιητικό RNA (ncRNA)). Τα κυκλοφορούντα καρκινικά νουκλεϊκά οξέα (ctNAs) απελευθερώνονται και κυκλοφορούν στο αίμα των ασθενών με καρκίνο. Οι αλλαγές στα επίπεδα των ctNAs στην κυκλοφορία έχουν συσχετιστεί με το φορτίο του όγκου, το στάδιο του καρκίνου, την αγγείωση, την αλλαγή φαινοτύπου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη μετάσταση (Yadav et al., 2018). Τα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα ελεύθερα κυττάρων μπορούν να απελευθερωθούν ενεργά μέσω κυστιδίων που εκκρίνονται από ζωντανά κύτταρα ή παθητικά από αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα (Zhang et al., 2017). Ένα σημαντικό συστατικό στο αίμα είναι τα νουκλεϊκά οξέα αποτελούμενα τόσο από ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cfDNA) όσο και από ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό RNA (cfRNA) και ειδικά το κλάσμα που προέρχεται από καρκινικά κύτταρα, ctDNA και ctRNA αντίστοιχα (Fernández-Lázaro et al., 2020).

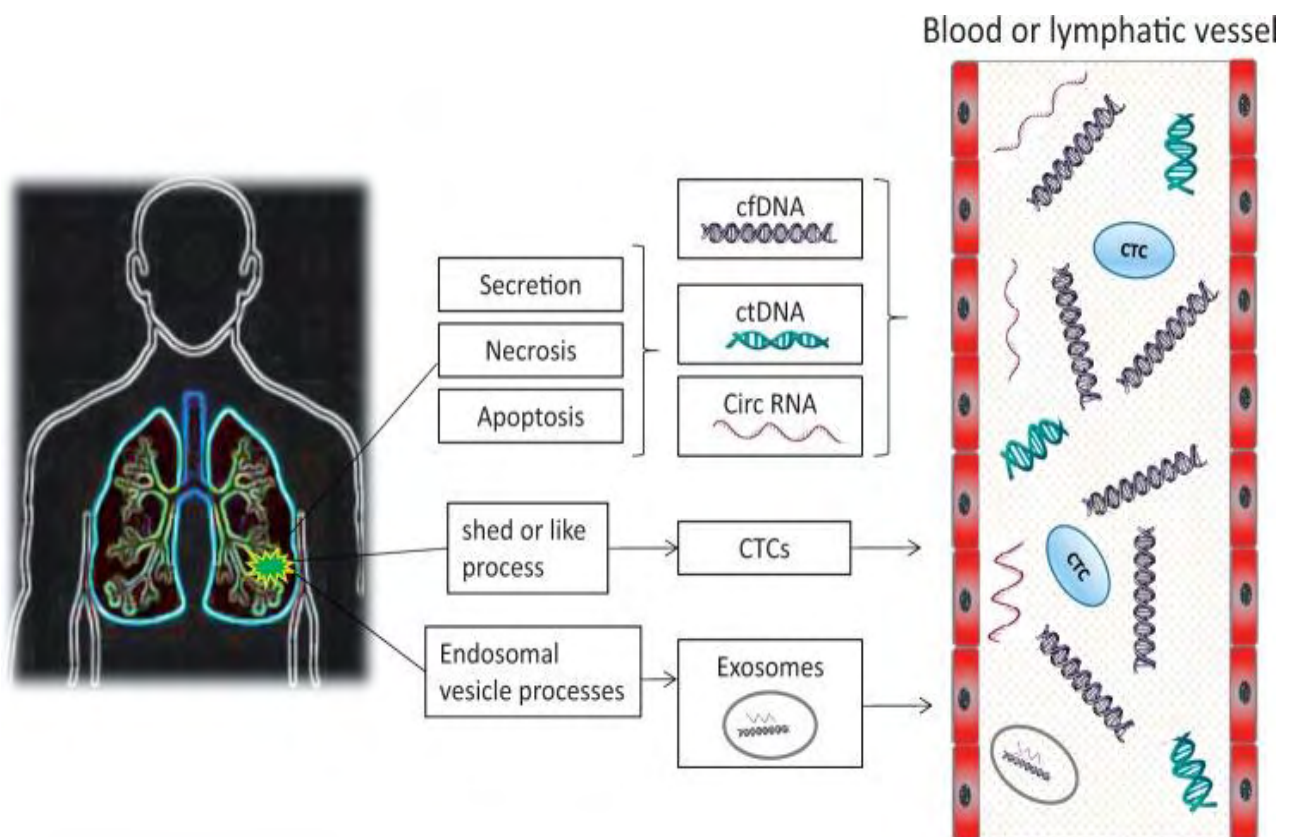
3.4.2.1 Ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cfDNA)

Το cfDNA (cell-free circulating DNA) που προέρχεται από τον όγκο είναι ιδιαίτερα ελκυστικό λόγω της αφθονίας του στο πλάσμα (Minciacchi et al., 2017). Η συγκέντρωση του cfDNA μπορεί να μεταβληθεί σε ασθενείς με διάφορες καλοήθεις ασθένειες όπως τραύμα, εγκεφαλικό επεισόδιο, εγκαύματα, σήψη και αυτοάνοσες ασθένειες, περιορίζοντας έτσι την αξία του για τη διάγνωση του καρκίνου (Asante et al., 2020; Salvianti et al., 2017). Παράγεται τόσο από διηθητικά καρκινώματα όσο και από καλοήθεις όγκους (Cree, 2015). Το κυκλοφορούν DNA του όγκου είναι ένας

βιοδείκτης υγρής βιοψίας, πολύτιμος για ανίχνευση ειδικών αλλοιώσεων που ευθύνονται για διάφορους τύπους καρκίνου (Boons et al., 2018).

Το cfDNA πρωτο-ανιχνεύθηκε στον ορό ασθενών με καρκίνο και η χρήση του έχει επεκταθεί πλέον αναγκαία σε πολλούς κλάδους της ιατρικής. Οι ασθενείς με κακοήθεις όγκους είχαν υψηλότερα επίπεδα cfDNA από εκείνους με καλοήθεις όγκους με τα επίπεδα αυτά να αυξάνονται ιδιαίτερα σε προχωρημένα στάδια της νόσου (Asante et al., 2020). Θεωρείται πιθανό ότι οι ασθενείς σε προχωρημένα κλινικά στάδια καρκίνων να απελευθερώνουν περισσότερο cfDNA στο αίμα, και επομένως να μπορεί να ανιχνευθεί πιο εύκολα σε σύγκριση με τους ασθενείς σε πιο πρώιμα κλινικά στάδια (Cui et al., 2017).

Σε υγιή άτομα, το cfDNA προέρχεται κυρίως από την απόπτωση εμπύρηνων κυττάρων στο αίμα που βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος. Επομένως, συνδυασμός απόπτωσης, νέκρωσης και έκκρισης συμβάλλει στην απελευθέρωση του cfDNA, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Προέλευση του εξωκυτταρικού DNA (cfDNA) (Johann et al., 2018).

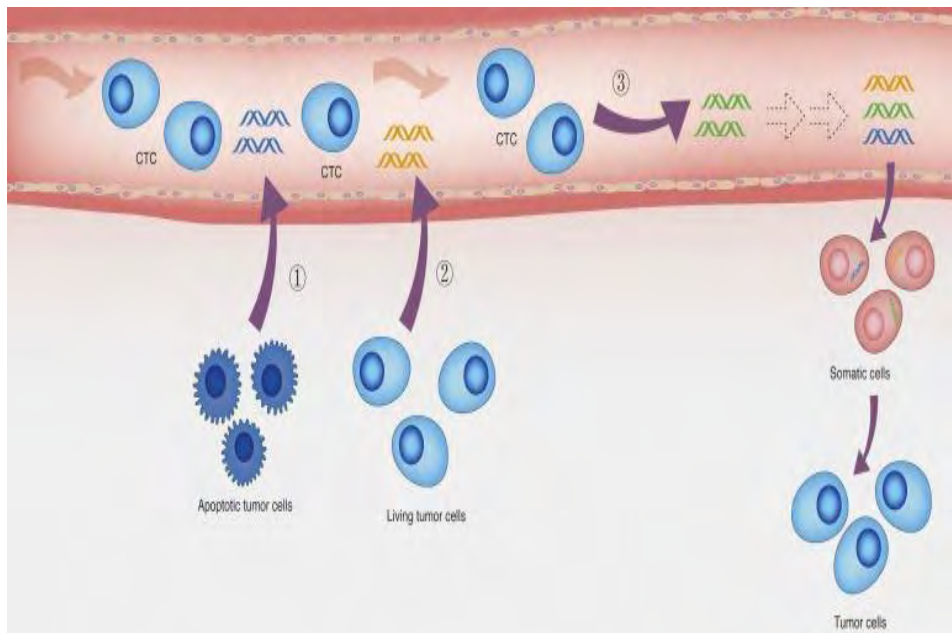
Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση και μελέτη του cfDNA από το αίμα όπως: (i) ο μαγνητικός εμπλουτισμός του cfDNA με θετικά φορτισμένα μαγνητικά σφαιρίδια που συνδέουν τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό του DNA, (ii) ο εμπλουτισμός με βάση στήλη πυριτίου χρησιμοποιεί τη συγγένεια δέσμευσης μορίων DNA, (iii) οι τεχνικές μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιούνται στην υγρή βιοψία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των ειδικών γενετικών αλλαγών ως πιθανοί στόχοι για στοχευμένη θεραπεία καρκίνου (Fernández-Lázaro et al., 2020).

3.4.2.1.1 Ελεύθερο καρκινικό DNA

Η ανάπτυξη και η θεραπεία του καρκίνου είναι μια δυναμική διαδικασία. Το μοριακό προφίλ των πρωτογενών όγκων ενδέχεται να αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Όταν τα καρκινικά κύτταρα πεθαίνουν, λύνονται, τότε απελευθερώνονται από τον όγκο μικρά θραύσματα γενετικού υλικού στην κυκλοφορία του αίματος, όπως το ctDNA.

Το ctDNA δεν πρέπει να συγχέεται με το ελεύθερο κυττάρων DNA (cfDNA), έναν ευρύτερο όρο που περιγράφει το DNA που κυκλοφορεί ελεύθερα στην κυκλοφορία του αίματος, αλλά δεν προέρχεται απαραίτητα από τον όγκο. Το ctDNA είναι υποσύνολο του cfDNA και προέρχεται από καρκινικά κύτταρα (Luo et al., 2018; Rapisuwon et al., 2016).

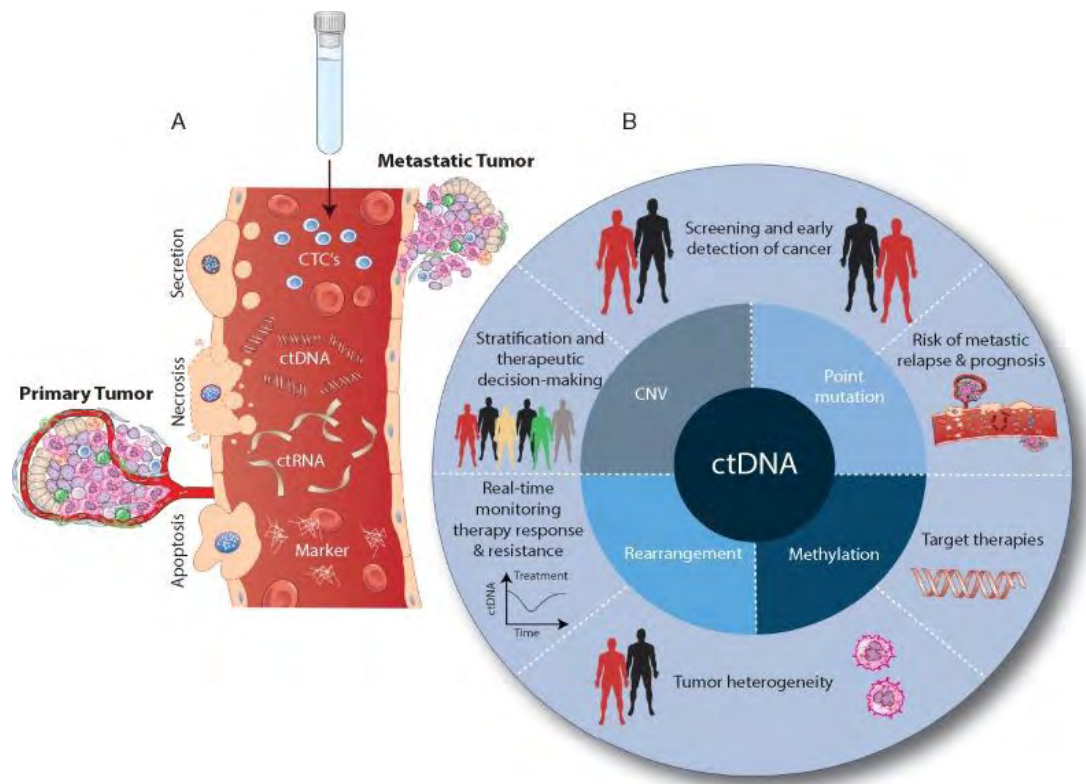
Το ctDNA εκκρίνεται στην κυκλοφορία είτε με ενεργή έξοδο μέσω σωματιδίων, των εξωσωμάτων, είτε παθητικά (Singh et al., 2017). Υπό φυσιολογικές καταστάσεις τα θραύσματα του γενετικού υλικού καταστρέφονται από τα φαγοκύτταρα. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, οι μηχανισμοί με τους οποίους το DNA του όγκου εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος παραμένουν ασαφείς. Έχει προταθεί ότι υπάρχουν τρεις πιθανές προελεύσεις του ctDNA: 1) αποπτωτικά ή νεκρωτικά καρκινικά κύτταρα, 2) κύτταρα του πρωτογενούς όγκου (όπως κύτταρα που απελευθερώνουν εξωσώματα) (Cheng et al., 2016).



Εικόνα 7: Η πιθανή προέλευση του ctDNA. Τρεις πιθανές ρίζες του ctDNA: (1) αποπτωτικά καρκινικά κύτταρα, (2) ζωντανά κύτταρα όγκου και (3) κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Cheng et al., 2016).

Ο ρυθμός απελευθέρωσης του ctDNA στην κυκλοφορία εξαρτάται από το μέγεθος, τη θέση και την αγγείωση του όγκου, οδηγώντας σε σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα ctDNA που ανιχνεύονται στο αίμα (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Το ctDNA μπορεί να αντικατοπτρίζει ολόκληρο το γονιδίωμα του όγκου, ενώ φέρει μεταλλάξεις και άλλες γονιδιωματικές αλλοιώσεις που είναι χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (Tan et al., 2016; Kastrisiou et al., 2019). Οι αλλοιώσεις του DNA καλύπτουν γενετικές μεταβολές που σχετίζονται με τον καρκίνο και αποσκοπούν στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και της αντίστασης στη θεραπεία σε πραγματικό χρόνο (Mao et al., 2017; Tan et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να περιέχει σημειακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, μοτίβα μεθυλίωσης, παραλλαγές αριθμών αντιγράφων ή αλληλουχίες ιών και ως εκ τούτου θεωρήθηκαν ότι προέρχονται από καρκινικό ιστό και περιγράφονται στην Εικόνα 8 (Fernández-Lázaro et al., 2020; Yang et al., 2018).



Εικόνα 8: Βιολογικά χαρακτηριστικά και κλινικές εφαρμογές του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA). (A) Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), ctDNA, κυκλοφορούν καρκινικό RNA (ctRNA) και κυκλοφορούσες ογκοπρωτεΐνες ως συμπληρωματικοί, βασισμένοι στο αίμα, βιοδείκτες. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν ctDNA στην κυκλοφορία του αίματος μέσω απόπτωσης, νέκρωσης ή ακόμα και με απλή έκκριση. Ένα υποσύνολο ctDNA εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος από τον πρωτογενή όγκο ή τις μεταστατικές βλάβες. (B) Ο κεντρικός κύκλος απεικονίζει το ctDNA το οποίο μπορεί να φέρει πολλές κατηγορίες γενετικών και επιγενετικών αλλαγών. Ο εξωτερικός κύκλος παρουσιάζει τα πιθανά κλινικά οφέλη της παρακολούθησης ctDNA στη διαχείριση του καρκίνου. (CNV: Copy Number Variation, Παραλλαγή αριθμού αντιγράφων) (Yang et al., 2018).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής του ctDNA στην κυκλοφορία του αίματος κυμαίνεται από 16 λεπτά έως 2,5 ώρες. Παραμένει στην κυκλοφορία για λίγες ώρες πριν μεταβολιστεί, πράγμα που επιτρέπει την παρακολούθηση όγκων σε πραγματικό χρόνο καθώς επεκτείνονται και μεταλλάσσονται ή αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία .

Τα επίπεδα του ctDNA είναι διαφορετικά από ασθενή σε ασθενή για τον ίδιο τύπο καρκίνου και ο εντοπισμός τους μπορεί να μην είναι εύκολος ιδίως αν πρόκειται για μικρούς όγκους σε πρώιμα στάδια (Yong, 2014). CtDNA έχει ανιχνευθεί σε έως και το 75% των ασθενών στους καρκίνους του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του μαστού, της ουροδόχου κύστης, του λαιμού, του ηπατοκυτταρικού του γαστροοισοφάγου, του μελανώματος και έως και 50% των πρωτοπαθών καρκίνων του ΚΝΣ, των νεφρών, του προστάτη και του θυρεοειδούς (Mattox et al., 2019).

Πράγματι, οι περισσότεροι ασθενείς με στάδιο III και μεταστατικό καρκίνο του ήπατος, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του μαστού, του οισοφάγου, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης και της κεφαλής και του λαιμού, καθώς και ασθενείς με νευροβλάστωμα και μελάνωμα, εμφανίζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA. Αντίθετα, οι όγκοι που εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή εκείνοι με βλεννώδη χαρακτηριστικά (όπως ο προστάτης και ο θυρεοειδής) συχνά παρουσιάζουν χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των όγκων του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων των μεταστατικών αλλοιώσεων του εγκεφάλου, το ctDNA μπορεί να βρεθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό παρέχοντας μια εναλλακτική πηγή υγρών βιοψιών (Siravegna et al., 2019).

3.4.2.1.2 Απομόνωση και ανάλυση του ελεύθερου καρκινικού DNA

Ο προσδιορισμός του ctDNA απαιτεί μεθόδους με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως οι Q-PCR, BEAMing, Safe-SeqS, CAPP-Seq και TAmSeq, οι οποίες χρησιμοποιούν μία ή λίγες γνωστές ειδικές για τον όγκο μεταλλάξεις για την παρακολούθηση της υπολειπόμενης νόσου στο περιφερικό αίμα (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Οι τεχνικές αυτές μπορούν να διαχωριστούν σε δυο κατηγορίες. Στην μία κατηγορία ανήκουν οι μη ειδικές προσεγγίσεις (π.χ. array-CGH, αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ή exome sequencing) που εξετάζουν το γονιδίωμα για νέες γονιδιακές αλλαγές π.χ. εκείνων που παρέχουν αντίσταση σε μια συγκεκριμένη στοχευμένη θεραπεία. Στην άλλη κατηγορία ανήκουν οι ειδικές που στοχεύουν στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε ένα σύνολο προκαθορισμένων γονιδίων και που διακρίνονται από υψηλότερη αναλυτική ευαισθησία και προσδιορίζουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε ένα σύνολο προκαθορισμένων γονιδίων (Alix-Panabières et al., 2016).

Τεχνικές προσδιορισμού, όπως η ποσοτική PCR, λόγω χαμηλής αναλυτικής ευαισθησίας μπορούν να ανιχνεύσουν το ctDNA μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η ευαίσθητη τεχνική της ψηφιακής PCR, ανήκει στην κατηγορία της ειδικής προσέγγισης προσδιορισμού και επιτρέπει τον προσδιορισμό χαμηλών ποσοστών ctDNA, καθώς και γνωστών μεταλλάξεων, ενώ η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), μπορεί να προσδιορίσει όλες τις πιθανές καρκινικές μεταλλάξεις (Jia et al., 2017). Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα αλλά ταυτόχρονα και υψηλό κόστος τουλάχιστον μέχρι σήμερα. Διακρίνεται για την ικανότητα ανάλυσης εκατομμυρίων μικρών τμημάτων μορίων γενετικού υλικού και τη σύγκρισή τους με μία ακολουθία αναφοράς (Fernández-Lázaro et al., 2020).

3.4.2.1.3 Εφαρμογές του ctDNA στην Ογκολογία

Παρόλο που η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του ctDNA παρεμποδίζεται από τα μερικές φορές εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα του, το ctDNA περιέχει ειδικές μεταλλάξεις για τον όγκο. Ευρύ φάσμα νέων εφαρμογών (Πίνακας 1) έχει προταθεί και περιγράφεται στον Πίνακα 1 (von Bubnoff, 2017).

Πίνακας 1: Πιθανές εφαρμογές του ctDNA σε καρκινοπαθείς (von Bubnoff, 2017)

Έγκαιρη διάγνωση και προσυμπτωματικός έλεγχος
Πρόγνωση
Θεραπεία
Έλεγχος απόκρισης σε θεραπεία
Ανίχνευση υπολειμματικής ασθένειας
Κλωνική ετερογένεια και αντίσταση σε θεραπεία

Πλεονεκτήματα:

- ✓ Ανίχνευση του φορτίου της νόσου με μεγαλύτερη ευαισθησία
- ✓ Σε συνδυασμό με τα CTCs ανίχνευση της MRD
- ✓ Μπορούν να προβλέψουν αντοχή στη θεραπεία
- ✓ Δυνητικά μπορούν να επηρεάσουν αλλαγές στο θεραπευτικό σχήμα

Μειονεκτήματα:

- ✓ Ακριβή μέθοδος
- ✓ Εφαρμόζεται σε ερευνητικά εργαστήρια
- ✓ Πιθανότητα ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων
- ✓ Έλλειψη τυποποίησης προαναλυτικών συνθηκών

3.4.2.2 Ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό RNA (cfRNA)

Στο περιφερικό αίμα ογκολογικών ασθενών έχει βρεθεί επίσης ότι υπάρχει ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό RNA (cftRNA ή ctRNA) που αν και βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις, μπορεί και αυτό να προσδιοριστεί στον ορό και το πλάσμα των ασθενών (Larrea et al., 2016).

Τα RNAs είναι σχετικά ασταθή μόρια που είναι ευαίσθητα σε αποικοδόμηση από ριβονουκλεάσες. Αρκετοί τύποι κωδικών και μη κωδικών cfRNA που εμπλέκονται στη μετάφραση, επεξεργασία και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης υπάρχουν στα σωματικά υγρά.

3.4.2.2.1 Κωδικά RNAs

Το ελεύθερο mRNA είναι κατακερματισμένο και λιγότερο άφθονο και ως εκ τούτου η ανίχνευσή του είναι δύσκολη. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η πλειονότητα των μελετών επικεντρώνεται στην ανάλυση μικρών μη κωδικών RNA, ειδικά του miRNA που είναι πιο σταθερά και άφθονα. Ωστόσο, παρά τους περιορισμούς αυτούς, η παρουσία του εξωκυτταρικού mRNA στην κυκλοφορία ογκολογικών ασθενών έχει επιβεβαιωθεί, με συνέπεια τη χρήση του ως κατάλληλο δείκτη στη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου.

3.4.2.2.2 Μη κωδικά RNAs

-MicroRNAs

Τα microRNAs είναι μικρομοριακά μη κωδικά RNA που φαίνεται να παίζουν διάφορους ρόλους στη φυσιολογία και την ανάπτυξη ασθενειών (Yokoi et al., 2017). Συνδέονται σε συγκεκριμένες

περιοχές μορίων mRNA με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση ή την αναστολή του μορίου και κυκλοφορούν σε σωματικά υγρά. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι τα ίδια miRNAs διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο σε διαφορετικού είδους καρκίνους, ώστε διάγνωση και η πρόγνωση με βάση τα miRNAs να δυσκολεύει. Έχουν ανακαλυφθεί miRNAs όπως τα Drosha, XPO5, DGCR8, AGO2, Dicer και το TRBP, τα οποία έχουν μεγάλες προοπτικές αξιοποίησης ως βιοδείκτες (Πίνακας 2) (Schneider et al., 2012).

Πίνακας 2: Επίπεδα έκφρασης miRNAs σε ανθρώπινους όγκους) (Schneider et al., 2012).

miRNA machinery gene	Alteration type	Cancer type (reference)
Drosha	Upregulation Downregulation	BCC, SCC, smooth muscle neoplasm Ovarian cancer, neuroblastoma, endometrial cancer, NPC, breast cancer, gallbladder adenocarcinoma
XPO5	Upregulation Mutant	Urothelial carcinoma, breast cancer Non-small-cell lung cancer, renal cell carcinoma, CRC, multiple myeloma
DGCR8	Upregulation	BCC, SCC, CRC, gastrointestinal cancer, ovarian cancer
AGO2	Upregulation	Prostate cancer, epithelial skin cancer, GC, hepatocellular

	Downregulation	carcinoma Lung adenocarcinoma, melanoma
Dicer	Upregulation	SCC, prostate cancer, smooth muscle neoplasm
	Downregulation	Neuroblastoma, breast cancer, endometrial cancer, NPC, transitional cell carcinoma, gallbladder adenocarcinoma
TRBP	Upregulation	Prostate cancer, diffuse large B-cell lymphoma, adenocortical carcinoma
	Mutant	CRC cells, endometrial cancer cells

Τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως κρίσιμοι παράγοντες που συνδέονται με τον καρκίνο σε όλα τα στάδια, από την έναρξη μέχρι και την μετάσταση (Jiang et al., 2014). Η σύνδεση ανάμεσα στα miRNAs και στον καρκίνο, έχει προκύψει από μελέτες που αποκαλύπτουν ότι η απορρύθμιση των miRNAs, διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Calin et al., 2002; Calin et al., 2004a; He et al., 2005a; Lu et al., 2005). Τα απορυθμισμένα miRNA μπορούν να λειτουργήσουν τόσο ως ογκογόνα όσο και ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες ανάλογα με τους μεταγενέστερους στόχους τους.

Η παρουσία κυκλοφορούντων miRNAs έχει αποδειχθεί σε διάφορες ασθένειες με τα προφίλ τους να ποικίλουν ανάλογα με τη νόσο και το βαθμό εξέλιξης της νόσου. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί με σκοπό τον εντοπισμό miRNAs στον ορό καρκινοπαθών. Έχουν ανιχνευθεί προφίλ έκφρασης miRNAs χρησιμοποιώντας ορό/πλάσμα από ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο

όπως οξεία λευχαιμία, καρκίνο του μαστού, καρκίνο των ωθηκών, γαστρικό καρκίνο, καρκίνο του πνεύμονα, καρκίνο παχέος εντέρου, γλοιοβλάστωμα, ηπατοκυτταρικό καρκίνο και καρκίνο του προστάτη. Πολλά miRNAs έχουν ανιχνευθεί και σε πολλά άλλα βιολογικά υγρά του σώματος όπως στο σάλιο, στα ούρα, στο μητρικό γάλα, στο σπέρμα, στα δάκρυα, στο αμνιακό υγρό, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο περιτοναϊκό υγρό, στο πλευριτικό υγρό (Sundarbose et al., 2013).

Συμπερασματικά, τα επίπεδα έκφρασης miRNAs είναι σημαντικά για την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και πρόβλεψη της απόκρισης στη θεραπεία σε διάφορους τύπους καρκίνου (Fernández-Lázaro et al., 2020).

- lncRNA (Long non-coding RNA)

Τα μεγάλα μη κωδικά RNAs (lncRNAs) είναι μετάγραφα με μήκος περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια που εμφανίζουν ιστοειδική έκφραση. Έχει αποδειχθεί ότι βρίσκονται σε βιολογικά υγρά, με ορισμένα lncRNA να φορτώνονται επιλεκτικά σε εξωσώματα και να μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα κύτταρα όπου ρυθμίζουν τις λειτουργίες και τη βιωσιμότητά τους. Σε αρκετές μελέτες, τα κυκλοφορούντα lncRNAs έχουν περιγραφεί ως κατάλληλοι βιοδείκτες για καρδιαγγειακά και καρκινικά νοσήματα.

-tRNA (transfer RNA)

Τα tRNAs είναι μόρια μήκους 73–93 νουκλεοτιδίων, τα οποία μεταφέρουν αμινοξέα στη θέση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Θραύσματα tRNA μήκους 30-33 νουκλεοτιδίων έχουν ανιχνευθεί στον ορό αίματος ανθρώπου. Τα περισσότερα από τα κυκλοφορούντα θραύσματα tRNA περιέχουν το 5' άκρο του tRNA. Υποτίθεται ότι αυτά τα κυκλοφορούντα θραύσματα tRNA λειτουργούν ως ανταγωνιστές των miRNAs και έτσι μπορούν να επηρεάσουν τη σίγαση του RNA και στη συνέχεια τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

-YRNA

Το YRNA με μήκος 84-112 νουκλεοτιδίων ανήκει σε μια ομάδα μικρών μη κωδικών μορίων. Θραύσματα 27-33 νουκλεοτιδίων που προέρχονταν από YRNA ταυτοποιήθηκαν στον ορό και στο πλάσμα ανθρώπων. Στην κυκλοφορία, αυτά τα θραύσματα ανιχνεύθηκαν, δεν εσωκλείονταν σε εξωσώματα ή μικροκύτταρα. Καθοριστικής σημασίας είναι η περαιτέρω έρευνα για να εξακριβωθεί εάν οι αλλαγές στην έκφραση των μεμονωμένων YRNAs σχετίζονται με ορισμένες ασθένειες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες.

-piRNA (piwi-interacting RNA)

Τα piRNAs είναι μη κωδικά μόρια RNA μήκους 26-31 νουκλεοτιδίων και εμπλέκονται στην γαμετογένεση, την ανάπτυξη και τη συντήρηση των γεννητικών κυττάρων και την επιγενετική ρύθμιση. Έχει αποδειχθεί ότι το piRNA συμμετέχει επίσης στην επιγενετική ρύθμιση του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Έχει αποδειχθεί ότι το piRNA είναι σταθερό στον ορό του αίματος και επομένως θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως πολύτιμος βιοδείκτης με βάση το αίμα για την ανίχνευση και παρακολούθηση καρκινικών νόσων.

-circRNA (circular RNA)

Τα κυκλικά RNAs (circRNAs) είναι ενδογενή μη κωδικά μόρια RNA που χαρακτηρίζονται από ιστοειδική έκφραση. Περισσότερο από το 90% των circRNAs προέρχονται από αλληλουχίες εξονίων και είναι πιθανό να έχουν σημαντική λειτουργία στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αυτή η διαδικασία διεξάγεται με τέτοιο τρόπο ώστε το circRNA να συνδέεται συμπληρωματικά με τα μόρια miRNA και έτσι να επηρεάζει τη δράση τους. Όπως και άλλα RNAs, το circRNA διατηρεί τη βιολογική του δράση σε εξωσώματα, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν σε κύτταρα δέκτες. Έχει αναφερθεί ότι τα circRNAs εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλαπλών ασθενειών όπως αθηροσκλήρωση, διαταραχές του νευρικού συστήματος ή καρκίνο, ενώ ταυτόχρονα θεωρούνται χρήσιμοι για διαγνωστικούς σκοπούς στην περίπτωση του καρκίνου.

-Άλλα μη κωδικά RNA

Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στα miRNAs, ώστε άλλες αλληλουχίες να θεωρούνται προϊόντα αποικοδόμησης διαφορετικών RNAs και να εξαιρούνται από την ανάλυση. Ωστόσο, ορισμένα μικρά μη κωδικά RNA έχουν αποδειχθεί ότι υφίστανται επεξεργασία σε ακόμη μικρότερα θραύσματα που μπορούν να εκτελέσουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Εκτός από τους αναφερόμενους τύπους RNAs, άλλα μη κωδικοποιούμενα RNA μόρια όπως rRNA, μικρό πυρηνικό RNA (snRNA) έχουν ταυτοποιηθεί στο ανθρώπινο αίμα και θα μπορούσαν να είναι πολύτιμοι βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες (Lodewijk et al., 2018; Pös et al., 2018).

3.4.3 Εξωσώματα

3.4.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια ενδοσωμικής προέλευσης με το μέγεθός τους να κυμαίνεται από 30 έως 150 nm που παράγονται από σχεδόν όλα τα είδη κυττάρων και εκκρίνονται

στο μεσοκυττάριο χώρο (Fujita et al., 2017). Παλαιότερα, οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι τα εξωσώματα χρησιμοποιούνταν από τα κύτταρα μόνο για να απομακρύνουν άχρηστα μόρια και παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Η θεωρία αυτή όμως άλλαξε όταν παρατήρησαν ότι τα εξωσώματα περιέχουν στο εσωτερικό τους και γενετικό υλικό πέρα από πρωτεΐνες και λιπίδια και οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος των μικρών αυτών κυστιδίων ήταν τελικά πιο σύνθετος.

Είναι αξιοσημείωτο πως τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν εξωσώματα σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τα υγιή. Τα εξωσώματα μπορούν να ανιχνευθούν σε πολυάριθμα βιολογικά υγρά, στα οποία συγκαταλέγονται το αίμα, τα ούρα, το μητρικό γάλα, το αμνιακό υγρό, ο κακοήθης ασκίτης, η λέμφος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, η σπείλος και η χολή, σε υγιείς σε νοσηρές καταστάσεις (Akers et al., 2013; Rashed et al., 2017).

Αυτά τα εξωκυτταρικά κυστίδια μπορούν και παράγονται από κύτταρα-δότες και να μεταφέρονται σε κύτταρα-δέκτες, συμβάλλοντας έτσι στη διακυτταρική επικοινωνία, στη μετάδοση σημάτων και στη μεταφορά μορίων μεταξύ κυττάρων. Τα εξωσώματα μπορούν και μεταφέρουν πληροφορίες στα κύτταρα-στόχους με τρεις κυρίως τρόπους: με την αλληλεπίδραση με υποδοχέα στην μεμβράνη του κυττάρου-δέκτη, την άμεση συγχώνευση με τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-δέκτη, με ενδοκυττάρωση και με φαγοκυττάρωση από το κύτταρο-δέκτη (Xu et al., 2015).

Έχειδειχθεί, ο ρόλος των εξωσωμάτων στη διακυτταρική επικοινωνία, σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως η γαλουχία, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η νευρωνική λειτουργία. Ταυτόχρονα, είναι ξεκάθαρο πως τα εξωσώματα μπορούν να εγείρουν ανοσολογική απάντηση. Ακόμα εμπλέκονται στην παθογένεση του διαβήτη, της θρόμβωσης, της αθηροσκλήρωσης και στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ηπατικών, νευροεκφυλιστικών νόσων και πρόσφατα του καρκίνου (Rashed et al., 2017).

Τα εξωσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες. Εκκρίνονται από ζωντανά κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, τα εξωσώματα υπάρχουν στο αίμα νωρίτερα από την απελευθέρωση cfNAs (που είναι αποτέλεσμα νέκρωσης) και μπορούν να ανιχνευθούν όταν οι όγκοι βρίσκονται σε πρώιμα στάδια (Qi et al., 2018). Το περιεχόμενο και η σύνθεση των εξωσωμάτων διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο, ανάλογα με τον τύπο. Περιέχουν στο εσωτερικό τους DNA, πρωτεΐνες.

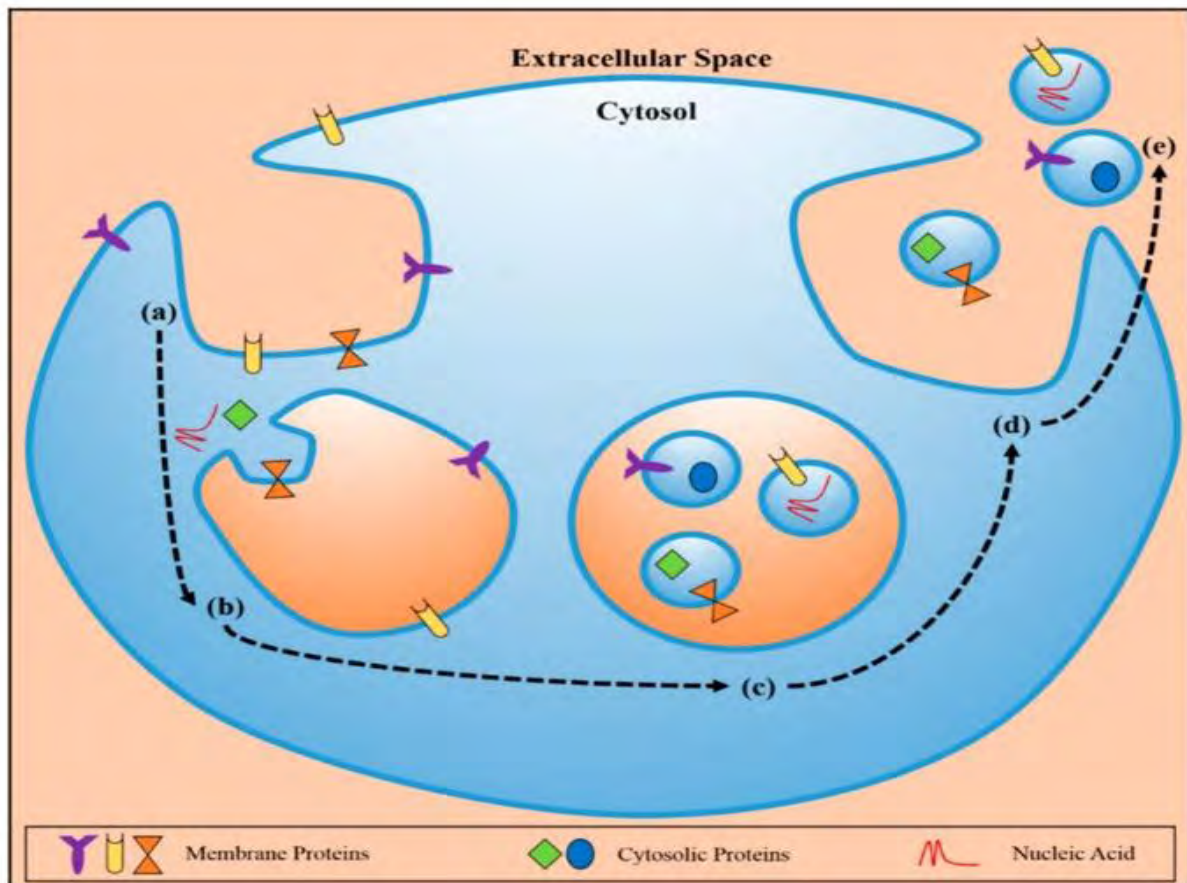
Τα κύρια συστατικά των εξωσωμάτων είναι τα λιπίδια. Τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη, διγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, γλυκεροφωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια ή γλυκοσυλκεραμίδια. Βιοενεργά λιπίδια, όπως τα λευκοτριένια, προσταγλανδίνες και ένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως η φωσφολιπάση C συναντώνται στα εξωσώματα. Έτσι, τα εξωσώματα μεταφέρουν βιοενεργά λιπίδια στα κύτταρα δέκτες. Κάποια από τα συστατικά των εξωσωμάτων (λιπαρό οξύ δοκοσαεξαενοϊκό οξύ και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη)

μπορούν να τονώσουν την αντιγονική ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων, ενώ τα υψηλά ποσοστά προσταγλαδινών κάποιων εξωσωμάτων (PGE2) συμμετέχουν στην προώθηση της αύξησης του όγκου (Rashed et al., 2017).

Επιπλέον, τα εξωσώματα περιέχουν και λειτουργικά μόρια RNA, επιλεκτικά φορτωμένα σε εξωσώματα (Giulietti et al., 2015) μεταξύ των οποίων τα mRNAs και άλλα μη κωδικά RNAs, όπως τα miRNAs και τα lncRNAs, που λειτουργούν στο κύτταρο δέκτη (Rashed et al., 2017).

3.4.3.2 Βιογένεση και απελευθέρωση των εξωσωμάτων

Η βιογένεση των εξωσωμάτων ολοκληρώνεται σε δύο βήματα την συγχώνευση των μεμβρανικών κυστιδίων των ενδοσωματίων και την απελευθέρωσή τους σε μία δομή, γνωστή ως πολύπλευρο σώμα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 η διαδικασία ξεκινά με τη ενδοκύττωση της πλασματικής μεμβράνης και το σχηματισμό των πρώιμων ενδοσωμάτων. Με την ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων, τα εξωσώματα δημιουργούνται ως αποτέλεσμα συγχώνευσης των μεμβρανικών κυστιδίων των ενδοσωματίων και η απελευθέρωσή τους σε μία δομή γνωστή ως πολύπλευρο σώμα. Τότε τα πολύπλευρα σωματίδια κατευθύνονται προς συγχώνευση είτε με τα λυσοσώματα, είτε με την πλασματική μεμβράνη με τα περιεχόμενά τους να αποβάλλονται στον εξωκυττάριο χώρο. Έπειτα, παρατηρούνται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην μεμβράνη με παρόμοιο προσανατολισμό με την πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 9) (Rashed et al., 2017).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού εξωσωμάτων και της αντίστοιχης απελευθέρωσής τους στην κυκλοφορία του αίματος (Marrugo-Ramirez et al., 2018).

3.4.3.3 Απομόνωση και ανάλυση εξωσωμάτων

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την αποτελεσματική απομόνωση εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά (Πίνακας 3). Άλλα από τα διαθέσιμα πρωτόκολλα βασίζονται στο διαχωρισμό των κυστιδίων σύμφωνα με τις βιοφυσικές τους ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους, της πυκνότητας και της μορφολογίας, ενώ άλλα βασίζονται σε μεθόδους ανοσοσυγγένειας ή στην αλλαγή της διαλυτότητας των εξωσωμάτων για να αυξηθεί η καθίζηση τους και να απομονωθούν αποτελεσματικά. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απομόνωση των εξωσωμάτων αποτελείται από μια σειρά διαδοχικών βημάτων φυγοκέντρησης και υπερφυγοκέντρησης που αποσκοπούν στην απομόνωση από το δείγμα τυχόν κυττάρων και άλλων κυτταρικών αποβλήτων. Παρόλο που η διαδικασία υπερφυγοκέντρησης είναι ευρέως αποδεκτή, η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα, μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση ή απώλεια εξωσωμάτων και δεν επιτρέπει σε κάποιον να απομονώσει επιλεκτικά εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικό όγκο. Άλλες τεχνικές απομόνωσης που εκμεταλλεύονται τις φυσικές ιδιότητες των εξωσωμάτων είναι η χρωματογραφία

αποκλεισμού μεγέθους και η φυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας με σακχαρόζη. Προσεγγίσεις ανοσοκαταστολής, όπως η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία που βασίζεται σε μικροπλάκες ή τα μαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα, αναγνωρίζουν συγκεκριμένα εξωσωμικά επιφανειακά αντιγόνα, οδηγώντας σε επιλεκτική απομόνωση των εξωσωμάτων. Τέλος, πολλά εμπορικά διαθέσιμα και φιλικά προς το χρήστη κιτ, προκαλούν καθίζηση εξωσωμάτων παρουσία πολυμερών χωρίς νερό (Palmirotta et al., 2018).

Πίνακας 3:Χαρακτηριστικά διαφορετικών μεθόδων απομόνωσης εξωσωμάτων (Palmirotta et al., 2018)

Τεχνική απομόνωσης	Μηχανισμός	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υπερφυγοκέντρωση	Με βάση τη διαφορετική ταχύτητα καθίζησης των κυστιδίων υπό φυγοκέντρωση, λόγω διαφορών στο μέγεθος, την πυκνότητα και το σχήμα	Διαδικασία χαμηλού κόστους. Μεγάλα ποσά δείγματος. Υψηλές αποδόσεις εξωσωμάτων. Υψηλή καθαρότητα απομονωμένων εξωσωμάτων	Απαιτείται ακριβός εξοπλισμός υπερφυγοκέντρωσης. Πολύ χρονοβόρα. Απώλεια ή μόλυνση εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα μπορεί να υποστούν βλάβη από υψηλή ταχύτητα
Με βάση το μέγεθος	Αποκλειστικά βάσει της διαφοράς μεγέθους μεταξύ των εξωσωμάτων και άλλων εξωκυτταρικών κυστιδίων	Πολύ γρήγορες και φθηνές διαδικασίες. Διατίθενται διάφορα εμπορικά κιτ	Μέτρια καθαρότητα απομονωμένων εξωσωμάτων. Υψηλή απώλεια εξωσωμάτων λόγω της παγίδευσης τους στις μεμβράνες

Κατακρήμνιση	Εκμετάλλευση της αλλοίωσης της διαλυτότητας του εξωσώματος χρησιμοποιώντας πολυμερή χωρίς νερό	Φιλικές προς το χρήστη διαδικασίες. Δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός. Μεγάλη χωρητικότητα δείγματος	Συγκαθίζηση μη νοσοσωματικών ρύπων. Χρονοβόρος
Ανοσοσυγγένεια	Με βάση την αλληλεπίδραση μεταξύ ειδικών εξωσωμικών επιφανειακών αντιγόνων και ακινητοποιημένων αντισωμάτων	Δυνατότητα απομόνωσης συγκεκριμένων και πολύ καθαρισμένων εξωσωμάτων	Υψηλό κόστος. Περιορισμένη χωρητικότητα δείγματος. Χαμηλές αποδόσεις. Πολύ χρονοβόρα

3.4.3.4 Εφαρμογές Εξωσωμάτων στην Ογκολογία

Η ανίχνευση εξωσωμάτων στην υγρή βιοψία θα μπορούσε να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου και την παρακολούθηση του για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της αντικαρκινικής θεραπείας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σχετικά με θεραπευτικές στρατηγικές έχει η χρήση των εξωσωμάτων ως μεταφορικά συστήματα φαρμάκων με στόχο την αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων σε συγκεκριμένες ασθένειες όπως ο καρκίνος και τη βελτιστοποίηση της γενετικής θεραπείας (Ha et al., 2016).

Πλεονεκτήματα:

- ✓ υψηλή ευαισθησία
- ✓ υψηλή συγκέντρωση στον ορό
- ✓ μη επεμβατική

Μειονεκτήματα:

- ✓ έλλειψη ειδικού δείκτη
- ✓ απουσία κλινικών δοκιμών για επιβεβαίωση εγκυρότητας της χρήσης σε κλινική πρακτική

3.4.4 Μικροσωματίδια

Το μέγεθος των μικροσωματιδίων είναι μεγαλύτερο από εκείνο των εξωσωμάτων (100-1000 nm). Τα εν λόγω σωματίδια προκύπτουν από τη μεμβράνη διαφόρων τύπων κυττάρων όπως τα αιμοποιητικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα και η σύνθεση της μεμβράνης τους είναι όμοια με εκείνη του κυττάρου από το οποίο προέρχονται, αντιπροσωπεύοντας το πρωτεωμικό προφίλ του όγκου.

Τα μικροσωματίδια μπορούν να μεταβάλλουν τη λειτουργία του κυττάρου δέκτη, κατά τη διάρκεια μεταφοράς του μοριακού περιεχομένου τους. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο εκκρίνουν μικροσωματίδια με miRNA στο εσωτερικό που διεγείρουν την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι πτυχές της βιογένεσης και της λειτουργίας των μικροσωματιδίων αποτελούν στόχους για αντικαρκινική θεραπεία, αφού έχει γίνει γνωστός ο βασικός ρόλος αυτών των μορίων στη διακυτταρική επικοινωνία σε ποικιλία κυτταρικών διεργασιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, την εξέλιξη του όγκου, όπως επίσης και της ανοσοκαταστολής, της αγγειογένεσης και της μετάστασης (Fernández-Lázaro et al., 2020).

3.4.5 Αιμοπετάλια

Μια ανερχόμενη μορφή υγρής βιοψίας που αποτελεί εξαιρετική πηγή απομόνωσης γενετικού υλικού του όγκου είναι τα αιμοπετάλια. Το περιφερικό αίμα περιέχει 150000-300000 αιμοπετάλια ανά μικρόλιτρο. Είναι, επομένως, ο δεύτερος πιο άφθονος τύπος κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Τα αιμοπετάλια χαρακτηρίζονται ως εργαλείο διάγνωσης του καρκίνου. Η χρήση αιμοπεταλίων ως βιοδείκτης στην υγρή βιοψία μπορεί να αντικατοπτρίζει το προφίλ του όγκου λειτουργώντας ως εργαλείο στην κλινική διάγνωση καρκίνου.

Μελέτες δείχνουν ότι τμήματα γενετικού υλικού του όγκου με τη μορφή RNA μπορούν να βρεθούν στα αιμοπετάλια (Braicu et al., 2015). Αυτό προκύπτει εξαιτίας του γεγονότος ότι

διάφοροι τύποι κυστιδίων που περιέχουν DNA, RNA, πρωτεΐνες του όγκου, απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα. Στο τέλος, προσροφούνται από τα αιμοπετάλια μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένους προσδέτες και λιπίδια. Τα κυστίδια περιβάλλονται από μεμβράνη και η δράση των νουκλεασών δεν είναι εφικτή με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό να παραμένει άθικτο.

Επιπλέον μηχανισμοί μεταφοράς γενετικού υλικού έχουν περιγραφεί από τα καρκινικά κύτταρα στα αιμοπετάλια χωρίς τη διαμεσολάβηση μεμβρανικών κυστιδίων οδηγώντας έτσι στη δημιουργία tumor educated platelets (TEPs). Τα TEPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή RNA όγκου για γενετική ανάλυση (In't Veld SGJG, 2019). Τα εν λόγω κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν κατευθείαν μετάγραφα από τα καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς, τα αιμοπετάλια μπορεί να «παίξουν» σημαντικό ρόλο στις νεοπλασίες (In' t Veld SGJG, 2019), αφού η χρήση τους είναι ωφέλιμη στην παρακολούθηση καρκινικών διεργασιών (Jonas, 2011).

3.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Η υγρή βιοψία αποτελεί μία μη επεμβατική προσέγγιση για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην άντληση πληροφοριών για την εξέλιξη του όγκου, καθώς και για την λήψη θεραπευτικών αποφάσεων και εξατομικευμένης θεραπείας μέσω της ανάλυσης περιφερικού αίματος. Δίνει τη δυνατότητα ενημέρωσης για την εξέλιξη ενός συμπαγούς όγκου σε τακτά χρονικά διαστήματα και σε πραγματικό χρόνο μέσω λεπτομερούς μοριακής ανάλυσης του κυκλοφορούντος γενετικού υλικού του στο περιφερικό αίμα. Παράλληλα, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση της μεθόδου αυτής είναι γρηγορότερα συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΥΠΟΙ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Υπάρχουν δύο διαφορετικές κατηγορίες δοκιμών για υγρές βιοψίες. Η πρώτη κατηγορία βασίζεται στον τύπο υλικού που αναλύεται στη δοκιμή, ενώ η δεύτερη βασίζεται στον τύπο ανάλυσης που διενεργείται για την ανίχνευση ή παρακολούθηση καρκίνου.

4.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

4.1.1 Ανάλυση καρκινικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα θεωρούνται ένα χρήσιμο υλικό ανάλυσης με σκοπό τη λήψη κρίσιμων πληροφοριών σχετικά με γενετικές μεταβολές. Ο μοριακός χαρακτηρισμός τέτοιων κυττάρων προσφέρει ευκαιρία για την αξιολόγηση καθώς και την παρακολούθηση φαινοτυπικών και γονοτυπικών χαρακτηριστικών για οποιοδήποτε τύπο καρκίνου.

Διάφορες μέθοδοι που διευκολύνουν την ανάλυση κυττάρων όγκου έχουν περιγραφεί. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα CellSearch, κυτταρομετρία ροής, τεχνολογίες που βασίζονται στον ανοσοφθορισμό και PCR αντίστροφης μεταγραφάσης. Το σύστημα CellSearch έχει εγκριθεί για έλεγχο κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε καρκινοπαθείς σε κλινικό επίπεδο. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή τα κύτταρα όγκου αφού ανιχνευθούν, αναλύονται με χρήση αντισώματος που συνδέεται με μόρια προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων. Έτσι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της επιθετικότητας των καρκίνων.

4.1.2 Ανάλυση ελεύθερου DNA

Το ελεύθερο DNA αποτελεί αιματολογικό βιοδείκτη που μπορεί να αναλυθεί με υγρή βιοψία. Το υλικό αυτό που απελευθερώνεται από όγκους ή από φλεγμονώδεις ιστούς κατά τη διαδικασία νέκρωσης ή απόπτωσης, μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις πρωτο-ογκογονιδίων. Το φορτίο του όγκου καθώς επίσης και μεταλλάξεις που χρειάζονται συγκεκριμένες θεραπείες μπορεί να εκτιμηθούν.

4.1.3 Ανάλυση εξωσωμικού DNA

Ένας άλλος τύπος ανάλυσης υγρής βιοψίας περιλαμβάνει εξωσωμικό DNA, εφόσον έχει γίνει ξεκάθαρη η συμβολή του στην εκτίμηση της ετερογένειας του όγκου σε διάφορα καρκινώματα, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του προστάτη και του μαστού, αλλά και στην αξιολόγηση των επιλεκτικών επιδράσεων των θεραπειών.

Εξαιρετικά ευαίσθητες τεχνολογίες, όπως η ψηφιακή PCR, μπορούν να βελτιώσουν την αξιοπιστία της ανάλυσης του εξωσωμικού DNA, ενισχύοντας τα εξωσώματα κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

4.1.4 Ανάλυση miRNAs

Σε υγρή βιοψία μπορούν επίσης να αναλυθούν miRNAs. Όσον αφορά τα miRNAs είναι μη κωδικά μόρια RNA που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Οι μεταβολές των miRNAs είναι ικανές να αντανakλούν την εξέλιξη και την ανάπτυξη του καρκίνου. Στους πιο συνηθισμένους δείκτες που είναι αποτελεσματικοί για τη διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του μαστού και του δέρματος περιλαμβάνονται οι miR-21, miR-320a, miR-423-5p και miR-24. Άλλοι δείκτες, όπως miR-106a, miR-29a και miR-106b χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Arneth, 2018).

4.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

4.2.1 Ανάλυση μεταλλάξεων μικρής κλίμακας και στοχευμένη ανάλυση αλληλουχίας (Small-scale mutation analysis and targeted deep sequencing)

Μέσω υγρής βιοψίας ενδέχεται να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση μεταλλάξεων μικρής κλίμακας (σημειακές μεταλλάξεις, εισαγωγές και διαγραφές). Η ανίχνευση των μεταλλάξεων EGFR, BRAF, KRAS και KIT είναι ζωτικής σημασίας στην παροχή πληροφοριών σχετικά με το χρόνο έναρξης θεραπείας όπως στην περίπτωση θεραπείας με αντισώματα EGFR η οποία μπορεί να ξεκινήσει μόνο εάν δεν υπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο RAS. Ενώ η αποτελεσματικότητα της υγρής βιοψίας στην ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR, PIK3CA, BRAF, KRAS, HER2, ALK, PDGFR και KIT είναι αποδεδειγμένη, οι διαδικασίες υγρής βιοψίας μπορεί να αντικαταστήσουν τη βιοψία ιστού όγκου για την ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων στο μέλλον.

Ένα άλλο πλεονέκτημα της χρήσης υγρής βιοψίας για ανίχνευση και παρακολούθηση μετάλλαξης είναι ότι μπορεί να παρέχει βασικές πληροφορίες για την πρόγνωση, την αντίσταση και το φορτίο της νόσου. Ορισμένες μεταλλάξεις συχνά οδηγούν σε κακές προγνώσεις για τους ασθενείς, όπως συμβαίνει με τις μεταλλάξεις KRAS και τις προγνωστικές επιπτώσεις τους κατά τη διάρκεια της θεραπείας, όπου υψηλότερα επίπεδα μεταλλάξεων αλληλόμορφων KRAS ctDNA συσχετίστηκαν με φτωχότερες αποκρίσεις στη θεραπεία. Εν κατακλείδι, η θεραπεία και την παρακολούθηση του καρκίνου βασίζεται σε πληροφορίες που σχετίζονται με τις μεταλλάξεις των κυττάρων. Επιπλέον,

οι σύγχρονες τεχνικές επέτρεψαν τη στοχευμένη αλληλούχιση σημαντικών μεταλλάξεων (εισαγωγές, διαγραφές και σημειακές μεταλλάξεις).

4.2.2 Ανάλυση δομικών αλλαγών (Analysis of structural changes)

Μια κύρια ανάλυση που μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω υγρής βιοψίας είναι η ανάλυση δομικών αλλαγών. Η επιλεκτική ενσωμάτωση διδεοξυνουκλεοτιδίων που τερματίζουν την αλυσίδα κατά την αντιγραφή του DNA in vitro, επικαλούμενη ως μέθοδος Sanger, μπορεί να εντοπίσει δομικές αλλαγές, σημειακές μεταλλάξεις, παραλλαγές αριθμού αντιγράφων και πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs), σε ένα γονιδίωμα όγκου.

4.2.3 Ανάλυση μεταλλάξεων μεγάλης κλίμακας με αλληλουχία επόμενης γενιάς (Large-scale mutation analysis by next-generation sequencing)

Η μέθοδος αλληλούχισης επόμενης γενιάς με τη χρήση της τεχνικής τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης για τον κατακερματισμό των γονιδιωματικών κλώνων και την μετέπειτα αναγνώριση βάσεων σε κάθε θραύσμα μέσω των εκπεμπόμενων σημάτων τους, απαιτείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων μεγάλης κλίμακας. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς επιτρέπει την ανάλυση του cfDNA για την προσεκτική επιλογή ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου όπως και τον έλεγχο ανταπόκρισης σε θεραπεία. Το αξιοσημείωτο πλεονέκτημα αυτής της μεθοδολογίας είναι ότι επιτρέπει την αλληλούχιση ολόκληρων γονιδίων ή του πλήρους cfDNA.

4.2.4 Ανάλυση αλλαγών αριθμού αντιγράφων (Analysis of copy number alterations)

Η ανάλυση αλλαγών αριθμού αντιγράφων είναι ένας ακόμα τύπος ανάλυσης που πραγματοποιείται μέσω υγρής βιοψίας, ικανός να ενημερώσει σχετικά με την ταξινόμηση των όγκων, τους θεραπευτικούς στόχους και την πιθανή ανταπόκριση ενός ασθενούς σε θεραπείες καρκίνου. Οι συγκεκριμένες μεταβολές μπορούν να αξιολογηθούν χρησιμοποιώντας δείγματα πλάσματος που περιέχουν cfDNA (Arneth, 2018).

4.3 ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν κλινικά σενάρια στα οποία αξιολογούνται υγρές βιοψίες.

- Διαγνωστικός έλεγχος

Η χρήση υγρών βιοψιών πριν από την κλινική ανίχνευση του καρκίνου είναι μακράν η πιο δύσκολη εφαρμογή, αλλά έχει επίσης τη μεγαλύτερη δυνατότητα μείωσης της νοσηρότητας και της θνησιμότητας από καρκίνο. Η ευαισθησία της μεθόδου αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ζήτημα.

Η χρησιμότητα της υγρής βιοψίας αντικατοπτρίζεται στην πρόγνωση κατά την αρχική διάγνωση, με την αποκάλυψη της ετερογένειας των όγκων να καθίσταται δυνατή. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, σε περίπτωση που δεν παρατηρείται διαθέσιμος ιστός για προσδιορισμό αλληλουχίας του γενετικού υλικού, μια υγρή βιοψία μπορεί να είναι η λύση.

- Ανίχνευση ενεργών μεταλλάξεων για επιλογή θεραπείας

Περισσότερα δεδομένα συγκεντρώνονται για να υποδηλώσουν ότι η υγρή βιοψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποικίλους κλινικούς και ερευνητικούς σκοπούς σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Είναι μια μέθοδος κατάλληλη για τον εντοπισμό ενεργών μεταλλάξεων προκειμένου να επιλεγεί η αποτελεσματικότερη θεραπεία. Η υγρή βιοψία, λοιπόν, μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική μέθοδο για ανίχνευση μετάλλαξης που θα καθοδηγήσει την επιλογή θεραπείας σε ασθενείς που δεν μπορούν να υποβληθούν σε βιοψία ιστού (ή ως συμπλήρωμα σε βιοψία ιστού).

- Μετά από απόκριση και αντίσταση σε θεραπείες

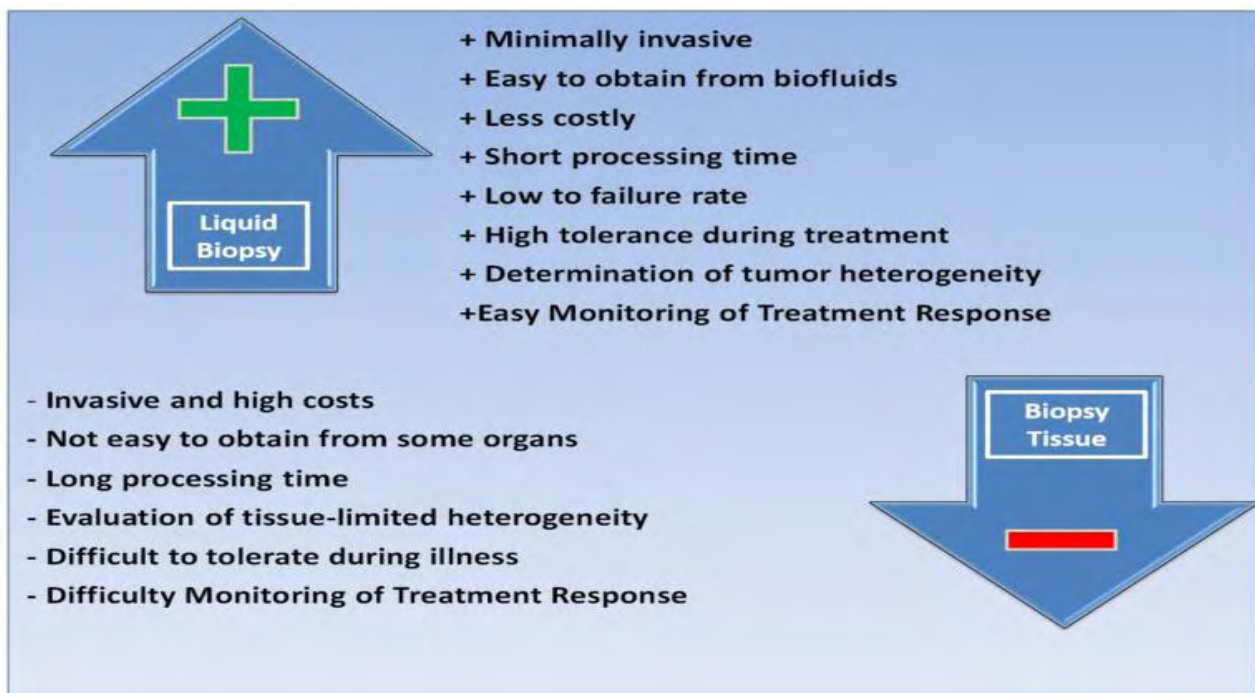
Οι υγρές βιοψίες είναι σε θέση να προβλέψουν την απόκριση και την αντίσταση σε θεραπείες. Έχουν την ικανότητα να ανιχνεύσουν πρώιμες υποτροπές δίνοντας πολυάριθμες ευκαιρίες στους ιατρούς για τροποποίηση θεραπευτικών σχημάτων. Σε περίπτωση υποτροπής ενός ασθενή οι υγρές βιοψίες ίσως αποκαλύψουν νέες μεταλλάξεις που δεν είναι εμφανείς στον πρωτογενή όγκο και να καθοδηγήσουν νέες θεραπευτικές επιλογές (Mattox et al., 2019).

4.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΨΙΑΣ ΙΣΤΟΥ

Η παραδοσιακή βιοψία ιστού θεωρείται βασικό εργαλείο για τη διάγνωση και τον έλεγχο ασθενειών. Μέχρι πρόσφατα, στην περίπτωση του καρκίνου, ο ιστός ήταν ο μόνος τρόπος μελέτης των μεταλλάξεων των όγκων, ενώ η συγκεκριμένη βιοψία επιτρέπει τον προσδιορισμό του γενετικού του προφίλ του όγκου, προκειμένου να διαγνώσει, να προβλέψει την εξέλιξη του όγκου και την απόκριση του ασθενούς στη θεραπεία. Οι περιορισμοί όμως της μεθόδου είναι εμφανείς και

σε αυτούς ανήκουν η δυσκολία εκτέλεσης της λόγω της θέσης και της απουσίας ορατού όγκου και η αδυναμία της επανάληψης η οποία την αποκλείει ως μέθοδο παρακολούθησης. Άλλοι περιορισμοί μπορεί να είναι απόρροια άλλων νοσηροτήτων των ασθενών, του κόστους και του χρόνου αποικοδόμησης στοιχείων (στην περίπτωση ανάλυσης ιστών που είναι αποθηκευμένοι σε τράπεζες). Ωστόσο, η ετερογένεια του όγκου που μπορεί να προέλθει καθώς οι όγκοι αποκλίνουν και σχηματίζουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς αποτελεί τον μεγάλο περιορισμό. Αυτή η ποικιλομορφία δεν σημειώνεται σε ένα δείγμα ιστού αφού ο χρόνος και ο χώρος είναι περιορισμένα (Fernandez-Lazaro et al., 2020).

Υπάρχει επείγουσα ανάγκη για καλύτερους καρκινικούς βιοδείκτες που μπορούσαν να συσχετιστούν με φορτίο του όγκου, να συσχετιστεί με αλλαγές στην απόκριση στη θεραπεία ή τη χειρουργική επέμβαση, να αντικατοπτρίζει την εξέλιξη και τη μετάσταση του όγκου και να υποδηλώνει την απόκριση στη θεραπεία και την αντίσταση στον όγκο ή υποτροπή (Fenizia et al., 2018; Willms et al., 2016). Συγκριτικά με τη χειρουργική βιοψία και τη βιοψία βελόνας, η υγρή βιοψία είναι μια μη επεμβατική μέθοδος (Fenizia et al., 2018) για τη διάγνωση όγκων και χαρακτηρίζεται από εύκολη και επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία. Έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο, η οποία παρέχει μια αποτελεσματική πρόγνωση (Qi et al., 2018). Για τους παραπάνω λόγους, η υγρή βιοψία γίνεται μια κοινή εναλλακτική προσέγγιση για τη διενέργεια μοριακών αναλύσεων (Fenizia et al., 2018).



Εικόνα 10: Σύγκριση υγρής βιοψίας (Fernández-Lázaro et al., 2020)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η ανάλυση των σχετιζόμενων με τον όγκο γενετικών αλλοιώσεων χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για διαγνωστικούς, προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, η διαδικασία της κλασικής βιοψίας λόγω της επεμβατικής της φύσης αλλά και της δυσκολίας να επιτρέψει την πλήρη κατανόηση και μελέτη του όγκου εξαιτίας της σημαντικής ετερογένειας του όγκου παρουσιάζει περιορισμούς. Συμπληρωματικό εργαλείο ή εναλλακτική της παραδοσιακής βιοψίας είναι η διαδικασία της υγρής βιοψίας, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα βιολογικά υλικά και να επιτρέψει να ξεπεραστούν σε σημαντικό βαθμό οι περιορισμοί της πρώτης. Οι μέθοδοι της υγρής βιοψίας περιλαμβάνουν την ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων όγκου (CTCs), των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων, των εξωσωμάτων, των μικροσωματιδίων και των αιμοπεταλίων, προερχόμενων από όγκο που εκχέονται από πρωτογενείς όγκους και τις μεταστατικές τους θέσεις σε περιφερειακό αίμα. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές τεχνικές, η υγρή βιοψία είναι ικανή να συμπεριλάβει τη χωρική και χρονική ετερογένεια που παρατηρείται στη βιολογική βάση του καρκίνου. Η υγρή βιοψία, είναι ιδιαίτερης σημασίας διαδικασία για την κλινική ογκολογία, καθώς παρέχει το γενετικό προφίλ των καρκινικών βλαβών. Η υγρή βιοψία βασίζεται σε ελάχιστα επεμβατικές εξετάσεις αίματος και μπορεί να επαναληφθεί σειριακά, επιτρέποντας έτσι την εξαγωγή πληροφοριών από τον όγκο σε πραγματικό χρόνο αντιπροσωπεύοντας έτσι μια μεγάλη υπόσχεση για εξατομικευμένη ιατρική. Ο έλεγχος, η διάγνωση, η πρόγνωση και η θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο μπορεί να αλλάξουν δραματικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Akers JC et al. (2013). “Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies”. *J Neurooncol*, 113(1):1-11.
- Alimirzaie Sahar et al. (2019). “Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Comprehensive Review”. *Clin Genet*, 95(6):643-660.
- Alix-Panabières C and Pantel K. (2016). “Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy”. *Cancer Discov*, 6(5):479-91.
- Anand P et al. (2008). “Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes”. *Pharm Res*, 25(9):2097-116.
- Andreoli A. (2010). *cecil Βασική παθολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Λίτσα.

- Ardle Orla and Mahony Deirdre (2010). *Ογκολογία: εικονογραφημένο εγχειρίδιο*, Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.
- Arneht Borros. (2018). “Update on the Types and Usage of Liquid Biopsies in the Clinical Setting: A Systematic Review”. *BMC Cancer*, 18(1):527.
- Asante DB et al. (2020). “Liquid Biopsy in Ovarian Cancer Using Circulating Tumor DNA and Cells: Ready for Prime Time?”. *Cancer Let.*, 468:59-71.
- Balic M et al. (2013). “Circulating Tumor Cells: From Bench to Bedside”. *Annu Rev Med*, 64: 10.1146/annurev-med-050311-163404.
- Bhardwaj J et al. (2005). “Recent Advances in Diagnosis of Cancer”. *Med J Armed Forces India*, 61(2): 112–114.
- Benini Stefania GG et al. (2018). “Detection of circulating tumor cells in liquid biopsy from Ewing sarcoma patients”. *Cancer management and research*, 10:49-60.
- Boons Gitta et al.(2018). “Cell-Free DNA From Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients Contains Tumor-Specific Mutations and Copy Number Variations”. *Front Oncol*, 8:467.
- Braicu C et al. (2015) “Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology?”. *Cell Death Differ*, 22(1): 34–45.
- Bratić Hench Ivana et al. (2018). “Liquid Biopsy in Clinical Management of Breast, Lung, and Colorectal Cancer”. *Front Med (Lausanne)*, 5: 9.
- Bray Freddie et al. (2018). “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”. *CA Cancer J Clin*, 68(6):394-424.
- Bunkusi Isam. (2012). *Πρακτική Προσέγγιση στην κλινική ογκολογία*, 2η έκδοση, Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου, σ. 16-20, 54-72.
- Burz C et al. (2018). “Circulating tumor cells in clinical research and monitoring patients with colorectal cancer”. *Oncotarget*, 9(36): 24561–24571.
- Calin GA et al. (2002). “Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 15524-15529.
- Calin GA et al. (2004a). “ MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11755-11760.
- Chabner BA et al. (2011). *Harrison Εγχειρίδιο Ογκολογίας* , Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.

- Chen Jing et al. (2018). “Metabolic reprogramming-based characterization of circulating tumor cells in prostate cancer”. *J Exp Clin Cancer Res*, 37: 127.
- Cheng Feifei et al. (2016). “Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer”. *Oncotarget*, 7(30):4883248841.
- Cohen JD et al. (2017). “Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(38):10202-10207.
- Cohen Joshua D et al. (2018). “Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test”. *Science*, 359(6378):926930.
- Cree IA. (2015). “Liquid biopsy for cancer patients: principles and practice”. *Pathogenesis*, 2(1):1–4.
- Cui Shaohua et al. (2017). “Use of capture-based nextgeneration sequencing to detect ALK fusion in plasma cell-free DNA of patients with non-small-cell lung cancer”. *Oncotarget*, 8(2):2771-2780.
- Constâncio Vera et al. (2020). “DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types”. *Cells*, 9(3):624.
- Dewit Susan C. (2009). *Παθολογική χειρουργική νοσηλευτική - Έννοιες και πρακτική*, έκδοση 1η , Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδης :218, 237-253.
- Dizdar L et al. (2019). “Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: results from a prospective, single-center study”. *Mol Oncol*, 13(7): 1548–1558.
- Domínguez-Vigil Irma G et al. (2017). “The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer”. *Oncotarget*, 9(2):2912-2922.
- Evan G I and Vousden K H. (2001). “Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer”. *Nature*, 411(6835):342-8.
- Fenizia Francesca et al. (2018). “Measuring tumor mutation burden in non-small cell lung cancer: tissue versus liquid biopsy”. *Transl Lung Cancer Res*, 7(6):668-677.
- Fernández-Lázaro Diego et al. (2020). “Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers”. *Diagnostics (Basel)*, 10(4):E215.
- Fici Pietro. (2019). “Cell- Free DNA in the Liquid Biopsy Context: Role and Differences Between ctDNA and CTC Marker in Cancer Management”. *Methods Mol Biol*, 1909:47-73.

- Fortunato Orazio et al. (2019). “Exo-miRNAs as a New Tool for Liquid Biopsy in Lung Cancer”. *Cancers (Basel)*, 11(6): 888.
- Fujita Kazutoshi et al. (2017). “Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer”. *Sci Rep*, 7:42961.
- Gu Yulan et al. (2020). “Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis”. *Open access*.
- Ha D et al. (2016). “Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges”. *Acta Pharm Sin B*, 6(4): 287–296.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). “The hallmarks of cancer”. *Cell*, 100(1):57-70.
- He H et al. (2005a). “The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102: 19075-19080
- Ilié Marius and Hofman Paul. (2016). “Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy?”. *Transl Lung Cancer Res*, 5(4): 420–423.
- Imamura Taisuke et al. (2016). Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: “Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids”. *World J Gastroenterol*, 22(25): 5627–5641.
- In’t Veld SGJG and Wurdinger T. (2019). “Tumor educated platelets”. *Blood*, 133(22):2359-2364.
- Izzotti Alberto et al. (2016). “Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention”. *Am J Cancer Res*. 6(7): 1461–1493.
- Jemal A et al. (2011). “Global cancer statistics”. *CA Cancer J Clin*, 61(2):69-90.
- Jia S et al. (2017). “Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer”. *Oncotarget*, 8(33): 55632–55645.
- Jiang H et al. (2014). “Diverse roles of miR29 in cancer”. *Oncology Reports*, 31(4), 1509–1516.
- Johann Donald J Jr et al. (2018). “Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer”. *Exp Biol Med (Maywood)*, 243(3):262-271.
- Jordan Bertrand. (2015). “Liquid Biopsies, a Revolution in Oncology?”. *Med Sci (Paris)*, 31(8-9):805-7.
- Jonas Oliver et al. (2011). “Invasive cancer cell lines exhibit biomechanical properties that are distinct from their noninvasive counterparts”. *Soft matter*, (24).

- Kamel HFM and Al-Amodi HSAB. (2017). “Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine”. *Genomics Proteomics Bioinformatic*, 15(4):220-235.
- Kastrisiou Myrto et al. (2019). “Clinical Application of Next-Generation Sequencing as A Liquid Biopsy Technique in Advanced Colorectal Cancer: A Trick or A Treat?”. *Cancers (Basel)*, 11(10):1573.
- Larrea E et al, 2016. New concepts in cancer biomarkers: Circulating miRNAs in liquid biopsies. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol 17:627
- Lodewijk I et al. (2018). “Liquid Biopsy Biomarkers in Bladder Cancer: A Current Need for Patient Diagnosis and Monitoring”. *Int J Mol Sci*, 19(9).
- Loffler G. (2007). *Βασικές αρχές βιοχημείας: Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης*.
- Lu J et al. (2005). “MicroRNA expression profiles classify human cancers”. *Nature*, 435: 834-838.
- Luo Wenna et al. (2018). “Applications of liquid biopsy in lung cancer-diagnosis, prognosis prediction, and disease monitoring”. *Am J Transl Res.*, 10(12): 3911–3923.
- Malapelle Umberto et al. (2016). “Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients”. *Transl Lung Cancer Res*, 5(5):505-510.
- Mao Xiaowei et al. (2017). “Capture-Based Targeted Ultradeep Sequencing in Paired Tissue and Plasma Samples Demonstrates Differential Subclonal ctDNA-Releasing Capability in Advanced Lung Cancer”. *J Thorac Oncol*, 12(4):663-672.
- Marrugo-Ramírez José et al. (2018). “Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy”. *Int J Mol Sci*, 19(10):2877.
- Mattox Austin K et al. (2019). “Applications of liquid biopsies for cancer”. *Science Translational Medicine*, 11(507).
- Mc Ardle Orla and O Mahony Deirdre. (2010). *Ογκολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.
- Micalizzi DS et al. (2017). “A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology”. *Genes Dev*, 31(18):1827-1840.
- Miller MC et al. (2010). “Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer”. *J Oncol*, 2010:617421.
- Minciacchi V R et al. (2017). “ Extracellular vesicles for liquid biopsy in prostate cancer: where are we and where are we headed?”. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 20(3):251-258.

- Mulita Francesk (2020). “Case Report of a Local Recurrence of Spindle Cell Embryonal Rhabdomyosarcoma”. *Medical Archives*.
- Nurwidya Fariz et al. (2016). “Circulating Tumor Cell and Cell-free Circulating Tumor DNA in Lung Cancer”. *Chonnam Med J*, 52(3): 151–158.
- Palmirotta R et al. (2018). “Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology”. *Ther Adv Med Oncol*, 10:1758835918794630.
- Pang Bairen et al. (2020). “Extracellular vesicles: the next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis”. *Theranostics*, 10(5): 2309–2326.
- Pasini Luigi and Ulivi Paola. (2019). “Liquid Biopsy for the Detection of Resistance Mechanisms in NSCLC: Comparison of Different Blood Biomarkers”. *J Clin Med*, 8(7):998.
- Pös O et al. (2018). “Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications”. *Eur J Hum Genet*, 26(7): 937–945.
- Qi Zi-Hao et al. (2018). “The Significance of Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer”. *J Cancer*. 9(18): 3417–3426.
- Rapisuwon S et al. (2016). “Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment”. *Comput Struct Biotechnol J*, 14: 211–222.
- Rashed H M et al. (2017). “Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets”. *Int J Mol Sci*, 18(3):538.
- Rofi Eleonora et al. (2018). “The Emerging Role of Liquid Biopsy in Diagnosis, Prognosis and Treatment Monitoring of Pancreatic Cancer”. *Pharmacogenomics*, 20(1):49-68.
- Rohanizadegan Mersedeh and Kulkarni Shashikant. (2018). “Transformational Role of Liquid Biopsy in Diagnosis and Treatment of Cancer”. *Cancer Genet*, 228-229:129-130.
- Roser Max HR. (2019). “Cancer”. *OurWorldInData.org*.
- Rothé F et al. (2014). “Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer”. *Ann Oncol*, 25(10):1959-65.
- Runge Marschall S et al. (2012). *Παθολογία: Βασικές αρχές*. Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Salvianti Francesca et al. (2017). “Integrity and Quantity of Total Cell-Free DNA in the Diagnosis of Thyroid Cancer: Correlation with Cytological Classification”. *Int J Mol Sci*, 18(7): 1350.
- Sato Yoshiharu et al. (2019). “Recent Advances in Liquid Biopsy in Precision Oncology Research”. *Biol Pharm Bull*, 42(3):337342.
- Schneider JE et al. (2012). “Cancer Biomarkers Used in Screening, Diagnosis, Monitoring & Treatment Optimization”. *Personalized Medicine*, 9(8):829-837.

- Siegel R et al. (2011). “Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths”. *CA Cancer J Clin*, 61(4):212-36.
- Siegel RL et al. (2020). “Cancer statistics, 2020”. *CA Cancer J Clin*, 70(1):7-30.
- Singh AP et al. (2017). “Circulating DNA in *EGFR*-mutated lung cancer”. *Ann Trans Med*, 5(18): 379.
- Siravegna G et al. (2019). “How liquid biopsies can change clinical practice in oncology”. *Ann Oncol*, 30(10):1580-1590.
- Sol Nik and Wurdinger Thomas. (2017). “Platelet RNA signatures for the detection of cancer”. *Cancer Metastasis Rev*, 36(2):263-272.
- Sokolenko AP and Imyanitov EN. 2018. “Molecular Diagnostics in Clinical Oncology”. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5:76.
- Sundarbose K et al. (2013). “MicroRNAs as Biomarkers in Cancer”. *Diagnostics (Basel)*, 3(1): 84–104.
- Sundling Kaitlin E and Lowe Alarice C. (2019). “Circulating Tumor Cells Overview and Opportunities in Cytology”. *Adv Anat Pathol*, 26(1):56-63.
- Tan Carlyn Rose C et al. (2016). “Circulating Tumor Cells Versus Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Pros and Cons”. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 12(3): 151–161.
- Tartarone A et al. (2017). “Molecular characterization and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer”. *J Thorac Dis*, 9(Suppl 13):S1359-S1363.
- Thierry AR et al. (2016). “Origins, Structures, and Functions of Circulating DNA in Oncology”. *Cancer Metastasis Rev*, 35(3):347-76.
- Thierry Alain R and Tanos Rita. (2018). “Liquid biopsy: a possible approach for cancer screening”. *Med Sci (Paris)*, 34(10):824-832.
- von Bubnoff Nikolas. (2017). “Liquid Biopsy: Approaches to Dynamic Genotyping in Cancer”. *Oncol Res Treat*, 40(7-8):409-416.
- Weinberg R. (2014). *The biology of cancer*. New York: Garland Science.
- WillsB et al. (2018). “Role of liquid biopsies in colorectal cancer”. *Curr Probl Cancer*, 42(6):593-600.
- *World Cancer Report*. (2014). World Health Organization.
- Willms A et al. (2016). “Tumour-associated circulating microparticles: A novel liquid biopsy tool for screening and therapy monitoring of colorectal carcinoma and other epithelial neoplasia”. *Oncotarget*, 7(21):30867-75.

- Xu Z et al. (2015). “Exosomes in cancer: small particle, big player”. *Journal of Hematology & Oncology*
- Yadav DK et al. (2018). “Liquid biopsy in pancreatic cancer: the beginning of a new era”. *Oncotarget*, 9(42):26900-26933.
- Yamada Takeshi et al. (2019). “ Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer”. *Digestion*, 99(1):39-45.
- Yang M et al. (2018). “Incorporating Blood-Based Liquid Biopsy Information Into Cancer Staging: Time for a TNMB System?”. *Ann Oncol*, 29(2):311-323.
- Yokoi Akira et al. (2017). “A combination of Circulating miRNAs for the Early Detection of Ovarian Cancer”. *Oncotarget*, 8(52): 89811–89823.
- Yong Ed. (2014). “Cancer Biomarkers: Written in Blood”. *Nature*, 511(7511):524-6.
- Zhang Wei et al. (2017). “Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes?”. *Cell Physiol Biochem*, 41(2):755-768.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Καβαντζάς Ν. (2000). *Ιστοπαθολογική Ταξινόμηση των Όγκων*. Αθήνα: εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Κιτράκη Ε και Τρούγκος Κ. (2006). *Βιολογία του Καρκίνου*. Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Κωστάκης Α. (2015). *Σύγχρονη χειρουργική διαγνωστική και θεραπευτική*. Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Νακοπούλου Λ. (2017). *ΔΙΗΘΗΣΗ-ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ* [Μεταγράφημα παρουσίασης]: Παναγιωτάκης Ζάχος.
- Παπαλάμπρος Ευστάθιος. (2012). *Χειρουργική από το διδακτικό και ερευνητικό προσωπικό του χειρουργικού τομέα*. Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδης.