



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

ΜΑΡΙΑ ΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΥΓΡΟ

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
EXOSOMES FROM BRONCHOALVEOLAR LAVAGE

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλαος Μπαλατσός

Εργαστήριο: Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Μπαλατσός: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης: Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζωή Δανιήλ: Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	7
1.2	ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	9
1.2.1	Τύποι του καρκίνου του πνεύμονα	10
1.2.1.1	Πλακώδες Καρκίνωμα του Πνεύμονα	10
1.2.1.2	Μικροκυτταρικός Καρκίνος.....	10
1.2.1.3	Αδενοκαρκίνωμα.....	11
1.2.1.4	Μεγαλοκυτταρικό Καρκίνωμα.....	11
1.3	ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ.....	12
1.3.1	Υποπληθυσμοί Εξωκυτταρίων Κυστιδίων	13
1.3.2	Εξωσώματα	14
1.3.3	Εξωσώματα στα Βιολογικά Υγρά.....	16
1.3.4	Εξωσώματα και Καρκίνος.....	16
1.4	ΒΡΟΓΧΟΣΚΟΠΗΣΗ.....	18
1.5	ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ	18
1.6	ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ	18
2.	ΣΚΟΠΟΣ.....	19
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1	ΥΛΙΚΑ	20
3.1.1	Κλινικά Δείγματα Βροχοκυψελιδικού Εκπλύματος (BALF).....	20
3.1.2	Ρυθμιστικά Διαλύματα (β.λ Παράρτημα).....	20
3.2	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	20
3.2.1	Προκαθορισμός Δειγμάτων με Φυγοκέντρηση.....	20
3.2.1.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	20
3.2.2	Απομόνωση Εξωσωμάτων με Υπερφυγοκέντρηση	21
3.2.2.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	21
3.2.3	Κατακρήμιση Εξωσωμάτων με PEG 8.000 DA.....	23
3.2.3.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ.....	23
3.2.4	Λύση Μεμβράνης των Εξωσωμάτων.....	23
3.2.4.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΛΥΣΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	24
3.2.5	Ποσοτικός Προσδιορισμός Εξωσωματικών Πρωτεϊνών	24
3.2.5.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	24

3.2.6	Προετοιμασία Εξωσωμικών Πρωτεϊνών για την Ανοσοαποτύπωση WESTERN	25
3.2.6.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗΣ	25
3.2.7	Ανίχνευση Πρωτεϊνών με τη χρήση WESTERN BLOT	26
3.2.8	Ηλεκτοφόρηση Πρωτεϊνών	27
3.2.8.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ GEL ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ.....	27
3.2.8.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ	28
3.2.8.3	ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF	31
3.2.8.4	ΧΡΗΣΗ BLOCKING BUFFER ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΥΨΗ ΜΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ.....	32
3.2.8.5	ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ.....	32
3.2.8.6	ΔΕΥΤΕΡΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ.....	33
3.2.8.7	ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΦΙΛΜ	33
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	38
6.1	ΔΙΑΛΥΜΑ PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X	38
6.2	ΔΙΑΛΥΜΑ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ 30%	38
6.3	ΔΙΑΛΥΜΑ PEG 8000 Da	39
6.4	ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ RIPA (100ml)	39
6.5	ΔΙΑΛΥΜΑ LAEMMLI BUFFER 4X (10 ml)	39
6.6	GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 10% (10ml)	40
6.7	GEL ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΣΗΣ 5% (5 ml)	41
6.8	RUNNING BUFFER 10X (ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ 1L)	41
6.9	ΔΙΑΛΥΜΑ TRANSFER BUFFER (500 ml)	42
6.10	ΔΙΑΛΥΜΑ TBST (Tris-Buffered Saline Tween) 10X.....	42
6.11	ΔΙΑΛΥΜΑ BLOCKING BUFFER (50ml).....	42
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι περιπτώσεις καρκίνου αυξάνουν παγκόσμια καθιστώντας την πρόληψη και την έγκαιρη διάγνωση επιτακτικές ανάγκες στην αντιμετώπιση της νόσου. Η υπερέκφραση ογκογονιδίων, η υποέκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, καθώς και απώλεια της λειτουργίας των γονιδίων αυτών, σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου. Τα εξωσώματα είναι κυστίδια μεγέθους 30-100 nm που απελευθερώνονται από όλα σχεδόν τα κύτταρα, είναι άφθονα σε βιολογικά υγρά και αναγνωρίζονται μέσω πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους από κύτταρα – αποδέκτες. Μεταφέρουν το φορτίο τους από RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια, μεταξύ διαφόρων τύπων κυττάρων, μεσολαβώντας έτσι στην διακυτταρική επικοινωνία και την έκφραση γονιδίων των αποδεκτών. Η οριζόντια μεταφορά του φορτίου τους παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογία του καρκίνου, όπως στη διείσδυση, τη μετάσταση, την εξέλιξη, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση, αλλά και στην ανανέωση των βλαστικών κυττάρων και την επέκταση. Συνεπώς, το φορτίο RNA των εξωσωμάτων έχει πολύ σημαντικό ρόλο ως μη-παρεμβατικό βιοδείκτη στην υγρή βιοψία. Εντούτοις, η αξιόπιστη απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων σε βιολογικά υγρά είναι ελλιπής. Στην εργασία, επιχειρείται η απομόνωση εξωσωμάτων σε βρογχοκυψελιδικό υγρό από καρκίνο του πνεύμονα, βάση πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε από την ομάδα μας σε πλευριτικές συλλογές. Από τα δείγματα απομονώνονται κυστίδια στα οποία ταυτοποιούνται κύριοι πρωτεϊνικοί δείκτες εξωσωμάτων. Περαιτέρω έρευνα θα αναδείξει τη σημασία της μεθόδου στην υγρή βιοψία.

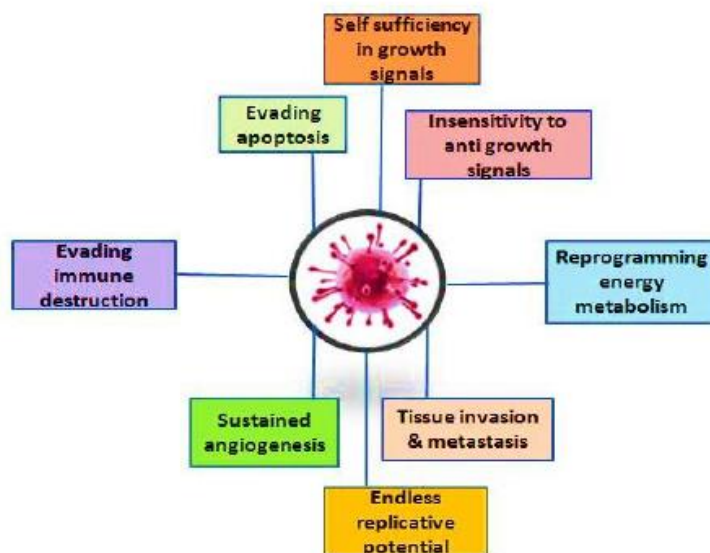
ABSTRACT: The cases of cancer are increasing worldwide making prevention and early diagnosis imperative needs for the diagnosis of the disease. The overexpression of the oncogenes, as the loss of function of those genes is associated with cancer progression. Exosomes are vesicles 30-100 nm in diameter, that are released by almost all cell types, they are abundant in all biological fluids and can be recognized through proteins on their membrane by receptor cells. They transport their cargo of RNA, proteins and lipids between different types of cells, thus mediating intercellular communication and gene expression of the recipients. Their horizontal transport plays an important role in cancer biology, such as in invasion, metastasis, progression, inflammation and angiogenesis, but also in stem cell renewal and expansion. Therefore, the RNA load of exosomes has a very important role as a non-invasive biomarker in liquid biopsy. However, reliable isolation and characterization of exosomes in biological fluids is deficient. In this thesis, is attempted the isolation and the characterization of the exosomes in bronchoalveolar fluid from lung cancer, based on the protocol which was developed from our team in pleural effusions. From these samples vesicles are isolated, in which major protein markers are identified. Further research will highlight the importance of the method in liquid biopsy.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια που εμφανίζεται όταν η πληροφορία στο κυτταρικό DNA αλλοιώνεται, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μη φυσιολογικών μοτίβων γονιδιακής έκφρασης. (Nenclares et al, 2020) Κύριο χαρακτηριστικό του αποτελεί η δημιουργία μαζών που ονομάζονται όγκοι. Οι όγκοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες : καλοήθεις και κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται αργά και δεν εισβάλλουν στον περιβάλλοντα ιστό. Αντιθέτως, οι κακοήθεις όγκοι είναι διεισδυτικοί και μπορούν να καταστρέψουν τους γειτονικούς ιστούς. Λόγω της αργής τους ανάπτυξης, οι καλοήθεις όγκοι, είναι λιγότερο επιβλαβείς και έχουν την ικανότητα να παραμένουν τοπικά. Για αυτό το λόγο μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα με μια χειρουργική επέμβαση. (Korgaonkar et al, 2019)

Το πρώτο καρκινικό κύτταρο δημιουργείται από γενετικές ή/και επιγενετικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε μεμονωμένα κύτταρα. Αυτές οι μεταλλάξεις απορυθμίζουν τις ενδοκυττάρειες οδούς σηματοδότησης, με αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική ανάπτυξη, την επιβίωση (επέκταση των μη φυσιολογικών κυττάρων και δημιουργία του όγκου) και την εισβολή τους σε άλλους ιστούς. Οι πρώτες μεταλλάξεις οδηγούν σε άμετρο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Οι δεύτερες μεταλλάξεις σχετίζονται με την επιβίωση, επηρεάζοντας τη διαφοροποίηση μέσω της μεταγραφής, της γονιδιακής έκφρασης, της καταστολής ογκογονιδίων με αποτέλεσμα την αντιγραφική αθανασία, την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και την αγγειογένεση. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κακοηθών όγκων που διαρρηγνύουν τις μεμβράνες τους δημιουργώντας μετάσταση. (Korgaonkar et al, 2019)



Εικόνα 1: Στάδια μετασχηματισμού κυττάρου σε καρκινικό (Korgaonkar et al, 2019)

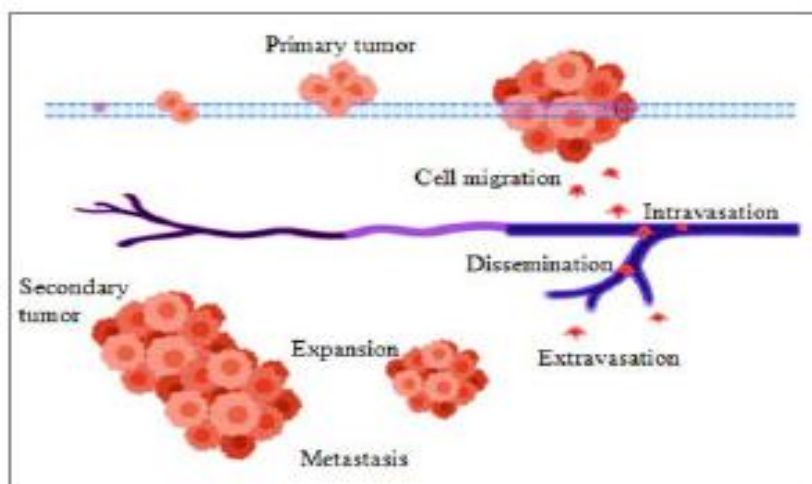
Το βασικότερο στάδιο της καρκινογένεσης είναι η ανάπτυξη του όγκου, η οποία σχετίζεται με το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης και με την συσσώρευση των

κυττάρων. (Bignold, 2020) Η εμφάνιση του καρκίνου συμβαίνει μετά από πολλές διαδοχικές μεταλλάξεις στα γονίδια, οι οποίες τροποποιούν κύριες κυτταρικές λειτουργίες, όπως πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, μεταγραφή και γενετική έκφραση. (Korgaonkar et al, 2019) Ένα άλλο αίτιο της καρκινογένεσης αποτελούν οι επιγενετικές τροποποιήσεις αλλά και κάποιες αλλαγές που μπορεί να πραγματοποιηθούν στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου. (Gomez et al, 2020; Dieterich et al, 2020)

Όταν ένα κύτταρο υποστεί ζημιά στο γενετικό του υλικό σταματάει τον πολλαπλασιασμό και προσπαθεί να επιδιορθώσει τη ζημιά. Εάν η βλάβη είναι αρκετά εκτεταμένη, τότε το κύτταρο υπόκειται σε μια μορφή προγραμματισμένου θανάτου, απόπτωση. Μερικά κύτταρα έχουν την ικανότητα αποφυγής της απόπτωσης, διαιωνίζοντας την βλάβη στις επόμενες γενεές, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του πρώτου καρκινικού κυττάρου. (Nenclares et al, 2020)

Η διαδικασία της καρκινογένεσης επηρεάζεται και από την εξωκυττάρια μήτρα, η οποία έχει υποστηρικτικό ρόλο στην ανάπτυξη, επιβίωση και μετάσταση του όγκου. Αυτό μπορεί να το επιτύχει ακόμα και με μικρές βιοφυσικές και βιοχημικές αλλαγές. (Walker et al, 2018) Καθώς ο όγκος αναπτύσσεται και εξελίσσεται στο μικροπεριβάλλον του δημιουργούνται συνθήκες υποξίας, δηλαδή παρατηρείται έλλειψη οξυγόνου. Αυτό συμβαίνει γιατί ο όγκος ξεπερνά τα όρια διάχυσης της τοπικής παροχής του αίματος και τα αγγεία που διαθέτει δεν επαρκούν για την πρόσληψη οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Συχνά ο κεντρικός πυρήνας των όγκων απαρτίζεται από νεκρά ή νεκρωτικά κύτταρα, αφού το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά δεν επαρκούν. (Al-Akra et al, 2019) Για να μπορέσει ο όγκος να προσλάβει όλα τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο που χρειάζεται για την ανάπτυξη του, πραγματοποιεί αγγειογένεση, η οποία υποστηρίζεται από την εξωκυττάρια μήτρα. Εκτός από τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο μέσα στον όγκο υπάρχει μεταφορά μεγάλης ποσότητας πλάσματος στην εξωκυττάρια μήτρα, με αποτέλεσμα τη λεμφαγγειογένεση για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί αποστράγγιση όλου του περιττού πλάσματος. (Dieterich et al, 2020)

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να μεταναστεύσουν σε μια δευτερεύουσα θέση μέσω του μικροπεριβάλλοντος του, δηλαδή μέσω των αιμοφόρων αγγείων, του ενδοθηλίου και του ιστού. (Korgaonkar et al, 2019) Η επιλογή του κατάλληλου μέρους γίνεται με βάση την παροχή της ευνοϊκής προσφοράς κατάλληλων αυξητικών παραγόντων. Το τελευταίο στάδιο της μετάστασης είναι προσκόλληση στο ενδοθήλιο του αιμοφόρου αγγείου και η εξαγγείωση του αγγείου. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό για το καρκινικό κύτταρο, καθώς μέσω της προσκόλλησης μπορεί να επιτύχει τον πολλαπλασιασμό του και τη διείσδυση στην νέα τοποθεσία, λόγω της νέας πρόσληψης από παροχή του αίματος. Ένα ακόμα σημαντικό κομμάτι αποτελεί η επιθηλιακή προς τη μεσεγχυματική μετάβαση, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εισβολής και της μετάστασης. Όταν ο όγκος φτάσει στον τελικό προορισμό θα σχηματίσει μια μεταστατική εναπόθεση, η οποία εμφανίζεται συχνά με μια μετάβαση από μεσεγχυματικό σε επιθηλιακό. Η μετανάστευση σε άλλα όργανα γίνεται σε συγκεκριμένα όργανα, ανάλογα με το όργανο προέλευσης που εμφανίζεται ο καρκίνος. Η έκφραση των υποδοχέων χημειοκίνης από τα καρκινικά κύτταρα επιτρέπουν την αναζήτηση ενός κατάλληλου περιβάλλοντος για μια καινούργια αποικία. (Nenclares et al, 2020)



Εικόνα 2: Μετάσταση των καρκινικών κυττάρων από τον όγκο σε δευτερεύουσα τοποθεσία και ανάπτυξη όγκου σε αυτή. (Korgaonkar et al, 2019)

1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αναμένεται ότι περίπου το 38,4% του πληθυσμού παγκοσμίως θα έχει διαγνωστεί με κάποια μορφή καρκίνου στην ζωή του. Εκτιμάται στις υποανάπτυκτες χώρες θα βρίσκεται 60% των συνολικών κρουσμάτων παγκοσμίως μέχρι το 2030. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας, αποτελεί τον πιο διαγνωσμένο καρκίνο στους άντρες παγκοσμίως και τον τρίτο στις γυναίκες. Έχουν καταγραφεί 2 εκατομμύρια περιπτώσεις, ανά τον κόσμο με 1,76 εκατομμύρια θανάτους, με αποτέλεσμα την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρκίνο. Τα πρόσφατα διαγνωσμένα περιστατικά έχουν κατά 19,4% πιθανότητα να επιβιώσουν για πέντε χρόνια, ποσοστό το οποίο έχει μειωθεί αρκετά τα τελευταία σαράντα χρόνια. Αυτά τα ποσοστά δείχνουν ότι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι αυτός με τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης. (Al Qudah et al, 2021) Περίπου το 80%-85% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα έχουν ιστορικό καπνίσματος, αλλά περίπου το 10%-15% των καπνιστών έχουν αναπτύξει κάποια μορφή καρκίνου στην ζωή τους, υποδεικνύοντας ότι οι κληρονομικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα, που αναπτύσσεται σε πρώην και νυν καπνιστές θα μπορούσε να είχε αποφευχθεί με την πρόληψη και τη διακοπή του καπνίσματος. Το 90% των καρκίνων θα μπορούσε να αποφευχθεί εάν τα άτομα μπορούσαν να σταματήσουν το κάπνισμα πριν τη μέση ηλικία. (Mao et al, 2016) Οι καπνιστές με οικογενειακό ιστορικό του καρκίνου του πνεύμονα παρουσιάζουν δύο έως τρεις φορές αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο του πνεύμονα. Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα διαφέρει στους καπνιστές ανάλογα με την καταγωγή τους. Η ευαισθησία και ο μεταβολισμός της νικοτίνης σχετίζεται με το έθνος και τη φυλή του καθένα. (Gesthalter et al, 2017)

Αν και η κύρια αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα (ενεργητικό, παθητικό, κάπνισμα μαριχουάνας ή κοκαΐνης), δεν είναι και η μοναδική. Η καύση της βιομάζας, η μόλυνση του αέρα, η έκθεση σε ουράνιο, ράδιο και ραδόνιο όπως και η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες στο εργασιακό περιβάλλον όπως αμίαντος και η γενετική προδιάθεση έχουν βρεθεί υπεύθυνα για τον καρκίνο του πνεύμονα. (Mao et al, 2016)

1.2.1 Τύποι του καρκίνου του πνεύμονα

Η ταξινόμηση των καρκίνων του πνεύμονα βασίζεται στη μικροσκοπική εξέταση χρωματισμένων δειγμάτων, στην ανοσοϊστοχημεία και τη γενετική ανάλυση. Οι περισσότεροι καρκίνοι του πνεύμονα χωρίζονται σε τέσσερις ιστολογικές κατηγορίες.

1.2.1.1 ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Αφορά περίπου το 20-25% των καρκίνων του πνεύμονα. Οι κακοήθειες εντοπίζονται στο επιθηλιακό στρώμα του βρογχικού τοιχώματος, μετά από μια σειρά ιστολογικών ανωμαλιών, που προκύπτουν από επαναλαμβανόμενο τραυματισμό. Συνήθως βρίσκονται σε σχετικά μεγάλους ή εγγύς αεραγωγούς, στο υποτμηματικό, τμηματικό ή λοβιακό επίπεδο. Η ανάπτυξη του όγκου στο βρογχικό αυλό είναι ικανή να αποφράξει τον αεραγωγό. Αρχικά δημιουργείται μεταπλασία στα βρογχικά κινοειδή επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία αντικαθίστανται από πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα. Με τον καιρό τα κύτταρα αυτά γίνονται όλο και πιο άτυπα, μέχρι την ανάπτυξη τους σε ένα μη διηθητικό καρκίνωμα. Σε κάποια φάση το καρκίνωμα εκτείνεται πέρα από το βρογχικό βλεννογόνο και γίνεται διεισδυτικό. Η διάγνωση του γίνεται μέσω κυτταρολογικής εξέτασης πτυέλων ή με τη βιοψία του βρογχικού βλεννογόνου. (Weinberg et al, 2019; Wistuba et al, 2018) Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από κερατινοποίηση και μεσοκυττάρια γέφυρες. (Wistuba et al, 2018) Δεν έχει την τάση να πραγματοποιεί μετάσταση, αλλά προβλήματα μέσα στο θώρακα. Συνήθως προσβάλλει άτομα που καπνίζουν. Η συνολική πρόγνωση είναι καλύτερη σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου. (Weinberg et al, 2019)

1.2.1.2 ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Είναι υπεύθυνο για το 14% του καρκίνου του πνεύμονα. Οι κακοήθειες προέρχονται από το βρογχικό τοίχωμα με διήθηση του βρογχικού υποβλεννογόνου και του περιβρογχικού ιστού, συχνά εντοπίζονται στο επίπεδο των εγγύς αεραγωγών. (Weinberg et al, 2019; Wistuba et al, 2018) Ο όγκος αυτού του είδους καρκίνου εμφανίζεται ως μεγάλη μάζα με εκτεταμένη νέκρωση. Σε ποσοστό μικρότερο του 5% των περιπτώσεων, μπορεί να παρουσιαστεί ως μονήρης πνευμονικός όζος. (Wistuba et al, 2018) Η τοπική ανάπτυξη του όγκου συνήθως ακολουθεί ένα υποβλεννογόνο μοτίβο, αφού έχει την ικανότητα να εισβάλλει γρήγορα στα λεμφικά και στα

υποβλεννογόνια αιμοφόρα αγγεία. Καθώς η νόσος προχωράει, μεγεθύνονται οι λαγόνιοι και οι μεσοθωρακικοί κόμβοι, λειτουργώντας ως σήμα κατατεθέν στην ακτινογραφία. (Weinberg et al, 2019) Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται μικρά, σκούρα με λιγοστό κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες τους είναι δυσδιάκριτοι στρογγυλοί με λεπτή κοκκιώδη χρωματίνη ή απόντες. (Weinberg et al, 2019; Wistuba et al, 2018) Για τη διάγνωση, χρησιμοποιούνται κυτταρολογικά δείγματα και όχι δείγματα από βιοψία. Αυτό συμβαίνει γιατί λόγω της τεχνικής που χρησιμοποιείται, κατά τη διάρκεια της βιοψίας, τα κύτταρα συνθλίβονται τεχνικά, με αποτέλεσμα λίγα εξ αυτών να είναι βιώσιμα. (Wistuba et al, 2018) . Αυτή η μορφή καρκίνου έχει συσχετιστεί άμεσα με το κάπνισμα. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος εμφανίζει πρόωμη μετάσταση επηρεάζοντας συχνά τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τα οστά, το μυελό των οστών και τα επινεφρίδια, έχοντας τη χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους υπόλοιπους καρκίνους (Weinberg et al, 2019)

1.2.1.3 ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου, προσπερνώντας ακόμα και το πλακώδες καρκίνωμα, αποτελώντας το 50% των περιπτώσεων. Συνήθως εντοπίζεται στην περιφέρεια του πνεύμονα , με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συσχετιστεί με το βρογχικό τοίχωμα. Το πιο πιθανό μέρος εμφάνισης του είναι το επίπεδο των βρογχιολίων, ή των κυψελιδικών τοιχωμάτων. Συνήθως βρίσκονται σε εντοπισμένη παρεγχυματική ουλή ή σε διάχυτη ινωτική διαδικασία. Έχει την τάση να σχηματίζει αδένες, οι οποίοι σε πολλές περιπτώσεις παράγουν βλέννα. Εμφανίζεται σαν περιφερειακός όζος ή μάζα, σε σχετικά μεγάλο βρόγχο με αποτέλεσμα να γίνεται κλινικά εμφανής λόγω της απόφραξης, που δημιουργεί. Ένας άλλος χαρακτηριστικό του είναι ότι ανήκει στην λεπιδική υποκατηγορία , δηλαδή είναι διηθητικός και φαίνεται να αναπτύσσεται κατά μήκος των προϋπαρχόντων κυψελιδικών τοιχωμάτων, χρησιμοποιώντας τα ως σκαλωσιά. Είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα σε μη καπνιστές, καθώς αποτελούν το 18%, ενώ στους υπόλοιπους τύπους του καρκίνου του πνεύμονα οι μη καπνιστές δεν καταλαμβάνουν τόσο μεγάλα ποσοστά. Συνήθως εξαπλώνεται τοπικά σε παρακείμενες περιοχές του πνεύμονα και στον υπεζωκότα, ενώ επίσης προσβάλλει τον αυλό και τους λεμφαδένες στο μεσοθωράκιο. Παρ' όλα αυτά πραγματοποιεί και μεταστάσεις στο ήπαρ, τα οστά, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στα επινεφρίδια. (Weinberg et al, 2019)

1.2.1.4 ΜΕΓΑΛΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Περίπου το 3 % των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα νοσούν από μεγαλοκυτταρικό καρκίνο. (Weinberg et al, 2019) Έχει την τάση να εμφανίζεται στην περιφέρεια του πνεύμονα. Για να πραγματοποιηθεί σωστά η διάγνωση απαιτείται λεπτομερή δειγματοληψία του όγκου με εκτομή και όχι σε μικρά δείγματα ή σε κυτταρολογικά δείγματα. Συνήθως σχηματίζει ένα σφαιρικό όγκο με καλά καθορισμένα όρια και έχει μια διογκωμένη, σαρκώδη, ομοιογενή και μάλλον

σαρκωματώδη εμφάνιση, συχνά παρατηρείται νέκρωση και σπάνια σπηλαίωση. (Wistuba et al, 2018) Μικροσκοπικά εμφανίζονται ως συμπαγείς φωλιές πολυγωνικών κυττάρων με φυσαλιώδεις και προεξέχοντες πυρήνες και μέτρια ποσότητα κυτταροπλάσματος και καλά καθορισμένα κυτταρικά όρια και ένα λιγοστό ιναγγειακό στρώμα. Κυτταρολογικά, αρχιτεκτονικά και ανοσοϊστοχημικά έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με το αδενοκαρκίνωμα. (Weinberg et al, 2019; Wistuba et al, 2018) Επίσης έχουν κοινά χαρακτηριστικά σε σχέση με την εξάπλωση και τη συνολική πρόγνωση. Είναι ο πιο δύσκολος τύπος καρκίνου σε σχέση με τη διάγνωσή του, καθώς οι όγκοι ορίζονται όταν τους λείπουν χαρακτηριστικά που συναντώνται στα υπόλοιπα τρία είδη καρκίνου. Για αυτό το λόγο η διάγνωση πραγματοποιείται με εις άτοπον απαγωγή. (Weinberg et al, 2019)

1.3 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ

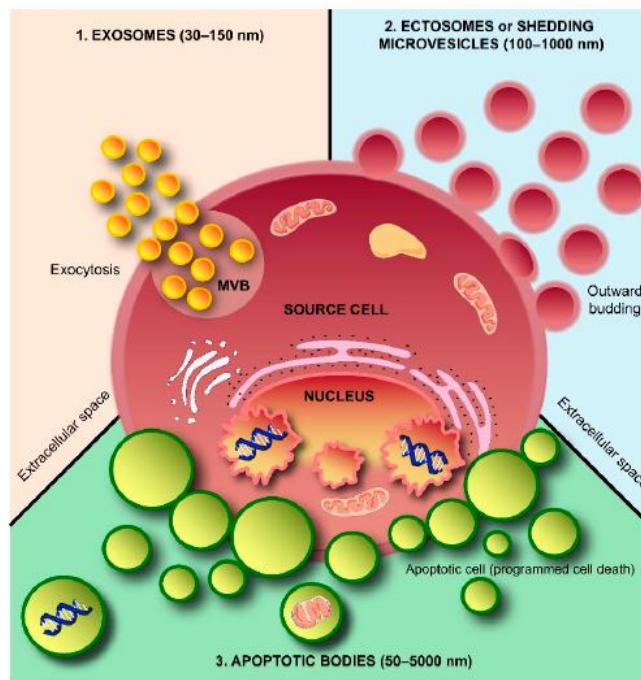
Μερικά εξειδικευμένα κύτταρα απελευθερώνουν εκκριτικά κυστίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά ορμονών ή νευροδιαβιβαστών. Όμως, όλων των ειδών των κυττάρων, εκκρίνουν εξωκυττάρια κυστίδια, καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. (van Niel et al, 2018) Ως εξωκυττάρια κυστίδια ορίζονται τα σωματίδια τα οποία απελευθερώνονται φυσικά από τα κύτταρα, αναφέρονται ως ένας ετερογενής πληθυσμός φυσαλιδωδών σωμάτων κυτταρικής προέλευσης, τα οποία παράγονται είτε από ενδοσωμικά διαμερίσματα, είτε ως αποτέλεσμα αποβολής του πλάσματος. (B.Qin et al, 2021) Η έκκριση τους μπορεί να πραγματοποιηθεί, είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες, είτε ως αντίδραση σε κάποιο ερέθισμα και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. (Farooqi et al, 2018; B.Qin et al, 2021; Kalra et al, 2016) Ο αριθμός των εξωκυττάρων κυστιδίων συσχετίζεται με την κυτταρική απόκριση, όπως κυτταρική ενεργοποίηση, αλλαγές στο pH, υποξία, κυτταρική βλάβη και κυτταρικό στρες. (Ahmadzade et al, 2020) Μπορούν να παραχθούν, σε ποικίλα σχήματα και μεγέθη, με το μέγεθος τους να κυμαίνεται από 30 έως 1000nm. Η μεμβράνη τους απαρτίζεται από μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία είναι εμπλουτισμένη με χοληστερόλη, φωσφατιδυλοσερίνη, σφιγγομυελίνη, κεραμίδιο, σφιγγολιπίδια και χαμηλή ποσότητα φωσφατιδυλοχολίνης, ενώ στο εσωτερικό τους μεταφέρουν DNA, RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, κυτταρικά υπολείμματα και μεταβολίτες. (Ahmadzade et al, 2020; Kalra et al, 2016) Το αποκτηθέν φορτίο των εξωκυττάρων κυστιδίων προκύπτει από τα κύτταρα, που τα απελευθερώνουν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να αντιπροσωπεύουν την κατάσταση των γονικών τους κυττάρων. (Farooqi et al, 2018; B.Qin et al, 2021)

Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση ότι τα κύτταρα χρησιμοποιούν τα εξωκυττάρια κυστίδια για να αποβάλλουν τα άχρηστα τους συστατικά. Αλλά με τον καιρό, διαπιστώθηκε ότι τα εξωκυττάρια κυστίδια λειτουργούν σαν οχήματα σηματοδότησης και χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα ως μέσο επικοινωνίας και ανταλλαγής υλικού μεταξύ τους. Το υλικό, που μεταφέρεται και ανταλλάσσεται, αποτελείται κυρίως από νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια. (van Niel et al, 2018) Τα κύτταρα, τα οποία

ανταλλάσσουν τα εξωκυττάρια κυστίδια μεταξύ τους, μπορεί να είναι γειτονικά και να έχουν και μια άμεση κυτταρική αλληλεπίδραση. Αλλά, μπορεί να είναι και απομακρυσμένα και να συνδέονται μέσω της έκκρισης διαλυτών παραγόντων. (Kalra et al, 2016; Farooqi et al, 2018)

1.3.1 Υποπληθυσμοί Εξωκυτταρίων Κυστιδίων

Ο πληθυσμός των εξωκυτταρίων κυστιδίων είναι ετερογενής, με αποτέλεσμα να αποτελείται από υποπληθυσμούς. Η ταξινόμηση τους, γίνεται κυρίως με βάση τη βιογένεση τους και το μέγεθος τους. Κάποια άλλα χαρακτηριστικά, που βοηθούν στην ταξινόμηση τους, είναι η μορφολογία τους, η πυκνότητά τους, το φορτίο τους (RNA, DNA και πρωτεΐνες) και τα μόρια που φέρουν στην επιφάνεια. (B. Qin et al, 2021) Τα εξωκυττάρια κυστίδια που παράγονται, χωρίζονται σε τρεις ευρείες κατηγορίες: τα αποπτωτικά κυστίδια, τα μικροκυστίδια και τα εξωσώματα. Τα μεγαλύτερα εξωκυττάρια κυστίδια είναι τα αποπτωτικά κυστίδια, τα οποία έχουν μέγεθος από 200nm έως και τα 5μm. Η αποβολή τους πραγματοποιείται από την πλασματική μεμβράνη και αποβάλλονται από κύτταρα που πεθαίνουν, κατά τα τελευταία στάδια της απόπτωσης. Τα αποπτωτικά σωματίδια φέρουν κυτταρικά υπολείμματα, τα οποία αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και στην συνέχεια εξαλείφονται από τα γειτονικά του κύτταρα. (B. Qin et al, 2021; Kalra et al, 2016; Lässer et al, 2018) Τα μεσαίου μεγέθους εξωκυττάρια κυστίδια ονομάζονται μικροκυστίδια ή εκτοσώματα. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 100 nm μέχρι 800 nm. Ο σχηματισμός τους γίνεται μέσω απευθείας εκβλάστησης προς τα έξω ή μέσω φυσαλίδων, που εμφανίζονται σε συγκεκριμένα σημεία της πλασματικής μεμβράνης. Το φορτίο που φέρουν, τοποθετείται ειδικά από το κύτταρο μέσα σε αυτά. Το κύτταρο χρησιμοποιεί αυτά τα εξωκυττάρια κυστίδια για διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Όταν ένα κύτταρο υποδέχεται ένα μικροκυστίδιο, δεσμεύεται μέσω ειδικών υποδοχέων προσκόλλησης. Η μεμβράνη του μικροκυστιδίου, συγχωνεύεται με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, με αυτό τον τρόπο μεταφέρονται υποδοχείς που επάγουν την κυτταρική σηματοδότηση και άλλους μηχανισμούς. (Ahmadzada et al, 2020; Lässer et al, 2018) Τα πιο μικρά εξωκυττάρια κυστίδια ονομάζονται εξωσώματα, με μέγεθος 30nm -150nm. Η προέλευσή τους προέρχεται από συγχώνευση των πολυκυστιδιακών σωμάτων με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας ενδοαυλιακά κυστίδια. (Lässer et al, 2018)



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της απελευθέρωσης των υποπληθυσμών των εξωκυττάρων κυστιδίων από ένα φυσιολογικό κύτταρο. (Kalra et al, 2016)

Εκτός από τα παραπάνω εξωκυττάρια κυστίδια, διαπιστώθηκε ότι παράγεται και ένας ακόμα υποπληθυσμός, τα ογκοσώματα. Αυτό που διαχωρίζει αυτόν τον υποπληθυσμό, από τους προηγούμενους, είναι ότι παράγεται μόνο από επιθετικά καρκινικά κύτταρα. Τα ογκοσώματα ταξινομούνται με βάση το μέγεθος τους σε δύο κατηγορίες: τα ογκοσώματα (100- 400 nm) και τα μεγάλα ογκοσώματα (1-10μm). Η βιογένεση τους, πραγματοποιείται από την πλασματική μεμβράνη, όπως και τα μικροκυστίδια. Το μοριακό φορτίο που φέρουν είναι ογκογόνο. (Ahmadzada et al, 2020)

1.3.2 Εξωσώματα

Τα εξωσώματα είναι ο πιο μικρός σε μέγεθος υποπληθυσμός των εξωκυττάρων κυστιδίων. Στην αρχή, θεωρήθηκε ότι το κύτταρο τα χρησιμοποιούσε ως μέσο για να απορρίψει κάποια κυτταρικά υπολείμματα, όπως περιττά ενδοκυτταρικά οργανίδια. Στην συνέχεια όμως διαπιστώθηκε, ότι τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία και συμμετέχουν και σε άλλες διεργασίες, όπως διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση, βοηθούν στην διαφοροποίηση και την αύξηση του κυττάρου και διευκολύνουν τη μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων. (Farooqi et al, 2018; Liu et al, 2020)

Η βιογένεση τους ξεκινάει με την είσοδο κάποιων εξωκυττάρων μορίων στο κύτταρο, η οποία πραγματοποιείται μέσω ενδοκυττάρωσης, σχηματίζοντας τα πρώιμα ενδοσώματα. Στην συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία και ταξινομούνται σε επιλεκτικά διαμερίσματα, που ονομάζονται ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs). Ένα μέρος των ενδοαυλικών κυστιδίων, συγχωνεύεται με τα ενδοκυτταρικά κυστίδια και αποικοδομούν ή κυκλώνουν το περιεχόμενό τους. Τα υπόλοιπα ενδοσώματα, μετατρέπονται σε όψιμα ενδοσώματα, που ονομάζονται πολυκυστιδιακά σώματα (MVBs). Μερικά από τα MVBs συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα να αποικοδομηθεί το περιεχόμενό τους, καθώς το φορτίο που φέρουν θεωρείται από το κύτταρο ως κυτταρικά απόβλητα. Τα υπόλοιπα, με την βοήθεια των ESCRT πρωτεϊνών, συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, ως εξωσώματα. (Ahmadzada et al, 2020; Xu et al, 2021)

Καθώς η δημιουργία της πλασματικής μεμβράνης των εξωσωμάτων πραγματοποιείται με την σύντηξη της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, που τα απελευθερώνει, έχει ως αποτέλεσμα η σύστασή τους να είναι η ίδια. Επομένως, η σύνθεση της αντιπροσωπεύει το γονικό τους κύτταρο, επιτρέποντας τη διάκριση μεταξύ των εξωσωμάτων, που προέρχονται από διαφορετικά κύτταρα. Τα εξωσώματα περιβάλλονται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία φέρει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. (Farooqi et al, 2018) Μερικά από τα λιπίδια που εμπλουτίζουν την μεμβράνη είναι το κεραμίδιο, η χοληστερόλη και τα σφιγγολιπίδια. (Kalra et al, 2016) Ανάμεσα σε αυτά τα λιπίδια υπάρχουν και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από τα ενδοσώματα και ρυθμίζουν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. (Farooqi et al, 2018; Kalra et al, 2016) Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες υπάρχουν αυτές που εμπλέκονται στον σχηματισμό των MVBs (Alix και TSG101), αυτές που διευκολύνουν τη μεταφορά και τη σύντηξη της μεμβράνης (αννεξίνες, φλοτιλλίνες και GTPάσες) και αυτές που βοηθούν στην προσκόλληση (ιντεγκρίνες) και τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81 και CD82). Επιπλέον, φέρουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση αντιγόνου (μόρια κατηγορίας MHC), πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP70, HSP90) και κάποιες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα λιπίδια. Όλες αυτές οι κατηγορίες πρωτεϊνών βοηθούν στην ταυτοποίηση των εξωσωμάτων ανεξαρτήτου κυτταρικής προέλευσης. (Farooqi et al, 2018; Kalra et al, 2016) Η μεμβράνη στα καρκινικά κύτταρα έχει διαφορετική σύσταση από αυτή στα φυσιολογικά κύτταρα. Η μεμβράνη είναι σημαντική για κάθε εξώσωμα, καθώς είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μεταξύ με τα άλλα εξωσώματα αλλά και με τα κύτταρα δέκτες. (Farooqi et al, 2018)

Η λιπιδική μεμβράνη αποτρέπει την αποικοδόμηση του περιεχόμενου των εξωσωμάτων. Το φορτίο των εξωσωμάτων περιέχει γενετικό υλικό, πρωτεΐνες και λιπίδια, που προέρχονται από τα κύτταρα που τα απελευθερώνουν. Το φορτίο αυτό εξαρτάται από το κυτταρικό τύπο και την προέλευση του κάθε κυττάρου. (Liu et al, 2021) Τα εξωσώματα εισέρχονται στο κύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια που βρίσκονται στη μεμβράνη των εξωσωμάτων, αλληλεπιδρούν με τα συμπληρωματικά μόρια, που βρίσκονται πάνω στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου δέκτη και ακολούθως εσωτερικεύονται. Ενώ το περιεχόμενο, με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, εισέρχεται στο

κυτταρόπλασμα, επιτρέποντας την οριζόντια μεταφορά του φορτίου τους. (Farooqi et al, 2018; van Niel et al, 2018) Το φορτίο των εξωσωμάτων είναι ικανό να ρυθμίσει τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου-δέκτη, όπως την έκφραση των γονιδίων, όπως και να ενεργοποιήσει οδούς σηματοδότησης του κυττάρου δέκτη. Οι λειτουργίες των εξωσωμάτων ποικίλουν και εξαρτώνται από την προέλευση του κυττάρου και του ιστού. (Farooqi et al, 2018)

Το φορτίο τους μπορεί να ενεργοποιήσει οδούς σηματοδότησης στα κύτταρα στόχους. (Liu et al, 2020)

1.3.3 Εξωσώματα στα Βιολογικά Υγρά

Τα εξωσώματα βρίσκονται σε αφθονία στα βιολογικά υγρά του σώματος. Αυτό συμβαίνει, καθώς όλα τα κύτταρα εκκρίνουν στον εξωκυττάριο χώρο τους εξωσώματα. Μετά την απελευθέρωση τους από το κύτταρο, τα εξωσώματα χρησιμοποιούν τα βιολογικά υγρά για να βρουν τα κύτταρα-στόχους, με σκοπό να μεταφέρουν το φορτίο τους. Η μεταφορά του φορτίου μπορεί να γίνει σε γειτονικά κύτταρα μέσω της παρακρινής σηματοδότησης ή/και σε μακρινά κύτταρα που γίνεται μέσω ενδοκρινής σηματοδότησης. Από τη στιγμή που τα εξωσώματα φέρουν πληροφορίες των προγονικών τους κυττάρων και βρίσκονται σε πληθώρα στα σωματικά υγρά, καθιστά τα εξωσώματα ιδανικούς βιοδείκτες και πληρούν όλες τις προϋποθέσεις για την εξειδίκευση που χρειάζεται μια διάγνωση. Η ανάλυση τους είναι οικονομική και ελάχιστα επεμβατική. Μερικά από τα σωματικά υγρά που εντοπίζονται τα εξωσώματα είναι το αίμα, το σάλιο, το μητρικό γάλα, το αρθρικό υγρό, τα ούρα, το σπέρμα και το ωοθυλακικό υγρό. (Farooqi et al, 2018)

1.3.4 Εξωσώματα και Καρκίνος

Όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα έτσι και τα καρκινικά εκκρίνουν εξωσώματα στον εξωκυττάριο χώρο. Έχει διαπιστωθεί, ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν δέκα φορές περισσότερα εξωσώματα από ένα φυσιολογικό κύτταρο. Αυτή η αύξηση στην απελευθέρωση των εξωσωμάτων, επιτρέπει στο καρκινικό κύτταρο να αποστείλει το ογκογόνο και το μεταστατικό του φορτίο σε φυσιολογικά αλλά και σε άλλα καρκινικά κύτταρα. (Farooqi et al, 2018) Λόγω της αυξημένης παρουσίας τους στα σωματικά υγρά, μπορούν εύκολα να απομονωθούν, με σκοπό την έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση του καρκίνου. (Liu et al, 2020)

Τα εξωσώματα εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε διαφορετικά βιολογικά φαινόμενα όπως τον πολλαπλασιασμό, στην πρόκληση αγγειογένεσης, την κυτταρική μετανάστευση, τις φλεγμονώδεις

αποκρίσεις, την ανοσοκαταστολή, τη διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση και τη μετάσταση. (Thakur et al, 2021)

Ο όγκος δημιουργεί το δικό του μικροπεριβάλλον και εξαρτάται από αυτό, ενώ παράλληλα στηρίζει την ανάπτυξη του και τη μετάσταση του μέσα σε αυτό. Το μικροπεριβάλλον είναι σημαντικό για τον όγκο, καθώς του δίνει πρόσφορο έδαφος να δημιουργήσει μια ισχυρή επικοινωνία με τα γειτονικά του κύτταρα αλλά και με κύτταρα που βρίσκονται μακριά από αυτόν. (Xu et al, 2021; Thakur et al, 2021) Για την εξέλιξη του όγκου είναι σημαντικό η επικοινωνία να είναι μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων. (Stefanius et al, 2021) Όμως, για τη διαμόρφωση του συμμετέχουν τα εξωσώματα, τα οποία μέσω της παρακρινής σηματοδότησης, αποτελούν το όχημα επικοινωνίας μεταξύ του όγκου και των στρωματικών κυττάρων. (Stefanius et al, 2021) Τα καρκινικά κύτταρα μεταφέρουν το ογκογόνο φορτίο τους, τροποποιώντας το φαινότυπο των φυσιολογικών κυττάρων, που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον, προωθώντας την ανάπτυξη του πρωτογενούς όγκου. (Thakur et al, 2021) Αυτή η μεταφορά, προάγει την εξέλιξη του καρκίνου, βοηθώντας την ανάπτυξη ετερογενών δορυφορικών όγκων, που βρίσκονται δίπλα στον πρωτοπαθή καρκίνο. Όλη αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων όγκων, με αποτέλεσμα τη μετάσταση. (Stefanius et al, 2021) Επιπροσθέτως, τα εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα, υποστηρίζουν την μετάσταση προκαλώντας αλλαγές στο μικροπεριβάλλον. Αυτό το επιτυγχάνουν με την δημιουργία ενός όξινου περιβάλλοντος ή με την προετοιμασία της προμεταστατικής θέσης. (Thakur et al, 2021)

Τα εξωσώματα συμμετέχουν στη ρύθμιση της επιθηλιακής-μεσεγγχυματικής μετάβασης. (EMT) και στην αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας. (Liu et al, 2020) Κατά τη διαδικασία της μετάβασης τα κύτταρα αποκτούν μεσεγγχυματικά χαρακτηριστικά, δηλαδή χάνουν την πολικότητα τους, με αποτέλεσμα την απώλεια της σύνδεσης μεταξύ τους. Αφού αποκολληθούν από τον όγκο, εισέρχονται σε κατάσταση χαμηλού πολλαπλασιασμού και αποκτούν ενισχυμένη ικανότητα μετανάστευσης και εισβολής. (Thakur et al, 2021; Liu et al, 2020)

Τα καρκινικά εξωσώματα ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε καρκινικούς ινοβλάστες (CAF) , οι οποίοι προάγουν τη μετάσταση του όγκου ενεργοποιώντας το EMT. (Stefanius et al, 2021; Thakur et al, 2021) Παράλληλα, τα καρκινικά εξωσώματα προάγουν την αγγειογένεση, οπότε μέσω των νέων αγγείων να μπορούν να τεθούν στην κυκλοφορία του αίματος με σκοπό τη μετάσταση. Τέλος διευκολύνουν το σχηματισμό προμεταστατικών κόγχων και προσδιορίζουν την οργανοτροφική μετάσταση. (Stefanius et al, 2021; Liu et al, 2020)

1.4 ΒΡΟΓΧΟΣΚΟΠΗΣΗ

Η βρογχοσκόπηση, είναι μια εξέταση κατά την οποία ο ιατρός μπορεί να εξετάσει οπτικά τους αεραγωγούς του ασθενούς. (Wood, 2019) Πιο συγκεκριμένα η ευέλικτη βρογχοσκόπηση αποτελεί ένα διαγνωστικό και θεραπευτικό εργαλείο για τη διαχείριση περίπλοκων και δύσκολων στη θεραπεία αναπνευστικών παθήσεων. Μια από τις παθήσεις, στις οποίες συνίσταται η χρήση της βρογχοσκόπησης, είναι ο καρκίνος του πνεύμονα. Μέσω της βρογχοσκόπησης μπορεί όχι μόνο να διαγνωσθεί ο καρκίνος αλλά και να γίνει και η σταδιοποίηση αυτού. Η εύκαμπτη βρογχοσκόπηση πραγματοποιείται υπό συνειδητή καταστολή και με τοπική αναισθησία. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, με ποσοστό σοβαρών επιπλοκών και θνησιμότητα, να κυμαίνεται κοντά στο 1%. (Modoni et al, 2020)

1.5 ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ

Μια βρογχοσκοπική μέθοδος δειγματοληψίας είναι το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Είναι μια αρκετά ασφαλής και ελάχιστα επεμβατική διαδικασία, η οποία συνίσταται σε ασθενείς με διάφορες παθήσεις του πνεύμονα, όπως ο καρκίνος. Με αυτή την τεχνική μπορούν να ληφθούν δείγματα για κυτταρολογικές και μικροβιολογικές εξετάσεις. Είναι μια μέθοδος που πραγματοποιείται πριν από οποιαδήποτε βιοψία, αφού πρώτα γίνει αξιολόγηση του τραχειοβρογχικού δέντρου από τον ιατρό. Για τη λήψη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος εισάγεται μέσω του βρογχοσκοπίου, στο κανάλι αναρρόφησης αποστειρωμένος ορός σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος του είναι 100-300 ml και χωρίζεται σε τρία με πέντε δείγματα. Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας αρνητική πίεση αναρρόφησης, έτσι ώστε να μην καταρρεύσουν οι αεραγωγοί. (Modoni et al, 2020)

1.6 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ

Τα εξωσώματα υπάρχουν άφθονα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα είτε σε φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε παθολογικές. Τα εξωσώματα, τα οποία βρίσκονται μέσα σε αυτό παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και περιέχουν μια ποικιλία πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους. Όπως και τα υπόλοιπα εξωκυττάρια κυστίδια, συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του αναπνευστικού συστήματος. (Yamada, 2021)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση εξωσωμάτων από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα με σκοπό την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών. Η απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης με μονή στοιβάδα σουκρόζης. Στη συνέχεια, με την ανοσοαποτύπωση κατά Western γίνεται η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών CD9, CD81, TSG101 και Calnexin.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Κλινικά Δείγματα Βρογχοκυψελιδικού Εκπλύματος (BALF)

Τα 2 δείγματα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, από τα οποία απομονώθηκαν τα εξωσώματα, δόθηκαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΩΝ ΕΚΠΛΥΜΑΤΩΝ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα 1	Καλοηθές δείγμα
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα 2	Κακοηθές δείγμα

Πίνακας 1: Σύνολο εξεταζόμενων βρογχοκυψελιδικών εκπλυμάτων και η διάγνωση τους

3.1.2 Ρυθμιστικά Διαλύματα (βλ. Παράρτημα)

3.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1 Προκαθορισμός Δειγμάτων με Φυγοκέντρηση

Για την αποτελεσματικότερη απομόνωση των εξωσωμάτων, το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα υφίστανται έναν προκαταρκτικό καθαρισμό. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει βασιστεί στην μελέτη του Purushothaman, 2019 και έχει τροποποιηθεί καταλλήλως για το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκε η ταχύτητα και ο χρόνος της φυγοκέντρησης, ώστε ο προκαταρκτικός καθαρισμός να μπορέσει να ανταπεξέλθει στα χαρακτηριστικά του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος αλλά η θερμοκρασία παρέμεινε ίδια.

3.2.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για τον προκαταρκτικό καθαρισμό των δειγμάτων βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, τα στάδια είναι:

1. Φυγοκέντρηση σε gel clot activator vacutainer, (η χρήση του συγκεκριμένου tube γίνεται για να διαλυθεί οποιοδήποτε ίχνος αίματος) σε ταχύτητα 3.000 g για 15' στους 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίπτεται το ίζημα και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα falcon.
2. Φυγοκέντρηση του προηγούμενου υπερκείμενου σε ταχύτητα 6.000 g στους 4 °C για 30'. Το ίζημα, που απορρίπτεται περιέχει κυτταρικά υπολείμματα και συσσωματώματα πρωτεϊνών, ενώ το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon.
3. Φυγοκέντρηση του προηγούμενου υπερκείμενου σε ταχύτητα 20.000 g για 30' στους 4 °C. Το ίζημα απορρίπτεται και περιέχει αποπτωτικά σωμάτια. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon.
4. Αφού ολοκληρωθούν τα προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού, το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω χρήση ή να αποθηκευτεί στους -80 °C.

3.2.2 Απομόνωση Εξωσωμάτων με Υπερφυγοκέντρηση

Η απομόνωση των εξωσωμάτων από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Camroy και των συνεργατών της, το οποίο τροποποιήθηκε καταλλήλως για το συγκεκριμένο είδος δείγματος. Για την απομόνωση τους, από το δείγμα χρησιμοποιείται μονό στρώμα σουκρόζης 30%, καθώς έχει παρόμοια πυκνότητα με τα εξωσώματα. Μετά την απομόνωση τους με τη χρήση υπερφυγοκέντρου, τα εξωσώματα εμφανίζονται σε μορφή ιζήματος το οποίο επαναδιαλύεται σε PBS (Phosphate Buffered Saline). Η κατακρήμνιση τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια του PEG (Polyethylene Glycol) και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών από τα εξωσώματα, πραγματοποιείται λύση της κυτταρικής τους μεμβράνης με τη χρήση της RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay). Τέλος γίνεται ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Western Blot.

3.2.2.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

1. Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (όπως περιγράφηκε παραπάνω).
2. Τοποθετούνται 4 ml σουκρόζης 30% σε ένα φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου.
3. Καταψύχεται στους -80 °C για 20', μέχρι να παγώσει η σουκρόζη.
4. Τοποθετείται προσεκτικά το δείγμα μέχρι το λαιμό του φιαλιδίου. Εάν αυτό δεν επαρκεί, τότε συμπληρώνεται το φιαλίδιο με αποστειρωμένο PBS 1x.
5. Αφού ξεπαγώσει η σουκρόζη σε θερμοκρασία δωματίου, υπερφυγοκεντρείται σε ταχύτητα 100.000 g για 1 ώρα στους 4 °C.

6. Αναρροφούνται προσεκτικά, με χρήση φλεβοκαθετήρα, από τον πάτο του φιαλιδίου 5 ml (4 ml σουκρόζη και 1 ml επιπλέον, ώστε να συλλεχθεί όσο πιο πολύ μεγάλη ποσότητα των εξωσωμάτων).
7. Η ποσότητα που αναρροφείται τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου.
8. Το φιαλίδιο συμπληρώνεται με PBS, πραγματοποιώντας παράλληλα καλή ανάδευση με χρήση πιπέτας pasteur.
9. Υπερφυγοκεντρείτε σε ταχύτητα 200.000 g για 2 ώρες στους 4 °C.
10. Το πάνω μέρος του φιαλιδίου αφαιρείται προσεκτικά με νυστέρι, για να μπορέσει με επιτυχία να απορριφθεί το υπερκείμενο και αφήνεται στο πάγκο για μερικά λεπτά για να στεγνώσει το ίζημα.
11. Το ίζημα, που περιέχει τα εξωσώματα, διαλύεται καλώς σε 500 µL PBS και τοποθετείται σε erpendorf.
12. Αποθηκεύεται στους -80 °C ή περαιτέρω επεξεργασία.

Η απομόνωση των εξωσωμάτων πραγματοποιείται με την υπερφυγόκεντρο Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter) με την κεφαλή MLA-50 (σταθερής γωνίας).

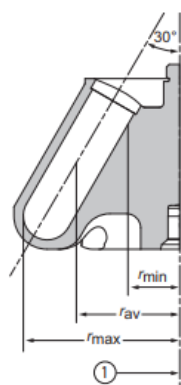


Εικόνα 4: Η κεφαλή με την οποία έγινε η υπερφυγοκέντρωση (Beckman Coulter)

Ο ρότορας και το καπάκι είναι κατασκευασμένα από αλουμίνιο και είναι ανοδιωμένα για να αντιστέκονται στη διάβρωση. Το καπάκι, που είναι κατασκευασμένο από καουτσούκ και η λαβή του ρότορα διατηρούν την ατμοσφαιρική πίεση σταθερή κατά τη διάρκεια της υπερφυγοκέντρωσης.

Η ταχύτητα του ρότορα , προσδιορίζεται από την υπερφυγόκεντρο, μέσω ενός μαγνητικού αισθητήρα ταχύτητας που βρίσκεται μέσα στο θάλαμο και στους μαγνήτες που εντοπίζονται στο κάτω μέρος του ρότορα. Με αυτόν τον τρόπο ο ρότορας δεν υπερβαίνει τη μέγιστη επιτρεπόμενη ταχύτητα του.

Τα φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φιαλίδια υπερφυγοκέντρου (OptiSeal Polypropylene) όγκου 32.4 mL και διαστάσεων 25 ×77 mm.



1. Axis of Rotation

Maximum speed	50,000 rpm
Density rating at maximum speed	1.2 g/mL
Relative Centrifugal Field ^a at maximum speed	
At r_{max} (83.2 mm)	$233,000 \times g$
At r_{av} (58.4 mm)	$164,000 \times g$
At r_{min} (33.6 mm)	$94,100 \times g$
k factor at maximum speed	92^b
Conditions requiring speed reductions	see Run Speeds
Number of tube cavities	6
Available tubes	see Table 1
Nominal tube dimensions (largest tube)	25 × 77 mm
Nominal tube capacity (largest tube)	29.9 mL
Nominal rotor capacity	194.4 mL
Approximate acceleration time to maximum speed (fully loaded)	9 min
Approximate deceleration time from maximum speed (fully loaded)	5 min
Weight of fully loaded rotor	2.85 kg (6.3 lb)
Rotor and lid material	aluminum

Εικόνα 5: Χαρακτηριστικά της κεφαλής (Beckman Coulter)

3.2.3 Κατακρήμνιση Εξωσωμάτων με PEG 8.000 DA

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση των εξωσωμάτων. Έχει αποδειχθεί από προηγούμενη μελέτη του Sidhom και των συνεργατών της, ότι το PEG μέσα σε υδατικό διάλυμα έχει την ικανότητα να τυλίγει πολλά εξωσώματα μαζί δημιουργώντας συσσωματώματα, τα οποία είναι εύκολα να κατακρημνιστούν με μία φυγοκέντρηση. Είναι εύκολη, χαμηλού κόστους και αποτελεσματική τεχνική για την απομόνωση εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά.

3.2.3.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

1. Το αραιωμένο ίζημα με PBS, τοποθετείται σε erpendorf.
2. Τοποθετείται 500μL 50 % PEG 8.000 Da.
3. Επώαση για 16 ώρες, υπό ανακαίνιση σε θερμοκρασία 1 °C.
4. Φυγοκέντρηση 25.000g για 1 ώρα.
5. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος με RIPA.
6. Αποθήκευση στους -80 °C ή περαιτέρω επεξεργασία.

3.2.4 Λύση Μembrάνης των Εξωσωμάτων

Ένας τρόπος για να λυθεί η κυτταρική μεμβράνη των εξωσωμάτων είναι η χρήση του διαλύματος RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay). Έχει αποδειχθεί από μελέτη

του Sterzenbach και των συνεργατών του, ότι η χρήση της RIPA είναι αποτελεσματική για την διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης των εξωσωμάτων και την εκχύλιση πρωτεϊνών. Το διάλυμα περιέχει τρία διαφορετικά είδη μη-ιοντικά και ιοντικά απορρυπαντικά.

3.2.4.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΛΥΣΗΣ MEMBRANΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

1. Το παραπάνω ίζημα επαναδιαλύεται με 100 μL RIPA. Η επαναδιάλυση γίνεται παρουσία αναστολέων πρωτεάσης.
2. Σύντομη ανάδευση με vortex.
3. 30'' υπέρηχοι που ακολουθούνται από 30'' επώαση στον πάγο. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές.
4. Ανακίνηση για 15' στον πάγο με ταχύτητα περιστροφής 400rpm
5. Φυγοκέντρηση στους 4 $^{\circ}\text{C}$.
6. Απόρριψη του υπερκείμενου και μεταφορά του ιζήματος σε νέο eppendorf.

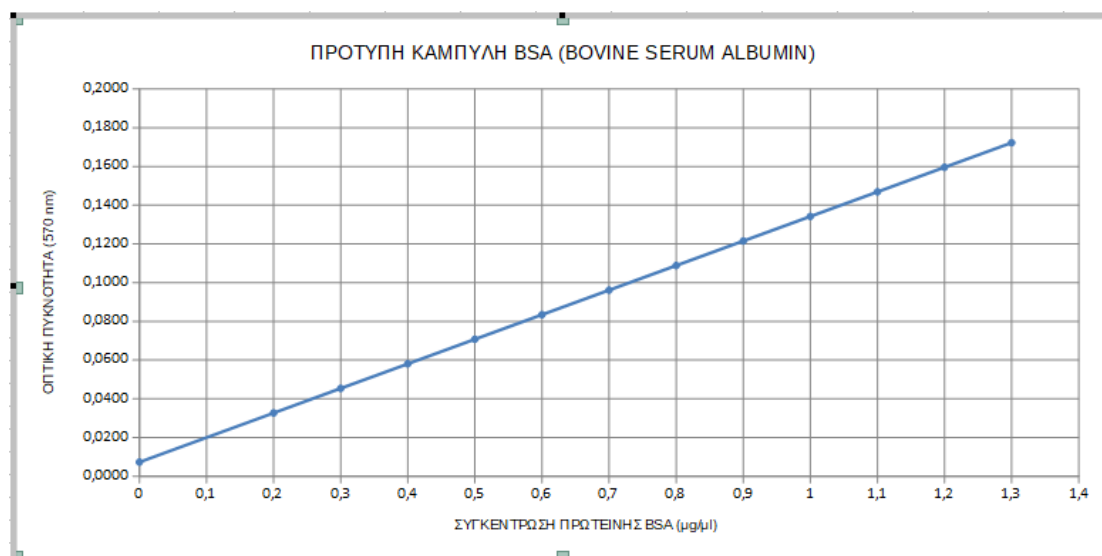
3.2.5 Ποσοτικός Προσδιορισμός Εξωσωματικών Πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των εξωσωματικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Είναι ένας εύκολος και αξιόπιστος τρόπος για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, με σκοπό το δείγμα να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί PSB(Protein Solving Buffer), που περιέχει SDS, αναγωγικό παράγοντα, βαφή και ένα συστατικό το οποίο αυξάνει την πυκνότητα του ρυθμιστικού διαλύματος. Επίσης χρησιμοποιεί και QR (Quantification Reagent), το οποίο έχει υδροχλωρικό οξύ.

3.2.5.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

1. Σε μια μικροπλάκα τοποθετείται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Το δείγμα αραιώνεται προς τελικό όγκο 20 μL . Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα είναι 1:5 και 1:10, με χρήση αποσταγμένου νερού ή RIPA.
2. Στο δείγμα προστίθενται 40 μL του αντιδραστηρίου PSB. Με την προσθήκη αυτή το δείγμα γίνεται μπλε.
3. Προστίθενται 40 μL QR. Μετά από αυτή την προσθήκη το δείγμα αλλάζει χρώμα και γίνεται κίτρινο.
4. Η μικροπλάκα αναδεύεται για ένα σύντομο χρονικό διάστημα, με ήπιες κινήσεις για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.
5. Πραγματοποιείται επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Μέτρηση στα 570nm με τη χρήση φασματοφωτομέτρου.
7. Υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, με βάση την πρότυπη καμπύλη.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη της BSA για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης. Η εξίσωση είναι: $y = 0,129x + 0,0073$

Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σωστά το kit, η εταιρεία δίνει μία πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις βόειας αλβουμίνης ορού (BSA). Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών γίνεται με χρήση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($OD_{570nm} = f(CBSA)$). Η μονάδα μέτρησης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών είναι τα μg/μL.

3.2.6 Προετοιμασία Εξωσωμικών Πρωτεϊνών για την Ανοσοαποτύπωση WESTERN

Πριν την ανοσοαποτύπωση κατά Western, τα δείγματα επαναδιαλύονται σε Laemmli buffer.

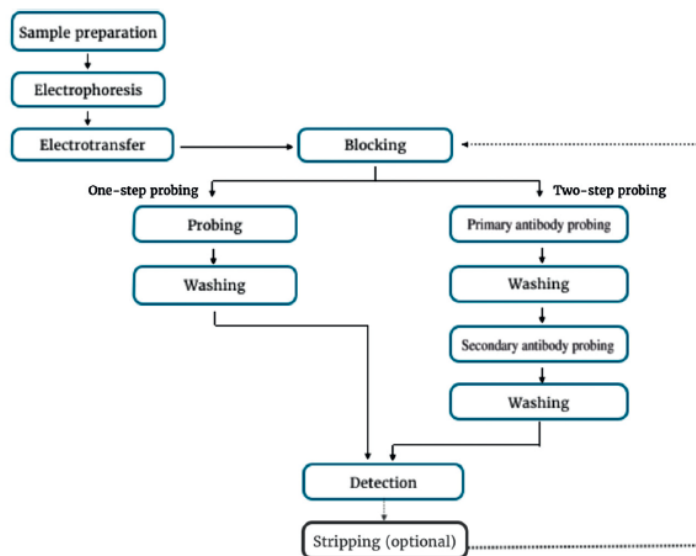
3.2.6.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗΣ

1. Σε 100 μL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος προστίθενται 400 μL κρύας ακετόνης (0-20 °C).
2. Μετά από αυτή την προσθήκη πραγματοποιείται μία σύντομη ανάδευση.
3. Το δείγμα καταψύχεται στους -80°C για 10'.

4. Στην συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στους -20°C για 90'.
5. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε ταχύτητα 15.000 g για 15' στους 4°C .
6. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
7. Για να εξατμιστεί η ακετόνη θερμαίνεται το ίζημα, που περιέχει τις πρωτεΐνες.
8. Το πρωτεϊνικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 30 μL Laemmli buffer.
9. Το πρωτεϊνικό ίζημα θερμαίνεται στους 95°C .
10. Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία.

3.2.7 Ανίχνευση Πρωτεϊνών με τη χρήση WESTERN BLOT

Η Western Blot ή πρωτεϊνική ανοσοαποτύπωση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και στη μοριακή βιολογία. Η τεχνική αρχικά περιγράφηκε από τον Towbin και τους συνεργάτες του, το 1979 και το όνομα της προέκυψε από τον Burnette το 1981 έτσι ώστε να συμβαδίζει με την Southern (DNA) και τη Northern (RNA). Το πρωτόκολλο που ακολουθεί έχει περιγραφεί από τους Gwozdz και Dorey.



Εικόνα 6: Σύνοψη περιγραφή των σταδίων της Western blot

Με την τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνευθεί μία πρωτεΐνη από ένα μείγμα πρωτεϊνών, που εξάγεται από κύτταρα. Μετά την προετοιμασία του δείγματος, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης με στόχο τον διαχωρισμό τους, η μεταφορά

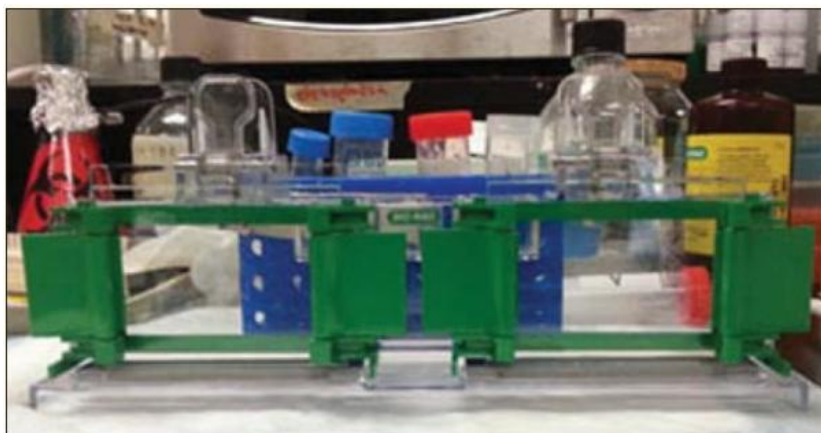
τους σε PVDF μεμβράνη , η επώαση της μεμβράνης με αντισώματα και τελικά η εμφάνιση τους.

3.2.8 Ηλεκτοφόρηση Πρωτεϊνών

Για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, θα πρέπει να παρασκευαστεί το gel πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE), το οποίο είναι ικανό να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες βάση το μεγέθους τους.

3.2.8.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ GEL ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

1. Στήνεται το stand για τον πολυμερισμό του gel πολυακρυλαμίδης (separation/resolving gel).
2. Τοποθετούνται και στερεώνονται 2 τζάμια για τον πολυμερισμό του gel. Πριν τοποθετηθεί το gel, τοποθετείται λίγο απιονισμένο νερό ανάμεσα από τα τζάμια για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει καμία διαρροή και στην συνέχεια αφαιρείται όλο.



Εικόνα 7: Ειδικό stand για τον πολυμερισμό του gel πολυακρυλαμίδης και του gel επιστοίβασης

3. Παρασκευάζεται το gel πολυακρυλαμίδης 10% και τοποθετείται προσεκτικά με μία πιπέτα ανάμεσα από τα δύο τζάμια.
4. Τοποθετείται ισοπροπανόλη έτσι ώστε να απομακρύνει πιθανές φυσαλίδες, οι οποίες μπορεί να υπάρχουν.
5. Αναμονή 20'-30' έως ότου πολυμεριστεί το gel.
6. Όταν πολυμεριστεί προσεκτικά αφαιρείται η ισοπροπανόλη.
7. Προσεκτικό ξέπλυμα με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της ισοπροπανόλης και αφαίρεση υπολειμμάτων νερού με χαρτί.
8. Παρασκευάζεται το stacking gel 5%.
9. Τοποθετείται πάνω από το gel πολυακρυλαμίδης.

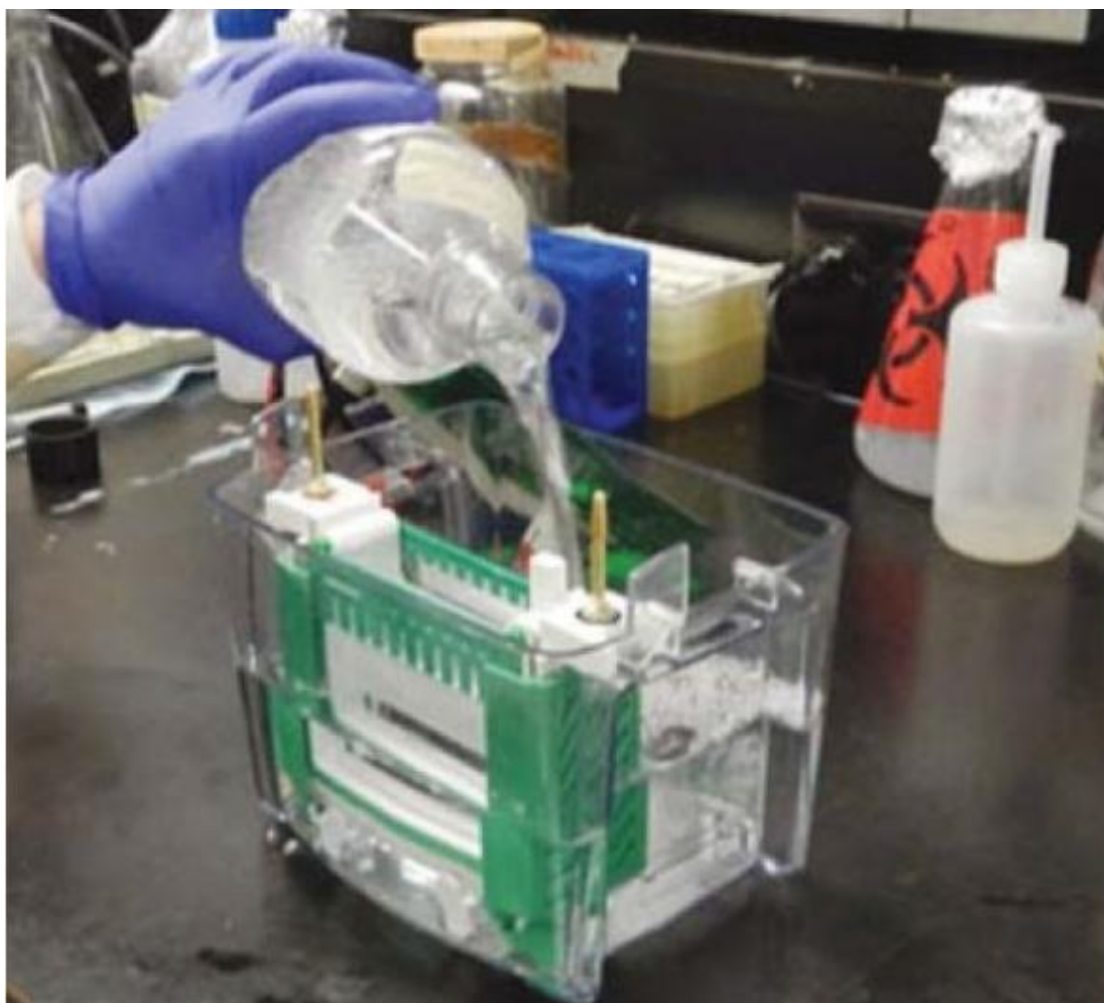
10. Αμέσως τοποθετείται το ειδικό χτενάκι, για να απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες.
11. Αναμονή 20'-30' για να πολυμεριστεί.



Εικόνα 8: Τοποθέτηση gel πολυακρυλαμίδης ανάμεσα από τα δύο τζάμια

3.2.8.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

1. Το gel ηλεκτροφόρησης μαζί με τα τζάμια μεταφέρεται στο ειδικό δοχείο ηλεκτροφόρησης.
2. Επίσης μέσα στο δοχείο τοποθετείται άφθονο Running Buffer 1x, το οποίο διατηρεί το pH και ψύχει το σύστημα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης
3. Αφαιρείται το χτενάκι μέσα στο running buffer, για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.



Εικόνα 9: Συσκευή ηλεκτροφόρησης και η τοποθέτηση του running buffer

4. Φορτώνονται τα δείγματα, αφού έχουν αραιωθεί στο Laemmli buffer και αφού έχουν θερμανθεί για 10' στους 95 °C. Για να υπολογιστεί η ποσότητα που θα τοποθετηθεί σε κάθε πηγαδάκι, λαμβάνεται υπόψη η συγκέντρωση που έχει υπολογιστεί νωρίτερα από το kit.
5. Σύνδεση της συσκευής στο τροφοδοτικό για να δημιουργηθεί ένα κλειστό κύκλωμα και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό στα 130 V.



Εικόνα 10: Τα δείγματα που 'τρέχουν' στο gel πολυακρυλαμίδης

6. Η ηλεκτροφόρηση τελειώνει 1 ώρα περίπου αργότερα, όταν τα δείγματα έχουν φτάσει στη βάση της συσκευής.



Εικόνα 11: Τέλος ηλεκτροφόρησης

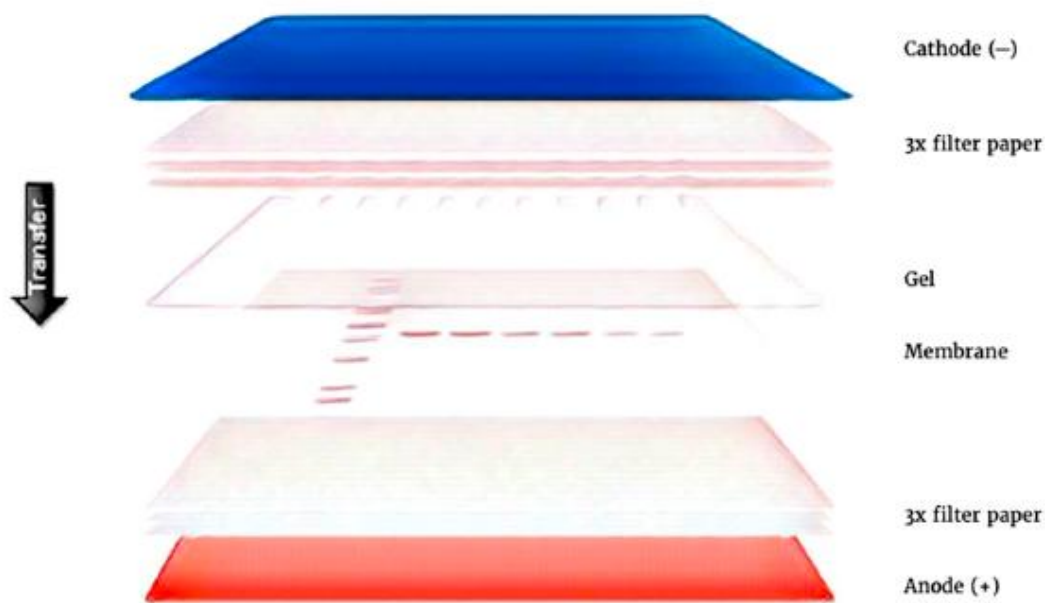
3.2.8.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF

Για να μπορέσει να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη PVDF από το gel πολυακρυλαμίδης, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ειδική συσκευή μεταφοράς (κασέτα), με ημιστεγνή μεταφορά. Η συσκευή αυτή δημιουργεί ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που βοηθάει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμίδης στην μεμβράνη PVDF. Η συσκευή αποτελείται από δύο πλάκες: την άνοδο και την κάθοδο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

1. Κόβονται έξι ειδικά χαρτιά Whatman και η μεμβράνη PVDF στο μέγεθος του gel πολυακρυλαμίδης.
2. Για ενεργοποιηθεί η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται για 30'' σε μεθανόλη και μετά τοποθετείται μέσα σε transfer buffer.
3. Τα έξι ειδικά χαρτιά Whatman εμβαπτίζονται σε transfer buffer.
4. Αφαιρούνται τα τζάμια προσεκτικά για να μην καταστραφεί το gel πολυακρυλαμίδης με τις πρωτεΐνες.
5. Το gel εμβαπτίζεται σε Transfer buffer.
6. Η διάταξη που ακολουθεί είναι τύπου sandwich καθώς η κάτω πλάκα είναι η άνοδος.
7. Μετά τοποθετούνται 3 χαρτιά Whatman, ενώ παράλληλα ενυδατώνεται με transfer buffer.
8. Τοποθετείται προσεκτικά η μεμβράνη, ενώ ενυδατώνεται με transfer buffer.
9. Τοποθετείται το gel πολυακρυλαμίδης, ενώ ενυδατώνεται με transfer buffer.
10. Τοποθετούνται και τα υπόλοιπα τρία χαρτιά Whatman.
11. Κλείνει η συσκευή χρησιμοποιώντας την πλάκα της συσκευής, την κάθοδο.

Η συσκευή συνδέεται στο τροφοδοτικό και λειτουργεί για 56' στα 0,27A.



Εικόνα 12: Αναπαράσταση της μεταφοράς των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη PVDF

3.2.8.4 ΧΡΗΣΗ BLOCKING BUFFER ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΥΨΗ ΜΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

Για να μπορέσουν να προσδεθούν οι επιθυμητές πρωτεΐνες πρέπει να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις, αυτό επιτυγχάνεται με το blocking buffer.

1. Η PVDF μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε blocking buffer.
2. Απομακρύνεται το blocking buffer.
3. Τρεις επαναλαμβανόμενες πλύσεις με TBST διάρκειας 5 λεπτών για να απομακρυνθεί το περιττό blocking buffer.

3.2.8.5 ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα της μεμβράνης PVDF γίνεται στους 4 °C για 16 ώρες, υπό ήπια ανακίνηση. Το διάλυμα του αντισώματος με το οποίο γίνεται η επώαση περιέχει το αντίσωμα αραιωμένο σε TBST (Tris-Buffered Saline Tween) και σκόνη άπαχου γάλακτος (λειτουργεί ως παράγοντας αποκλεισμού). Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5', για να απομακρυνθεί η περίσσια του αντισώματος.

3.2.8.6 ΔΕΥΤΕΡΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Το δεύτερο αντίσωμα θα πρέπει να προέρχεται από το ίδιο ζώο με το πρώτο. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα της μεμβράνης PVDF γίνεται υπό ήπια ανακίνηση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις για 5' με TBST , ώστε να απομακρυνθεί το περιττό αντίσωμα.

3.2.8.7 ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΦΙΛΜ

1. Τοποθετείται το Immobilon crescendo της εταιρίας Millipore πάνω στη μεμβράνη PVDF
2. Λήψη της ψηφιακής εικόνας σε Imager Uvitec Cambridge

Η διαδικασία μπορεί να κρατήσει από λίγα δευτερόλεπτα μέχρι 10'-15'

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στα εξωσώματα προέρχονται από τα γονικά τους κύτταρα είτε αυτά είναι φυσιολογικά είτε αυτά είναι καρκινικά. Μεγάλη κατηγορία αυτών των πρωτεϊνών είναι οι τετρασπανίνες, οι οποίες προέρχονται από τη βιογένεση των εξωσωμάτων και χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτες για την ανίχνευση τους. Στην συγκεκριμένη μελέτη ανιχνεύθηκαν οι CD 9 και η CD 81. Μια ακόμα πρωτεΐνη που μελετήθηκε είναι η TSG101 (Tumor Susceptibility gene 101) η οποία υπάρχει σε αφθονία στα εξωσώματα. Αυτές οι πρωτεΐνες λόγω της παρουσίας τους στα εξωσώματα σε αφθονία, χαρακτηρίζονται ως δείκτες εξωσωμάτων. (Janikonová et al,2020) Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες, ανιχνεύεται και η πιθανότητα ύπαρξης της Calnexin, που δεν βρίσκεται φυσιολογικά στα εξωσώματα και υποδηλώνει την πιθανότητα προσμίξεων στο δείγμα.

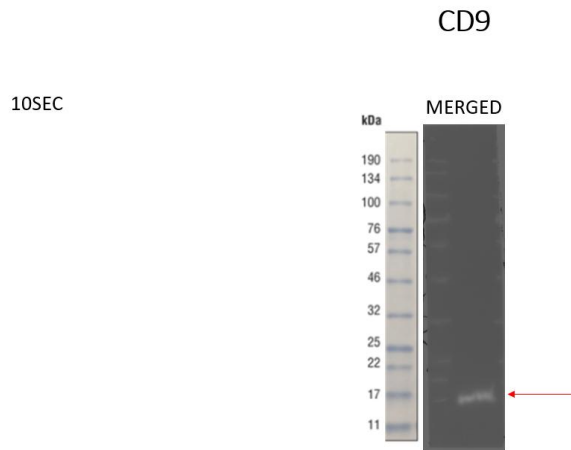
Τα δείγματα υπερφυγοκεντρούνται παρουσία μιας στοιβάδας 30% σουκρόζης και για την απομόνωση και την κατακρήμνιση των εξωσωμάτων χρησιμοποιείται PEG. Μετά την λύση των κυττάρων, απομονώνονται οι πρωτεΐνες και οι επιθυμητές πρωτεΐνες ανιχνεύονται με ανοσοαποτύπωση Western.

Καλοήθες δείγμα

Αρχικό δείγμα: 30 ml, Μ.Ο. συγκέντρωσης πρωτεϊνών: 9,15 µg/µl

Κακοήθες δείγμα

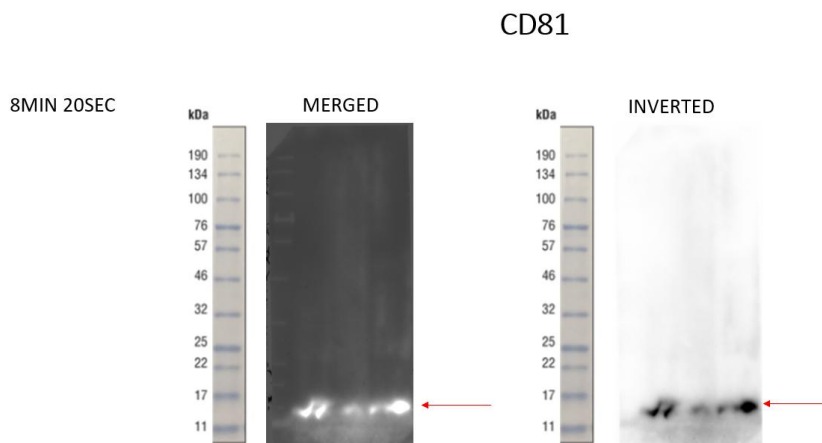
Αρχικό δείγμα 25 ml, Μ.Ο. συγκέντρωσης πρωτεϊνών: 14,6 µg/µl



Εικόνα 13: Απεικόνιση των επιπέδων της πρωτεΐνη CD9

Μονοκλωνικά αντισώματα anti-rabbit CD9 (1/1000 TBST 1x 5% BSA) Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST)

Το μοριακό βάρος της CD 9 είναι περίπου 22 kDa

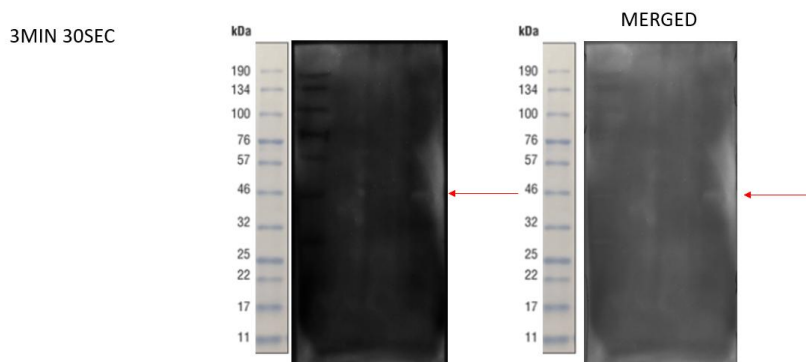


Εικόνα 14: Απεικόνιση των επιπέδων της πρωτεΐνη CD81

Μονοκλωνικά αντισώματα anti-rabbit CD81 (1/1000 TBST 1x 5% BSA) Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST)

Το μοριακό βάρος της cd 81 είναι περίπου 25 kDa

TSG101

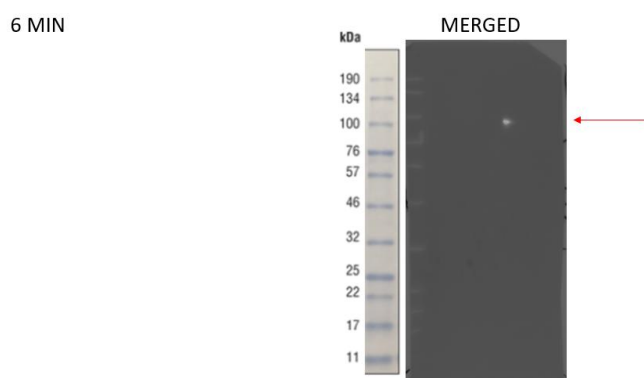


Εικόνα 15: Απεικόνιση των επιπέδων της πρωτεΐνη TSG101

Μονοκλωνικά αντισώματα anti-rabbit TSG 101 (1/1000 TBST 1x 5% BSA) Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST)

Το μοριακό βάρος της TSG101 είναι περίπου 44 kDa

CALNEXIN



Εικόνα 16: Απεικόνιση των επιπέδων της πρωτεΐνη Calnexin

Μονοκλωνικά αντισώματα anti-rabbit Calnexin (1/1000 TBST 1x 5% BSA) Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST)

Το μοριακό βάρος της calnexin είναι περίπου 90 kDa

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος με τους περισσότερους θανάτους είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, (Al Qudah et al,2021) οπότε είναι επιτακτική η έγκυρη διάγνωση. Τα εξωσώματα μελετούνται περισσότερο, από τα υπόλοιπα εξωκυττάρια κυστίδια, γιατί φέρουν πολύτιμες πληροφορίες για το κύτταρο. (Farooqi et al, 2018)

Σε αυτή τη μελέτη απομονώθηκαν εξωσώματα από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης, παρουσία μια στοιβάδας σουκρόζης 30 % και ακολουθήθηκε κατακρήμιση των εξωσωμάτων με PEG. (Camproy et al,2016.) Αυτή η μέθοδος έχει χαρακτηριστεί ως αποτελεσματική ως προς την απομόνωση και την καθαρότητα των εξωσωμάτων.

Μετά την απομόνωση τους, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western στις πρωτεΐνες CD9, CD81, TSG101 και Calnexin. Η CD9 ανιχνεύθηκε στο δείγμα καθώς σύμφωνα με την απεικόνιση της (Εικόνα 12) , ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη κοντά στα 17 kDa που συνάδουν με το μοριακό βάρος της CD9 που είναι περίπου 22 kDa. Επίσης ανιχνεύθηκε και η CD81 στο δείγμα, (Εικόνα 13)αφού η απεικονιζόμενη πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε γύρω στα 17 kDa και το μοριακό βάρος της CD81 κυμαίνεται στα 25 kDa. Στην συνέχεια ανιχνεύθηκε μέσω της ανοσοαποτύπωσης Western και η TSG 101 (Εικόνα 14) με το μοριακό της βάρος, το οποίο κυμαίνεται στα 44 kDa να είναι παρόμοιο με αυτό που ανιχνεύθηκε σε αυτό το δείγμα (46 kDa).

Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν όχι μόνο την παρουσία αυτών των πρωτεϊνών στα εξωσώματα, αλλά τα καθιστούν και ικανούς δείκτες για την επιτυχή απομόνωση των εξωσωμάτων. Σε αντίθεση με αυτά, η ανίχνευση της Calnexin δείχνει την πρόσμιξη του δείγματος με άλλα εξωκυττάρια κυστίδια, καθώς αυτή η πρωτεΐνη, δεν είναι παρούσα στα εξωσώματα. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 15 στο κακοήθες δείγμα η πρωτεΐνη ήταν παρούσα, ενώ δεν θα έπρεπε να υπάρχει κάποιο αποτέλεσμα, υποδηλώνοντας την πρόσμιξη και άλλων εξωκυττάρων κυστιδίων. Αυτό καθιστά την Calnexin έναν αρνητικό δείκτη σε σχέση με την σωστή απομόνωση των εξωσωμάτων. Όλα τα παραπάνω στοιχεία , υποδεικνύουν ότι η υγρή βιοψία, που αποτελεί τη λιγότερο επεμβατική μέθοδο ανίχνευσης καρκίνου και πιο συγκεκριμένα η απομόνωση των εξωσωμάτων που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, είναι αποτελεσματική για την ύπαρξη ή μη του καρκίνου.

Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των εξωσωμάτων θα μπορούσε να γίνει απεικόνιση τους μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, όπως και η κυτταρομετρία ροής για την για τη μέτρηση του μεγέθους και την ανίχνευση των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια τους.

Η μελέτη των εξωκυττάρων κυστιδίων και ειδικότερα των εξωσωμάτων είναι ένα πεδίο που μένει περαιτέρω να ερευνηθεί, καθώς μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για τα καρκινικά κύτταρα.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 ΔΙΑΛΥΜΑ PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	14.4g
K ₂ PO ₄	2.4g
dH ₂ O	1L

Πίνακας 2: Διάλυμα PBS

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα μπουκάλι τοποθετείται απιονισμένο νερό όγκου 800ml. Ζυγίζονται το NaCl, το KCl, το Na₂HPO₄ και το K₂PO₄
2. Προστίθενται στο μπουκάλι και αναδεύονται
3. Προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί το ένα λίτρο
4. Για τη ρύθμιση του pH χρησιμοποιείται NaCl και HCl

Το PBS είναι ένα υδατικό διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην βιολογική έρευνα. Είναι ισοτονικό και μη τοξικό στα κύτταρα, καθώς η ωσμωτικότητα και οι συγκεντρώσεις ιόντων του διαλύματος ταιριάζουν με αυτές του ανθρώπινου σώματος. Για την αποστείρωση του γίνεται χρήση ειδικού φίλτρου. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

6.2 ΔΙΑΛΥΜΑ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ 30%

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Σουκρόζη	30g
PBS 1x (αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο)	100ml

Πίνακας 3: Διάλυμα Σουκρόζης 30%

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα μπουκάλι τοποθετείται αποστειρωμένο PBS 1x, όγκου 50ml
2. Ζυγίζεται η σουκρόζη
3. Προστίθεται στο μπουκάλι και αναδεύεται
4. Προστίθεται PBS 1x μέχρι να συμπληρωθούν τα 100 ml

Η πυκνότητα της σουκρόζης 30% κυμαίνεται από 1,13 g/ml έως 1,19 g/ml

6.3 ΔΙΑΛΥΜΑ PEG 8000 Da

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
PEG	50 g
PBS 1x (αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο)	100 ml

Πίνακας 4: Διάλυμα PEG 8000 Da

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα μπουκάλι τοποθετείται αποστειρωμένο PBS 1x, όγκου 50 ml
2. Ζυγίζεται το PEG
3. Προστίθεται στο μπουκάλι και αναδεύεται
4. Προστίθεται PBS 1x μέχρι να συμπληρωθούν τα 100 ml

6.4 ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ RIPA (100ml)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΟΓΚΟΣ
NaCl	5M	3 ml
Tris-HCl	1 M, pH 7,6	2,5 ml
NP-40	-	1ml
Sodium Deoxycholate	10%	10ml
SDS	10%	1 ml
dH ₂ O	-	82,5 ml

Πίνακας 5: Διάλυμα Λύσης Μεμβρανών των Εξωσωμάτων RIPA (100ml)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ογκομετρείται το NaCl, Tris-HCl, NP-40, Sodium Deoxycholate και SDS
2. Τοποθετούνται σε ένα μπουκάλι
3. Συμπληρώνεται το μπουκάλι με dH₂O έτσι ώστε να φτάσει το διάλυμα τα 100 ml όγκο.

6.5 ΔΙΑΛΥΜΑ LAEMMLI BUFFER 4X (10 ml)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Tris-HCl	1M,pH 6,8	2,4 ml
SDS		0,8 g
dH ₂ O		2,1 ml
Bromophenol Blue		4 mg
Glycerol	80%	5 ml
β-mercaptoethanol		0,5 ml

Πίνακας 6: Διάλυμα LAEMMLI BUFFER 4X (10 ml)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα μπουκάλι τοποθετείται το Tris-HCl
2. Προστίθενται στο μπουκάλι το SDS, το dH₂O, το Bromophenol Blue και η Glycerol
3. Αναδεύονται καλώς όλα τα συστατικά
4. Προστίθεται και η β-mercaptoethanol

Αποθηκεύεται στους 4⁰C

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ:

Το Tris-HCl είναι μια ρυθμιστική ουσία, που εμποδίζει τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών καθώς και να σταθεροποιήσει το pH του gel.

Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) είναι ένα απορρυπαντικό με ισχυρή δράση μετουσίωσης πρωτεϊνών

Η glycerol έχει υψηλή πυκνότητα, διασφαλίζει ότι το δείγμα θα εισέλθει μέσα στο πηγάδι του gel ηλεκτροφόρησης.

Η β-mercaptoethanol μαζί με το SDS χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών με σκοπό την αποδιάταξη των μοριακών συμπλόκων, και ως εκ τούτου το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών σε γραμμικές αλυσίδες με αρνητικό φορτίο ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας

Το Bromophenol Blue χρωματίζει το δείγμα μπλε, ώστε να είναι ευδιάκριτο κατά την ηλεκτροφόρηση.

6.6 GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 10% (10ml)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΟΓΚΟΣ
Μίγμα ακρυλαμιδίου	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
dH ₂ O	4 ml
0% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Πίνακας 7: GEL Πολυακρυλαμίδης 10% (10 ml)

Το μίγμα ακρυλαμιδίου σχηματίζει ένα πλέγμα έτσι ώστε να μπορέσουν να κινηθούν οι πρωτεΐνες.

Το APS (Ammonium Persulfate) μαζί με το TEMED Tetramethylethylenediamine καταλύουν τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου .

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα falcon τοποθετούνται τα συστατικά με τη σειρά
2. Το TEMMED και το APS προστίθενται τελευταία, καθώς αυτά πολυμερίζουν το gel
3. Καλή ανάδευση με πιπέτα pasteur

6.7 GEL ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΣΗΣ 5% (5 ml)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΟΓΚΟΣ
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	0,33 ml
1,5 Tris-HCl	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
dH ₂ O	1,4 ml
10% APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Πίνακας 8: GEL Επιστοίβασης 5 % (5ml)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα falcon τοποθετούνται τα συστατικά με τη σειρά
2. Το TEMMED και το APS προστίθενται τελευταία, καθώς αυτά πολυμερίζουν το gel
3. Καλή ανάδευση με πιπέτα pasteur

6.8 RUNNING BUFFER 10X (ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ 1L)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Tris-HCl	30,30 g	250 Mm
Glycine	144 g	1,92 M
SDS	10g	1% w/v
dh ₂ O	1 l	

Πίνακας 9: Running Buffer 10x (Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 1L)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα ογκομετρικό δοχείο τοποθετείται dh₂O όγκου 800 ml
2. Ζυγίζεται το Tris-HCl, η Glycine και το SDS
3. Προστίθενται στο ογκομετρικό δοχείο
4. Καλή ανάδευση
5. Προστίθεται dh₂O έτσι ώστε να συμπληρωθεί το 1λίτρο.

Η glycine αυξάνει την αγωγιμότητα του running buffer.

6.9 ΔΙΑΛΥΜΑ TRANSFER BUFFER (500 ml)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Tris-HCl	15,15 g	250 mM
Glycine	72 g	
SDS	5 g	1% w/v
dh ₂ O	500 ml	

Πίνακας 10: Διάλυμα TRANSFER BUFFER (500 ml)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα ογκομετρικό δοχείο τοποθετείται dh₂O όγκου 400 ml
2. Ζυγίζεται το Tris-HCl, η Glycine και το SDS
3. Προστίθενται στο ογκομετρικό δοχείο με το dh₂O και ανακατεύονται καλώς
4. Προστίθεται dh₂O έτσι ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος των 500ml

6.10 ΔΙΑΛΥΜΑ TBST (Tris-Buffered Saline Tween) 10X

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Tris-Base	24 g
NaCl	88 g
Tween	5 ml
dh ₂ O	1 l

Πίνακας 11: Διάλυμα TBST

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε ένα ογκομετρικό δοχείο τοποθετείται dh₂O όγκου 800ml
2. Ζυγίζεται το Tris-Base, το NaCl και ογκομετρείται το Tween
3. Τοποθετούνται στο ογκομετρικό δοχείο με το dh₂O
4. Καλή ανάδευση
5. Προστίθεται dh₂O για να συμπληρωθεί το 1 λίτρο

6.11 ΔΙΑΛΥΜΑ BLOCKING BUFFER (50ml)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Non-fat dry milk	5g
TBST 1x	50ml

Πίνακας 12: Διάλυμα BLOCKING BUFFER

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ζυγίζεται το Non- fat dry milk και ογκομετρείται το TBST
2. Σε ένα falcon τοποθετείται αρχικά το TBST και στη συνέχεια το non-fat dry milk
3. Καλή ανάδευση

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΑΡΘΡΑ

- P Nenclares, KJ Harrington (2020). The biology of cancer. *Cancer and biology imaging* Volume 48 Issue 2 (67-72)
- Nidhi Korgaonkar, Khushwant S. Yadav (2019) Understanding the biology and advent of physics of cancer with perspicacity in current treatment therapy *Life Science*
- Stephanie Gomez, Tomasz Tabernackia, Julie Kobyra, Paige Roberts, Katherine B. Chiappinella (2020) Combining epigenetic and immune therapy to overcome cancer resistance *Seminars in cancer biology* 65 (99-113)
- Lothar C. Dieterich, Andreas Bikfalvi, (2020) The tumor organismal environment: Role in tumor development and cancer immunotherapy *Seminars in Cancer Biology* 65 (197-206)
- Lina Al-Akra, Dong-Hun Bae, Lionel Y.W. Leck, Des R. Richardson, Patric J. Jansson (2019) The biochemical and molecular mechanisms involved in the role of tumor micro-environment stress in development of drug resistance, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subject* Volume 1863, Issue 9 (1930-1937)
- Mohammad A. ALQudah, Mahmoud A. ALFaqih, Shadi Hamouri, Ala'a F. Al-Shaikh, Husam K. Haddad, Wejdan Y. Al-Quran, Mohanad M. ALebbini, Nama' Bany Amer, Haifa I. AL-Smadi, Karem H. Alzoubi (2021) Epidemiology and histopathological classification of lung cancer: A study from Jordan, retrospective observational study *Annals of Medicine and Surgery* 65
- Yousheng Mao, Ding Yang, Jie He, Mark J. Krasna (2016) Epidemiology of Lung Cancer, *Surgical Oncology Clinics of North America* Volume 25, Issue 3 pages (439-445)
- Guillaume van Niel, Gisela D'Angelo and Graça Raposo (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*
- Bo Qin, Xi-min Hu, Zhen-hong Su, Xiao-bo Zeng, Hong-ying Ma, Kun Xiong (2021) Tissue-derived extracellular vesicles: Research progress from isolation to application, *Pathology – Research and Practice*, 226
- Hina Kalra, Gregor P. C. Drummen and Suresh Mathivanan (2016) Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing, *International Journal of Molecular Science*, 2016 Feb 6; 17(2)
- Ammad Ahmad Farooqi, Nishil N. Desai, Muhammad Zahid Qureshi, Daniele Rubert Nogueira Librelotto, Maria Luisa, Gasparri, Anupam Bishayee, Seyed Mohammad Nabavi, Valeria Curti, Maria Daglia (2018) Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds *Biotechnol Adv*, Jan-Feb 2018; 36(1) 328-334
- Tamkin Ahmadzada, Steven Kao, Glen Reid, Stephen Clarke, Georges E. Graua, Elham Hosseini-Beheshti (2020) Extracellular vesicles as biomarkers in malignant pleural mesothelioma: A review, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 150

- Cecilia Lässer ,Su Chul Jang, Jan Lötval (2018) Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 60 pages 1-14
- Kanghong Xu, Chengpeng Zhang, Tiantian Du, Abakundana Nsenga Ariston Gabriel, Xue Wang, Xiaomeng Li, Li Sun, Nan Wang, Xinquan Jiang, Yi Zhang (2021) Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 134
- Liu J, Ren L, Li S, Li W, Zheng X, Yang Y, Fu W, Yi J, Wang J, Du G (2021) The biology, function, and applications of exosomes in cancer, *Acta Pharmaceutica Sinica B*
- Abhimanyu Thakur, Diana Carolina Parra, Pedram Motallebnejad, Marcelo Brocchi, Huanhuan Joyce Chen (2021), Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics , *Bioactive Materials*
- Karoliina Stefanius, Kelly Servage and Kim Orth (2021) Exosomes in cancer development, *Cancer Genomics* 66: 83-92
- M. Mondoni, R.F. Rinaldo, P. Carlucci, S. Terraneo, L. Sadari, S. Centanni, G. Sotgiu (2020) Bronchoscopic sampling techniques in the era of technological bronchoscopy, *Pulmonology journal*
- Mitsuhiro Yamada (2021) Extracellular vesicles: Their emerging roles in the pathogenesis of respiratory diseases, *Respiratory investigation* volume 59, Issue 3, pages 302-311
- Irene Campoy, Lucia Lanau, Tatiana Altadill , Tamara Sequeiros , Silvia Cabrera , Montserrat Cubo-Abert , Assumpción Pérez-Benavente , Angel Garcia , Salvador Borrós , Anna Santamaria , Jordi Ponce , Xavier Matias-Guiu , Jaume Reventós^{1,8,9}, Antonio Gil-Moreno, Marina Rigau and Eva Colas (2016) Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols, *Journal of Translational Medicine* 14:180
- Karim Sidhom, Patience O. Obi and Ayesha Saleem (2020) A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option?, *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Sep 4;21(18):6466
- Ulrich Sterzenbach, Ulrich Putz, Ley-Hian Low, John Silke, Seong-Seng Tan, and Jason Howitt (2017) *Molecular Therapy* Vol. 25 No 6
- Andrew P. Joy, D. Craig Ayre, Ian C. Chute, Annie-Pier Beauregard, Gabriel Wajnberg, Anirban Ghosh, Stephen M. Lewis, Rodney J. Ouellette & David A. Barnett (2018) Proteome profiling of extracellular vesicles captured with the affinity peptide Vn96: comparison of Laemmli and TRizol© protein-extraction methods, *Journal of Extracellular Vesicles*, 7:1, 1438727
- Tahrin Mahmood and Ping-Chang Y (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting *North American Journal of Medicine* 2012 Sept 4(9) 429-434
- Jana Jankovicová , Petra Secová , Katarína Michalková and Jana Antalíková (2020), Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction *International Journal of Molecular Sciences*

BIBLIA

- Leon P. Bignold (2020). Principles of tumors, Academic Press 87-104
- Yaron B. Gesthalter, Ehab Billatos and Hasmeena Kathuria (2017) Genomic and Precision Medicine, Academic Press 165-178
- Steven E. Weinberg, Barbara A. Cockrill, Jess Mendel (2019) Principles of Pulmonary Medicine 7th edition 20 (259-269), Elsevier
- Ignacio I. Wistuba, Elisabeth Brambilla, and Masayuki Noguchi (2018) IASLC Thoracic Oncology 2nd edition, Elsevier Pages 143-163
- Mustafa Kotmakçi and Gülşah Erel Akbaba (2017) Novel implications of exosomes in diagnosis and treatment of cancer and infectious diseases, intechopen
- Robert E. Wood (2019) Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children (Ninth Edition) pages 134-146, Elsevier
- Purushothaman A. (2019) Exosomes from Cell Culture-Conditioned Medium: Isolation by Ultracentrifugation and Characterization. In: Vigetti D., Theocharis A.D. (eds) The Extracellular Matrix. Methods in Molecular Biology, vol 1952. Humana Press, New York, NY.
- Tomasz Gwozdz, Karel Dorey (2017) Basic Science Methods for Clinical Researchers, Chapter 6- Western Blot pages 99-117, Academic Press