

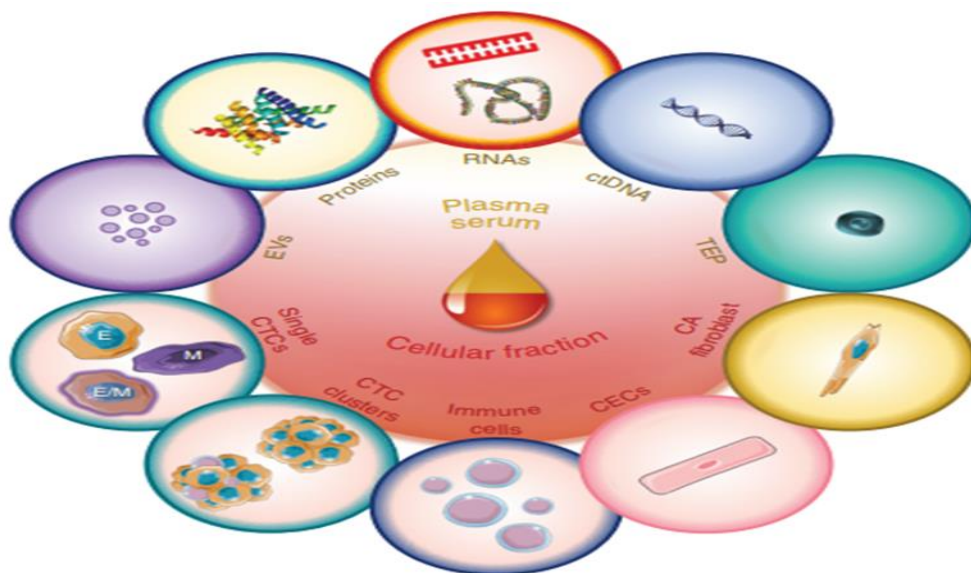
Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ



Ελευθερία Μακράκη

Επιβλέπων καθηγητής: ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του

συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ,
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ**

Ελευθερία Μακράκη

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ

Μέλος ΣΕΠ, ΕΑΠ

Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

ΣΟΥΛΤΑΝΑ ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ

Μέλος ΣΕΠ, ΕΑΠ

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

*Ελευθερία Μακράκη, Κυκλοφορούντες βιοδείκτες στον καρκίνο του
μαστού πρώιμου σταδίου. Χαρακτηριστικά, ανίχνευση και κλινικές
εξελίξεις.*

Στον Νίκο μου, και στην αγαπημένη μας Βεατρίκη.

Περίληψη

Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες, όπως το κυκλοφορούν DNA (ctDNA), τα μη κωδικοποιητικά RNAs (nc RNAs), τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), οι μεταβολίτες και τα εξωσώματα, αναδεικνύονται ως κρίσιμα εργαλεία για την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Η υγρή βιοψία αποτελεί μια καινοτόμο, μη επεμβατική μέθοδο που επιτρέπει την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό αυτών των βιοδεικτών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Νέες τεχνολογίες, όπως η ψηφιακή PCR και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), ενισχύουν τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των βιοδεικτών, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για τη μοριακή υπογραφή του όγκου. Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων υπόσχεται να βελτιώσει τη διαγνωστική ακρίβεια, την έγκαιρη παρέμβαση και την εξατομικευμένη διαχείριση του καρκίνου του μαστού πρώιμου σταδίου.

Λέξεις – Κλειδιά

Κυκλοφορούντες βιοδείκτες, καρκίνος μαστού, ctDNA, CTCs, υγρή βιοψία, καινοτόμες μέθοδοι ανίχνευσης

CIRCULATING BIOMARKERS IN EARLY-STAGE BREAST CANCER. CHARACTERISTICS, DETECTION, AND CLINICAL ADVANCES

Eleftheria Makraki

Abstract

Circulating biomarkers, such as circulating DNA (ctDNA), non-coding RNAs (ncRNAs), circulating tumor cells (CTCs), metabolites, and exosomes, are emerging as critical tools for the early detection of breast cancer. Liquid biopsy is an innovative, non-invasive method that enables the detection and characterization of these biomarkers with high sensitivity and specificity. Advanced technologies, such as digital PCR and next-generation sequencing (NGS), enhance the ability to detect and quantify these biomarkers, providing valuable insights into the tumor's molecular signature. The application of these methods promises to improve diagnostic accuracy, facilitate early intervention, and enable personalized management of early-stage breast cancer.

Keywords

Circulating biomarkers, breast cancer, ctDNA, CTCs, liquid biopsy, innovative detection methods

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	viii
Abstract	ix
Περιεχόμενα	x
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	xii
Κατάλογος Πινάκων	xviii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xix
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	1
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	2
1.2.ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	5
1.2.1 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	7
1.2.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	10
1.2.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	13
1.2.4 Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	15
2. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	28
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ: ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ	28
2.2 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ CTCs (Circulating Tumor Cells)	32
2.2.1 CTCs - ΕΝΑΣ ΠΟΛΛΑ ΥΠΟΣΧΟΜΕΝΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ	32
2.2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ DNA ΟΓΚΟΥ – ctDNA (Circulating Tumor DNA) - ΟΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΟΥ ctDNA ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ	39
2.2.3 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs - ncRNAs (Non- Coding RNAs).....	42
.....	55
.....	55
2.2.4 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	55

2.2.5 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΟΓΚΟΥ	60
2.2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	68
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	71
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ	71
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	71
3.1.1 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	72
3.1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ- ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ	100
3.1.3 ΑΞΙΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ	103
3.2 ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	112
Βιβλιογραφία.....	119

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Φυσιολογική ανατομία γυναικείου μαστού. (Προσαρμοσμένο από: "The Breast" (Rehfeld, Nylander, & Karnov, 2017, p. XX). In Compendium of Histology (pp. 593–601). Springer International Publishing).....	5
Εικόνα 2: Δύο θεμελιώδη μοντέλα μετάστασης: Μοντέλα γραμμικής και παράλληλης εξέλιξης. Στο μοντέλο γραμμικής εξέλιξης (δεξιό πλαίσιο), καρκινικά κύτταρα διαχέονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου και στη συνέχεια σε απομακρυσμένες θέσεις (πρωτοπαθείς μετάσταση). Στο μοντέλο παράλληλης εξέλιξης (αριστερό πλαίσιο), καρκινικά κύτταρα από την πρώιμη, εξελίσσονται σε πολλαπλές θέσεις με διαφορετικούς ρυθμούς. (Προσαρμοσμένο από: Dissemination of circulating tumor cells in breast and prostate cancer: Implications for early detection" (Bae et al., 2024). https://doi.org/10.1210/endocr/bqae022)	6
Εικόνα 3: Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού με βάση τους ορμονικούς υποδοχείς και τον υποδοχέα HER2 σε υποτύπους, Συσχετισμός των διαφόρων υποτύπων με την πρόγνωση της νόσου. (Προσαρμοσμένο από: "Advances with metal oxide-based nanoparticles as MDR metastatic breast cancer therapeutics and diagnostics" (Subhan, 2022). RSC Advances, 12(51), 32956–32978. https://doi.org/10.1039/d2ra02005j)	10
Εικόνα 4: Υγρή βιοψία: Ποικιλία κυκλοφορούντων βιοδεικτών που ανιχνεύονται στα διάφορα βιολογικά υγρα. (Προσαρμοσμένο από "Liquid biopsy as a tool for the diagnosis, treatment, and monitoring of breast cancer" (Freitas et al., 2022). International Journal of Molecular Sciences, 23(17), 9952. https://doi.org/10.3390/ijms23179952).....	31
Εικόνα 5: Πλεονεκτήματα της υγρής βιοψίας σε σύγκριση με την βιοψία ιστού. (Προσαρμοσμένο από "Liquid biopsy as a tool for the diagnosis, treatment, and monitoring of breast cancer" (Freitas et al., 2022). International Journal of Molecular Sciences, 23(17), 9952. https://doi.org/10.3390/ijms23179952)	32
Εικόνα 6: Επιθηλιακή Μεσεγχυματική Μετάβαση (EMT) κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων(CTCs): Τα διεισδυτικά κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο παρουσιάζουν πλαστικότητα του επιθηλίου, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας επιθηλιακών δεικτών και αύξησης μεσεγχυματικών δεικτών. Μεμονωμένα και σε συστάδες (CTC clusters) παρουσιάζουν ετερογένεια επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών. (Προσαρμοσμένο	

από: "Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells" (Micalizzi, Haber, & Maheswaran, 2017). <i>Molecular Oncology</i> , 11(7), 770–780. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12081).....	36
Εικόνα 7: Ο ρόλος των miRNAs στον καρκίνο του μαστού. Τα miRNAs εμπλέκονται σε συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης, ρυθμιζόμενα είτε προς τα πάνω είτε προς τα κάτω. Έτσι συμμετέχουν αναλόγως στην ογκογένεση και στην ογκοκαταστολή. (Προσαρμοσμένο από: "Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers" (Amorim, Salta, Henrique, & Jerónimo, 2016). <i>Journal of Translational Medicine</i> , 14, 265. https://doi.org/10.1186/s12967-016-1025-3)	46
Εικόνα 8: Ο ρόλος των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (LncRNAs) στις διάφορες διεργασίες των κυττάρων στον καρκίνο του μαστού. (Προσαρμοσμένο από: "Diagnostic and therapeutic role of non-coding RNAs regulating programmed cell death in melanoma" (Wang, Xie, & Chen, 2024). <i>Frontiers in Oncology</i> , 14, 1476684. https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1476684).....	49
Εικόνα 9: Η λειτουργία των κυκλικών μη κωδικοποιητικών RNAs (circRNAs) ως miRNA sponges και η συμμετοχή τους στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες στον καρκίνο του μαστού. (Προσαρμοσμένο από: "Circular RNAs in breast cancer: An update" (Bao, Li, Zhao, Yang, & Xu, 2024). <i>Biomolecules</i> , 14(2), 158. https://doi.org/10.3390/biom14020158)	55
Εικόνα 10: Συμβολή των εξωσωμάτων, που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα του μαστού, στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την εξέλιξη του καρκίνου. Τα εξωσώματα μεταφέρουν βιομόρια όπως miRNAs, πρωτεΐνες και άλλα φορτία, τα οποία εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες, όπως η καρκινογένεση, η μετάσταση και διήθηση, η απόπτωση και επιβίωση των κυττάρων και η πρωτεϊνική σηματοδότηση. (Προσαρμοσμένο από "Exosomes: A rising star in breast cancer (Review)" (Wang, Wang, Wen, Mao, Ren, & Yang, 2020). <i>Oncology Reports</i> , 44(2), 407–423. https://doi.org/10.3892/or.2020.7638)	59
Εικόνα 11: Η τεχνολογία του συστήματος CellSearch, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs). Τα CTCs διαχωρίζονται μέσω αντισωμάτων EpCAM που είναι συνδεδεμένα με μαγνητικά σωματίδια (ferrofluid). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επισημαίνονται με αντισώματα κυτταροκερατίνης (CK) και DAPI για την ταυτοποίησή τους, ενώ τα λευκά αιμοσφαίρια	

(Leukocytes) επισημαίνονται με αντισώματα CD45. Ο μαγνητικός διαχωρισμός πραγματοποιείται σε ειδικές κασέτες (magnet cartridge) που απομονώνουν τα CTCs βάσει της θετικής τους έκφρασης σε CK, EpCAM και DAPI, και αρνητικής σε CD45.

(Προσαρμοσμένο από: "Clinical applications of circulating tumor cells in lung cancer patients by CellSearch system" (Truini et al., 2014). *Frontiers in Oncology*, 4, 242.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00242>).....75

Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση στρατηγικών εμπλουτισμού για CTCs με βάση τις βιολογικές και φυσικές τους ιδιότητες. Ανοσοσυγγένεια: (Α) Θετική επιλογή επιτρέπει τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό με βάση τις εκφρασμένες πρωτεΐνες σε CTC. (Β) Η αρνητική επιλογή αφαιρεί τα ανεπιθύμητα κύτταρα χρησιμοποιώντας αντισώματα όπως CD45 (C) Ακίνητοποίηση CTCs. (D) Προσεγγίσεις κλίσης πυκνότητας που επιτρέπουν τον διαχωρισμό CTCs με βάση τις πυκνότητες τους. (Ε) Διήθηση με βάση το μέγεθος των κυττάρων (F) Η διηλεκτροφόρηση (DEP) χρησιμοποιεί το διηλεκτρικό φορτίο κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης των CTCs σε ένα αγωγίμο μέσο. (G) Μικρορευστο-υδροδυναμική που χρησιμοποιεί αδράνεια κυψέλης για την ταξινόμηση των CTCs σε διακριτά μικρορευστικά κανάλια. (Προσαρμοσμένο από: "Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy" (Marrugo-Ramírez, Mir, & Samitier, 2018). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2877. <https://doi.org/10.3390/ijms19102877>).....77

Εικόνα 13: Μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης miRNA με RT-qPCR. a)

Αντίστροφη μεταγραφή με εκκινητή βρόχου: Κάθε miRNA μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA χρησιμοποιώντας έναν ειδικό εκκινητή βρόχου. Στη συνέχεια, το cDNA ενισχύεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και ενός υδρολυόμενου ανιχνευτή. Η Taq πολυμεράση υδρολύει τον ανιχνευτή, διαχωρίζοντας το φθορίζον φθοροφόρο από τον ανιχνευτή απόσβεσης φθορισμού (quencher) , επιτρέποντας την ανίχνευση του σήματος.b)

Πολυαδενυλίωση και αντίστροφη μεταγραφή: Τα miRNAs πολυαδενυλιώνονται

(προσθήκη πολυ-A ουράς) με τη χρήση πολύ-A πολυμεράσης.Στη συνέχεια

πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδιο dT. Το cDNA ενισχύεται μέσω ειδικών εκκινητών και παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής. (Προσαρμοσμένο από: "Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection" (Shiddiky, M. J. A. [Ed.], n.d.).).....78

Εικόνα 14: Διαδικασία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυκλοφορούντος DNA όγκου (ctDNA) μέσω ddPCR (ψηφιακής σταγονοειδούς PCR). Η διαδικασία περιλαμβάνει: Συλλογή δείγματος αίματος. Επεξεργασία αίματος με φυγοκέντρηση για διαχωρισμό του πλάσματος. Εξαγωγή του ctDNA από το πλάσμα. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης ddPCR με προσθήκη DNA, εκκινητών και ανιχνευτών. Δημιουργία ~20.000 σταγονιδίων μέσω μικρορευστοποίησης. Ανίχνευση του ctDNA με ενίσχυση μέσω PCR. Ανάγνωση σταγονιδίων για τον προσδιορισμό θετικών και αρνητικών σταγονιδίων. Ψηφιακή ανάλυση των δεδομένων και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του ctDNA. (Προσαρμοσμένο από: "Molecular methods in cancer diagnostics: a short review" (Budhbaware, Rathored, & Shende, 2024). Annals of Medicine, 56(1), 2353893. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2353893>).....82

Εικόνα 15: Μια ολοκληρωμένη διαδικασία ανάλυσης δεδομένων των μεθόδων αλληλούχησης: WGS, WES: Τα γονιδιωματικά δεδομένα (Genomics) αναλύονται για σημειακές μεταλλάξεις, μεταβολές αριθμού αντιγράφων, μικρές εισαγωγές/διαγραφές (small indels) και δομικές αλλαγές. RNA-Seq: Τα μεταγραφομικά δεδομένα (Transcriptomics) αξιολογούνται για διαφορική έκφραση, γονιδιακή σύντηξη, εναλλακτική συρραφή (alternative splicing) και RNA επεξεργασία. Bisulfite-Seq, ChIP-Seq: Τα επιγονιδιωματικά δεδομένα (Epigenomics) επικεντρώνονται σε μεθυλίωση, τροποποιήσεις ιστονών και δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων. Ακολουθεί ανάλυση δεδομένων, όπου γίνεται ερμηνεία των μεταβολών σε γονιδιώματα, μεταγραφώματα και επιγονιδιώματα για τη συσχέτιση με καρκινικά μονοπάτια και λειτουργικές επιδράσεις μεταλλάξεων. Η ενσωμάτωση και η ερμηνεία τέλος, περιλαμβάνουν ολοκληρωμένες αναλύσεις δικτύων και μονοπατιών παρέχοντας βαθύτερη κατανόηση του καρκίνου και ενισχύουν την εφαρμογή κλινικών προσεγγίσεων. (Προσαρμοσμένο από: "Next generation sequencing in cancer research and clinical application" (Shyr & Liu, 2013). Biological Procedures Online, 15(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-15-4>).....86

Εικόνα 16: Αρχή του συστήματος Nanostring nCounter. (α) Το miRNA γεφυρώνει μεταξύ βιοτινυλιωμένου ανιχνευτή σύλληψης, επιτρέποντας την ακινητοποίηση σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και έναν ανιχνευτή ανίχνευσης που φέρει έναν συνδυασμό φθοριζόντων ετικετών που επιτρέπουν την αναγνώριση του miRNA στόχου. (β) Τα ακινητοποιημένα σύνολα ετικετών μετρώνται, καθένα από αυτά αναφέρει τη σύλληψη ενός μόνο μορίου miRNA. (Προσαρμοσμένο από "Advances in multiplexed techniques

for the detection and quantification of microRNAs" (Jet, Gines, Rondelez, & Taly, 2021).
Chemical Society Reviews, 50(6), 4141–4161. <https://doi.org/10.1039/d0cs00609b>).....92

Εικόνα 17: Ροή εργασιών προετοιμασίας χρώσης και ανάλυσης CTCs πλατφόρμας
RareCyte. Α. Συλλογή δειγμάτων στο AccuCyte BCT Β. Συλλογή πυρηνωμένων
κυττάρων με βάση την πυκνότητα και μεταφορά σε αντικειμενοφόρους πλάκες. C.
Σωλήνας διαχωρισμού AccuCyte μετά από φυγοκέντρωση. D. Χρώση διαφανειών και
λήψη εικόνων σάρωσης. E. Ανάλυση εικόνων από το σύστημα CyteFinder.
(Προσαρμοσμένο από: "The RareCyte® platform for next-generation analysis of
circulating tumor cells: RareCyte platform CTC analysis" (Kaldjian et al., 2018).
Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology,
93(12), 1220–1225. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23619>)96

Εικόνα 18: Δοκιμασία CTC καρκίνου του μαστού έξι παραμέτρων που ενσωματώνει
ερευνητικούς βιοδείκτες ER, Her2 και Ki-67. Κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού
που αντιπροσωπεύουν διάφορους φαινοτύπους ER και Her2, τοποθετήθηκαν σε
αντικειμενοφόρους πλάκες και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το
σύστημα AccuCyte. (Προσαρμοσμένο από: "Novel multi-parameter assays for
investigational phenotyping of circulating tumor cells" (Ericson et al., n.d.). RareCyte,
Inc.)97

Εικόνα 19: Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων βιοδεικτών σε σχέση με την φύση του
βιοδείκτη καθώς και σε σχέση με το είδος της ανάλυσης. (Προσαρμοσμένο από:
"Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection" (Soda et al.,
2019). Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine, 7(43),
6670–6704. <https://doi.org/10.1039/c9tb01490j>)102

Εικόνα 20: Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων βιοδεικτών. Παρουσιάζονται στην
πρώτη στήλη οι μέθοδοι και στη δεύτερη στήλη οι αντίστοιχοι ανιχνευόμενοι βιοδείκτες.
(Προσαρμοσμένο από "Circulating tumor biomarkers in early-stage breast cancer:
characteristics, detection, and clinical developments" (Qiu et al., 2023). Frontiers in
Oncology, 13, 1288077. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1288077>)103

Εικόνα 21: Προαναλυτική διαδικασία αναλόγως του προς ανάλυση βιοδείτη καθώς και
της ακολουθούμενης αναλυτικής μεθόδου. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει απομόνωση και
εμπλουτισμό με διάφορες μεθόδους. (Προσαρμοσμένο από: "The pre-analytical phase of

the liquid biopsy" (Salvianti et al., 2020). New Biotechnology, 55, 19–29.

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.006>) 106

Κατάλογος Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Υποτύποι του καρκίνου του μαστού.....	9
--	---

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

BC: Breast Cancer (Καρκίνος του Μαστού)

Bimimg: Τεχνολογία ανίχνευσης κυκλοφορούντων βιοδεικτών μέσω μοριακής απεικόνισης

BRCA (Breast Cancer Genes): Γονίδια BRCA1 και BRCA2, μεταλλάξεις των οποίων συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού

CA: Cancer Antigen (Καρκινικό Αντιγόνο)

CBs: Circulating Biomarkers (Κυκλοφορούντες Βιοδείκτες)

CellSearch System: Εμπορικά διαθέσιμο σύστημα για την ανίχνευση και μέτρηση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs)

cfDNA (Cell-Free DNA): Κυκλοφορούν DNA χωρίς κύτταρα, που περιλαμβάνει και το ctDNA

circRNA (Circular RNA): Κυκλικά RNAs, μη κωδικοποιητικά μόρια RNA που συμμετέχουν στη ρύθμιση του καρκίνου

CK: Cytokeratin (Κυτταροκερατίνη)

CTC CLUSTERS: Συστάδες κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων

CTCs (Circulating Tumor Cells): Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα.

ctDNA (Circulating Tumor DNA): Κυκλοφορούν DNA που προέρχεται από τον όγκο

CytoSorter System: Σύστημα απομόνωσης και ανάλυσης CTCs

ddPCR (Droplet Digital PCR): Ψηφιακή PCR σταγονιδίων για ποσοτική ανίχνευση γενετικού υλικού

EBC: Early Breast Cancer (Πρώιμος Καρκίνος του Μαστού)

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition (Επιθηλιακή Μεσεγχυματική Μετάβαση)

EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule (Μόριο Προσκόλλησης Επιθηλιακών Κυττάρων)

ER (Estrogen Receptor): Υποδοχέας οιστρογόνων

EVs (Extracellular Vesicles): Εξωκυτταρικά κυστίδια που μεταφέρουν βιομόρια

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2): Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα επιδερμικού τύπου

LB: Liquid Biopsy (Υγρή Βιοψία)

LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry): Μέθοδος χρωματογραφίας και φασματομετρίας

miRNAs (MicroRNAs): Μικρά ncRNAs που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση

MRD (Minimal Residual Disease): Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος

MS (Mass Spectrometry): Φασματομετρία μάζας

MUC1: Μια γλυκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με καρκίνους

MVB: Multivesicular Bodies (Πολυκυστικά Σωματίδια)

NanoString Counter: Τεχνολογία ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης

ncRNA (Non-Coding RNA): Μη κωδικοποιητικά RNAs

NAC: Neoadjuvant Chemotherapy (Νεοεπικουρική Χημειοθεραπεία)

NGS (Next-Generation Sequencing): Αλληλούχιση επόμενης γενιάς

NTA (Nanoparticle Tracking Analysis): Μέθοδος ανάλυσης εξωσωμάτων

OS (Overall Survival): Συνολική Επιβίωση

PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1): Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την ανοσοδιαφυγή του όγκου

PR (Progesterone Receptor): Υποδοχέας προγεστερόνης

qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction): Ποσοτική PCR

RCP (Riboflavin Carrier Protein): Πρωτεΐνη Φορέας Ριβοφλαβίνης

RFS (Relapse-Free Survival): Επιβίωση Χωρίς Υποτροπή

RT-PCR (Reverse Transcription PCR): Αντίστροφη μεταγραφή και PCR

ROS: Reactive Oxygen Species (Ενεργές Μορφές Οξυγόνου)

TMB (Tumor Mutational Burden): Φορτίο μεταλλάξεων όγκου

TNBC (Triple-Negative Breast Cancer): Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος του Μαστού

TPS: Tumor Proportion Score (Δείκτης Ποσοστού Όγκου)

VIDESSA BREAST: Διαγνωστικό τεστ βασισμένο σε κυκλοφορούντες βιοδείκτες για τον καρκίνο του μαστού

.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού αναγνωρίζεται ως μια από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως, με όγκους σημαντικά διαφορετικούς, που περιέχουν πολλούς τύπους κυττάρων και που παρουσιάζουν διαφορετικά γενετικά και επιγενετικά προφίλ. Η ύπαρξη κυτταρικής, μοριακής και βιοχημικής ετερογένειας των καρκίνων του ανθρώπινου μαστού αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα των βιοδεικτών, διεγείροντας τις μελέτες για νέες προσεγγίσεις, όπως οι «υγρές βιοψίες». Την τελευταία δεκαετία, έχουν ανοιχτεί νέα σύνορα στον χαρακτηρισμό του καρκίνου αρχικού σταδίου μέσω καινοτόμων μοριακών (π.χ. ελεύθερα κυκλοφορούντα DNA και RNA όγκου, εξωσώματα) και βιοχημικών τεχνολογιών (π.χ. πρωτεομική) στα σωματικά υγρά του ασθενούς. [1]

Ο αυξανόμενος επιπολασμός του καρκίνου του μαστού, παρουσιάζει μια σημαντική παγκόσμια πρόκληση για την υγεία, υπογραμμίζοντας την επείγουσα ανάγκη για βελτιωμένες διαγνωστικές μεθόδους. Η μη επεμβατική φύση της ανίχνευσης των κυκλοφορούντων βιοδεικτών, προσφέρει μια καθησυχαστική προσέγγιση στην ταυτοποίηση ασθενών με καρκίνο του μαστού στα αρχικά στάδια και την αξιολόγηση της ανταπόκρισής τους σε θεραπεία. Αυτή η προσέγγιση υπόσχεται πολλά για τη διάγνωση και την αξιολόγηση της θεραπείας.

Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες στην κλινική πράξη, μπορούν να διευκολύνουν την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού και να βελτιώσουν την ακρίβεια της παρακολούθησης της θεραπείας. Με την παρακολούθηση αλλαγών σε αυτούς τους βιολογικούς δείκτες, οι επαγγελματίες υγείας μπορούν να λαμβάνουν τεκμηριωμένες αποφάσεις σχετικά με τροποποιήσεις στη θεραπεία. Οι πληροφορίες που παρέχονται για τους υποκείμενους μηχανισμούς των κυκλοφορούντων βιοδεικτών προσφέρουν μια πρωτοποριακή προσέγγιση για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού πρώιμου σταδίου.[2]

1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο μαστικός αδένας είναι ένα όργανο εξωδερμικής προέλευσης, χαρακτηριστικό των θηλαστικών, του οποίου η δομή αντανακλά την ιδιαίτερη λειτουργία του που είναι η παραγωγή γάλακτος για τη γαλουχία. Η εσωτερική δομή του μαστικού αδένος αποτελείται από επιθηλιακά στοιχεία τα οποία διαιρούνται σε λοβούς, όπου παράγεται το γάλα. Οι λοβοί συνδέονται με αγωγούς που οδηγούν έξω στη θηλή. Οι λοβοί και οι πόροι απλώνονται σε όλο τον ινώδη και τον λιπώδη ιστό που σχηματίζουν την κύρια μάζα του μαστού. Η δομή του ανδρικού μαστού είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτή του γυναικείου μαστού, με τη διαφορά ότι ο ιστός του ανδρικού μαστού στερείται των εξειδικευμένων λοβών επειδή δεν υπάρχει φυσιολογική ανάγκη για παραγωγή γάλακτος.[3]

Οι μαστοί βρίσκονται εκατέρωθεν του στέρνου μεταξύ της δεύτερης και της έκτης πλευράς, πάνω από τον μείζονα θωρακικό μυ. Το σχήμα του μαστού είναι ημισφαιρικό με μια ουρά ιστού που εκτείνεται στην μασχάλη, γνωστή ως ουρά του Spence.

Σταθεροποιούνται από έναν σύνδεσμο γνωστό ως σύνδεσμο του Κούπερ, που πήρε το όνομά του από τον Σερ Άστλεϊ Κούπερ. Το μέγεθος του μαστού ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και την ηλικία και διαφέρει επίσης μεταξύ των ατόμων. Είναι σύνηθες να έχουμε τον ένα μαστό λίγο μεγαλύτερο από το άλλο. Κεντρικά σε κάθε στήθος βρίσκεται το σύμπλεγμα θηλής – θηλαίας άλω.

Η θηλή είναι η χρωματισμένη κυκλική περιοχή, με διάμετρο περίπου 2,5 cm. Στην επιφάνεια της θηλής υπάρχει ένας αριθμός μικρών προεξοχών γνωστών ως φυματίων του Μοντγκόμερυ, τα οποία είναι τροποποιημένοι σμηγματογόνοι αδένες που σκοπός τους είναι να λιπάνουν τη θηλή κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η επιφάνεια της θηλής είναι διάτρητη από τα ανοίγματα των γαλακτοφόρων αγωγών. Το σύμπλεγμα θηλής – θηλαίας άλω, είναι πλούσιο σε λείες μυϊκές ίνες. [4] (Εικόνα 1) Οι βασικές ανατομικές δομές του μαστού, περιλαμβάνουν το δέρμα, το λίπος, τα στρώματα της περιτονίας, τους συνδέσμους Cooper, τον ινοαδενικό ιστό, τα λεμφαγγεία και τις νευροαγγειακές δομές, όλα τοποθετημένα πάνω από το τοίχωμα του θώρακα. Στους άνδρες, το παρέγχυμα του μαστού συνήθως αποτελείται μόνο από λίπος, με απουσία ινοαδενικού ιστού. Στις

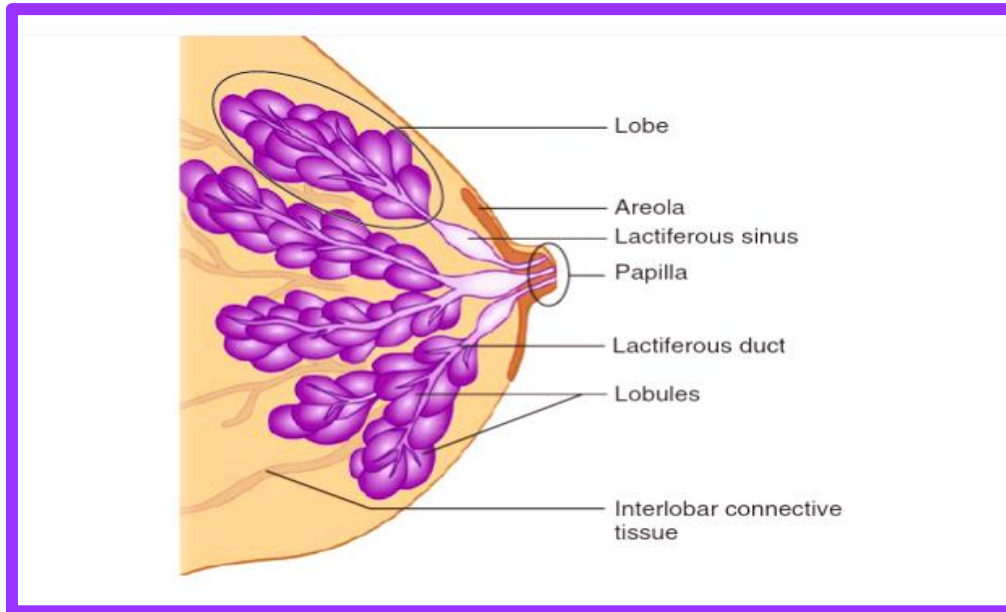
γυναίκες, ο όγκος του ινοαδενικού ιστού ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία, με πολλές γυναίκες να έχουν υπερχρή λίπους στους μαστούς μετά την εμμηνόπαυση.

Εμβρυολογικά, ο μαστός αναπτύσσεται υπό γενετική και ορμονική επίδραση από τα πρόδρομα κύτταρα του δέρματος κατά την τέταρτη έως τη δωδέκατη εβδομάδα κύησης και ο προκύπτων οφθαλμός του μαστού συνεχίζει να επιμηκύνεται και να διακλαδίζεται σε όλη την υπόλοιπη κύηση, σχηματίζοντας ένα σύνθετο δίκτυο ακτινικά διατεταγμένων αγωγών του μαστού που συνδέουν η θηλή με τους μαστικούς λοβούς. Η βασική παροχή αρτηριακού αίματος στο μαστό προέρχεται από την έσω θωρακική αρτηρία. Στην περίοδο της εγκυμοσύνης ο λοβιακός ιστός του μαστού φθάνει σε λειτουργική ωριμότητα. Εντός των λοβών του μαστού, η μονή στιβάδα των επιθηλιακών λοβιακών κυττάρων, με μια υποκείμενη στοιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων διαφοροποιείται για τη γαλουχία. Μετά τον τοκετό, η ορμόνη προλακτίνη διεγείρει τα λοβιακά επιθηλιακά κύτταρα για να παράγουν και να εκκρίνουν πρωτεΐνες γάλακτος και η ωκυτοκίνη προκαλεί συστολή των μυοεπιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τις λοβιακές κυψελίδες για να αποβάλλει το γάλα για το παιδί που θηλάζει. Μετά τη διακοπή του θηλασμού, τα λοβιακά επιθηλιακά κύτταρα επιστρέφουν στη μη λειτουργική τους κατάσταση. Αργότερα στη ζωή (ξεκινώντας περίπου στην ηλικία των 40 ετών), ο λοβιακός και ο πόρων ιστός του μαστού στο μαστό αρχίζει να ατροφεί, με περιέλιξη του αδενικού ιστού και αντικατάσταση από συνδετικό ιστό και λίπος. [5]

Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του εμμηνορροϊκού κύκλου, οι λοβοί είναι μικροί, με λίγες κυψελίδες και υπάρχει χαμηλή μιτωτική δραστηριότητα. Κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης, οι λοβοί και οι κυψελίδες αναπτύσσονται με ανοιχτούς αυλούς και η μιτωτική δραστηριότητα είναι στο μέγιστο. Από την ημέρα 27 έως την έμμηνο ρύση, αυτές οι αλλαγές υποχωρούν. Ωστόσο, ο εκφυλισμός της επιθηλιακής ανάπτυξης δεν είναι πλήρης, και μέρος της ωοθυλακικής ανάπτυξης παραμένει μέχρι τον επόμενο κύκλο. Με την αύξηση των ετών, παρατηρείται μια σχετική μείωση της μιτωτικής δραστηριότητας μέχρι την ηλικία των 35 ετών περίπου, όταν η ανάπτυξη του μαστού εμφανίζεται.

Κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, ο μαστός φτάνει στην πλήρη λειτουργική του ικανότητα και ως αποτέλεσμα, συμβαίνουν αρκετές εσωτερικές και εξωτερικές αλλαγές. Το χρώμα της θηλαίας άλω σκουραίνει και οι αδένες Μοντγκόμερν, που είναι ένας συνδυασμός σμηγματογόνων αδένων και μαστικών αδένων γάλακτος, αυξάνονται σε μέγεθος. Οι εκκρίσεις αυτών των αδένων, πιστεύεται ότι παρέχουν προστασία της μητέρας τόσο από το μηχανικό στρες του θηλασμού όσο και από την παθογόνο εισβολή. Επιπλέον, υπάρχει επίσης υποψία ότι το έκκριμα μπορεί να λειτουργήσει ως μέσο επικοινωνίας με το βρέφος μέσω της οσμής. Σε σχέση με αυτό, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο αυξημένος αριθμός αδένων Μοντγκόμερν σχετίζεται με αυξημένη αύξηση βάρους του βρέφους τις πρώτες 3 ημέρες μετά τη γέννηση, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει πράγματι λειτουργικός ρόλος των αδένων Μοντγκόμερν κατά τη διάρκεια της γαλουχίας.

Αν και είναι ευρέως αναγνωρισμένο ότι η πλήρης κατανόηση της ανατομίας ενός οργάνου είναι απαραίτητη για να καταστεί δυνατή η αξιολόγηση τυχόν ανωμαλιών σε αυτό το όργανο, έχει υπάρξει μικρή έρευνα για την ανατομία του φυσιολογικού θηλάζοντος μαστού από τότε που ο Sir Astley Cooper πραγματοποίησε λεπτομερείς ανατομές της ανατομίας του μαστού πριν από περισσότερα από 160 χρόνια. Πρόσφατα, ένας μικρός αριθμός μελετών επικεντρώθηκε στη γενική ανατομία του μαστού και διαπίστωσε ότι το σύστημα του πόρου αποτελείται από λιγότερους αριθμούς κύριων αγωγών από ό,τι πιστεύαμε προηγουμένως. Επιπλέον, οι αγωγοί είναι συμπίεσιμοι και δεν περιέχουν μεγάλες ποσότητες γάλακτος, η ποσότητα του λιπώδους ιστού στο στήθος είναι μεταβλητή και ένα ποσοστό βρίσκεται εντός του αδενικού ιστού. Αυτά τα ευρήματα προσθέτουν στην κατανόησή μας τόσο για τη φυσιολογία όσο και για την παθολογία του θηλάζοντος μαστού.[6]



Εικόνα 1: Φυσιολογική ανατομία γυναικείου μαστού. (Προσαρμοσμένο από: "The Breast" (Rehfeld, Nylander, & Karnov, 2017, p. XX). In *Compendium of Histology* (pp. 593–601). Springer International Publishing)

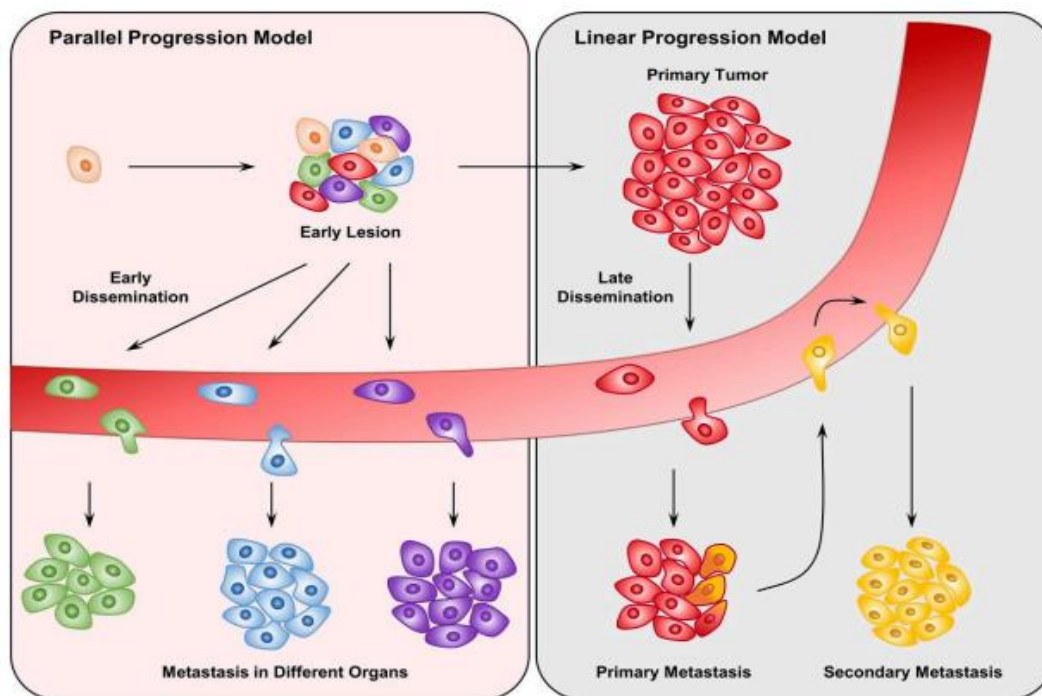
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους διηθητικούς καρκίνους στις γυναίκες. Στην πραγματικότητα, είναι η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Αν και κυρίως γυναικείος καρκίνος, έχει παρατηρηθεί σε άνδρες, αν και πολύ σπάνια. Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται όταν τα κύτταρα του μαστού αρχίζουν να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα, σχηματίζοντας έναν όγκο που μπορεί να γίνει αισθητός ως εξόγκωμα. Ο όγκος μπορεί να είναι κακοήθης εάν τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντες ιστούς και να εξαπλωθούν σε κοντινά όργανα ή άλλες περιοχές του σώματος.

Η μετάλλαξη του γονιδίου BRCA1 ή BRCA2 είναι η πιο κοινή αιτία κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Οι επιστήμονες πιστεύουν ότι οι γονιδιακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις βιοφυσιολογικές οδούς ρύθμισης των κυττάρων (που ονομάζονται μονοπάτια PI-3K-AKT-mTOR και RAS/MEK/ERK) είναι κυρίως υπεύθυνες για τον

καρκίνο του μαστού (BC-Breast Cancer), αν και πολλά άλλα γονίδια εμπλέκονται επίσης, συμπεριλαμβανομένων των ATM, TP53, CHEK -2, PTEN, CDH1, STK11 και PLB2 . [7]

Τα δύο κορυφαία μοντέλα που έχουν προταθεί για την καρκινογένεση του μαστού είναι το μοντέλο σποραδικής κλωνικής εξέλιξης και το μοντέλο καρκινικών βλαστοκυττάρων (cSC-cancer Stem Cell) . Σύμφωνα με την υπόθεση της σποραδικής κλωνικής εξέλιξης, οποιαδήποτε από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού μπορούν να αποτελέσουν στόχο τυχαίων μεταλλάξεων. Τα κύτταρα με πλεονεκτικές γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις επιλέγονται με την πάροδο του χρόνου για να «συνεισφέρουν» στην εξέλιξη του όγκου. Το εναλλακτικό μοντέλο cSC υποστηρίζει ότι μόνο τα βλαστοκύτταρα και τα προγονικά κύτταρα μπορούν να ξεκινήσουν και να διατηρήσουν την εξέλιξη του όγκου. Οι δύο υποθέσεις δεν αλληλοαποκλείονται μια και έχει προταθεί ότι τα βλαστοκύτταρα ενδέχεται να υποστούν κλωνοποίηση, παρέχοντας μια δυναμική σύνδεση μεταξύ των δύο μοντέλων. [8] (εικόνα 2)



Εικόνα 2: Δύο θεμελιώδη μοντέλα μετάστασης: Μοντέλα γραμμικής και παράλληλης εξέλιξης. Στο μοντέλο γραμμικής εξέλιξης (δεξιό πλαίσιο), καρκινικά κύτταρα διαχέονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου και στη συνέχεια σε απομακρυσμένες θέσεις (πρωτοπαθείς μετάσταση). Στο μοντέλο παράλληλης εξέλιξης (αριστερό πλαίσιο), καρκινικά κύτταρα από την πρώιμη, εξελίσσονται σε πολλαπλές θέσεις με διαφορετικούς ρυθμούς. (Προσαρμοσμένο από:

Dissemination of circulating tumor cells in breast and prostate cancer: Implications for early detection" (Bae et al., 2024). <https://doi.org/10.1210/endo/bgae022>)

1.2.1 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού εξαρτάται από το μέγεθος του όγκου, την επέκταση της νόσου στους λεμφαδένες ή σε άλλα μέρη του σώματος, σύμφωνα με το σύστημα TNM [T - όγκος, N - λεμφαδένες, M – μεταστάσεις]. Αυτές οι πληροφορίες χρησιμοποιούνται και βοηθούν ώστε να αποφασιστεί η βέλτιστη θεραπεία. Η παρουσία βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων των ορμονικών υποδοχέων και ενός υποδοχέα που ονομάζεται HER2, βοηθούν επίσης στον προσδιορισμό του τύπου της θεραπείας.

1.2.1.1 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να κατηγοριοποιηθεί από το εάν είναι μη-διηθητικός ή διηθητικός.

A. Μη-διηθητικός καρκίνος του μαστού (in situ)

Το διηθητικό καρκίνωμα in situ (DCIS): Είναι μια προκαρκινική αλλοίωση. Σε αυτό τον τύπο του καρκίνου, τα καρκινικά κύτταρα εστιάζονται στους πόρους του μαστού αλλά δεν έχουν εξαπλωθεί στους υγιείς ιστούς του μαστού.

Η λοβιακή νεοπλασία (παλαιότερα ονομάζονταν λοβιακό καρκίνωμα in situ):

Αναφέρεται στις αλλαγές στα κύτταρα που επενδύουν τα λόβια, το οποίο καταδεικνύει ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στο μέλλον. Η λοβιακή νεοπλασία δεν είναι ακριβώς καρκίνος του μαστού και παρόλο που οι γυναίκες με λοβιακή νεοπλασία υποβάλλονται σε τακτικούς ελέγχους, οι περισσότερες δεν θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού.

B. Διηθητικός καρκίνος του μαστού: Διηθητικός καρκίνος του μαστού είναι το όνομα που δίνεται σε ένα καρκίνο ο οποίος έχει εξαπλωθεί έξω από τους πόρους (διηθητικός πορογενής καρκίνος του μαστού) ή τα λόβια (διηθητικός λοβιακός καρκίνος του μαστού). Αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν επιπλέον από την ιστολογία τους. Για παράδειγμα ο σωληνώδης, ο βλεννώδης, ο μυελοειδής και ο θηλώδης όγκος του μαστού είναι σπάνιοι υπότυποι καρκίνου του μαστού.

1.2.1.2 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΠΟΣΟ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ ΕΙΝΑΙ Η ΝΟΣΟΣ

Α.Πρώιμος καρκίνος του μαστού (σταδιο 0-ΙΑ): Ο καρκίνος του μαστού περιγράφεται ως αρχικός, εάν ο όγκος δεν έχει εξαπλωθεί πέραν από το μαστό ή τους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Οι καρκίνοι αυτοί είναι συνήθως χειρουργήσιμοι και η κύρια θεραπεία τους είναι συχνά το χειρουργείο για την απομάκρυνση του καρκίνου, αν και πολλοί ασθενείς λαμβάνουν προεγχειρητική νεοεπικουρική συστηματική θεραπεία.

Β.Τοπικά προχωρημένος καρκίνος του μαστού (στάδια ΙΒ ΙΙΙ): Ο καρκίνος του μαστού είναι τοπικά προχωρημένος εάν έχει εξαπλωθεί πέρα από το μαστό στους γύρω ιστούς ή τους λεμφαδένες. Στην μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών, η θεραπεία για τον τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού αρχίζει με συστηματικές θεραπείες. Ανάλογα με το πόσο έχει εξαπλωθεί ο καρκίνος, τοπικά προχωρημένοι όγκοι μπορεί να είναι είτε εγχειρήσιμοι ή ανεγχείρητοι.

Γ.Μεταστατικός καρκίνος του μαστού (στάδιο ΙV): Ο καρκίνος του μαστού περιγράφεται ως μεταστατικός όταν έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος, όπως τα οστά, το ήπαρ ή οι πνεύμονες. Ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού δεν είναι ιάσιμος αλλά είναι αντιμετωπίσιμος.

Δ.Προχωρημένος καρκίνος του μαστού: Ο προχωρημένος καρκίνος του μαστού είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει και τους δύο, τον τοπικά προχωρημένο ανεγχείρητο καρκίνο του μαστού και το μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Η ανάπτυξη κάποιων όγκων διεγείρεται από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη. Είναι σημαντικό να βρεθεί εάν ένας όγκος έχει **οιστρογονικούς υποδοχείς (ER)** ή **προγεστερονικούς υποδοχείς (PgR)** θετικούς ή αρνητικούς, καθώς όγκοι με υψηλό επίπεδο ορμονικών υποδοχέων μπορούν να θεραπευτούν με φάρμακα τα οποία μειώνουν την παροχή των ορμονών στον όγκο. Ο **HER2** είναι επίσης ένας υποδοχέας που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των κυττάρων και παρουσιάζεται σε περίπου 20% των καρκίνων του μαστού. Όγκοι οι οποίοι έχουν υψηλό επίπεδο του HER2 μπορούν να θεραπευτούν με αντι-HER2 φάρμακα. Όγκοι που δεν έχουν ER, PgR ή υψηλά επίπεδα HER2 περιγράφονται ως τριπλά αρνητικοί όγκοι. [9]

1.2.1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΥΣ ΟΡΜΟΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ, ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ HER2 ΚΑΙ ΤΟΝ ΔΕΙΚΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67

Α. ΠΡΩΪΜΗ ΝΟΣΟΣ (ΣΤΑΔΙΑ I-III)

Για τον καλύτερο καθορισμό του οφέλους από την επικουρική χημειοθεραπεία αλλά και της πρόγνωσης, οι όγκοι προτείνεται να κατηγοριοποιούνται με βάση την ιστολογία και την ανοσοϊστοχημεία ρουτίνας κατ' αντιστοιχία των μοριακών υποτύπων: luminal A, luminal B, HER2-positive και 'basal-like'. (πίνακας 1). (Εικόνα 3)

Μοριακός Υπότυπος (κατ' αντιστοιχία)	Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά
Luminal A-like (αυλικού τύπου A)	Έκφραση υποδοχέα οιστρογόνων (ER), χωρίς υπερέκφραση HER2 Υψηλή έκφραση προγεστερονικού υποδοχέα (PR) Χαμηλό Ki-67 Ή Μοριακή υπογραφή με αποτέλεσμα συμβατό με χαμηλό κίνδυνο
Luminal B-like (αυλικού τύπου B)	Έκφραση ER, χωρίς υπερέκφραση HER2 ΚΑΙ είτε χαμηλή έκφραση PR είτε υψηλό Ki-67 Ή Μοριακή υπογραφή με αποτέλεσμα συμβατό με υψηλό κίνδυνο
Luminal B-like HER2-θετικός	Έκφραση ER ΚΑΙ υπερέκφραση HER2 Ανεξάρτητα από την έκφραση PR και το Ki-67
HER2-θετικός (non luminal)	Υπερέκφραση HER2 Χωρίς έκφραση ER και PR
'Basal-like'	ΧΩΡΙΣ έκφραση ER και PR και χωρίς υπερέκφραση HER2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

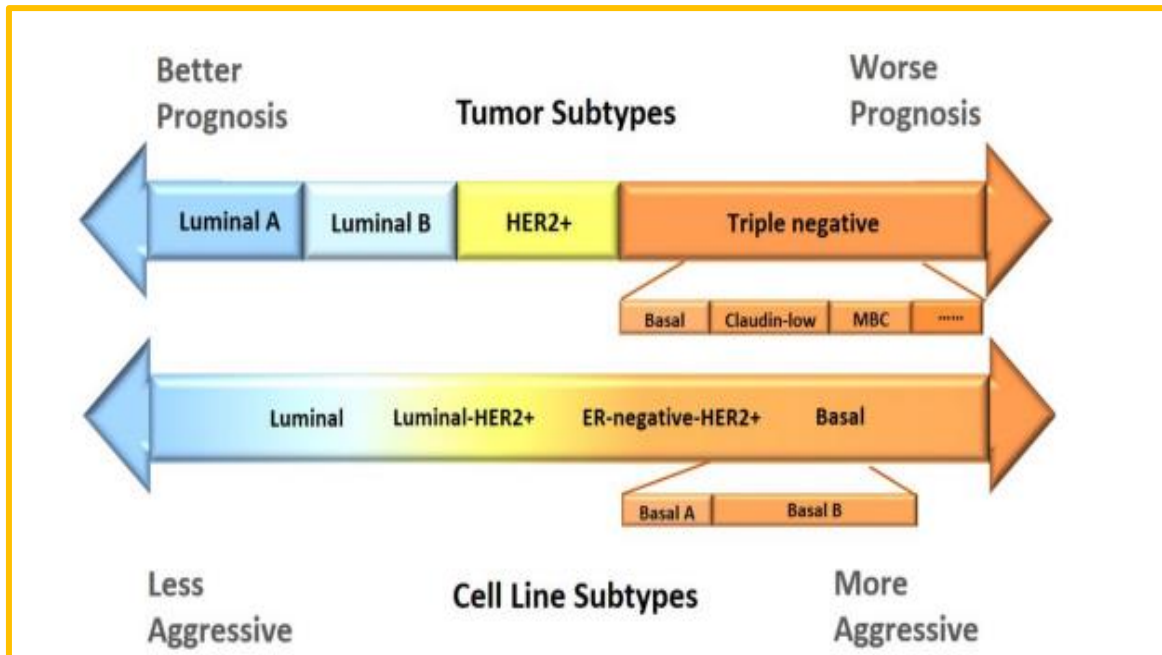
Β. ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

B1. Ορμονοευαίσθητη νόσος

B2. HER2-θετική νόσος

B3. Τριπλά αρνητική νόσος

B4. Ασθενείς με μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1/2 και HER2-αρνητική νόσο. [10]



Εικόνα 3: Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού με βάση τους ορμονικούς υποδοχείς και τον υποδοχέα HER2 σε υποτύπους, Συσχετισμός των διαφόρων υποτύπων με την πρόγνωση της νόσου.

(Προσαρμοσμένο από: "Advances with metal oxide-based nanoparticles as MDR metastatic breast cancer therapeutics and diagnostics" (Subhan, 2022). RSC Advances, 12(51), 32956–32978.

<https://doi.org/10.1039/d2ra02005j>)

1.2.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.2.2.1 ΚΑΘΙΕΡΩΜΕΝΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού γίνεται μέσω συνδυασμού κλινικής εξέτασης, απεικονιστικών μεθόδων και ιστολογικών εξετάσεων. Οι κύριες μέθοδοι είναι οι εξής:

A. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Αυτοεξέταση μαστών: Η γυναίκα παρακολουθεί τακτικά τους μαστούς της για αλλαγές (όπως εξογκώματα, πρήξιμο, αλλαγή στο δέρμα ή στη θηλή).

Κλινική εξέταση από γιατρό: Ο γιατρός ψηλαφά τους μαστούς και τις μασχάλες για ανώμαλες μάζες ή διογκωμένους λεμφαδένες.

B. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Μαστογραφία: Η βασική προληπτική εξέταση για τον καρκίνο του μαστού.

Μπορεί να ανιχνεύσει όγκους που δεν είναι ψηλαφητοί.

Χωρίζεται σε: 1. Προληπτική μαστογραφία: Σε γυναίκες χωρίς συμπτώματα και
2. Διαγνωστική μαστογραφία: Για περαιτέρω διερεύνηση αν υπάρχει ύποπτη περιοχή.

β. Υπερηχογράφημα μαστού: Συμπληρωματική εξέταση, ιδιαίτερα χρήσιμη σε γυναίκες με πυκνό μαστό. Μπορεί να διακρίνει μεταξύ κυστικών (υγρού) και συμπαγών μορφωμάτων.

γ. Μαγνητική τομογραφία (MRI): Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου οι άλλες απεικονιστικές μέθοδοι δεν είναι σαφείς. Είναι χρήσιμη για τη διερεύνηση πολλαπλών εστιών καρκίνου ή σε γυναίκες υψηλού κινδύνου.

δ. Τομοσύνθεση (3D μαστογραφία): Παρέχει λεπτομερέστερη απεικόνιση του μαστού. Ιδιαίτερα χρήσιμη για γυναίκες με πυκνό μαστό.

Γ. ΒΙΟΨΙΑ:

Απαραίτητη για την επιβεβαίωση της διάγνωσης.

Μορφές βιοψίας:

α. Λεπτή βελόνα (Fine Needle Aspiration -FNA): Λαμβάνει δείγμα κυττάρων από τον όγκο. Χρήσιμη για αρχική αξιολόγηση.

Β. Βιοψία με παχιά βελόνα (Core Needle Biopsy): Λαμβάνει ιστό για πιο λεπτομερή ανάλυση.

Χειρουργική βιοψία: Αφαιρείται ολόκληρη ή μέρος της ύποπτης μάζας όταν οι άλλες μέθοδοι δεν επαρκούν.

Δ. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΕΣ/ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ :

Εξετάζεται το υλικό που λαμβάνεται από τη βιοψία.

Αναλύονται οι υποδοχείς ορμονών (ER, PR) και το HER2.

Αξιολογείται η επιθετικότητα (Ki-67).

Ε. ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

PET-CT ή αξονική τομογραφία (CT): Για την ανίχνευση μεταστάσεων.

Σπινθηρογράφημα οστών: Εξετάζεται η εξάπλωση του καρκίνου στα οστά.

ΣΤ. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Συνιστάται ετήσια ή διετής μαστογραφία για γυναίκες άνω των 40 ετών ή νωρίτερα σε περίπτωση οικογενειακού ιστορικού ή αυξημένου κινδύνου.

Η έγκαιρη διάγνωση μέσω αυτών των μεθόδων βελτιώνει σημαντικά την πρόγνωση και τη δυνατότητα επιτυχούς θεραπείας.

1.2.2.2 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι Σύγχρονες Μοριακές και Γενετικές Τεχνολογίες, ανοίγουν τον δρόμο για πιο στοχευμένες και αποτελεσματικές προσεγγίσεις στον καρκίνο του μαστού, με απώτερο στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της επιβίωσης των ασθενών. Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, ανάλυση κυκλοφορούντος DNA όγκου (ctDNA), γονιδιωματική ανάλυση (ανάλυση μεταλλάξεων σε γονίδια όπως BRCA1, BRCA2, PIK3CA και TP53), μεθυλίωση DNA, καθώς και πολυγονιδιακά προγνωστικά τεστ (τεχνολογίες όπως το Oncotype DX και το MammaPrint). [1]

Οι βιοχημικοί αισθητήρες έχουν κερδίσει μεγάλο ενδιαφέρον στις βιοϊατρικές εφαρμογές, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προληπτικό έλεγχο της νόσου, τη διάγνωση και ως εργαλεία παρακολούθησης της θεραπείας. Επιπλέον, η χρήση χημειοαισθητήρων έχει δημιουργήσει πολλά υποσχόμενες ευκαιρίες για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Οι χημικές αρχές πίσω από αυτούς τους αισθητήρες βελτιώνουν την επιλεκτικότητα και την ευαισθησία τους, επιτρέποντας ακριβέστερη αναγνώριση στόχων και μείωση των ορίων ανίχνευσης. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει οπτικούς, ηλεκτροχημικούς και αισθητήρες τρανζίστορ. Αυτό επιτρέπει την ακριβέστερη αναγνώριση καρκινικών δεικτών και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.

Οι θερμικοί αισθητήρες, μπορούν να ανιχνεύσουν διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του ιστού του μαστού που μπορεί να σηματοδοτούν μη φυσιολογική ανάπτυξη ή κακοήθειες. Οι όγκοι ενισχύουν την κυκλοφορία του αίματος στους περιβάλλοντες ιστούς, επομένως, οι αισθητήρες θερμότητας αξιολογούν μικρές αλλαγές στη ροή του αίματος. Τα έξυπνα εμφυτεύματα εξυπηρετούν τόσο θεραπευτικούς όσο και διαγνωστικούς σκοπούς. Μπορούν να παρέχουν αντικειμενικά ποσοτικά δεδομένα για την προσαρμογή των φαρμάκων, και τον έγκαιρο εντοπισμό δυσμενών συνεπειών. Αυτά τα εμφυτεύματα αξιολογούν ζωτικά σημεία, διεγείρουν τα νεύρα και βοηθούν τα όργανα. Ορισμένα εμφυτεύματα μπορούν να παρακολουθούν την υγεία ενός ασθενούς και να παρέχουν δεδομένα σε πραγματικό χρόνο στους γιατρούς, βελτιώνοντας τη διάγνωση και τη θεραπεία. [11]

1.2.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.2.3.1 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ: ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο κορυφαίος πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος με συνολικά 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις (11,7%). Επιπλέον, σύμφωνα με εκτιμήσεις, ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και οι θάνατοι στις ΗΠΑ ήταν 0,28 εκατομμύρια και 0,04 εκατομμύρια, αντίστοιχα. Ως εκτίμηση, μία στις 4 γυναίκες έχει καρκίνο του μαστού και μία στις 8 γυναίκες πέθαναν λόγω ασθένειας καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία, η παγκόσμια επιβάρυνση του καρκίνου θα είναι 28,4 εκατομμύρια περιπτώσεις έως το 2040, που είναι ~47% αύξηση σε σύγκριση με την επιβάρυνση του καρκίνου το 2020. Οι γυναίκες σε μεγαλύτερη ηλικία έχουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Το 2018, αναφέρθηκαν 6,4 έναντι 1,4 εκατομμυρίων περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και 130.000 έναντι 490.000 θανάτων στην προεμμηνοπαυσιακή και μετεμμηνοπαυσιακή ομάδα, αντίστοιχα. Η ανεπάρκεια προσέγγισης της πρώιμης διάγνωσης και της αποτελεσματικής θεραπείας παραμένει κρίσιμος παράγοντας για υψηλότερη θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού στις αναπτυσσόμενες χώρες .[12]

Τα διαθέσιμα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η επίπτωση και η θνησιμότητα στις χώρες με υψηλούς πόρους μειώνονται, ενώ η επίπτωση και η θνησιμότητα σε χώρες με χαμηλούς πόρους αυξάνονται. Αυτό το μοτίβο είναι πιθανό να οφείλεται σε μεταβαλλόμενα προφίλ παραγόντων κινδύνου και διαφορές στην πρόσβαση στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν την αύξηση της ηλικίας, τη φυλή, το ιστορικό εμμηναρχής, τα χαρακτηριστικά του μαστού, τη χρήση ορμονών, τη χρήση αλκοόλ, τη χρήση καπνού, τη διατροφή, τη σωματική δραστηριότητα και τη συνήθη συμπεριφορά του σώματος.[13]

Το 2020, η αναλογία θνησιμότητας προς επίπτωση από τον καρκίνο του μαστού (MIR) ως αντιπροσωπευτικός δείκτης των ποσοστών πενταετούς επιβίωσης ήταν 0,30 παγκοσμίως.

Λαμβάνοντας υπόψη την κλινική έκταση του καρκίνου του μαστού, σε περιοχές με ανεπτυγμένη υγειονομική περίθαλψη (Χονγκ-Κονγκ, Σιγκαπούρη, Τουρκία) η 5ετής επιβίωση ήταν 89,6% για τον εντοπισμένο καρκίνο και 75,4% για τον μεταστατικό καρκίνο. Σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες (Κόστα Ρίκα, Ινδία, Φιλιππίνες, Σαουδική Αραβία, Ταϊλάνδη) τα ποσοστά επιβίωσης ήταν 76,3% και 47,4% για τοπικό και μεταστατικό καρκίνο του μαστού αντίστοιχα. Οι τρέχουσες προβλέψεις δείχνουν ότι μέχρι το 2030 ο παγκόσμιος αριθμός των νέων περιπτώσεων που διαγιγνώσκονται φθάνει τα 2,7 εκατομμύρια ετησίως, ενώ ο αριθμός των θανάτων σε 0,87 εκατομμύρια. Σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω λόγω του εκδυτικισμού του τρόπου ζωής (π.χ. καθυστερημένες εγκυμοσύνες, μειωμένος θηλασμός, χαμηλή ηλικία στην εμμηναρχή, έλλειψη σωματικής δραστηριότητας και κακή διατροφή).

1.2.3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΙΝΔΥΝΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Γυναικείο Φύλο: Το γυναικείο φύλο αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού κυρίως λόγω της ενισχυμένης ορμονικής διέγερσης. Σε αντίθεση με τους άντρες που παρουσιάζουν ασήμαντα επίπεδα οιστρογόνων, οι γυναίκες έχουν κύτταρα μαστού που είναι πολύ ευάλωτα στις ορμόνες (ιδιαίτερα οιστρογόνα και προγεστερόνη).

Ηλικία: Επί του παρόντος, περίπου το 80% των ασθενών με καρκίνο του μαστού είναι άτομα ηλικίας >50 ενώ περισσότερο από το 40% είναι άτομα άνω των 65 ετών. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται ως εξής: Κίνδυνος 1,5% στην ηλικία των 40 ετών, 3% στην ηλικία των 50 ετών, και περισσότερο από 4% στην ηλικία των 70 ετών.

Οικογενειακό Ιστορικό: Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού αποτελεί σημαντικό παράγοντα που σχετίζεται σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο. Περίπου το 13-19% των ασθενών που διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού αναφέρει έναν συγγενή πρώτου βαθμού που έπασχε από την ίδια πάθηση.

Ένα οικογενειακό ιστορικό του καρκίνου των ωοθηκών – ειδικά εκείνων που χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις BRCA1 και BRCA2 – μπορεί να προκαλούν επίσης μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου του μαστού.

Γενετικές μεταλλάξεις: Αρκετές γενετικές μεταλλάξεις αναφέρθηκε ότι σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου του μαστού. Δύο κύρια γονίδια που είναι το BRCA1 (εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17) και BRCA2 (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13), συνδέονται πρωτίστως με τον αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης του μαστού .

Άλλα γονίδια περιλαμβάνουν το TP53, CDH1, PTEN και STK11. Σημαντικός αριθμός γονιδίων επιδιόρθωσης DNA που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με γονίδια BRCA, συμπεριλαμβανομένων των ATM, PALB2, BRIP1, ή CHEK2, αναφέρθηκε ότι εμπλέκονται στην καρκινογένεση του μαστού.

Φυλή/Εθνότητα: Το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του μαστού παραμένει το υψηλότερο μεταξύ των λευκών γυναικών. Αντίθετα, το ποσοστό θνησιμότητας λόγω αυτής της κακοήθειας είναι σημαντικά υψηλότερο μεταξύ των μαύρων γυναικών.

Πυκνότητα ιστού μαστού: Μεγαλύτερη πυκνότητα του ιστού του μαστού συσχετίζεται με τον μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου. Προτάθηκε ότι ο έλεγχος της πυκνότητας του ιστού του μαστού, θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη, μη επεμβατική και γρήγορη μέθοδος που επιτρέπει την ορθολογική παρακολούθηση γυναικών με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου.

Πλήθος άλλων παραγόντων που σχετίζονται με το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής , έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

Μερικοί από αυτούς είναι ορισμένα φάρμακα ηφυσική δραστηριότητα, ο δείκτης μάζας σώματος, η πρόσληψη αλκοόλ, το κάπνισμα κ.ά.[14]

1.2.4 Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η παθογένεση του καρκίνου του μαστού είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλούς γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες. Η ανάπτυξή του, συνήθως ακολουθεί μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει γενετικές μεταλλάξεις, απορύθμιση των κυτταρικών οδών και αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Στην διαδικασία της εμφάνισης και εξέλιξης του όγκου, εμπλέκονται πολλά

συστήματα με σημαντικό το ρόλο που διαδραματίζει το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και πολλές μεταβολικές και μοριακές διεργασίες.

1.2.4.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι γενετικοί παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεση του BC, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικής έρευνας, καθώς η κατανόηση της γενετικής βάσης της νόσου προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την πρόληψη, την πρόληψη και την εξατομικευμένη θεραπεία.

Το οικογενειακό ιστορικό της νόσου είναι ο σημαντικός γενετικός παράγοντας κινδύνου που σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού. Το πιο καθιερωμένο μοντέλο ευαισθησίας είναι ο καρκίνος που οφείλεται σε αρκετούς αριθμούς μεταλλάξεων υψηλής διείσδυσης, όπως στα BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, STK11 και CDH1, και έναν πολύ μεγαλύτερο αριθμό παραλλαγών μέτριας διείσδυσης σε CHK2, ATM, RAD51C, BRIP1 και το PALB2. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, μόνο το 15%–20% του οικογενούς καρκίνου του μαστού φέρει ισχυρά προδιαθεσικές μεταλλάξεις BRCA1 και BRCA2, ενώ το υπόλοιπο 80%–85% του οικογενειακού κινδύνου προέρχεται από άλλα γνωστά και άγνωστα οικογενειακά προδιαθεσικά γονίδια. Ωστόσο, άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 ή BRCA2 έχουν κίνδυνο 47%-87%. ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μέχρι την ηλικία των 70 ετών.[15] Ο οικογενής καρκίνος του μαστού (περίπου το 30 τοις εκατό των ασθενών), που παρατηρείται συχνά σε οικογένειες με υψηλή συχνότητα BC (Breast Cancer), έχει συσχετιστεί με έναν αριθμό γονιδίων ευαισθησίας υψηλής, μέτριας και χαμηλής διείσδυσης. Μελέτες οικογενειακής σύνδεσης έχουν εντοπίσει γονίδια υψηλής διείσδυσης, BRCA1, BRCA2, PTEN και TP53, που ευθύνονται για τα κληρονομικά σύνδρομα.

Επιπλέον, ένας συνδυασμός προσεγγίσεων που βασίζονται στην οικογένεια και στον πληθυσμό έδειξε ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, όπως τα CHEK2, ATM, BRIP1 (FANCI), PALB2 (FANCD1) και RAD51C (FANCD2), σχετίζονται με μέτριο κίνδυνο ανάπτυξης BC.[16]

Τα γονίδια υψηλής διείσδυσης, BRCA1 και BRCA2, αποδίδονται ως κύρια προδιαθεσικά γονίδια στον καρκίνο του μαστού και συνιστώνται για γενετικό έλεγχο. Εναλλακτικά, πρόσφατες μελέτες έχουν αναγνωρίσει το γονίδιο PALB2 ως ένα αξιόπιστο γονίδιο δείκτη

ευαισθησίας στον καρκίνο του μαστού και συνιστάται για γενετικό έλεγχο σε ασθενείς με κληρονομικό καρκίνο του μαστού μαζί με τα BRCA. [15]

Γονίδια BRCA1 και BRCA2: Η πρώτη απόδειξη της ύπαρξης ενός γονιδίου ευαισθησίας BC που κωδικοποιεί ένα ένζυμο επιδιόρθωσης DNA στο χρωμόσωμα 17 παρασχέθηκε από μελέτες σύνδεσης το 1990 και το BRCA1 στο χρωμόσωμα 17 αναγνωρίστηκε το 1994. Μετά την ταυτοποίηση του BRCA1, το BRCA2, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13, αναγνωρίστηκε το 1995. Τα BRCA1 και BRCA2 διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους στην επιδιόρθωση ανασυνδυασμού (HR), ενεργοποίησης σημείου ελέγχου κυτταρικού κύκλου και διχάλας βλάβης του DNA, ειδικά στην επιδιόρθωση σπασίματος διπλού κλώνου DNA (DSBs), η οποία συμβάλλει στη διατήρηση της δομής των χρωμοσωμάτων μέσω επισκευής ομόλογου αντιγραφής DNA προστασία. [17]

Παρά το ότι τα BRCA1 και BRCA2 αρχικά φαίνονται να είναι γονίδια με παρόμοιες λειτουργίες, είναι πλέον σαφές ότι αυτά τα δύο γονίδια είναι διαφορετικά όσον αφορά τη μοριακή τους βιολογία, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και τους κινδύνους καρκίνου που συνεπάγονται.

BRCA1: Το BRCA1 συνδέεται με πολλαπλές πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου, όντας ικανό να σχηματίζει πολλαπλά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμβάλλουν στη διατήρηση της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων και στην καταστολή του όγκου. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ο ρόλος του BRCA1 στη διατήρηση της ακεραιότητας της ετεροχρωματίνης. Το BRCA1 ρυθμίζει επίσης τη μεταγραφή αρκετών γονιδίων στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου του ATM, και της ίδιας της ομοιόστασης, έτσι ώστε τα επίπεδα να παραμένουν ικανά να διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος ως απόκριση στη γονοτοξική προσβολή. [16]

Στον άνθρωπο, η πλήρους μήκους πρωτεΐνη BRCA1 κωδικοποιείται από 24 εξόνια και αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει για να κατανοήσουν τον λειτουργικό του ρόλο. Είναι ενδιαφέρον ότι το BRCA1 ανακαλύφθηκε ως πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη σε φυσιολογικά κύτταρα και σε κυτταρικές σειρές όγκου από ιστούς άλλους εκτός του μαστού και των ωοθηκών. Εφόσον το BRCA1 αλληλεπιδρά με πολλαπλούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως p53, ER-α, c-Myc, STAT1, CtIP και ZBRK1 καθώς και με την RNA πολυμεράση II, είναι προφανές ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση. Στην πραγματικότητα,

σημειακές μεταλλάξεις του, που σχετίζονται με τον καρκίνο διαταράσσουν την αλληλεπίδρασή του με το RNA.

BRCA2: Το γονίδιο περιέχει 27 εξόνια με οκτώ εσωτερικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ονομάζονται μοτίβο BRC, το οποίο θεωρείται ότι είναι η κύρια περιοχή που αλληλεπιδρά με το RAD51. Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που προέρχονται από όγκους παρατηρήθηκε στην C-τερματική περιοχή BRCA2. Η συσχέτιση του BRCA2 με το RAD51 έδειξε τη συμμετοχή του στην επιδιόρθωση της βλάβης του DNA από την οδό HR. [18] Η κύρια λειτουργία του BRCA2 είναι στο HR και βασίζεται στην ικανότητά του να δεσμεύεται στην ανασυνδυασμένη εισβολή κλώνου RAD51. [16]

To HER2: Είναι γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HER2, έναν υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 (17q12) και έχει περίπου 125 kb μήκος. Η υπερέκφραση ή ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου HER2 σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού και άλλους τύπους καρκίνου, ενώ οι θεραπείες που στοχεύουν το HER2 αποτελούν μια σημαντική στρατηγική για την αντιμετώπιση αυτών των καρκίνων. Όταν το γονίδιο HER2 υπερεκφράζεται ή εμφανίζει αυξημένο αριθμό αντιγράφων, οι κυτταρικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη και η επιβίωση των κυττάρων ενεργοποιούνται ακατάλληλα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη όγκων, και ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού που είναι θετικός για HER2 χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση της HER2 πρωτεΐνης στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, και συχνά είναι πιο επιθετικός σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Η λειτουργία του γονιδίου HER2 είναι κυρίως η κωδικοποίηση υποδοχέα HER2 της οικογένειας EGFR (Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας). Ο υποδοχέας HER2 είναι μια τιροσίνη κινάση που ενεργοποιεί σήματα εντός του κυττάρου και είναι σημαντικός για την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Σε ορισμένους τύπους καρκίνου, το γονίδιο HER2 μπορεί να υποστεί μεταλλάξεις, γεγονός που οδηγεί στην υπερέκφραση της HER2 πρωτεΐνης στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η υπερέκφραση μπορεί να προκαλέσει την υπερδραστηριότητα του υποδοχέα, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. [19]

ΓΟΝΙΔΙΟ PALB2: Το γονίδιο PALB2 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PALB2, η οποία συνδέεται με το BRCA2 ως λειτουργικό εταίρο και διευκολύνει τον εντοπισμό τόσο του

BRCA1 όσο και του BRCA2 σε θέσεις βλάβης του. Πρόσφατες μελέτες που έγιναν σε φορείς μετάλλαξης PALB2 έδειξαν ότι έχουν κίνδυνο καρκίνου του μαστού 9,47 φορές υψηλότερο από τον μέσο όρο. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού για γυναίκες με μη φυσιολογικό γονίδιο PALB2 είναι 14% στα 50 χρόνια και 35% στα 70 χρόνια. Πολλές μελέτες εντόπισαν ότι η συμμετοχή του PALB2 είναι παρόμοια με το BRCA2 στην προδιάθεση για καρκίνο του μαστού στους άνδρες. Ως εκ τούτου, ο έλεγχος για μεταλλάξεις του γονιδίου PALB2 συνιστάται ως χρήσιμο βήμα για κληρονομικούς καρκίνους του μαστού αρνητικούς σε BRCA1 και BRCA2, άτομα κινδύνου, καθώς και άρρενες ασθενείς με καρκίνο μαστού.[15] Ο ρόλος του PALB2 στην ομόλογη επιδιόρθωση είναι να συμπεριφέρεται ως πρωτεΐνη που γεφυρώνει λειτουργικά τα BRCA1 και BRCA2 και επίσης συνεργάζεται με το RAD51 για να διεγείρει τον ανασυνδυασμό.[16]

ΓΟΝΙΔΙΟ TP53 ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ LI-FRAUMENI: Το TP53 εμπλέκεται σε πολλούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του λήπτη αποφάσεων σε συνθήκες στρες, η βλάβη του DNA, μεταβολική στέρηση ή διαβρώσεις τελομερών. Μια κλασική αυτοσωματική επικρατούσα κληρονομική προδιαθεσική διαταραχή όγκου που ονομάζεται σύνδρομο Li-Fraumeni σχετίζεται με μεταλλάξεις βλαστικής σειράς στο γονίδιο TP53 και δείχνει μια πρώιμη έναρξη της νόσου.

Μεταλλάξεις βλαστικής γραμμής στο TP53 ευθύνονται για <1% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με την εμφάνιση σωματικών μεταλλάξεων 19%-57% στους καρκίνους του μαστού.

ΓΟΝΙΔΙΟ PTEN ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ COWDEN: Το PTEN είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Οι μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς σε αυτό το γονίδιο προκαλούν το σύνδρομο Cowden, το οποίο κληρονομείται με αυτοσωμικό κυρίαρχο πρότυπο και χαρακτηρίζεται από πολλαπλά αμαρτόματα καθώς και καλοήθεις και κακοήθεις όγκους. Οι γυναίκες με σύνδρομο Cowden έχουν 30%–50% κίνδυνο εμφάνισης κακοήθους καρκίνου του μαστού και 67% κίνδυνο να αναπτύξουν καλοήγη νόσο του μαστού.

ΓΟΝΙΔΙΟ STK11/LKB1 ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ PEUTZ-JEGHERS: Το γονίδιο STK11/LKB1 κωδικοποιεί για την κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία δρα ως

ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μεσολαβεί στην απόπτωση και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις βλαστικής γραμμής σε αυτό το γονίδιο προκαλούν το σύνδρομο Peutz-Jeghers, το οποίο κληρονομείται με αυτοσωμικό κυρίαρχο μοτίβο. Οι ασθενείς με σύνδρομο Peutz-Jegh έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο προδιάθεσης για καρκίνους του μαστού. Ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού για γυναίκες με σύνδρομο Peutz-Jeghers υπολογίστηκε σε 8% στην ηλικία των 40 ετών, ο οποίος αυξάνεται δραματικά έως και 45% στην ηλικία των 70 ετών.

ΓΟΝΙΔΙΟ ATM ΚΑΙ ΑΤΑΞΙΑ ΤΗΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑ (AT): Το γονίδιο ATM κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης του σημείου ελέγχου ως απόκριση σε βλάβη του DNA (διακοπή διπλού κλώνου), μέσω φωσφορυλιωτικών πρωτεϊνών όπως BRCA, p53 και Chk2 που εμπλέκονται στις οδούς επιδιόρθωσης του DNA. Υπάρχει αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού σε ετερόζυγους φορείς μεταλλάξεων ATM. [15]

CHEK2: Το CHEK2 κωδικοποιεί μια κινάση σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Η συσχέτισή του με τον αυξημένο κίνδυνο BC έχει διερευνηθεί σε πολλές μελέτες από το 2002 και σήμερα, η σημασία του έχει αποδειχθεί σε υψηλό βαθμό.

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ FANC: Η αναιμία Fanconi (FA) είναι μια γενετική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από προοδευτική απλαστική αναιμία, πολλαπλά συγγενή ελαττώματα και ευαισθησία τόσο σε αιματολογικές όσο και σε συμπαγείς κακοήθειες. Ένα ελάττωμα σε οποιαδήποτε από τις πρωτεΐνες κατά μήκος της οδού FA εμποδίζει τα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ των κλώνων και τα προδιαθέτουν σε χρωμοσωμική θραύση και κυτταρικό θάνατο.

Η σχέση μεταξύ της ευαισθησίας σε FA και BC δεν έγινε πλήρως εμφανής έως ότου ανακαλύφθηκε ότι τα BRCA2 και FANCD1 ήταν δύο διαφορετικά ονόματα για το ίδιο γονίδιο. Το BRCA1 δεν ανήκει στην οικογένεια γονιδίων FA, παρόλο που είναι βασικό συστατικό της οδού FA. Η οδός FA-BRCA συντονίζει έναν περίπλοκο μηχανισμό που περιλαμβάνει στοιχεία τριών κλασικών μονοπατιών επιδιόρθωσης DNA. Υπάρχουν

ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των ετερόζυγων μεταλλάξεων του BRCA2/FANCD1 και της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [16]

1.2.4.2 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι επιγενετικοί παράγοντες είναι μη γενετικές μεταβολές που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων χωρίς να αλλάζουν τη βασική αλληλουχία του DNA. Αυτές οι επιγενετικές αλλαγές διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού, καθώς μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ο επιγενετικός έλεγχος περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις της ιστόνης και η ρύθμιση των μικρο-RNA.

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA: Πρόκειται για αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που δεν προέρχονται από αλλοιώσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA. Οι επιγενετικές αλλοιώσεις είναι συνήθως εμφανείς από τις πρώτες φάσεις της ογκογενετικής διαδικασίας. Η μεθυλίωση του DNA είναι μια συνηθισμένη τροποποίηση του DNA που αναφέρεται στην ομοιοπολική προσθήκη μιας μεθυλομάδας, που καταλύεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA (DNMTs), στη θέση 5-ανθράκων (C5) των βάσεων κυτοσίνης στα δινουκλεοτίδια κυτοσίνηςγουανίνης (CpG) σε κλώνους DNA θηλαστικών και οδηγεί στη σίγαση της γονιδιακής έκφρασης. Αυτές οι θέσεις CpG περιορίζονται σε επιλεγμένες γονιδιωματικές περιοχές που περιέχουν υψηλή συχνότητα θέσεων CpG και αναφέρονται ως CpG-νησίδες. Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να προκαλέσει γονιδιακή σίγαση είτε παρεμβαίνοντας άμεσα στη δέσμευση συγκεκριμένων παραγόντων μεταγραφής στο DNA είτε δεσμεύοντας πρωτεΐνες δέσμευσης μεθυλ-CpG (MBDs), οι οποίες εμποδίζουν την έκφραση γονιδίων στρατολογώντας συμπλέγματα συντελεστών αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, παρέχοντας έτσι μια σύνδεση μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [19]

Υπερμεθυλίωση του DNA στον Καρκίνο του Μαστού: Στον καρκίνο του μαστού, η υπερμεθυλίωση των προαγωγικών περιοχών (promoter regions) των κατασταλτικών ογκογονιδίων (tumor suppressor genes) μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση αυτών

των γονιδίων, επιτρέποντας στους καρκινικούς όγκους να αναπτυχθούν ανεξέλεγκτα. Το BRCA1, το TP53, και το PTEN είναι γονίδια που μπορούν να υπερευαισθητοποιηθούν μέσω υπερμεθυλίωσης. Η υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (TSGs) προάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα τη μετάσταση, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Υπομεθυλίωση DNA στον Καρκίνο του Μαστού: Η υπομεθυλίωση συγκεκριμένων περιοχών του DNA μπορεί να ενεργοποιήσει γονίδια που προάγουν την ανάπτυξη όγκου ή την μετάσταση (ογκογονίδια). Η υπομεθυλίωση του DNA εμφανίζεται στο 50% περίπου των καρκίνων του μαστού και σχετίζεται με το στάδιο ιστολογικού βαθμού και την κακοήθεια.

Ανώμαλη μεθυλίωση επίσης, σχετίζεται με την αντίσταση στα φάρμακα στον καρκίνο του μαστού, η οποία περιορίζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. [20]

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΝΗΣ: Οι τροποποιήσεις ιστόνης είναι ένας άλλος βασικός μηχανισμός που εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση. Κάθε ιστόνη περιέχει εύκαμπτες N-τελικές ουρές που προεξέχουν από τα νουκλεοσώματα, τα οποία στοχεύουν εκτενώς από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της ακετυλίωσης και της μεθυλίωσης. Αυτές οι τροποποιήσεις διαδραματίζουν έναν κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση. Λόγω της εμπλοκής τους στις λειτουργίες της χρωματίνης οι τροποποιήσεις ιστόνης παίζουν πολύπλευρους ρόλους στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής μεταγραφής, της επιδιόρθωσης του DNA, του ανασυνδυασμού και της αντιγραφής, και η απορρύθμισή τους έχει εμπλακεί ευρέως σε κακοήθειες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει τις τροποποιήσεις ιστόνης και αντίστροφα, για να δημιουργήσει έναν εξαιρετικά πολύπλοκο μηχανισμό επιγενετικού ελέγχου που συνεργάζεται και αλληλεπιδρά για τη δημιουργία και τη διατήρηση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης. Έτσι, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι αυτές οι επιγενετικές αλλοιώσεις εμφανίζονται νωρίς στην ογκογόνο διαδικασία, καθώς υπάρχουν ήδη σε προκαρκινικές μορφές. [21]

Οι ιστόνες μπορούν να υποστούν τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση, η μεθυλίωση και η φωσφορυλίωση. Αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν την πυκνότητα της χρωματίνης και, επομένως, την προσβασιμότητα του DNA για τους μηχανισμούς έκφρασης των γονιδίων.

Ακετυλίωση της ιστόνης: Ρυθμίζεται από την αντίθετη δράση δύο οικογενειών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των ακετυλοτρανσφερασών ιστόνης (HATs) και των αποακετυλασών ιστόνης (HDACs). Η ακετυλίωση των ιστονών σε γονίδια καταστολής του όγκου μπορεί να υποστηρίξει την αυξημένη έκφραση των γονιδίων που προάγουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Μεθυλίωση της ιστόνης: Είναι μια ευρέως γνωστή μετα-μεταφραστική τροποποίηση που περιλαμβάνει μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου από έναν ενζυματικό δότη υψηλής ενέργειας σε αμινομάδες, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των κατασταλτικών γονιδίων και να συμβάλλει στην καρκινογένεση.

Φωσφορυλίωση της ιστόνης: Είναι μια δυναμική μεταμεταφραστική τροποποίηση που συμβαίνει στη σερίνη, υπολείμματα θρεονίνης και τυροσίνης των ιστονών του πυρήνα, κυρίως στις N-τελικές ουρές.

Η ανισορροπία της καταλυτικής δραστηριότητας των ενζύμων (απομεθυλάσες, ακετυλοτρανσφεράσες, δεακετυλάσες και μεθυλοτρανσφεράσες της ιστόνης), είναι άμεσα συνδεδεμένη με την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Ως εκ τούτου, μεμονωμένα μοτίβα του τροποποιήσεις ιστόνης μπορεί να ενοχοποιούνται ως δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία και τα συγκεκριμένα μοτίβα τους μπορεί να συσχετιστεί με την υποτροπή του καρκίνου και τη συνολική επιβίωση των ασθενών BC.[22]

ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΙΚΡΟ-RNAS (MiRNAs): Τα μικρο-RNA (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA που αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων στόχων μέσω της αποδόμησης του mRNA ή της αναστολής της μετάφρασης. Η έκφραση δεκάδων miRNAs έχει αποδειχθεί ότι τροποποιείται στον καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό του μαστού ή μεταξύ διαφόρων υποτύπων καρκίνου του μαστού. Ορισμένα miRNAs ρυθμίζονται προς τα πάνω σε όγκους του μαστού, όπως τα miR-21, miR-155, miR-373 και miR-520c, και εμφανίζονται ως πιθανά ογκογονίδια. Άλλα miRNA ρυθμίζονται προς τα κάτω, όπως τα miR-126 και miR-145 και μέλη της οικογένειας let-7.

MiRNAs που σχετίζονται με την έκφραση και τη λειτουργία των υποδοχέων οιστρογόνων, όπως miR-18a, miR-22, miR-181, miR-206, miR-221 και miR-222 ή με HER2/neu, όπως miR-125, έχουν επίσης αναγνωρισθεί. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα miRNAs (μέλη οικογένειας miR-200, miR-205) που εμπλέκονται στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), μια διαδικασία που παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Στον καρκίνο του μαστού, ορισμένα miRNAs λειτουργούν ως ογκογονίδια ή γονίδια καταστολής του όγκου. Οι αλλαγές στην έκφραση των miRNAs επηρεάζουν κρίσιμες οδούς σηματοδότησης που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την επιβίωση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. [23]

1.2.4.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΑΝΟΣΟΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΟΓΚΟΥ: Η ανοσοεπιτήρηση μπορεί να είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της μεταστατικής εξάπλωσης, της πιο θανατηφόρας πτυχής του καρκίνου. Οι μηχανισμοί υπέρβασης του ανοσοποιητικού ελέγχου μπορεί να είναι αρκετά διαφορετικοί από εκείνους στην αρχική εστία. Πρόσφατα ευρήματά υποστηρίζουν την απώλεια σηματοδότησης ιντερφερόνης τύπου I (IFN) ως εγγενή μηχανισμό αποφυγής των ειδικών για μετάσταση ανοσοαποκρίσεων στον καρκίνο του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο αποφεύγουν την ανοσολογική αναγνώριση μέσω μειωμένης ανοσογονικότητας, αλλά στρατολογούν επίσης ανοσοκατασταλτικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. [24]

ΦΛΕΓΜΟΝΗ: Η χρόνια φλεγμονή στον ιστό του μαστού μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη καρκίνου. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εμπλέκονται στη φλεγμονή, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μέσω παραγωγής κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Η φλεγμονή που προάγει τον όγκο έχει προταθεί ως αναδυόμενο χαρακτηριστικό του καρκίνου από τους Hanahan και Weinberg το 2011. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που διεισδύουν στον όγκο μπορούν να προβλέψουν την επιβίωση και τα θεραπευτικά αποτελέσματα σε πολλές κακοήθειες μεταξύ αυτών και ο καρκίνος του μαστού. Ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας προστίθεται από την παρουσία άλλων εγκατεστημένων κυττάρων και δομών εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, τα οποία δεν είναι σιωπηλοί παρευρισκόμενοι αλλά

μάλλον ενθαρρύνονται (ή τουλάχιστον επηρεάζονται) από τους φλεγμονώδεις μηχανισμούς. Η ενεργοποίηση τοπικών ή συστηματικών προφλεγμονωδών οδών, οδηγεί σε γονιδιωματική αστάθεια την οποία ακολουθεί ο κακοήθης μετασχηματισμός. [25]

ΤΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΟΓΚΟΥ TILs (TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES):

Τα διηθητικά λεμφοκύτταρα (TILs) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που διεισδύουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανοσολογική απόκριση κατά του καρκίνου. Η παρουσία μεγάλου αριθμού TILs συσχετίζεται συχνά με καλύτερη πρόγνωση σε διάφορους τύπους καρκίνου του μαστού ενώ αποτελούν βιοδείκτες για την ανοσολογική απόκριση, με την προγνωστική και διαγνωστική τους σημασία να ποικίλλει μεταξύ των υποτύπων BC. [26] Η συγκέντρωση των TILs μπορεί επίσης να προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία. Όχι μόνο η ποσότητα της λεμφοκυτταρικής διήθησης αλλά και ο φαινότυπος αυτής της διήθησης καθορίζει την κλινική έκβαση καθώς τα TILs συνδέονται με ευνοϊκή πρόγνωση. [27]

Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ-Α. TNF-Α (TUMOR NECROSIS

FACTOR-ALPHA, TNF-Α): Είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη, που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη φλεγμονή, στην ανοσολογική απόκριση και στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και θανάτου. Αποτελεί κρίσιμο ρυθμιστή της φλεγμονής και της εξέλιξης του όγκου. Τα στοιχεία έχουν αποκαλύψει έναν προ-ογκογόνο ρόλο του TNF-α κατά την εξέλιξη και τη μετάσταση του BC. [15]

1.2.4.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ

Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων αυτών στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα τροποποιούν τον μεταβολισμό τους ώστε να υποστηρίξουν την αυξημένη ενεργειακή απαίτηση, την ταχεία ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Αυτές οι αλλαγές είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του όγκου και τη διαφυγή του από την ανοσολογική επιτήρηση. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός (metabolic reprogramming) αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα, και ειδικότερα τα καρκινικά κύτταρα, προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους για να υποστηρίξουν τις

αυξημένες ενεργειακές ανάγκες και τις βιοχημικές απαιτήσεις της ανάπτυξης και της επιβιώσής τους. Αυτή η διαδικασία είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων και θεωρείται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση και στην εξέλιξή του καρκίνου. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός μπορεί να περιλαμβάνει αλλαγές σε διάφορους μεταβολικούς δρόμους, όπως η γλυκόλυση, η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η σύνθεση λιπιδίων, η ανακύκλωση αμινοξέων και η βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, με σκοπό να υποστηρίξει τη ταχεία κυτταρική διαίρεση και την ανάπτυξη του όγκου. Η απορρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας και των βιοχημικών μονοπατιών έχουν αναδειχθεί ως σημαντικοί παράγοντες ογκογένεσης στον καρκίνο του μαστού. Πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεταβολικού συνδρόμου (MetS) και των μεταλλάξεων της βλαστικής σειράς BRCA1. Επιπλέον, η παχυσαρκία, και ο ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος) είναι επίσης παράγοντες κινδύνου για BC στους άνδρες, σε συσχέτιση με την αύξηση των επιπέδων οιστρογόνων με την αύξηση βάρους λόγω της μετατροπής της τεστοστερόνης σε οιστρογόνο από την αρωματάση στον λιπώδη ιστό. [28]

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ: Η απορρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντική σχέση με την εξέλιξη του καρκίνου. Ο μηχανισμός της απορρυθμισμένης διαδικασίας έχει μελετηθεί στα κλινικά και βιολογικά μοντέλα, υποδεικνύοντας ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταβολικών οδών που σχετίζονται με τους υδατάνθρακες στα στάδια της καρκινογένεσης που φέρουν ποικίλες αλλαγές σε μοριακό επίπεδο.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ: Στον καρκίνο, διάφορα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη λιπογένεση ρυθμίζονται ανοδικά, δεδομένου ότι τα δομικά στοιχεία των λιπιδίων βρίσκονται σε αυξημένη ζήτηση. Η μεταβολική διαδικασία στην BC αυξάνει το επίπεδο του ακετυλο-CoA χρησιμοποιώντας μεγάλη ποσότητα γλυκόζης. Το αυξημένο ακετυλο CoA μπορεί να ρυθμίσει την ακετυλίωση των ιστονών, να μεταβάλει τις εκφράσεις των ογκογονιδίων και να προετοιμάσει τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό. Αρκετά γονίδια είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των λιπιδίων- μεταξύ αυτών, το γονίδιο N-myc downstream- regulated gene (NDRG1) που εμπλέκεται καθοριστικά στον μεταβολισμό των λιπιδίων στον καρκίνο του μαστού. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το

NDRG1 σχετίζεται με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με BC. Η σύνθεση λιπαρών οξέων είναι αυξημένη στο κυτταρόπλασμα και τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο BC.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ: Αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η γλυκόζη δεν είναι η μόνη πηγή πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, αλλά τα αμινοξέα είναι επίσης μια κύρια πηγή του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός στο BC είναι ιδιαίτερα εδραιωμένος στο μεταβολισμό των αμινοξέων ο οποίος διαφοροποιείται στους διάφορους υποτύπους του BC.

ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ: Αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη νεοπλασματική μετατροπή. Στο παρατεταμένο υποξικό μικροπεριβάλλον επηρεάζεται σημαντικά η μεταβολική διαδικασία. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από τη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS-Reactive Oxygen Species), ελεύθερων ριζών κυρίως. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η παραγωγή ROS ελέγχεται από μια ποικιλία ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση κ.ά. Ωστόσο, στα καρκινικά κύτταρα, οι ανισορροπίες των επιπέδων ROS μπορούν να μεταβάλλουν τα μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία μπορούν τελικά να οδηγήσουν στην ογκογένεση. [23]

2. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ: ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ

Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες προσφέρουν μια εναλλακτική μη επεμβατική στρατηγική για τη βελτίωση του προσυμπτωματικού ελέγχου του καρκίνου και αποτελούν πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες που έχουν δείξει μεγάλες δυνατότητες στην ανίχνευση του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης στα προεπεμβατικά και πρώιμα στάδια της νόσου. Οι αναλύσεις των κυκλοφορούντων βιοδεικτών μπορεί να περιλαμβάνουν αναλύσεις κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), κυκλοφορούντος DNA όγκου (ctDNA), κυκλοφορούντων RNA όγκου (ctRNA), μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (lncRNAs), αγγελιαφόρου RNA (mRNA), microRNA (miRNA), αιμοπεταλίων, εξωκυτταρικών κυστιδίων που προέρχονται από όγκο (μικροκύστεις, εξωσώματα) και πρωτεϊνών, τα οποία απελευθερώνονται στα ούρα, τον ορό, το σάλιο και άλλα βιολογικά δείγματα από τον πρωτοπαθή όγκο και/ή τις μεταστατικές εναποθέσεις. **(εικόνα 4)**

Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες λαμβάνονται με υγρή βιοψία. Η υγρή βιοψία (**liquid biopsy**) είναι μια μη επεμβατική ή ελάχιστα επεμβατική μέθοδος που σε συνδυασμό με εξειδικευμένες τεχνικές, συμβάλλει στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων βιοδεικτών. Η υγρή βιοψία παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι της βιοψίας όγκου όπως η ευκολότερη η πρόσβαση, είναι λιγότερο επώδυνη και επιτρέπει την αξιολόγηση της

ετερογένειας του όγκου (δείκτες από όλες τις θέσεις όγκου απελευθερώνονται στο αίμα). **(εικόνα 5)** Επίσης έχει το πλεονέκτημα της έγκαιρης διάγνωσης, της ανίχνευσης της υποτροπής, της πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία (δηλαδή, της διάκρισης των ανταποκρινόμενων και των μη αποκρινόμενων) και της διαχρονικής παρακολούθησης κατά τη διάρκεια της θεραπείας και της επιλογής φαρμάκων.

Στη συνέχεια, αναφέρονται ορισμένα ενδεικτικά παραδείγματα, τα οποία αναδεικνύουν τη δυναμική και τις δυνατότητες των κυκλοφορούντων βιοδεικτών για την ανίχνευση καρκίνου του μαστού πρώιμου σταδίου:

- Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) και η φασματομετρία μάζας, έχουν συμβάλλει στην ολοκληρωμένη και συστηματική εξέταση του πρωτεώματος του αίματος κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες, οδηγώντας στην ανακάλυψη διαφόρων κυκλοφορούντων βιοδεικτών πρωτεϊνικής φύσεως, που προσφέρουν βελτίωση ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Οι γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας βλεννινών (MUC) και οι CKs των ενδιάμεσων νηματίων είναι δύο πολύ γνωστές ομάδες που παράγουν αρκετούς κλασικούς βιοδείκτες καρκίνου του μαστού. Ο προσδιορισμός του CA 15-3 χρησιμοποιείται επί του παρόντος για την παρακολούθηση της θεραπείας, ενώ τα CKs 8, 18 και 19, έχουν προταθεί ως δείκτες για τα πρώιμα στάδια του BC. Για πρώτη φορά, η τιμή του λόγου συγκέντρωσης του αντιγόνου της επιθηλιακής μεμβράνης ορού (MUC1) και του CK1 έχουν προταθεί ως πιθανός διαγνωστικός βιοδείκτης, ιδιαίτερα για την ανίχνευση BC πρώιμου σταδίου, και η διαγνωστική ικανότητα αυτού του νέου συνδυασμού βρέθηκε να είναι ανώτερη από το αντίστοιχο, CA 15-3.

- Δεδομένης της ανιχνευσιμότητας και της σταθερότητας των εξωκυτταρικών miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος, η αξία των κυκλοφορούντων miRNAs ως βιοδεικτών και η κλινική τους σημασία για τη μη επεμβατική έγκαιρη ανίχνευση ή διάγνωση του BC έχει αξιολογηθεί εκτενώς. Τα τελευταία χρόνια, έχουν εμφανιστεί αρκετοί πολλά υποσχόμενοι υποψήφιοι, όπως τα miR-21, miR-221 και miR-145 στον ορό ή το πλάσμα ασθενών με BC. Οι υπογραφές miRNA με βάση το αίμα με miR-21 και/ή miR-221 αναφέρεται ότι αποδίδουν καλύτερη διαγνωστική ευαισθησία από το CA 15-3 και το CEA για όλα τα στάδια του καρκίνου. Η ανίχνευση μοριακού προφίλ miRNA είναι μια ευκαιρία για τον εντοπισμό ελάχιστα επεμβατικών βιοδεικτών για πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του

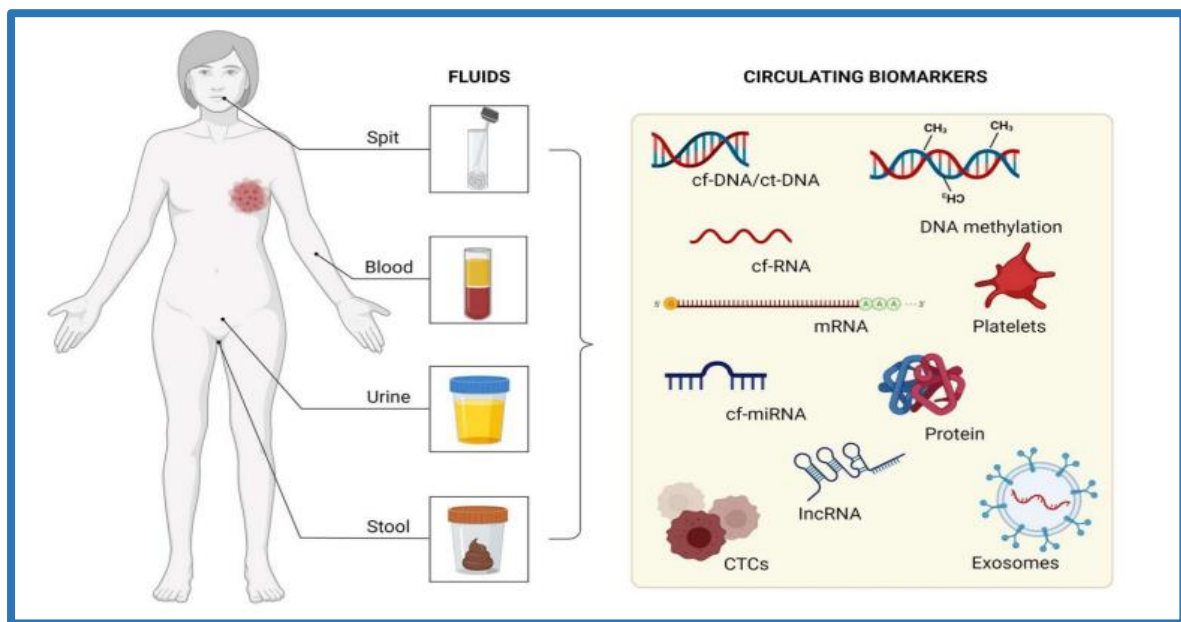
μαστού. Οι Shimomura et al. αξιολόγησε τα προφίλ έκφρασης miRNA στον ορό ασθενών με BC και υγιών γυναικών. Ένας συνδυασμός πέντε miRNAs (miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p και miR-6875-5p) βοήθησε στην ανίχνευση BC πρώιμου σταδίου (ευαισθησία 97,3%, ειδικότητα 82,9%, ακρίβεια 89,7%). Οι Erbes et al. πραγματοποίησε την πρώτη μελέτη για τον εντοπισμό προφίλ διαφορικού κυκλοφορούντος miRNA (miR-21, miR-125b, miR-451 και miR-155) στο αίμα και τα ούρα ασθενών με BC, για διάκριση μεταξύ ασθενών με εντοπισμένο BC και υγιών γυναικών. Επιπλέον, αυτή η μελέτη ανέφερε την αξιοπιστία και την αναπαραγωγιμότητα των αναλύσεων που αφορούσαν δείγματα ούρων. Επιπλέον, οι Hirschfeld et al. εντόπισε τη διαφορική έκφραση τεσσάρων ct-miRNAs (miR-424, miR-423, miR-660 και let7-i) στα ούρα ασθενών με BC, διακρίνοντας με επιτυχία τους ασθενείς από υγιείς μάρτυρες.

- Ορισμένες μελέτες έχουν αναγνωρίσει το cfDNA ως βιοδείκτη πρώιμης ανίχνευσης του καρκίνου του μαστού, αναλύοντας τις αλλαγές μεθυλίωσης του DNA. Σύμφωνα με όσα είναι γνωστά για την υπερμεθυλίωση και τον καρκίνο, παρατήρησαν ότι οι ασθενείς με BC είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης από τους υγιείς μάρτυρες. Ένα εξαιρετικά ευαίσθητο σύστημα βασισμένο σε κυκλοφορούν χωρίς κύτταρα DNA (cfDNA) για την έγκαιρη διάγνωση της BC έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση επιγενετικών βιοδεικτών με ψηφιακή MSP (Digital MSP-Methylation-Specific PCR). Αυτό το νέο σύστημα έχει δημιουργήσει μια επιγενετική ανάλυση πρώιμου σταδίου BC βασισμένη σε cfDNA που θα μπορούσε να διακρίνει τις περιπτώσεις BC από υγιή άτομα με υψηλή ακρίβεια, υποδηλώνοντας μια πιθανή χρήση αυτού του συστήματος για προσυμπτωματικό έλεγχο.

- Η βελτιωμένη κατανόηση του δυσρυθμισμένου μεταβολισμού του καρκίνου μέσω της μεταβολομικής συνέβαλε στη δημιουργία νέων οδών για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για την ανίχνευση BC. Δύο πρόσφατες μελέτες που δημοσιεύθηκαν το 2017 κατέδειξαν την εξαιρετική απόδοση των αλλοιωμένων μεταβολιτών στην έγκαιρη ανίχνευση ή διάγνωση του BC. Η Metabolomics είναι η ολοκληρωμένη παγκόσμια μελέτη των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα οι, οποίοι αντικατοπτρίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών, επιγενετικών και πρωτεομικών προφίλ.

- Οι πρόσφατες πρόοδοι στον τομέα της ανάλυσης, χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση NGS (Next Generation sequencing-Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς) που ενσωματώνει και τη μηχανική μάθηση μπορεί να ανοίξει το δρόμο για τη δημιουργία νέων τρόπων έγκαιρης ανίχνευσης καρκίνου.

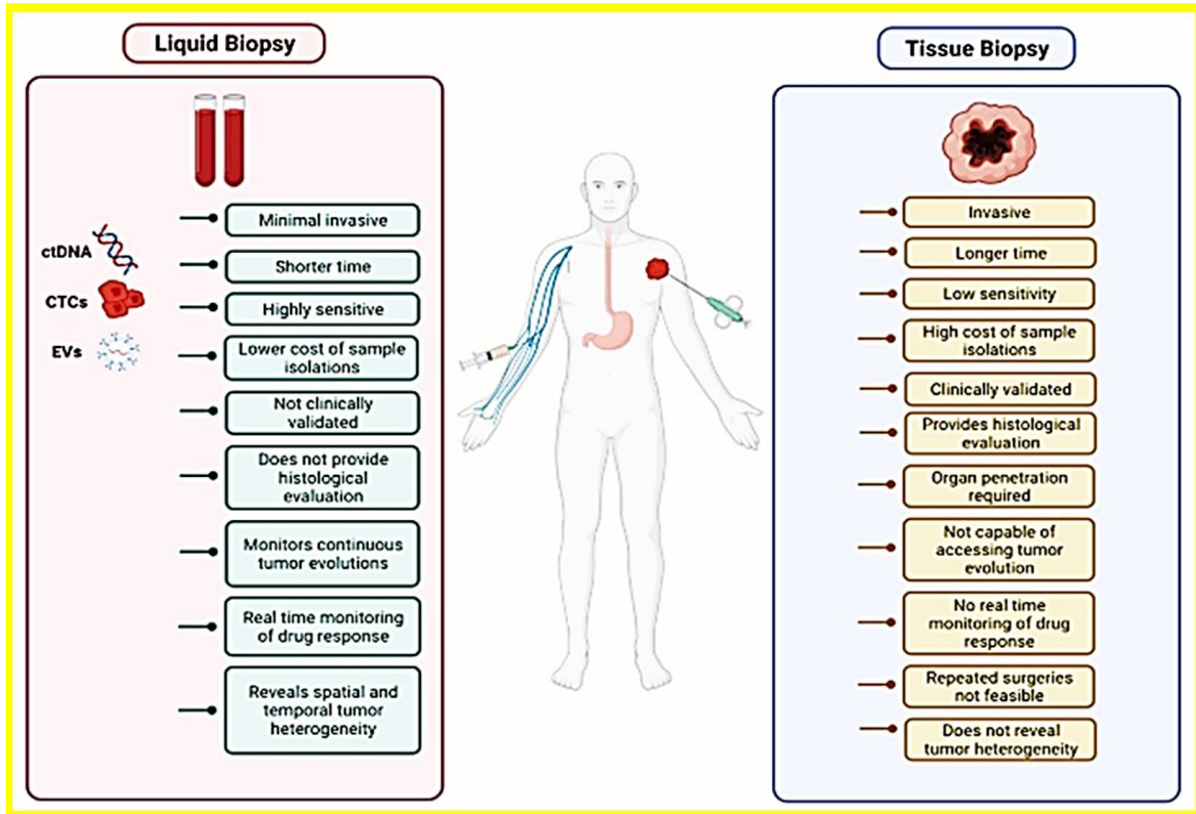
Η ανάλυση των κυκλοφορούντων βιοδεικτών, μπορεί να προσφέρει πιο ακριβή και έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού, σε σύγκριση με τη μαστογραφία. Παρόλα αυτά, υπάρχουν σημαντικές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν προτού μπορέσει



Εικόνα 4: Υγρή βιοψία: Ποικιλία κυκλοφορούντων βιοδεικτών που ανιχνεύονται στα διάφορα βιολογικά υγρα. (Προσαρμοσμένο από "Liquid biopsy as a tool for the diagnosis, treatment, and monitoring of breast cancer" (Freitas et al., 2022). International Journal of Molecular Sciences, 23(17), 9952.

<https://doi.org/10.3390/ijms23179952>)

να πραγματοποιηθεί η μετάφραση αυτής της γνώσης στην πραγματική κλινική πράξη. Ορισμένες από τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται περιλαμβάνουν την απόδειξη ότι ο βιοδείκτης είναι ειδικός του BC και ότι μπορεί να ανιχνευθεί με συνέπεια σε πρώιμο στάδιο. [29,30]



Εικόνα 5: Πλεονεκτήματα της υγρής βιοψίας σε σύγκριση με την βιοψία ιστού. (Προσαρμοσμένο από "Liquid biopsy as a tool for the diagnosis, treatment, and monitoring of breast cancer" (Freitas et al., 2022). International Journal of Molecular Sciences, 23(17), 9952. <https://doi.org/10.3390/ijms23179952>)

2.2 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ CTCs (Circulating Tumor Cells)

2.2.1 CTCs - ΕΝΑΣ ΠΟΛΛΑ ΥΠΟΣΧΟΜΕΝΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ

Την τελευταία δεκαετία, η απομόνωση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) και των συστάδων CTCs (CTC clusters), έχουν διερευνηθεί ενεργά ως μια προσέγγιση για τη διάγνωση και την πρόγνωση του

καρκίνου του μαστού. Τα CTCs είναι τα κύτταρα που αποβάλλονται από τον πρωτοπαθή όγκο ή τις θέσεις μετάστασης και είναι σε θέση να ξεκινήσουν την ανάπτυξη δευτερογενών και τριτογενών κακοήθων βλαβών (Lu et al., 2016).

Η ανίχνευση των CTCs στο περιφερικό αίμα, έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους. Σε αντίθεση με τη βιοψία ιστού, η δειγματοληψία αίματος είναι λιγότερο επίπονη και επιτρέπει ταχύτερη και ευκολότερη συλλογή.

Επιπλέον, η υγρή βιοψία επιτρέπει την έγκαιρη αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, παρέχοντας βασικές πληροφορίες για τη φροντίδα και τη διαχείριση του ασθενούς (Cabel et al., 2017; Liu et al., 2021; Ningsi et al., 2022). Η υγρή βιοψία μέσω απομόνωσης CTC έχει επίσης το πλεονέκτημα της επαναλαμβανόμενης και πολλαπλής δειγματοληψίας και επομένως είναι κατάλληλη για την συνεχή παρακολούθηση της νόσου (Lianidou et al., 2015). [31]

Ένα διευρυνόμενο σύνολο στοιχείων υποστήριξε την ποσοτικοποίηση των CTCs στον πρώιμο καρκίνο του μαστού για προγνωστική αξιολόγηση της τοπικής και μεταστατικής υποτροπής και θνησιμότητας. Ένας περιορισμός των CTCs ως μοναδικού βιοδείκτη στον πρώιμο καρκίνο του μαστού είναι η σπανιότητά τους στο περιφερικό αίμα. (Εντοπίζονται σε πολύ μικρό αριθμό 1-10 CTCs ανά 10 mL αίματος). Επομένως, η συμπληρωματική χρήση άλλων κυκλοφορούντων βιοδεικτών όγκου, συμπεριλαμβανομένου του κυκλοφορούντος DNA όγκου, του RNA χωρίς κύτταρα, των αιμοπεταλίων που προέρχονται από όγκο, και των εξωκυτταρικών κυστιδίων μεταξύ άλλων, μπορεί να ξεπεράσει αυτόν τον περιορισμό και να αυξήσει την ευαισθησία αυτής της εξέτασης. Στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, ένας αριθμός CTC $\geq 1/7,5$ mL έχει δείξει προγνωστική σημασία για την πρώιμη τοπική ή μεταστατική υποτροπή και θνησιμότητα. [32]

2.2.1.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ CTCs ΣΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η διαδικασία της μετάστασης ξεκινά τυπικά όταν τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν γενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν την αποκόλληση από τον ιστό προέλευσής τους και εισβολή στην κυκλοφορία του αίματος ή στο λεμφικό σύστημα. Υπάρχουν 2 θεμελιώδη μοντέλα μετάστασης: Το μοντέλο γραμμικής εξέλιξης και το μοντέλο παράλληλης εξέλιξης. Το μοντέλο γραμμικής εξέλιξης προτείνει ότι τα καρκινικά

κύτταρα συσσωρεύουν γενετικές αλλοιώσεις εντός του πρωτογενούς όγκου, οδηγώντας σε πλήρως κακοήθεις φαινοτύπους και μόνο τότε διαδίδονται για να σχηματίσουν μεταστάσεις. Αντίθετα, στο μοντέλο της παράλληλης εξέλιξης η μετάσταση ξεκινά πολύ νωρίτερα στην πορεία της νόσου, ακόμη και πριν από τα κλινικά συμπτώματα ή τη διάγνωση του πρωτοπαθούς όγκου. Αυτό το σενάριο οδηγεί σε μεγαλύτερες γενετικές διαφορές μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστατικών κυττάρων, με τα καρκινικά κύτταρα να εμφανίζουν ποικίλους ρυθμούς διάδοσης σε διαφορετικά όργανα. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της συνεχούς παρακολούθησης και ανάλυσης των CTCs σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου του μαστού. [33]

Για τον χαρακτηρισμό των CTCs, έχει διερευνηθεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, επιθηλιακών γονιδίων καθώς και γονίδια που σχετίζονται με καρκινικά βλαστοκύτταρα και τον πολλαπλασιασμό σε μεμονωμένα CTCs. Οι επιθηλιακοί δείκτες εκφράστηκαν στο 82,86% των CTCs. Σχεδόν όλα τα CTCs (94,29%) εξέφρασαν δείκτες που σχετίζονται με τα βλαστοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των CD44, KIT και SOX2. Επιπλέον, το 88,57% των CTCs εξέφρασαν δείκτες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αλληλεπίδραση με συστατικά του αίματος. Για παράδειγμα, η έκφραση των γονιδίων PF4 και PPBP απεικονίζει την ύπαρξη προσκόλλησης αιμοπεταλίων στα CTCs. [34]

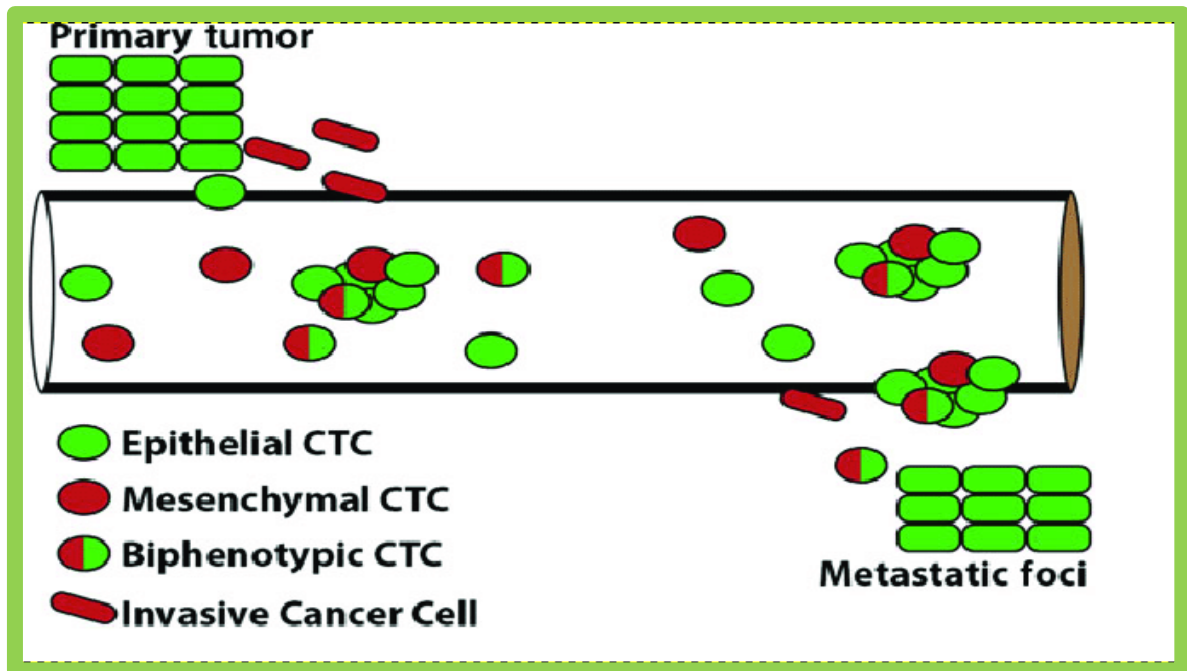
2.2.1.2 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT) ΣΤΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ: ΈΝΑΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα CTCs εμφανίζουν υψηλούς βαθμούς ετερογένειας στον καρκίνο του μαστού. Η ετερογένειά τους μπορεί να αντανακλά την κατάσταση και την πρόγνωση της νόσου. Η μορφολογική τους ετερογένεια είναι εμφανής, καθώς τα CTCs παρουσιάζουν διάφορα είδη μεγέθους και σχήματος. Τα διάφορα μεγέθη τους, επηρεάζουν τις ικανότητές τους να περνούν μέσα από τριχοειδή αγγεία και να καθορίζουν τους προορισμούς τους. Δεδομένου ότι η φαινοτυπική ετερογένεια πιθανότατα προκύπτει από ετερογενή γονιδιωματικά προφίλ, έχει δοθεί μεγαλύτερη προσοχή στον γενετικό χαρακτηρισμό των CTCs, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη γονιδιακή έκφραση και μετάλλαξη.

Εμφανίζουν επικρατούσες μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια οδηγούς, όπως τα TP53, PIK3CA, ESR1, FGFR2 και KRAS. Δεδομένου ότι αυτές οι μεταλλάξεις εμπλέκονται στην αντοχή στην ενδοκρινική θεραπεία, η εστίαση στη μοριακή ετερογένεια μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή κατάλληλων θεραπειών. Η επιγενετική αλλαγή μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως κριτήριο ταξινόμησης για τον προσδιορισμό του επιπέδου κινδύνου. [35]

Η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταβαση (EMT Epithelial-to-Mesenchymal Transition), είναι η διαδικασία με την οποία τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα χάνουν τη διακυτταρική τους πρόσφυση και αποκτούν μεσεγχυματικές και διεισδυτικές ιδιότητες. Τα καρκινικά κύτταρα αποσπώνται από τη βασική μεμβράνη μέσω της ενεργοποίησης EMT και εισέρχονται απευθείας στην κυκλοφορία, ως CTCs που ταξιδεύουν σε απομακρυσμένες τοποθεσίες. Όταν τα CTCs εξαγγειώνονται, στη συνέχεια υφίστανται μια αντίστροφη διαδικασία που ονομάζεται **MET (Μεσεγχυματική-Επιθηλιακή Μετάβαση)** και πολλαπλασιάζονται για να σχηματίσουν μακρο-μεταστάσεις. Εδώ, η μεταστατική ανάπτυξη εξαρτάται από τη λεπτή ισορροπία της μετάβασης μεταξύ αυτών των δύο φαινοτύπων. Η δραστηριότητα του EMT-MET προτάθηκε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μεταστατική διαδικασία των CTCs . Στον καρκίνο του μαστού, τα CTCs εμφανίζουν δυναμικές αλλαγές στην EMT και τα μεσεγχυματικά CTCs βρέθηκαν να σχετίζονται στενά με την εξέλιξη του καρκίνου.[36] **(εικόνα 6)**

Η σειριακή παρακολούθηση CTCs σε 11 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, υπέδειξε συσχέτιση των μεσεγχυματικών CTCs με την εξέλιξη της νόσου. Τα μεσεγχυματικά CTCs εμφανίστηκαν τόσο ως μεμονωμένα κύτταρα όσο και ως συστάδες, που εκφράζουν γνωστούς ρυθμιστές EMT, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών οδού μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα (TGF)-b και του μεταγραφικού παράγοντα FOXC1. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο της EMT στην εξάπλωση του καρκίνου του μαστού μέσω του αίματος.[37]



Εικόνα 6: Επιθηλιακή Μεσεγγυματική Μετάβαση (EMT) κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων(CTCs): Τα διεισδυτικά κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο παρουσιάζουν πλαστικότητα του επιθηλίου, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας επιθηλιακών δεικτών και αύξησης μεσεγγυματικών δεικτών. Μεμονωμένα και σε συστάδες (CTC clusters) παρουσιάζουν ετερογένεια επιθηλιακών και μεσεγγυματικών δεικτών. (Προσαρμοσμένο από: "Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells" (Micalizzi, Haber, & Maheswaran, 2017). Molecular Oncology, 11(7), 770–780. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12081>)

2.2.1.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (CTCs)

Α. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ CTCs: Τα CTCs εκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιφανείας, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τα καρκινικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τη στόχευσή τους: Τέτοιες πρωτεΐνες είναι, η EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) η οποία χρησιμοποιείται συχνά για την απομόνωση των CTCs λόγω της έκφρασής της στα περισσότερα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, οι Cytokeratins (CKs), χαρακτηριστικές πρωτεΐνες για καρκινικά κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης, οι CD44 και CD24 που αποτελούν δείκτες που συνδέονται με βλαστοκύτταρα καρκίνου, καθώς και ο HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), όπου στον καρκίνο του μαστού, η υπερέκφραση του HER2 σχετίζεται με αυξημένη

επιθετικότητα. Καθώς οι περισσότεροι καρκίνοι είναι επιθηλιακής προέλευσης, ο πιο κοινός δείκτης που χρησιμοποιείται για τα CTC είναι ο EpCAM, ένας «καθολικός» επιθηλιακός δείκτης καρκίνων.

Ο EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) είναι μια πρωτεΐνη επιφανείας που εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς δείκτες για την ανίχνευση και απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση EpCAM ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών τύπων καρκίνου και οι τεχνολογίες ανίχνευσης CTCs που βασίζονται σε EpCAM, εφαρμόζονται ευρέως για καρκίνους που εκφράζουν έντονα αυτό το δείκτη, όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα CTCs στον καρκίνο του μαστού, είναι θετικοί στο EpCAM και έχουν επικυρώσει την προγνωστική τους αξία είτε σε περιπτώσεις πρώιμου είτε μεταστατικού σταδίου.

B. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ DNA ΟΓΚΟΥ (ctDNA) ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ RNAs

(mRNA ΚΑΙ MiRNA) ΑΠΟ CTCs: Τα CTCs μπορούν να απελευθερώσουν ct DNA στο πλάσμα. Το ctDNA μπορεί να περιλαμβάνει μεταλλάξεις όγκου (π.χ. PIK3CA, TP53) καθώς και γενετική αστάθεια: (π.χ. αλλαγές αριθμού αντιγράφων –CNAs)

Τα κυκλοφορούντα RNAs αντικατοπτρίζουν τη γονιδιακή έκφραση του όγκου και μπορεί να είναι mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, καθώς και miRNAs τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και συχνά σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Θα ήταν πολύ σημαντικό να χαρακτηριστεί το προφίλ έκφρασης miRNA στα CTCs, τα οποία θα μπορούσαν να παρέχουν αξιόπιστες βιολογικές πληροφορίες που προέρχονται από όγκο. Η ανίχνευση miRNA προερχόμενου από CTCs αναμένεται να είναι η τάση για έγκαιρο έλεγχο του καρκίνου του μαστού, για διάγνωση και παρακολούθηση θεραπειών στο εγγύς μέλλον. [38]

Γ. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΩΝ CTCs:

Τα CTCs φέρουν γενετικές αλλαγές που συνδέονται με τον καρκίνο, όπως μεταλλάξεις DNA, αριθμητικές ανωμαλίες χρωμοσωμάτων καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις. Γονίδια που σχετίζονται με τα CTCs: Υπερέκφραση γονιδίων όπως το HER2, το PIK3CA και το EGFR έχουν αναφερθεί σε CTCs του καρκίνου του μαστού.

2.2.1.4 ΣΥΣΤΑΔΕΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ CTCs (CIRCULATING TUMOUR CELL CLUSTERS): Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΩΣ ΙΣΧΥΡΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Στον καρκίνο του μαστού (όπως και σε άλλους), τα CTCs παρουσιάζονται ως μεμονωμένα κύτταρα ή ως πολυκύτταρα συσσωματώματα ή αλλιώς συστάδες (CTC clusters). Η μεταστατική ισχύς των CTCs αυξάνεται δραματικά, όταν «ταξιδεύουν» μαζί με άλλους τύπους κυττάρων (για να σχηματίσουν συστάδες CTCs), συμπεριλαμβανομένων ουδετερόφιλων, κατασταλτικών κυττάρων που προέρχονται από μυελοειδή, μακροφάγων, αιμοπεταλίων, ινοβλαστών που σχετίζονται με καρκίνο και ερυθρών αιμοσφαιρίων που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Η ομαδοποίηση των CTCs μπορεί να τα προστατεύσει από δυνάμεις διάτμησης, ανοϊκές δυνάμεις καθώς και την επιτήρηση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι οι συστάδες CTCs, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ετερογένεια, καθώς αλληλεπιδρούν με διάφορους τύπους κυττάρων αίματος στην κυκλοφορία.

Μέχρι σήμερα, έχουν παρατηρηθεί ομάδες CTCs σε ασθενείς κυρίως σε προχωρημένα στάδια της νόσου (δηλαδή με εγκατεστημένες απομακρυσμένες μεταστάσεις), εγείροντας το ερώτημα εάν εμπλέκονται ή όχι σε πρώιμο στάδιο BC. Δεν είναι σαφές εάν εκδηλώνονται ή όχι σε πρώιμο καρκίνο του μαστού, καθώς η εμφάνισή τους σε ασθενείς με πρωτοπαθή νόσο χωρίς μετάσταση δεν έχει αξιολογηθεί διεξοδικά. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την πιθανή εμπλοκή τους στην πρώιμη μεταστατική εξάπλωση και την εξέλιξη της νόσου. [39, 40]

Πρόσφατες μελέτες ανέφεραν επίσης, την ανίχνευση συστάδων CTCs σε μικρές κοόρτες ασθενών καρκίνου του μαστού πρώιμου σταδίου και επιβεβαίωσαν την κακοήθεια τους με γονιδιωματικό προφίλ μεμονωμένων συστάδων. Συγκεκριμένα, χάρη στη χρήση μιας τεχνολογίας διήθησης αίματος, ανιχνεύθηκαν CTC-clusters σε δείγματα ασθενών πρώιμου καρκίνου του μαστού (EBC- Early Breast Cancer) και αξιολογήθηκε η παρουσία ανωμαλιών DNA στο 96% των 48 συστάδων που αναλύθηκαν. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα CTC-clusters είναι συχνά στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. [41]

2.2.1.5 ΕΞΕΤΑΖΟΝΤΑΣ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΤΩΝ CTCs: ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Αν και τα CTCs έχουν δείξει αρχική υπόσχεση σε κλινικές εφαρμογές, πολλές προκλήσεις πρέπει να ξεπεραστούν πριν η ανάλυσή τους μπορέσει να εφαρμοστεί ευρέως στην κλινική πράξη. Σήμερα, η κλινική εφαρμογή των CTC εξαρτάται κυρίως από την ανάλυση της απαρίθμησης των κυττάρων, καθώς και των μοριακών τους φαινοτύπων. Ένας πιο ολοκληρωμένος χαρακτηρισμός των CTCs με βάση το γονιδίωμά τους και το πρωτέωμά τους, θα ωφελήσει περαιτέρω την κλινική εφαρμογή, αλλά θα προσθέσει επίσης στην πολυπλοκότητα και τη δυσκολία της ανάλυσης δεδομένων. Τα CTCs θα αποτελούν κρίσιμο παράγοντα της «ιατρικής ακριβείας» στο μέλλον, καθώς ο φαινοτυπικός, ο γονότυπος και ο λειτουργικός τους χαρακτηρισμός, μπορεί να δώσει την ευκαιρία να μελετηθεί η ευαισθησία στα φάρμακα που σχετίζεται με τη μετάσταση. [42]

Οι πρόοδοι στις τεχνικές ανάλυσης μονοκυττάρου και στις τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, έχουν ωθήσει τις έρευνες στα διάφορα φαινοτυπικά και γονοτυπικά προφίλ των CTCs, ρίχνοντας φως στις δυνατότητές τους ως δείκτες θεραπευτικής απόκρισης και οδούς για στοχευμένες παρεμβάσεις. Το μοριακό προφίλ των CTCs έχει ασκήσει ευδιάκριτο αντίκτυπο στην προσαρμογή των θεραπευτικών στρατηγικών σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία προτείνουν την πιθανή χρήση των CTCs ως προγνωστικών δεικτών για την επιλογή της χορηγούμενης χημειοθεραπείας. Επιπλέον, μελέτες καταδεικνύουν τον πιθανό ρόλο των CTCs σε συνδυασμό με το ctDNA ως συμπληρωματικό βιοδείκτη για την πρώιμη ένδειξη της ανταπόκρισης στη θεραπεία. [41,43]

2.2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ DNA ΟΓΚΟΥ – ctDNA (Circulating Tumor DNA) - ΟΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΟΥ ctDNA ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

Είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες ότι όλα τα κύτταρα, τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά, αποβάλλουν DNA χωρίς κύτταρα (cfDNA- cell free DNA) στην κυκλοφορία. Το ctDNA είναι θραύσματα DNA που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκου και

εκκρίνεται στην κυκλοφορία μέσω της απόπτωσης, της νέκρωσης και της ενεργού απελευθέρωσης των καρκινικών κυττάρων.

Η χρήση του κυκλοφορούντος DNA όγκου (ctDNA) στην υγρή βιοψία ως βιοδείκτη, γίνεται το νέο μοντέλο για τον έλεγχο και την επιτήρηση του καρκίνου μαστού και πολλών άλλων καρκίνων. Οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνολογίες ctDNA έχουν βελτιώσει την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα, επιτρέποντας την ανίχνευση του ctDNA σε πρώιμο στάδιο της νόσου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού πρώιμου σταδίου.

Η πρώτη έκθεση της χρήσης cfDNA στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού δημοσιεύτηκε από τον Huang και τους συνεργάτες του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το διάμεσο επίπεδο του cfDNA ήταν 5 φορές υψηλότερο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού από ότι σε υγιείς μάρτυρες, και περίπου 3 φορές υψηλότερο από ό,τι σε ασθενείς που είχαν καλοήγη νόσο του μαστού. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ποσοτικοποίηση του κυκλοφορούντος cfDNA μπορεί να είναι ένα πολύτιμο συμπληρωματικό διαγνωστικό εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Στην Κίνα, μια κλινική δοκιμή βρίσκεται σε εξέλιξη για την αξιολόγηση της πιθανής κλινικής εφαρμογής ανίχνευσης ctDNA στο περιφερικό αίμα ασθενών ελέγχου, ασθενών με καλοήγη νόσο του μαστού και άτομα με καρκίνο του μαστού (NCT03973034).

Οι περισσότερες μέθοδοι ανίχνευσης ctDNA, βασίζονται στην αναγνώριση και ανίχνευση παραλλαγών ειδικών για τον όγκο στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες προτείνουν ότι ορισμένα διακριτά χαρακτηριστικά στο ctDNA, όπως τα μοναδικά μοριακά βάρη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της καρκινογένεσης με ακρίβεια. Οι μελλοντικές μέθοδοι μπορεί να βασίζονται στην ανάλυση πιθανών μεταλλάξεων στο ctDNA σε συνδυασμό με επίπεδα cfDNA για τη βελτίωση της ακρίβειας της έγκαιρης ανίχνευσης και διαλογής. [40,44]

Ως αποτέλεσμα, το ctDNA έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μεταλλάξεων ενδιαφέροντος και γενετικής ετερογένειας. Μια άλλη χρήση του ctDNA είναι η παρακολούθηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας ανιχνεύοντας αντίσταση που προκαλείται από μετάλλαξη. Το ctDNA είναι μια αναδυόμενη ερευνητική περιοχή και με

την ανίχνευσή του, είναι δυνατή η μέτρηση και η παρακολούθηση της δυναμικής του καρκίνου με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία. [45]

2.2.2.1 ΝΕΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΟΥΝ ΤΟΝ ΡΟΛΟ ΤΟΥ *ctDNA* ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ (MRD - *Minimal Residual Disease*) ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι ειδικές για τον όγκο μεταλλάξεις, ασκούν σημαντική επίδραση στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Τα συγκεκριμένα γονίδια, οι γονιδιωματικοί τόποι και οι τύποι μετάλλαξης, που περιλαμβάνουν πολυμορφισμούς μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNPs) και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs), μαζί με το ποικίλο φάσμα επιγενετικών τροποποιήσεων του DNA, εμπλέκονται με ποικίλους τρόπους στη συμπεριφορά του καρκίνου του μαστού. Πέρα από την άμεση χρήση της συγκέντρωσης cfDNA, ορισμένες τροποποιήσεις του DNA, όπως η μεθυλίωση, προσφέρουν πολύτιμα συμπληρωματικά εργαλεία για τον πρώιμο προσυμπτωματικό έλεγχο.

Οι έρευνες που στοχεύουν τη μεθυλίωση του DNA τυπικά χρησιμοποιούν δύο κύριες στρατηγικές: (1) Μη στοχευμένο έλεγχο, ο οποίος αξιολογεί τη συνολική μεθυλίωση του DNA και (2) Προσδιορισμούς που έχουν σχεδιαστεί για την εξέταση προτύπων μεθυλίωσης σε συγκεκριμένα γονίδια. Επιπλέον, αυτές οι μελέτες συχνά κάνουν διαφοροποίηση μεταξύ δειγμάτων που λαμβάνονται από πλήρες αίμα και πλάσμα. Η ποιοτική ανάλυση του cfDNA σε υγιή άτομα προσφέρει πολύτιμες γνώσεις σχετικά με τη διαστρωμάτωση κινδύνου για καρκίνο του μαστού.

Σε μια παρατεταμένη έρευνα παρακολούθησης που αφορούσε υγρές βιοψίες σε υγιή άτομα, προέκυψε μια αξιοσημείωτη παρατήρηση: Τέσσερις αρχικά υγιείς αιμοδότες με ανιχνεύσιμες ογκογόνες μεταλλάξεις ανέπτυξαν τελικά καλοήθεις όγκους ή διηθητικούς καρκίνους του μαστού μέσα στα επόμενα 1 έως 10 χρόνια παρακολούθησης. Αυτό το ενδιαφέρον εύρημα υποδηλώνει ότι εάν μεγαλύτερες προοπτικές μελέτες εξέταζαν εξονυχιστικά την αποτελεσματικότητα της υγρής βιοψίας ως κλινικού εργαλείου για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του μαστού, θα μπορούσε να ανοιχτεί νέος

δρόμος για την προληπτική διαχείριση του καρκίνου και βελτιωμένες προγνώσεις.

Λόγω των μοριακών ιδιοτήτων του, το ctDNA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση της **MRD. (Minimal Residual Disease, Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος)**. Το MRD είναι ένας όρος που αναφέρεται στην παρουσία πολύ μικρών ποσοτήτων καρκινικών κυττάρων που παραμένουν στο σώμα μετά τη θεραπεία, όπως χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία.

Το ctDNA υπόσχεται επίσης τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του μαστού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, προσφέροντας μια εναλλακτική λύση για τις μέλλουσες μητέρες που μπορεί να διστάζουν να υποβληθούν σε απεικονιστικές εξετάσεις λόγω ανησυχιών για την υγεία του εμβρύου.

Σε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου που είχαν υποβληθεί σε άμεση χειρουργική επέμβαση, οι Olsson et al. έκανε μια σημαντική παρατήρηση: Διαπίστωσαν ότι η δοκιμή ctDNA έδειξε εξαιρετική ακρίβεια στον εντοπισμό της μετεγχειρητικής υποτροπής, με ευαισθησία 93% και ειδικότητα 100%. Επιπλέον, ο διάμεσος χρόνος για την κλινική ανίχνευση της υποτροπής ήταν 7,9 μήνες. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα του ctDNA, ως ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση υποτροπιάζοντος καρκίνου του μαστού σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική θεραπεία.[46]

2.2.3 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs - ncRNAs (Non-Coding RNAs)

2.2.3.1 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ: ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Γνωρίζουμε ότι μόνο το 1-2% της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες. Τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) φαίνεται να εμπλέκονται σε εξελιγμένους και ακόμη ελάχιστα γνωστούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Τα ncRNAs αντιπροσωπεύουν το 98% του μεταγραφώματος.[47] Στην πραγματικότητα, τα ncRNAs που προηγουμένως θεωρούνταν «θόρυβος μεταγραφής», πιστεύεται ότι είναι ένα κρυφό στρώμα εσωτερικών σημάτων που ελέγχουν

διάφορα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των κυττάρων και η απορρύθμισή τους εμπλέκεται στην ανάπτυξη πολλών ανθρώπινων ασθενειών. [48]

Σταδιακά κερδίζουμε περισσότερες γνώσεις σχετικά με τις βιολογικές λειτουργίες των ncRNAs, όπως η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο, η καθοδήγηση της σύνθεσης DNA ή της γονιδιακής αναδιάταξης και την προστασία του γονιδιώματος από ξένα νουκλεϊκά οξέα. Ένας αυξανόμενος όγκος ερευνών δείχνει ότι τα ncRNAs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ογκογένεση του καρκίνου του μαστού, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον όγκο. Περίπου το 70% των μελετών σε αυτό το πεδίο έχουν αξιολογήσει τα εξωσώματα ως την πηγή επιλογής για τα ncRNAs ως βιοδείκτες.

Τα μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNAs) είναι ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής και διακυτταρικής σηματοδότησης στον καρκίνο του μαστού. Ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση για τον έλεγχο ποικίλων κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων και της δραστηριότητας του υποδοχέα οιστρογόνου α (ERα), του πολλαπλασιασμού, της εισβολής, της μετανάστευσης και της απόπτωσης. Τα ncRNAs μπορούν να συσκευαστούν σε εξωσώματα για να παρέχουν διακυτταρική επικοινωνία με τη μετάδοση microRNAs (miRNAs) και μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (lncRNAs) στα κύτταρα τοπικά ή συστηματικά. [49] Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν 45.000 θέσεις στόχοι για ncRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα που έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε έως και 60% των ανθρώπινων γονιδίων. Έτσι εμπλέκονται ευρέως στη διαμόρφωση διαφορετικών βιολογικών γεγονότων.

Τα μη κωδικοποιητικά RNAs λειτουργούν επίσης ως ρυθμιστές του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού στον καρκίνο του μαστού καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση των λιπιδίων, της γλυκόζης και του μεταβολισμού των αμινοξέων μέσω της ρύθμισης των γονιδιακών μεταγραφών και των βασικών ενζύμων που είναι απαραίτητα για τις μεταβολικές οδούς. Τα ncRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικό εργαλείο για την πρόγνωση της απορρύθμισης της μεταβολικής οδού στον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, τα ncRNAs μπορούν να στοχεύσουν διάφορα γονίδια και να

τροποποιήσουν την έκφρασή τους, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμους κυκλοφορούντες βιοδείκτες για την πρόγνωση και την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού.[47.48]

2.2.3.2 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ miRNAs (MicroRNAs) Η ΔΙΤΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ miRNAs ΩΣ ΟΓΚΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα miRNAs ήταν τα πρώτα ncRNAs που αναγνωρίστηκαν και αναλύθηκαν σε καρκίνους. Αυτά τα μικρά ενδοκυτταρικά RNAs είναι ικανά να προκαλέσουν σίγαση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών, δεσμευόμενα με στοχευμένο τρόπο στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' -UTR) των mRNAs, προκαλώντας μπλοκάρισμα μετάφρασης ή αποικοδόμηση που προκαλεί είτε ενεργοποίηση είτε καταστολή της μετάφρασης. Δεν αμφισβητείται ότι τα miRNAs παραμένουν η καλύτερα χαρακτηρισμένη κατηγορία ncRNAs. Εκτιμάται ότι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση περισσότερο από το 60% των ανθρώπινων γονιδίων καθοδηγώντας μια ποικιλία από πολυπρωτεϊνικά επαγόμενα από RNA συμπλέγματα σιγής (RISCs) για να στοχεύσουν ειδικά τα mRNA .

Από την πρώτη αναφορά το 2005 για το ρόλο της απορρύθμισης του miRNA στον καρκίνο του μαστού, πολλές μελέτες έχουν δείξει αλλοιωμένη έκφραση των miRNAs και επακόλουθο κακοήγη μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων του μαστού. Αυτά τα σχετιζόμενα με τον καρκίνο του μαστού miRNAs, μπορούν να υποδιαιρεθούν σε **ογκογόνα miRNAs (oncomiR)** και **ογκοκατασταλτικά miRNAs (tsmiR)**. Ωστόσο, αυτή η κατηγοριοποίηση του miRNA μπορεί να είναι ανακριβής, καθώς πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNA μπορεί να έχουν διπλή λειτουργία, με ογκογόνες ή ογκοκατασταλτικές ιδιότητες με βάση τον τύπο του όγκου και το κυτταρικό πλαίσιο.

Τα **OncomiR** γενικά ρυθμίζονται προς τα πάνω στον καρκίνο του μαστού, καταστέλλοντας την έκφραση πιθανών ογκοκατασταλτικών γονιδίων και οδηγώντας σε κακοήθεια. Αντίθετα, τα **tsmiRs** μπορούν να αναστείλουν την έκφραση των ογκογονιδίων. Γνωρίζουμε ότι ορισμένα από αυτά τα miRNAs εμπλέκονται σε

συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης. Γνωρίζουμε επίσης ότι αυτά εκφράζονται ανάλογα με τα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. [48,49,50] (εικόνα 7)

2.2.3.3 ΤΟ ΠΡΟΦΙΛ *miRNA* ΚΑΙ Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ *miRNAs* : ΝΕΑ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

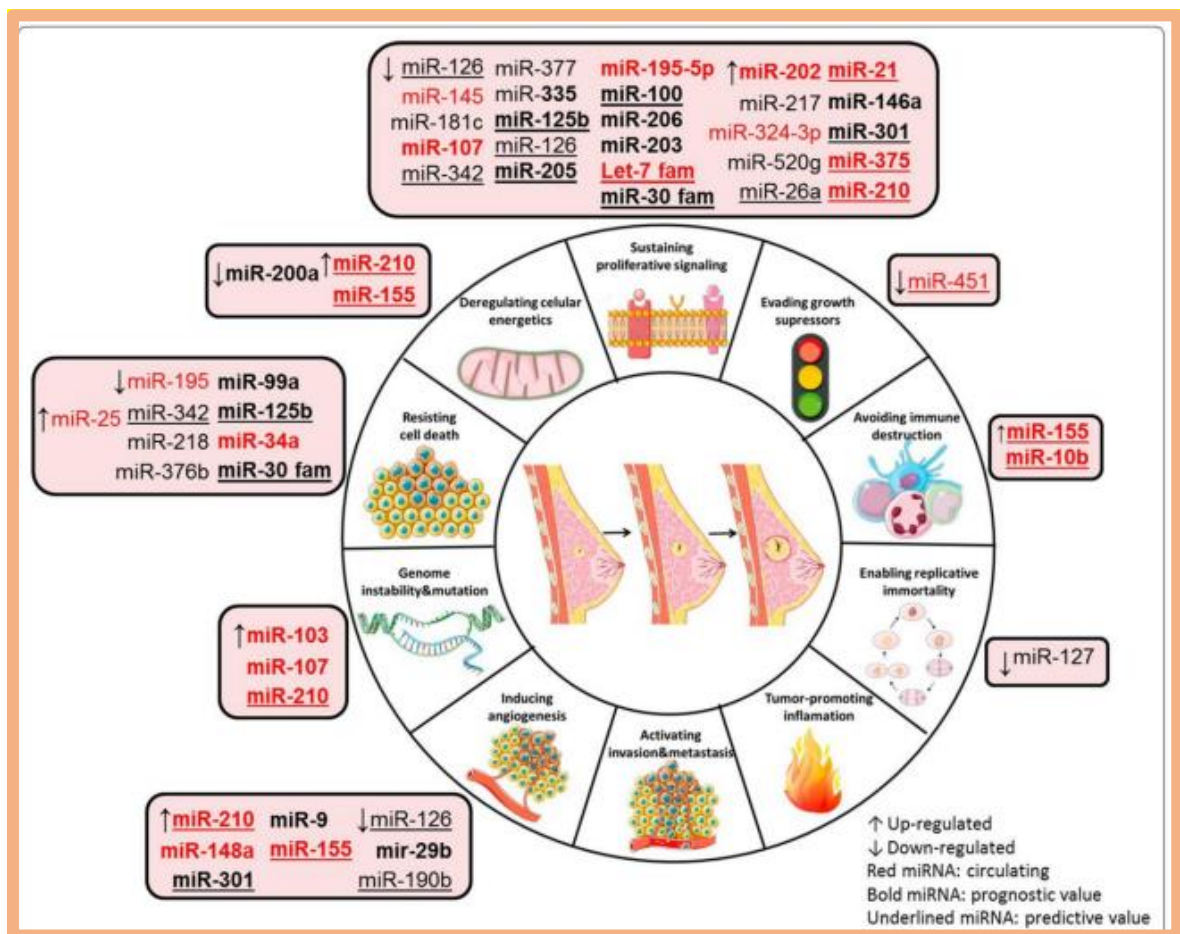
Κάθε τύπος όγκου έχει μια ξεχωριστή υπογραφή *miRNA* που τον ξεχωρίζει από τους φυσιολογικούς ιστούς και άλλους τύπους καρκίνου. Τα **προφίλ *miRNA*** δείχνουν καλύτερη διαγνωστική απόδοση καθώς και αυξημένη ευαισθησία συγκριτικά με τα μεμονωμένα *miRNAs* για την ανίχνευση BC.

Το 2005, οι Iorio et al. εντόπισε μια σήμανση 13-*miRNAs* που θα μπορούσε να διακρίνει το BC από τους φυσιολογικούς ιστούς του μαστού με τέλεια ακρίβεια. Μεταξύ των διαφορετικά εκφραζόμενων *miRNAs*, τα πιο σταθερά απορρυθμισμένα ήταν τα *miR-125b* και *miR-145* (μη ρυθμισμένα) και *miR-21* (επαναρρυθμισμένα). Οι Hu et al. εντόπισε μια υπογραφή 4-*miRNAs* με αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό ασθενών με BC που θα μπορούσε να διακρίνει τους ασθενείς με BC από υγιή άτομα με 92,1 και 93,4% ευαισθησία και ειδικότητα, αντίστοιχα.

Αρκετές μελέτες έχουν επίσης επισημάνει διαφορές μεταξύ των προφίλ *miRNA* του ορού και του πλάσματος στον καρκίνο σε σύγκριση με υγιή άτομα. Το *miR-222*, για παράδειγμα, ήταν σημαντικά αυξημένο στον ορό ασθενών με BC, ενώ υψηλότερα επίπεδα *miR-205* έχουν βρεθεί στον ορό υγιών ατόμων σε σύγκριση με ασθενείς με BC. Επιπλέον, οι Zhao et al. διαπίστωσε ότι το *miR-195* ήταν μειωμένο στο πλάσμα των ασθενών με BC σε σύγκριση με υγιή άτομα.

Πιο πρόσφατα, ο Zhang και οι συνεργάτες του βρήκαν μια υπογραφή 3-*miRNA* στον ορό ως διαγνωστικό βιοδείκτη για μη επεμβατική πρώιμη ανίχνευση του BC, ενώ οι Ng et al. ανέφερε ότι ο συνδυασμός των επιπέδων *miR-145* και *miR-451* στο πλάσμα μπορεί να διακρίνει τα φυσιολογικά άτομα από τους ασθενείς με BC, τόσο σε πρώιμο όσο και σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Τέλος, οι Cuk et al. έχουν επίσης βρει μια ομάδα απορρυθμισμένων *miRNAs* του πλάσματος που ήταν αυξημένα σε γυναίκες με καλοήγη και σταδίου I ή II BC, που μπορεί να είναι ελκυστικοί υποψήφιοι για πρώιμη ανίχνευση BC.

Η αναζήτηση κυκλοφορούντων miRNAs ως προγνωστικών βιοδεικτών είναι μια συνεχής και θεμελιώδης εργασία σε εξέλιξη, καθώς οι ασθενείς με υψηλότερο κίνδυνο μπορεί να χρειαστούν διαφορετικές θεραπευτικές παρεμβάσεις. Αρκετά συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης miRNA έχουν επίσης συσχετιστεί με μοριακούς υποτύπους BC.



Εικόνα 7: Ο ρόλος των miRNAs στον καρκίνο του μαστού. Τα miRNAs εμπλέκονται σε συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης, ρυθμιζόμενα είτε προς τα πάνω είτε προς τα κάτω. Έτσι συμμετέχουν αναλόγως στην ογκογένεση και στην ογκοκαταστολή. (Προσαρμοσμένο από: "Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers" (Amorim, Salta, Henrique, & Jerónimo, 2016).

Journal of Translational Medicine, 14, 265. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1025-3>

2.2.3.4 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΜΑΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs – lncRNAs (Long Non-Coding RNAs) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα lncRNAs έχουν κερδίσει σημαντική προσοχή ως βασικοί ρυθμιστές σε διάφορα φυσιολογικά και παθοφυσιολογικά συμβάντα. Μεταβλημένα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs έχουν αναφερθεί σε πολλούς καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Έχει καταστεί σαφές ότι τα lncRNA με απορρυθμισμένη έκφραση οδηγούν την έναρξη και την εξέλιξη των καρκίνων μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους τύπους μορίων (RNA, DNA και πρωτεϊνών). [51]

Τα lncRNAs αποτελούνται από περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια, με τα περισσότερα να αποτελούνται από 1000 έως 10.000. Δρουν μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων των διαμεσολαβούντων διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων, που χρησιμεύουν ως σπόγγοι για τα ενδογενή RNAs. Ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των mRNAs ρυθμίζοντας επιγενετικά συστατικά που ανακατευθύνονται στους στόχους τους. **(εικόνα 8)** Επομένως, οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες. Αυτός ο τύπος ncRNA δημιουργεί δευτερεύουσες και τρισδιάστατες δομές, επιτρέποντάς τους να παίζουν τον διπλό ρόλο του RNA και της πρωτεΐνης.[47] Αυτές οι ετερογενείς πολύπλοκες τρισδιάστατες δομές, τους επιτρέπουν να λαμβάνουν διαφορετικά σχήματα και να αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία ενδοκυτταρικών συστατικών.[49].

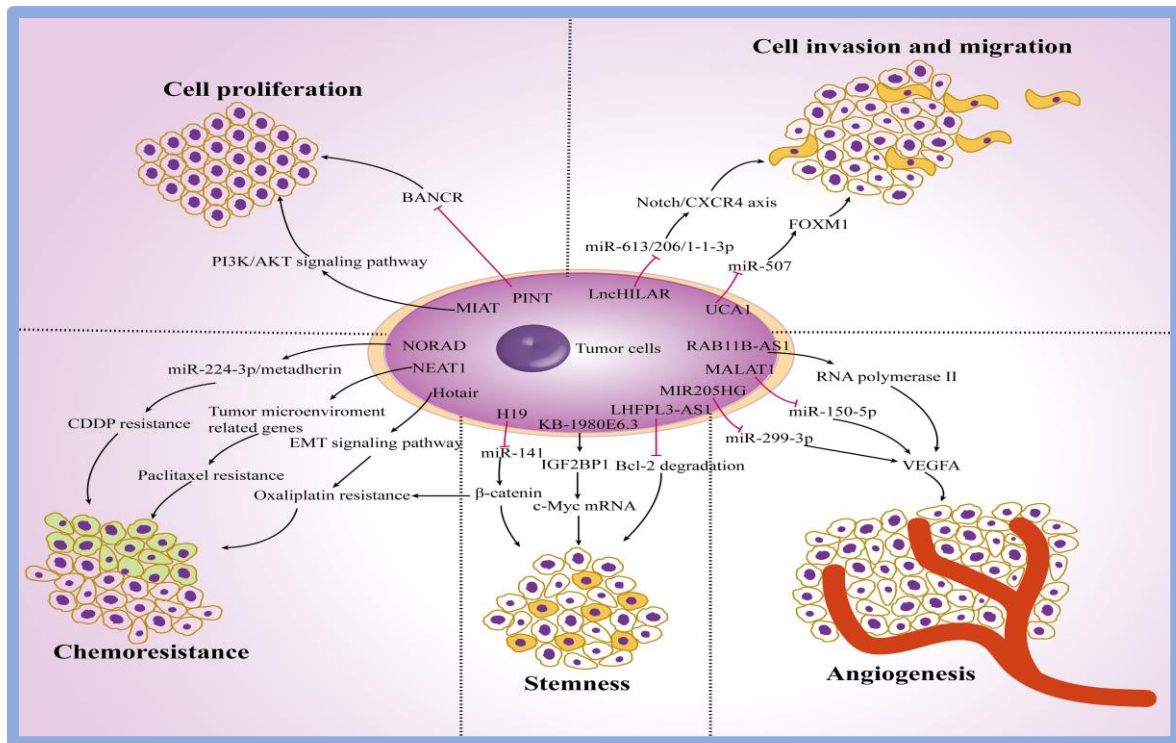
Η βιογένεση των lncRNAs είναι παρόμοια με αυτή του mRNA στο ότι μεταγράφονται πρώτα από την RNA πολυμεράση II, μετά την οποία τα περισσότερα από τα μεταγραφώματα ματίζονται. Τα lncRNAs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης από τα miRNAs.[48] Μέχρι σήμερα, πάνω από 27.000 lncRNAs έχουν σχολιαστεί και ο αριθμός συνεχίζει να αυξάνεται, ενώ οι λειτουργίες μεγάλου αριθμού lncRNAs παραμένουν ανεξερεύνητες.

Το lncRNAs είναι ο πιο πολύπλοκος τύπος ncRNAs, χωρίς ενιαίο πρότυπο ταξινόμησης. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν κατά μήκος, γονιδιωματική θέση και μηχανισμό δράσης. **Με βάση τον γονιδιωματικό εντοπισμό τους, μπορούν να ταξινομηθούν ως ιντρονικά, διαγονιδιακά, νοηματικά, αντιπληροφοριακά και ενισχυτικά.**

Ανάλογα με τους μηχανισμούς δράσης τους, κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους:
lncRNAs οδηγού, ικριώματος, δολώματος και σηματοδότησης .

Τα **καθοδηγητικά lncRNAs** μπορούν να συνδεθούν με παράγοντες μεταγραφής και να τους κατευθύνουν σε συγκεκριμένους στόχους. Τα **lncRNAs ικριώματος** λειτουργούν ως «κεντρική πλατφόρμα» που δεσμεύει διαφορετικά μόρια τελεστών ταυτόχρονα, όπως ένα «ικρίωμα», για να ενσωματώσει διάφορες οδούς σήματος. Τα lncRNA των οδηγών σιγής και του ικριώματος μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα αλλοιωμένο εντοπισμό ή ακόμα και αλλοίωση απώλεια της λειτουργίας των μορίων τελεστών. Τα **παραπλανητικά lncRNAs** αλληλεπιδρούν με τους μεταγραφικούς ρυθμιστές-στόχους και μπλοκάρουν τα κατάντη σήματα. Τα **σηματοδοτικά lncRNAs** ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων προς τα κάτω χωρίς μετάφραση πρωτεΐνης.

Ο μηχανισμός της ρύθμισης βιοδιαδικασιών με τη μεσολάβηση lncRNAs συχνά περιλαμβάνει miRNAs. Στην πραγματικότητα, τα lncRNA αλληλεπιδρούν με τα miRNAs μέσω πολλαπλών μηχανισμών για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μαζί, σχηματίζουν τον **άξονα lncRNAs-miRNAs-mRNAs**. Με άλλα λόγια, τα lncRNAs μπορούν να δράσουν ως «**σπόγγιο miRNA**» δεσμευόμενα ανταγωνιστικά με miRNAs, ρυθμίζοντας έμμεσα την έκφραση των mRNAs . Αυτά τα ανταγωνιστικά δίκτυα ενδογενών RNAs (ceRNAs) είναι ευρέως παρόντα σε όλες τις πτυχές του καρκίνου του μαστού.[52]



Εικόνα 8: Ο ρόλος των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (lncRNAs) στις διάφορες διεργασίες των κυττάρων στον καρκίνο του μαστού. (Προσαρμοσμένο από: "Diagnostic and therapeutic role of non-coding RNAs regulating programmed cell death in melanoma" (Wang, Xie, & Chen, 2024). *Frontiers in Oncology*, 14, 1476684. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1476684>)

2.2.3.5 Η ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΤΩΝ lncRNAs ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Εκτός από την πιθανή χρήση των lncRNAs ως διαγνωστικών βιοδεικτών, έχουν προταθεί ως πολύτιμοι προγνωστικοί βιοδείκτες. Είναι αξιοσημείωτο ότι η έκφραση των lncRNAs βρέθηκε να σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού. Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα lncRNAs παραμένουν σταθερά ενώ κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά ακόμη και υπό ακραίες συνθήκες, ενισχύοντας περαιτέρω το ανταγωνιστικό τους πλεονέκτημα ότι είναι καλά διαγνωστικά εργαλεία. Τα τελευταία χρόνια, αρκετά κυκλοφορούντα lncRNAs έχουν αποδειχθεί ως κατάλληλοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες σε διάφορους τύπους καρκίνου:

Το **MALAT1** έχει αποδείξει τη διαγνωστική του αξία για τον καρκίνο του μαστού (ευαισθησία 83,7% και ειδικότητα 81,2%), [50] ενώ τα επίπεδα έκφρασης στον ορό του

κυκλοφορούντος lncRNA RP11-445H22.4 βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με BC, εντοπίζοντας περιπτώσεις BC με 92% ευαισθησία και 74% ειδικότητα. [49]

ΟΓΚΟΓΟΝΟΝΑ lncRNAs:

To HOTAIR - (HOX Transcript Antisense Intergenic RNA): Σχετίζεται με την επιθετικότητα και τις μεταστάσεις του καρκίνου του μαστού. Το HOTAIR είναι ογκογόνο όταν ρυθμίζεται προς τα πάνω. Τα επίπεδα έκφρασής του συσχετίζονται επομένως με την πρόγνωση του ασθενούς και το HOTAIR θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης.[87]

Το HOTAIR είναι ένα lncRNA 2.158 bp που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 12q13.13 μεταξύ των γονιδίων HOXC11 και HOXC12. Η έκφραση HOTAIR φαίνεται να είναι αυξημένη σε καρκινικούς ιστούς και η υψηλή έκφραση του HOTAIR έχει συσχετιστεί με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, προχωρημένο στάδιο όγκου, αυξημένο κίνδυνο μετάστασης και δυσμενή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού.

To MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1): Είναι ένα από τα πιο διατηρημένα και εξαιρετικά άφθονα lncRNAs σε διαφορετικούς ιστούς, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να έχει ζωτικές βιολογικές λειτουργίες. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα MALAT1 στον ορό σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού είναι σημαντικά υψηλότερα από εκείνα σε ασθενείς με καλοήγη νόσο του μαστού. Οι Huang et al. έδειξε ότι η έκφραση του MALAT1 ήταν αυξημένη σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με υγιείς περιπτώσεις. Επιπλέον, η σίγαση του MALAT1 παρεμπόδιζε σημαντικά την αγγειογένεση μέσω της ανοδικής ρύθμισης της έκφρασης miR-145. Έχει επίσης βρεθεί ότι το MALAT1 προάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT).

NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1): Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν τη συμμετοχή του NEAT1 στον καρκίνο του μαστού. Οι Jiang et al. ανέφερε ότι τα υψηλά επίπεδα NEAT1 σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού συνδέθηκε με επιθετική εξέλιξη και δυσμενή πρόγνωση.[50] Το NEAT1 επηρεάζει οδούς όπως η PI3K/AKT, Wnt/β-catenin και NF-κB, που είναι κρίσιμες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. [52]

To H19: Λειτουργεί ως μοριακός σπόγγος του miR-152 για να ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση της μεθυλτρανσφεράσης του DNA DNMT1, διευκολύνοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η πρώτη

απόδειξη ότι το H19 έχει κεντρικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού παρείχε οι Adriaenssens et al., οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση του H19 συσχετίστηκε σημαντικά με την κατάσταση ER/PR και την εξέλιξη του όγκου.[50]

To lncRNA CDC6 : Η υπερέκφραση του CDC6 απορυθμίζει τη φάση G1 στον κυτταρικό κύκλο, προάγοντας τη μετανάστευση των καρκινικών κυτάρων του μαστού.

Ένα νέο lncRNA που ονομάζεται **LINC02273** σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με το hnRNPL και ενεργοποιεί το ογκογονίδιο AGR2, προάγοντας έτσι τη μετάσταση BC.[50,52]

ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ lncRNAs:

To MEG3: Ήταν το πρώτο lncRNA που αναγνωρίστηκε ως ογκοκατασταλτικό. Η αυξημένη έκφραση του MEG3 μπορεί να αναστείλει την κυτταρική εισβολή, τον πολλαπλασιασμό και την επαγωγή απόπτωσης, υποδεικνύοντας ότι το MEG3 μπορεί να είναι ένας νέος θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο του μαστού.

XIST (X-inactive specific transcript): Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει συσχετίσεις μεταξύ της ανώμαλης έκφρασης XIST και του καρκίνου του μαστού. Οι Zheng et al. έδειξε ότι η έκφραση XIST μειώθηκε δραστικά στους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού

Επιπλέον, οι Liu et al. διαπίστωσε επίσης ότι το XIST λειτουργούσε ως ceRNA για το miR-362-5p και έτσι ανέστειλε την κατασταλτική του δράση στην πρωτεΐνη 1 που σχετίζεται με την ουβικιτίνη (UBAP1), αναστέλλοντας κατά συνέπεια την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

Οι Sircia et al. έδειξε ότι το BRCA1 συμμετέχει στη ρύθμιση XIST στο ενεργό χρωμόσωμα X καθώς και στη δυσρύθμιση του XIST και οδηγεί στην ογκογένεση στον καρκίνο του μαστού.

GAS5 (Growth Arrest-Specific 5): Είναι ένα πολύ γνωστό ογκοκατασταλτικό lncRNA, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q25. Οι Zhang et al. έδειξε την αμοιβαία αναστολή μεταξύ miR-21 και GAS5 στον καρκίνο του μαστού. Το MiR-21 μείωσε την έκφραση του GAS5, ενώ η σίγαση του GAS5 αύξησε την έκφραση του miR-21. Οι Jing et al. διαπίστωσε ότι η έκφραση του GAS5 είχε μειωθεί σημαντικά από το Notch-1 και ότι τα μειωμένα επίπεδα GAS5 εμπλέκονταν στον πολλαπλασιασμό του καρκίνου του μαστού. Έτσι, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι το GAS5 θα μπορούσε να είναι ένας ελκυστικός υποψήφιος βιοδείκτης στη θεραπεία του καρκίνου BC.

PTENP1 (PTEN pseudogene 1): Έχει αποδειχθεί ότι παίζει κατασταλτικό ρόλο στην καρκινογένεση μέσω της ρύθμισης του γονιδίου PTEN, το οποίο είναι γνωστό για τις ογκοκατασταλτικές του ιδιότητες. [50]

3.2.3.6 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΥΚΛΙΚΑ RNAs – circRNAs (Circular RNAs) **ΤΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ circRNAs ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ** **ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Τα κυκλικά RNAs (circRNAs), αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1976 αλλά για πολλά χρόνια θεωρούνταν χωρίς λειτουργικό ρόλο. Οι επιστήμονες πίστευαν ότι ήταν απλώς υποπροϊόντα της συναρμογής RNA (RNA splicing). Με την ανάπτυξη τεχνολογίας αλληλουχίας RNA υψηλής απόδοσης και εργαλείων βιοπληροφορικής, ένας αυξανόμενος αριθμός circRNAs έχει ανακαλυφθεί και ερευνηθεί. Πολλά circRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες και χαρακτηρίζονται από την ποικιλία, τη σταθερή δομή, τις διατηρημένες αλληλουχίες και την ειδική τους έκφραση σε κύτταρα ή ιστούς. Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα circRNAs, εμπλέκονται στην διαδικασία εμφάνισης όγκων μεταξύ αυτών και ο καρκίνος του μαστού.

Τα CircRNAs δεν εμπλέκονται μόνο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της εισβολής και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων του μαστού, αλλά μπορούν να χρησιμεύσουν ως νέοι μοριακοί δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και την εξατομικευμένη αξιολόγηση της πρόγνωσης του BC. Έτσι, τα circRNAs παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση του BC. Ωστόσο, γενικά, η έρευνα που σχετίζεται με το circRNAs σε όγκους είναι ακόμη σε αρχικά στάδια και οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται με την λειτουργία τους δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρέπει ακόμα να πραγματοποιήσουμε πολλά διερευνητικά πειράματα. Πιστεύεται ότι με τις αδιάκοπες προσπάθειες των επιστημόνων, τα circRNAs θα ανοίξουν ένα νέο πεδίο για την έρευνα όγκων, δημιουργώντας ένα νέο σημείο εκκίνησης στην κλινική διάγνωση και θεραπεία.[53]

Αν και υπάρχουν πολλές διαφορετικές μορφές κυκλικών RNAs, αυτά **χωρίζονται κυρίως σε τρεις κατηγορίες**, ανάλογα με τα συστατικά τους τμήματα. Ο πρώτος τύπος είναι

γνωστός ως **εξωνικά circRNAs (ecRNAs)** και προέρχονται από μεμονωμένα ή πολλά εξόνια στα προ-mRNA. Ο δεύτερος τύπος, τα **circRNAs εσώνιων (ciRNAs)** που περιέχουν μόνο εσώνια, και τέλος τα **circRNAs εξωνίου-ιντρονίου (EIciRNAs)** είναι ένας τύπος circRNA που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και περιέχει εξόνια και εσώνια. Μεταξύ των τριών τύπων, τόσο τα ciRNAs όσο και τα EIciRNAs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, ενώ τα ecRNAs υπάρχουν κυρίως στο κυτταρόπλασμα.[54]

Τα CircRNAs ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον καρκίνο. Ένας αυξανόμενος αριθμός αποδεικτικών στοιχείων έχει καταδείξει τη σχέση μεταξύ των διαφόρων νέων circRNAs και των οδών σηματοδότησης με την καρκινογένεση. Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα circRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού ρυθμίζοντας τα γονίδια-στόχους άμεσα ή αλληλεπιδρώντας με τα miRNAs που συνδέονται στενά με τα μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με τον καρκίνο. [55] **(εικόνα 9)**

Αρκετές μελέτες έχουν υποδείξει ότι τα circRNAs, που εκφράζονται παρεκκλίνοντα σε διάφορους κακοήθεις όγκους, επηρεάζουν την ογκογένεση και την ανάπτυξη μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Μερικά circRNAs έχει παρατηρηθεί ότι εκτελούν τις λειτουργίες τους μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες.

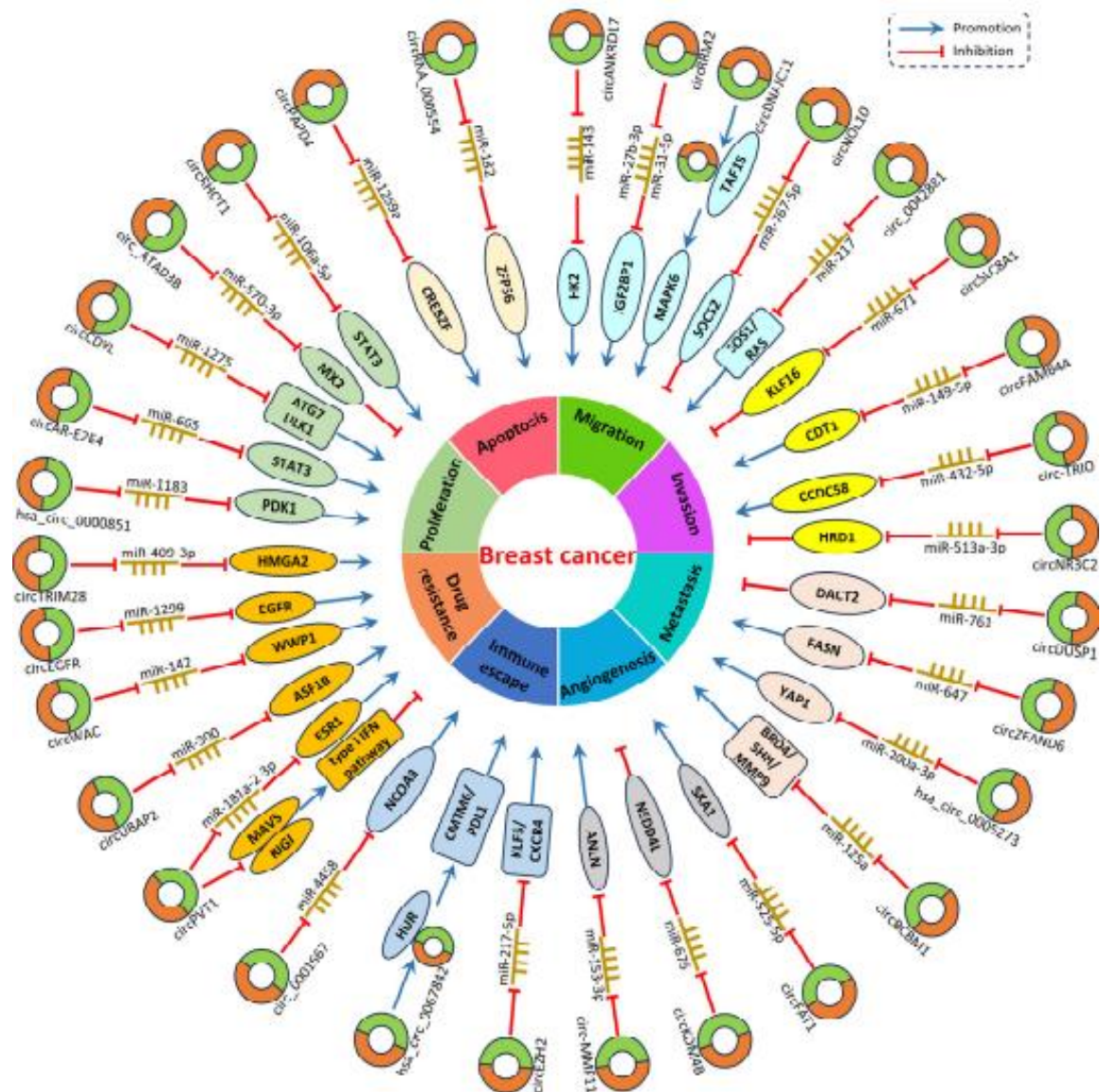
Λόγω της αντοχής τους στην αποικοδόμηση που προκαλείται από το ένζυμο RNase R (η RNase δεν μπορεί να διασπάσει τα circRNAs λόγω της κυκλικής τους δομής), τα circRNAs θα μπορούσαν να ανιχνευθούν σε διάφορα σωματικά υγρά, όπως το αίμα, το σάλιο και τα ούρα. Αυτή τους η ιδιαιτερότητα καθιστά τα circRNAs ελκυστικά ως υποσχόμενους κυκλοφορούντες βιοδείκτες για τον έλεγχο και την παρακολούθηση του καρκίνου του μαστού. Για παράδειγμα, το hsa_circ_0067842 μπορεί να αξιοποιηθεί ως πολλά υποσχόμενος προγνωστικός βιοδείκτης στο BC. [56]

3.2.3.7 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ *circRNAs* ΩΣ *MiRNA SPONGES*

Τα *circRNAs* εκτός από το ότι μπορούν να δεσμεύσουν απευθείας πρωτεΐνες για να συμμετάσχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, χρησιμεύουν ως **0** Έτσι ως νέα ταξινόμηση του ανταγωνιστικού ενδογενούς RNA (*ceRNA*), τα *circRNA* ως *miRNA sponges*, μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα ή τη μετάφραση των mRNA-στόχων δεσμεύοντας το *miRNA*. Επιπλέον, τα *circRNAs* δεσμεύονται πιο αποτελεσματικά στο *miRNA* από άλλα *ceRNAs* λόγω της αφθονίας και της σταθερότητάς τους. Το *CiRS-7* ήταν το πρώτο *circRNA* που επικυρώθηκε ως σπόγγος *miRNA*. [53]

ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΑ *circRNAs* ΩΣ ΣΠΟΓΓΟΙ *miRNA*: Στοχεύουν κυρίως στην αναστολή της έκφρασης ενδογενών ογκοκατασταλτικών γονιδίων και επιταχύνουν την καρκινογένεση. Η ανοδική ρύθμιση των ογκογόνων *circRNAs* προάγει την εξέλιξη και συσχετίζεται θετικά με το κλινικό στάδιο του BC μέσω διαταράξεων φυσιολογικών γονιδίων. Κυρίως, τα ρυθμισμένα προς τα πάνω *circRNAs* απορροφούν και μειώνουν την έκφραση των ογκοκατασταλτικών *miRNAs*, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των ογκογονικών γονιδίων-στόχων που προκαλούν πολλαπλασιασμό, μετάσταση και εισβολή. Το *Circ_0000518* αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως σφουγγάρι του *miR-326*, το οποίο βρέθηκε ότι επιταχύνει τον κυτταρικό κύκλο στοχεύοντας τον υποδοχέα-1 του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (*FGFR1*) στο BC, ενώ το *Circ_ABCC4* βρέθηκε ότι ενισχύει τη δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού και ανέστειλε την απόπτωση με σπόγγο *miR-154-5p*.

ΤΑ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ *circRNAs* ΩΣ ΣΠΟΓΓΟΙ *miRNA*: Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά ογκοκατασταλτικά *circRNAs* παίζουν σημαντικό ρόλο στην καθυστέρηση της εξέλιξης του όγκου στον καρκίνο του μαστού, ρυθμίζοντας προς τα πάνω τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που σχετίζονται στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την εισβολή και τη μετανάστευση. Η υπερέκφραση των ογκοκατασταλτικών *circRNAs* μπορεί να απορροφήσει *miRNAs* που προάγουν τον όγκο και να αποδυναμώσει έτσι την ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. [57]



Εικόνα 9: Η λειτουργία των κυκλικών μη κωδικοποιητικών RNAs (circRNAs) ως miRNA sponges και η συμμετοχή τους στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες στον καρκίνο του μαστού.

(Προσαρμοσμένο από: "Circular RNAs in breast cancer: An update" (Bao, Li, Zhao, Yang, & Xu, 2024). Biomolecules. 14(2). 158. <https://doi.org/10.3390/biom14020158>)

2.2.4 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

2.2.4.1 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ: ΑΓΓΕΛΙΟΦΟΡΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs-Extracellular Vesicles), που περιγράφηκαν για πρώτη φορά ως τέτοια, πριν από 30 χρόνια και έκτοτε εμπλέκονται στην επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου και στη μετάδοση καταστάσεων ασθένειας.

Ορίζονται καλύτερα ως εξωκυτταρικά κυστίδια που απελευθερώνονται από τα κύτταρα κατά τη σύντηξη ενός ενδιάμεσου ενδοκυτταρικού διαμερίσματος, του πολυκυστιδικού σώματος (**MVB-MultivesicularBody**), με την πλασματική μεμβράνη. Αυτό απελευθερώνει ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs) στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και τα κυστίδια που απελευθερώνονται με αυτόν τον τρόπο είναι αυτά που γνωρίζουμε ως εξωσώματα.

Τα εξωσώματα που μεταφέρουν πρωτεΐνες μεμβράνης ή περιεχόμενο του αυλού στο κύτταρο δέκτη μπορεί να καταποντιστούν ολόκληρα είτε η μεμβράνη του εξωσώματος μπορεί να συντηχθεί απευθείας με την πλασματική μεμβράνη του ξενιστή. Για τη διακυτταρική μετάδοση, έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί φαγοκυττάρωσης και ενδοκυττάρωσης εξωκυτταρικών κυστιδίων και το ποιος μηχανισμός λειτουργεί, μπορεί να εξαρτάται από το μέγεθος των κυστιδίων, το οποίο μπορεί με τη σειρά του να εξαρτάται από το φορτίο που μεταφέρεται από το κυστίδιο. [58]

2.2.4.2 ΕΞΩΣΩΜΙΚΟ RNA

Τα RNAs εντός των εξωκυτταρικών κυστιδίων είναι ως επί το πλείστον κατακερματισμένα καθώς παρουσιάζουν απώλεια τμημάτων των αρχικών μορίων, αλλά τα μόρια μικρότερου μεγέθους μπορεί να είναι ανθεκτικά στην αυτοπύκνωση. [59]

Μεταξύ των διαφόρων φορτίων που θα μπορούσαν να μεταφερθούν από εξωσώματα, τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως κύρια φορτία με σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού. (Sempere, Keto, & Fabbri, 2017) [61] Έχει εξεταστεί η πιθανότητα χρήσης των εξωσωμικών RNAs (miRNAs και lncRNAs) στην διάγνωση και τη θεραπεία του BC. [60] Μεταξύ αυτών, το miR-21 και το miR-1246 έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και την πρόοδο του BC. Τα εξωσώματα από κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, έχει αποδειχθεί ότι είναι εμπλουτισμένα με miRNAs σε σχέση με μη ογκογενείς κυτταρικές σειρές μαστού.

Επίσης, η έκθεση φυσιολογικών κυττάρων σε εξωσώματα που προέρχονται από κυτταρικές σειρές BC, αύξησε τόσο την κυτταρική επιβίωση όσο και τον πολλαπλασιασμό, συνοδευόμενη από απώλεια έκφρασης ορισμένες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες. [58] Σε μια μελέτη, οι Hannafon et al. (2016) αξιολόγησε τα επίπεδα

πλάσματος διαφόρων εξωσωμικών miRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα, εμπλουτίζονται με διάφορα miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-21 και miR-1246. [61]

2.2.4.3 ΕΞΩΣΩΜΙΚΟ DNA – ExoDNA

Το κυκλοφορούν εξωσωμικό DNA (**exoDNA**) αντικατοπτρίζει τις γενετικές αλλοιώσεις του όγκου, όπως τις μεταλλάξεις στα γονίδια TP53 ή PIK3CA. Το εξώσωμα περιέχει θραύσματα DNA από το κύτταρο προέλευσης. Παρά τη βιολογική του σταθερότητα και την κλινική του χρησιμότητα σε διάγνωση όγκου, το εξωσωμικό DNA (ExoDNA) έχει μελετηθεί πολύ λίγο σε σύγκριση με το εξωσωμικό RNA. Κυτοπλασματική συσσώρευση κατεστραμμένου DNA από τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια συχνά οδηγούν στη συσκευασία τους σε εξωσώματα από άγνωστες ακόμη οδούς. Εκτός από την εκκίνηση της ανοσίας του όγκου, το ExoDNA περιέχει μια ποικιλία μεταλλάξεων γονιδίων π.χ. EGFR, BRAF, RAS, IDH και HER2, καθιστώντας το έτσι ένα πολλά υποσχόμενο υλικό «υγρής βιοψίας».[62]

Το Exo-DNA είναι ένα ιδανικό βιοϋλικό για υγρή βιοψία λόγω της μοριακής του σταθερότητας σε σύγκριση με το Exo-miRNA. Οι δοκιμές υγρής βιοψίας με βάση το Exo-DNA αναπτύσσονται ως πιο αποτελεσματικά διαγνωστικά εργαλεία στο μέλλον. Το Exo-DNA έχει έναν πιθανό ρόλο στη διαδικασία θεραπείας του καρκίνου. Ερευνητικά στοιχεία δείχνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα που έλαβαν θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα απελευθέρωσαν Exo-DNA υπεύθυνο για την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση που προκαλείται από δενδριτικά κύτταρα (DCs).[63]

2.2.4.4 ΕΞΩΣΩΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Τα εξωσώματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες ιντεγκρίνης, μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), πρωτεΐνες κυτταροσκελετού και τετρασπανίνες όπως τα TSG10, CD63 και CD9, τα οποία χρησιμοποιούνται ως εξωσωμικοί δείκτες. Τα τελευταία πρωτεομικά αποτελέσματα που συλλέχθηκαν στις βάσεις δεδομένων ExoCarta και EVPedia14, δείχνουν ότι τα εξωσώματα από διάφορες πηγές έχουν συγκεκριμένα προφίλ

πρωτεΐνης που εκφράζεται άφθονα σε αυτά. Εκφραζόμενες ευρέως, αυτές οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης, της κίνησης, της εισβολής, της σύντηξης μεμβράνης, της μεταγωγής σήματος κ.ά. Ως ένα από τα μέλη της οικογένειας τετρασπανινών, το CD82 παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε κακοήθεις όγκους και έχει στενή σχέση με την κακοήθη εξέλιξη και την πρόγνωση του όγκου. Το CD82/KA11, ένας καταστολέας της μετάστασης, είναι ένας βιολογικός δείκτης για την πρόβλεψη του μεταστατικού δυναμικού των συμπαγών όγκων καθώς έχει μειωμένη ή καθόλου έκφραση σε ιστούς όγκου. Κλινικά, η κακοήθεια και η μεταστατική ικανότητα των όγκων συσχετίζεται αρνητικά με την πρωτεϊνική έκφραση του CD82. Η ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης CD82 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας σημαντικός δείκτης για να κριθεί η μετάσταση και η πρόγνωση του όγκου. Δεδομένου ότι η ικανότητα αναστολής της μετάστασης όγκου του CD82 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1995, πολλοί μελετητές συνέχισαν να διερευνούν τον μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την αναστολή της εισβολής όγκου και μετάσταση, και ο μηχανισμός που διέπει την αναστολή της μετάστασης του όγκου έχει σταδιακά προσδιοριστεί. [64] Επιπλέον οι εξωσωμικές πρωτεΐνες CD9, CD63 αποτελούν βιοδείκτες της επιβάρυνσης του όγκου σε ασθενείς με καρκίνο μαστού θετικούς για HER2. [65]

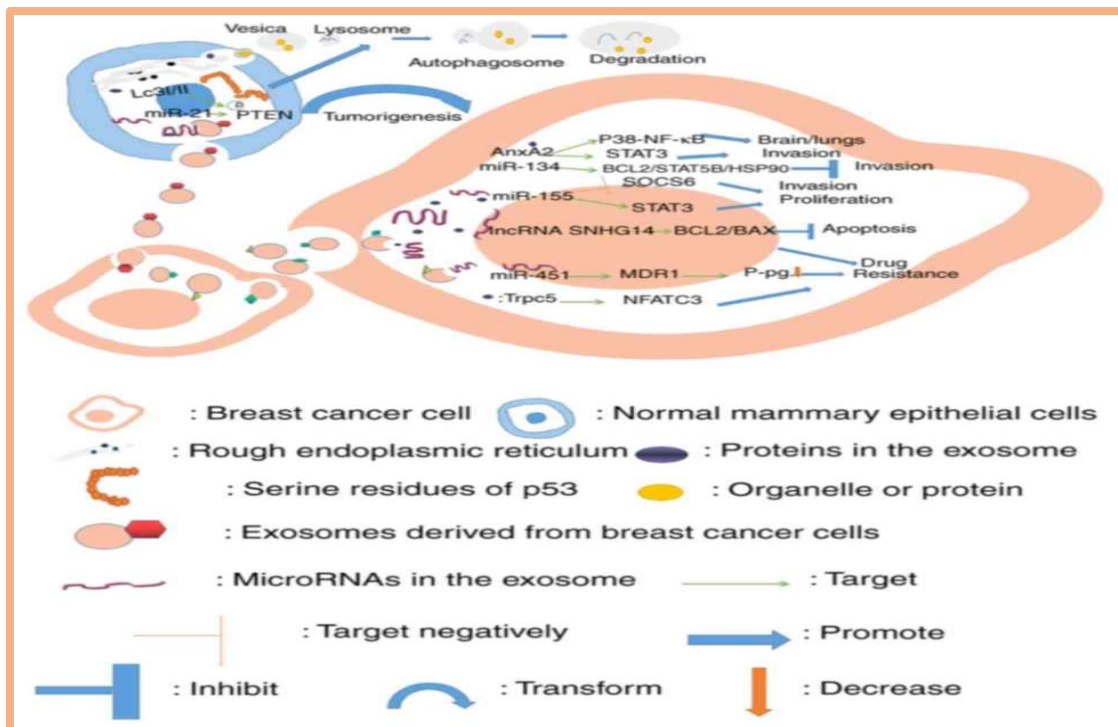
2.2.4.5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει επικεντρωθεί όλο και περισσότερο στα εξωσώματα που απελευθερώνονται από καρκινικά κύτταρα ως νέους βιοδείκτες για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο. Η χρήση των εξωσωμάτων (exosomes) ως κυκλοφορούντες βιοδείκτες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας λόγω της ικανότητάς τους να αντικατοπτρίζουν την κατάσταση του κυττάρου προέλευσης και της ευκολίας ανίχνευσής τους στο αίμα, στα ούρα ή σε άλλα βιολογικά υγρά. [66]

Τα εξωσώματα, είναι γνωστά ως βιολογικά νανο-οχήματα που θα μπορούσαν να μεταφέρουν μια ποικιλία κυτταρικών και μοριακών σημάτων στα κύτταρα λήπτες (Banikazemi et al., 2017, Saeedi Borujeni et al., 2017). Μεταφέροντας τα σήματα τους στοχεύουν τα φορτία τους (π.χ. πρωτεΐνες, mRNA και miRNAs) σε κύτταρα λήπτες

(Mirzaei, Sahebkar, et al., 2017, Saadatpour, Fadaee, et al., 2016). Σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, οι κυκλοφορούντες εξωσωματικοί αναλύτες μπορεί να αντικατοπτρίζουν την αλλοιωμένη κατάσταση (π.χ. υπερ- ή υποεκφρασμένες βασικές πρωτεΐνες και microRNA) του κυττάρου προέλευσης και, επομένως, μπορεί να έχουν σημαντική διαγνωστική αξία. Ορισμένα μοριακά συστατικά των εξωσωμάτων μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την προέλευση του καρκινικού ιστού, που είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για τη χρήση τους ως βιοδείκτες καρκίνου. [67] **(εικόνα 10)**

Το πρωτόμα των καρκινικών κυττάρων του μαστού και τα εξωσώματά τους μπορούν να δείξουν εάν το κύτταρο προέλευσης ήταν επιθηλιακό ή μεσεγχυματικό. Σε άλλες μελέτες, έχει προταθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν περισσότερα εξωσώματα σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα από τον ίδιο ή άλλους ιστούς. [68]



Εικόνα 10: Συμβολή των εξωσωμάτων, που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα του μαστού, στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την εξέλιξη του καρκίνου. Τα εξωσώματα μεταφέρουν βιομόρια όπως miRNAs, πρωτεΐνες και άλλα φορτία, τα οποία εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες, όπως η καρκινογένεση, η μετάσταση και διήθηση, η απόπτωση και επιβίωση των κυττάρων και η πρωτεϊνική σηματοδότηση. (Προσαρμοσμένο από "Exosomes: A rising star in breast

cancer (Review)" (Wang, Wang, Wen, Mao, Ren, & Yang, 2020). *Oncology Reports*, 44(2), 407–423.
<https://doi.org/10.3892/or.2020.7638>)

2.2.5 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΟΓΚΟΥ

2.2.5.1 ΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα κυκλοφορούντα αντιγόνα όγκου, συνδέονται στενά με τις πολλαπλασιαστικές, μεταναστευτικές, επεμβατικές, αγγειογενετικές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των κυττάρων όγκου. Αρκετά τέτοια αντιγόνα έχουν ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με BC, συμπεριλαμβανομένων του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA), CA15-3, CA27-29, CA-125, το ειδικό για το πολυπεπτιδίο ιστού αντιγόνο TPS, η κυκλοφορούσα εξωκυτταρική περιοχή του HER2 και η πρωτεΐνη φορέας ριβοφλαβίνης (RCP). Ενώ αυτοί οι βιοδείκτες μπορεί να απορρυθμιστούν στον πρώιμο καρκίνο του μαστού (EBC), η χρησιμότητά τους στο πλαίσιο του πρώιμου προσυμπτωματικού ελέγχου, αντιμετωπίζει προκλήσεις [69]. Ο καρκίνος του μαστού, ως ετερογενής νόσος, εκφράζει διάφορες παρεκκλίνουσες πρωτεΐνες ικανές να προκαλέσουν μια ανοσολογική απόκριση που μπορεί να εκδηλωθεί μήνες ή χρόνια πριν από την κλινική διάγνωση. [70]

Τα αντιγόνα που υπάρχουν στα καρκινικά κύτταρα είναι οι στόχοι για το ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, πολλά δεν είναι πραγματικά ειδικά για τον καρκίνο, καθώς μπορεί επίσης να βρεθούν σε φυσιολογικούς ιστούς. [71]

ΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟΕΜΒΡΥΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CEA): Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ένα ειδικό για τον όγκο αντιγόνο που βρέθηκε σε εκχυλίσματα ιστού όγκου. Βρίσκεται επίσης σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού του εμβρύου. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 180 kDa που περιέχει 45-50% υδατάνθρακες. Είναι μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από 641 αμινοξέα, με τη λυσίνη στη Ν-τερματική της θέση. [72] Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) υπερεκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα καρκινωμάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του μαστού. Είναι ένα μόριο προσκόλλησης και η υπερέκφρασή του σε καρκινικά κύτταρα προάγει την προσκόλληση

και τη μετάσταση.[71] Το CEA, που βρίσκεται στην επιφάνεια των κακοήθων καρκινικών κυττάρων, αναγνωρίζεται ως δείκτης όγκου ευρέος φάσματος. [70]

Η συνεχής αύξηση του επιπέδου του CEA στον καρκίνο του μαστού μπορεί να εξηγεί είτε τον καρκίνο που δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία είτε την υποτροπή μετά τη θεραπεία .

Η σταθερά αυξανόμενη συγκέντρωση του CEA μπορεί να είναι το πρώτο σημάδι υποτροπής του καρκίνου μετά τη θεραπεία.Επίσης, οι ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ή μεταστατικό καρκίνο μπορεί να έχουν υψηλότερα επίπεδα CEA από ότι εκείνοι με εντοπισμένο.Το CEA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσει τη διάγνωση, την κλινική σταδιοποίηση, την ανίχνευση υποτροπής σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση και για την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία.

Στον καρκίνο του μαστού, το αυξημένο CEA σχετίζεται με μεταστατική νόσο . Οι προεγχειρητικές μετρήσεις CEA έχουν αποδειχθεί ότι συσχετίζονται με το παθολογικό στάδιο και την έκταση του όγκου. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα CEA σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξαρτώνται άμεσα από το μέγεθος τόσο του πρωτοπαθούς όσο και του μεταστατικού όγκου. Για τον καρκίνο του μαστού, το CEA αντικαθίσταται από άλλους πιο ειδικούς δείκτες, όπως ο CA 15-3. [72]

Η ΒΛΕΝΝΙΝΗ 1 (MUC-1): Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με τη μεμβράνη και εκφράζεται από πολλούς τύπους επιθηλίων. Εκφράζεται υπερβολικά και γλυκοζυλιώνεται ανώμαλα σε κακοήθη κύτταρα. Είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην προστασία των βλεννογόνων, τη μεταγωγή σήματος και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.Οι ακριβείς λειτουργίες των πρωτεϊνών MUC1 δεν είναι πλήρως γνωστές, αλλά φαίνεται να σχετίζονται με τη μείωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων καθώς και την αναστολή της λύσης των καρκινικών κυττάρων. [71]

Το γονίδιο MUC1 υπερεκφράζεται σε κακοήθεις όγκους του μαστού, επιτρέποντας τη χρήση του γονιδιακού προϊόντος CA 15-3 ως δείκτη όγκου για τον καρκίνο του μαστού. Είναι πιο χρήσιμο για τον προσδιορισμό της πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας καθώς αποδείχθηκε ότι ο ορός συγκέντρωση και το ποσοστό των ασθενών με αυξημένες τιμές αυτού του δείκτη τείνουν να αυξάνονται με τη σοβαρότητα (στάδιο) της νόσου ή/και το μέγεθος του όγκου.

Τα CA15-3 και CA27-29 είναι πρωτεϊνικά αντιγόνα της διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης MUC-1.[73] Είναι οι μόνοι εγκεκριμένοι από τον FDA δείκτες ορού για τον καρκίνο του μαστού καθώς χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της νόσου.[70]

ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CA) 15-3: Είναι ένα θραύσμα της γλυκοπρωτεΐνης MUC-1 που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία από καρκινικά κύτταρα. Το όνομα αυτού του δείκτη προέρχεται από έναν συνδυασμό της μοριακής δομής και των δοκιμασιών που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευσή του. Οι αριθμοί 15-3 αναφέρονται στα αντισώματα που χρησιμοποιούνται σε ανοσοπροσδιορισμούς για αυτά τα αντιγόνα.[71] Το CA 15-3 είναι ένας από τους πιο σημαντικούς και αξιόπιστους δείκτες για την παρακολούθηση του μεταστατικού καρκίνου του μαστού, που συνήθως ανιχνεύεται στον ορό, αλλά μπορεί επίσης να ανιχνευθεί στο σάλιο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CA) 27.29: Συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με τον καρκίνο του μαστού, καθώς το 80% των γυναικών με BC έχουν αυξημένα επίπεδα CA 27-29. Ωστόσο, μπορεί επίσης να βρεθεί σε ασθενείς με άλλες κακοήθειες ή με καλοήθειες διαταραχές του μαστού. Επομένως, η αύξηση αυτού του δείκτη δεν είναι ειδική του BC. Το CA 27.29 έχει κλινική απόδοση παρόμοια με αυτή του CA 15.3. Τα στοιχεία έδειξαν ότι το CA 27.29 μπορεί να είναι πιο ευαίσθητος αλλά λιγότερο ειδικός δείκτης από τον CA 15-3, αλλά αυτό δεν έχει αποδειχθεί οριστικά και γενικά θεωρείται ότι είναι ουσιαστικά ισοδύναμα για τους περισσότερους κλινικούς σκοπούς. Η χαμηλή ευαισθησία και η έλλειψη ειδικότητας αποκλείουν τη χρήση του για προσυμπτωματικό έλεγχο. Οι Gion et al.27 βρήκαν ότι το CA27.29 φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητο από το CA15.3 σε περιορισμένες παραλλαγές επέκτασης όγκου. Ωστόσο, δεν μπορεί να βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς να διακρίνουν τους ασθενείς σταδίου I από τους ασθενείς σταδίου II. Οι Rack et al.28 έδειξαν ότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ των επιπέδων CA27.29 και της μάζας του όγκου. [72]

ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CA) 125: Το CA125, ή πρωτεΐνη MUC16, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους που πληροί τις περισσότερες ιδιότητες των καρκινικών δεικτών. Τα επίπεδά του σχετίζονται με το μέγεθος του όγκου και τη σταδιοποίηση της νόσου. Χρησιμοποιείται για διάγνωση κα πρόγνωση κατά κύριο λόγο

στον καρκίνο της ωοθήκης ωστόσο παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του και σε άλλους καρκίνους μεταξύ αυτών και του μαστού. Λόγω του ότι ανιχνεύεται αυξημένο και σε μη καρκινοπαθείς σε ποσοστό 1-5% δεν προτείνεται για διαγνωστικό έλεγχο (screening) σε ασυμπτωματικό πληθυσμό. [74]

Η ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ HER2: Το HER2 εκφράζεται σε πολλούς επιθηλιακούς όγκους και υπερεκφράζεται στο 25% περίπου όλων των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού. Η υπερέκφραση του HER2 σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Το HER2 είναι ένας κατάλληλος στόχος επειδή περιλαμβάνει μια εξωκυτταρική περιοχή (ECD) που μπορεί να στοχευτεί από αντισώματα που παράγονται από Β κύτταρα.

Αυθόρμητες επαναανταποκρίσεις T και B κυττάρων έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με HER2 θετικούς όγκους, επιβεβαιώνοντας την ανοσογονικότητα του HER2. [70]

Το γονίδιο του υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) εκφράζει έναν υποδοχέα γλυκοπρωτεΐνης 185 kDA που έχει εγγενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Το HER2 έχει αποδειχθεί ότι ενισχύεται στο 20% έως 30% των όγκων του μαστού, HER2 έχει καθιερωθεί ως προγνωστικός και διαγνωστικός βιοδείκτης για την ανταπόκριση στις θεραπείες anti-HER2. [73]

ΤΟ ΙΣΤΙΚΟ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ TPA (Tissue Polypeptide Antigen):

Είναι ένα πολυπεπτίδιο μονής αλυσίδας, που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια των τελικών φάσεων S και G2 του κυτταρικού κύκλου και απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια και αμέσως μετά τη μίτωση. Πρωτοπεριγράφηκε από τους Bjorklund και Bjorklund το 1957.

Η χαρτογράφηση του αντιγόνου πολυπεπτιδίου ιστού με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων αποκάλυψε 35 διαφορετικούς επιτόπους, δύο από τους οποίους είναι ειδικοί για αυτό το αντιγόνο. Το μονοκλωνικό αντίσωμα TPS δημιουργήθηκε ενάντια στον είδο M3 του TPA (Beki Diagnostics AB, Fredsforstigen 22, S-161 70 BROMMA, Σουηδία), το οποίο συνδέεται με τη δραστηριότητα πολλαπλασιασμού του όγκου.

Είναι παρόν σε διάφορους τύπους κακοήθων όγκων και αποτελεί συστατικό του ενδοπλασματικού δικτύου και της κυτταρικής μεμβράνης. Από βιοχημική άποψη, το TPA είναι ένα πολυπεπτίδιο μονής αλυσίδας με μοριακό βάρος περίπου 20.000 Da.

Αποτελείται κυρίως από ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ και λευκίνη. [75]

ΤΟ ΕΙΔΙΚΟ ΓΙΑ ΤΟ ΙΣΤΙΚΟ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ TPS (Tissue

Polypeptide Specific Antigen): Είναι ένας ειδικός δείκτης, που προέρχεται από το ΤΡΑ, και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της κυτταρικής δραστηριότητας και του πολλαπλασιασμού του όγκου. Το TPS στην ουσία, αποτελεί αντιγονική περιοχή του ΤΡΑ. [74] Σχετίζεται με την κυτοκερατίνη, μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέρος του κυτταροσκελετού και αντικατοπτρίζει την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων. Το TPS μετρά την παρουσία συγκεκριμένων τμημάτων της κυτοκερατίνης 18 στον ορό του αίματος. Αυτό γίνεται μέσω ενός μονοκλωνικού αντισώματος που ονομάζεται Μ3, το οποίο αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη δομή (επίτοπο) που σχετίζεται με τη δραστηριότητα του πολλαπλασιασμού των όγκων. Υψηλά επίπεδα TPS στο αίμα συνδέονται με έντονη κυτταρική διαίρεση και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής του όγκου. [76]

Το TPS ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα, Μ3 (Bonfrer et al. 1994, Rydlander, αϊ. D' Alessandro et al. 2001), το οποίο σχετίζεται με την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα του όγκου (O'Hanlon et al. 1996). Δεδομένου ότι οι γνωστοί δείκτες όγκου ορού στον καρκίνο του μαστού, συμπεριλαμβανομένων των CA 15-3 και CEA, δεν αντανakλούν την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα, το TPS μπορεί να είναι πιο ωφέλιμο ως προγνωστικός δείκτης. Ένας κύριος περιορισμός του TPS είναι ότι δεν είναι ειδικός δείκτης, γεγονός που εμποδίζει τη διαγνωστική του χρησιμότητα. Επιπλέον, τα επίπεδα του TPS μεταβάλλονται ανάλογα με τις καταστάσεις φλεγμονής, όπως η κίρρωση του ήπατος, η ωορρηξία και η κατάσταση της εμμηνόπαυσης. Απαιτούνται περαιτέρω κλινικές μελέτες για την πλήρη τεκμηρίωση της κλινικής χρησιμότητας του TPS, τόσο μόνο του όσο και σε συνδυασμό με άλλους καθιερωμένους προγνωστικούς δείκτες. [77]

Έχει βρεθεί ότι παρακολούθηση του TPS μπορεί να προσφέρει πρόσθετη αξία όταν συνδυάζεται με τον δείκτη CA 15-3 κατά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του μαστού, συμβάλλοντας στη βελτίωση της ευαισθησίας και της πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία. [78]

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΦΟΡΕΑΣ ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗΣ (Riboflavin Carrier Protein, RCP):

Είναι μια εξειδικευμένη πρωτεΐνη που μεταφέρει τη ριβοφλαβίνη (βιταμίνη Β2) σε διάφορους ιστούς και κυρίως στα κύτταρα που την χρειάζονται για την ανάπτυξη και τη

λειτουργία τους. Η ριβοφλαβίνη (Rf) και τα μεταβολικά της ανάλογα μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (FMN) και δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης (FAD) είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργία. Η ενδοκυτταρική μεταφορά τους ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη φορέα ριβοφλαβίνης (RCP), η οποία έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται από μεταβολικά ενεργά καρκινικά κύτταρα. [79] Τα αποτελέσματα προκαταρκτικής μελέτης, προκειμένου αξιολογηθεί η δυναμική του RCP σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού έδειξαν αυξημένα επίπεδα RCP ορού.

Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των αυξανόμενων επιπέδων RCP και της εξέλιξης της νόσου, καθώς σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις RCP ($p < 0,005$) συναντώνται σε ασθενείς με προχωρημένο μεταστατικό καρκίνο του μαστού έναντι αυτών με πρώιμη νόσο. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η μέτρηση του κυκλοφορικού RCP θα μπορούσαν να αξιοποιηθεί ως πρόσθετος δείκτης στη διάγνωση/πρόγνωση του καρκίνου του μαστού. [81]

2.2.5.2 ΧΡΗΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ – ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ

Οι τιμές των κυκλοφορούντων καρκινικών αντιγόνων επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες που μπορεί να μη σχετίζονται με όγκους. Έτσι, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα αυξημένα επίπεδά τους, μπορεί να αντιπροσωπεύουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα οδηγώντας σε άγχος του ασθενούς και άσκοπη κατανάλωση ιατρικών πόρων. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό για τους ιατρούς που διαχειρίζονται ασθενείς με καρκίνο του μαστού να χρησιμοποιούν βιοδείκτες ορού στο σωστό κλινικό πλαίσιο. [70]

Για παράδειγμα, το CEA μπορεί να αναπτυχθεί σε διάφορες μη κακοήθεις καταστάσεις, όπως καλοήθεις ηπατικές και γαστρεντερικές παθήσεις, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και αναπνευστικές παθήσεις. Επειδή μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, οι ηπατικές και οι χοληφόρες δυσλειτουργίες μπορεί να σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα, προκαλώντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν επίσης συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων CEA και του μεταβολικού συνδρόμου. Τα επίπεδα CEA είναι συνήθως αυξημένα στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές.

Το CA15-3 επίσης, μπορεί να αυξηθεί σε μη κακοήθεις ηπατικές παθήσεις, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, κολίτιδα και δερματολογικές παθήσεις. Μερικές άλλες καλοήθεις

καταστάσεις που έχουν αναφερθεί ότι αυξάνουν τα επίπεδα CA15-3 είναι η σαρκοείδωση, η φυματίωση και ο συστηματικός ερυθριματώδης λύκος. Η διάμεση πνευμονοπάθεια μπορεί επίσης να αυξήσει τα επίπεδα CA15-3, παράγοντας που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διαχείριση ασθενών με καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν θεραπεία με φάρμακα που είναι γνωστό ότι προκαλούν αυτήν την πάθηση.[72]

Το CA 15-3 και το CEA είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι δείκτες στον καρκίνο του μαστού, αν και δεν συνιστώνται ως δείκτες προσυμπτωματικού ελέγχου. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι ο σειριακός προσδιορισμός των επιπέδων CA 15-3 και CEA σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού μπορεί να είναι χρήσιμος για την έγκαιρη ανίχνευση προκλινικής υποτροπής ή μεταστατικής νόσου. Τα επίπεδα του CA 15-3 και του CEA μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος και το στάδιο του καρκίνου, η παρουσία μεταστάσεων και οι μεμονωμένοι παράγοντες του ασθενούς. [70] Αυτοί οι δείκτες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο και κανένας από αυτούς δεν έχει χρησιμοποιηθεί μόνος για προσυμπτωματικό έλεγχο λόγω χαμηλής διαγνωστικής ευαισθησίας για πρώιμη νόσο ή έλλειψης ειδικότητας. [72]

Παρόλο που ένα συνδυασμός πολλών τέτοιων βιοδεικτών μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία και την ειδικότητα, μια μελέτη έδειξε ότι κανένας συνδυασμός των επιλεγμένων δέκα δεικτών πρωτεΐνης ορού καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένων των CA15-3, CA125 και CEA, δεν θα μπορούσε να προβλέψει με ακρίβεια τον καρκίνο του μαστού σε πρώιμο στάδιο.

Σε συνδυασμό με τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς, το συνδυαστικό πάνελ βιοδεικτών ορού **Videssa Breast** (Αιματολογικό τεστ που χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό βιοδεικτών πρωτεϊνών και αντισωμάτων, που έχει ως στόχο τη βελτίωση της ακρίβειας της διάγνωσης σε γυναίκες με ύποπτες αλλοιώσεις, ιδίως σε περιπτώσεις όπου οι ακτινολογικές εξετάσεις, όπως η μαστογραφία, δίνουν αμφίβολα αποτελέσματα), θα μπορούσε να επιτύχει συνολική ευαισθησία 93% και αρνητική προγνωστική αξία 98% για γυναίκες ηλικίας 25-75 ετών και αρνητική προγνωστική αξία 99,1%. 87,5% ευαισθησία και 83,8% ειδικότητα για γυναίκες κάτω των 50 ετών. Ωστόσο, σε μια μελέτη, η αρνητική προγνωστική αξία της υγρής βιοψίας μαστού Videssa δεν ήταν αρκετά υψηλή ώστε να

καθυστερήσει τη βιοψία ιστού και η ειδικότητά της ήταν επίσης πολύ χαμηλή για να βοηθήσει στην πρόβλεψη των αποτελεσμάτων σε συμπαγείς βλάβες υψηλού κινδύνου . Έτσι, παρόλο που οι δοκιμές μαστού Videssa, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα απεικόνισης μαστού, θα μπορούσαν να βελτιώσουν την ακρίβεια και να μειώσουν το ψευδώς θετικό ποσοστό ανίχνευσης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών σε σύγκριση με τη μαστογραφία, οι περαιτέρω βελτιώσεις στην ευαισθησία ανίχνευσης με τη χρήση νέων τεχνολογιών εξακολουθούν να είναι απαραίτητες. [82] Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι βιοδείκτες ορού CA15-3, CA27-29 και CEA έχουν χαμηλή ευαισθησία στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, η ευαισθησία τους αυξάνεται και γίνονται χρήσιμα ως σειριακές μετρήσεις για τη διαχείριση του μεταστατικού καρκίνου του μαστού και την παρακολούθηση των θεραπευτικών αποκρίσεων σε περιβάλλον προοδευτικής νόσου.

Οι Οδηγίες Κλινικής Πρακτικής της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας (ESMO) δεν συνιστούν δείκτες όγκου όπως CA15-3 ή CEA για παρακολούθηση σε πρώιμο καρκίνο του μαστού. Στην περίπτωση δε, του προχωρημένου καρκίνου του μαστού, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναπτύχθηκαν από την Ευρωπαϊκή Σχολή Ογκολογίας σε συνεργασία με την ESMO, η χρησιμότητά τους στη διάγνωση και την παρακολούθηση της επικουρικής θεραπείας είναι ασαφής. Παρόλα αυτά, μπορούν να βοηθήσουν στην αξιολόγηση των ανταποκρίσεων στη θεραπεία, ειδικά σε μη μετρήσιμη μεταστατική νόσο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι αποφάσεις θεραπείας δεν πρέπει να βασίζονται αποκλειστικά σε μια αλλαγή στους δείκτες όγκου.[70]

Η Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (ASCO) δεν συνιστά τα CA15-3 και CA27.29 για προσυμπτωματικό έλεγχο, διάγνωση, σταδιοποίηση και παρακολούθηση για υποτροπή στον καρκίνο του μαστού. Η σημασία τέτοιων καρκινικών δεικτών στον πρώιμο καρκίνο του μαστού παραμένει αβέβαιη, αν και μπορεί να έχουν προγνωστική αξία. Το CA15-3 ή το CA27.29 από μόνα τους δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της θεραπείας, αν και τα αυξανόμενα επίπεδα μπορεί να υποδηλώνουν ανεπιτυχή θεραπεία σε καταστάσεις όπου η εξέλιξη της νόσου δεν είναι μετρήσιμη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βοηθήσουν στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού, αλλά δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο τους για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

Οι Slawicki et al. ανέφεραν ότι το CEA από μόνο του δεν είναι ειδικό για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, ενώ οι Geng et al. πρότειναν ότι πρέπει να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του CEA, CA 15-3 και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων για σωστή διάγνωση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Οι Lumachi et al. πρότεινε ότι το CEA και το CA 15-3 θα πρέπει να θεωρούνται συμπληρωματικά για την ανίχνευση υποτροπής του καρκίνου του μαστού, αλλά η ευαισθησία τους είναι χαμηλή και ανεξάρτητη από την πλειονότητα των προγνωστικών παραμέτρων που μπορεί να ληφθούν υπόψη πριν από την υποτροπή.

Οι Darlix et al.²² ανέφεραν ότι το επίπεδο CA 15-3 ορού είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.[72]

2.2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Το μικροπεριβάλλον των όγκων (TME-Tumor Microenvironment) στον καρκίνο του μαστού, χαρακτηρίζεται από μεταβολικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της προσθήκης γλουταμίνης, του φαινομένου Warburg και αυξημένων επιπέδων ζύμωσης γαλακτικού οξέος που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ανοσοκαταστολής και της αγγειογενετικής δραστηριότητας. Ένα υποσύνολο αυτών των κυτταρικών μεταβολιτών μπορεί να απελευθερωθεί στη συστηματική κυκλοφορία εντός των EVs έτσι ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν σε δείγματα υγρής βιοψίας. Κατά συνέπεια, αρκετές αναφορές έχουν διερευνήσει την πιθανή εφαρμογή αυτών των μεταβολιτών ως βιοδεικτών για την πρώιμη διάγνωση ασθενών με καρκίνο, τον χαρακτηρισμό και την προγνωστική αξιολόγηση της θεραπείας. [69] Τα προφίλ των μεταβολιτών στο στο αίμα είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης για τη διαφοροποίηση των ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού από τους υγιείς μάρτυρες.

Οι μελέτες που ακολουθούν, υποδεικνύουν ότι τα προφίλ μεταβολιτών θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα προσέγγιση για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού πρώιμου σταδίου:

- Τα επίπεδα έκφρασης τριών μεταβολιτών (8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνη, 1-μεθυλγουανωσίνη και 1-μεθυλ αδενοσίνη), μαζί με το CA15-3, θα μπορούσαν να επιτύχουν ευαισθησία 88,8% και ειδικότητα 86,8% στην ανίχνευση πρώιμου σταδίου καρκίνου του μαστού με βάση τη βαθμολογία μεταβολισμού ορού.
- Μια μελέτη εντόπισε 18 ελεύθερα λιπαρά οξέα ορού από δείγματα ορού 16 ασθενών με καρκίνο του μαστού και 18 ασθενών με αδένωση του μαστού.
- Πέντε υποψήφιοι (παλμιτικό οξύ, ελαϊκό οξύ, cis-8,11,14-εικοσατριενοϊκό οξύ, εικοσιδυανοϊκό οξύ και η αναλογία ελαϊκού οξέος προς στεατικό οξύ) αποδείχθηκαν πιθανοί βιοδείκτες ορού για τη διαφορική διάγνωση του καρκίνου του μαστού .
- Μια ομάδα πέντε ελεύθερων λιπαρών οξέων ορού (C16:1, C18:3, C18:2, C20:4 και C22), αποδείχθηκε ότι έχει την ικανότητα να διαφοροποιεί ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε πρώιμο στάδιο (n = 140) από υγιείς μάρτυρες (n = 202), με AUC 0,953, ευαισθησία 83,3% και ειδικότητα 87,1%.
- Σε μια προοπτική μελέτη περίπτωσης-ελέγχου, η υπογραφή επτά μεταβολιτών (διμεθυλδωδεκάνιο, γαλακτόζη, α-γλυκερυλ στεατικό, μεθυλ στεατικό, 1(1-μεθοξυκαρβονυαιθυλ)-4-(2-μεθυλ-2-τριμεθυλσιλυλ-οξυπροπυλ) βενζόλιο, τετραδεκάνιο, και γλυκοπυρανοσίδη) στον ορό αποκάλυψαν έναν διακριτό διαχωρισμό μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών με καρκίνο του μαστού σε ευαισθησία 96% και ειδικότητα 100%.
- Τέσσερις μεταβολίτες του πλάσματος (L-οκτανοϋλκαρνιτίνη, 5-οξοπρολίνη, υποξανθίνη και εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ) ταυτοποιήθηκαν επίσης ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, με την L-οκτανοϋλκαρνιτίνη να δείχνει 100,0 % θετική προγνωστική αξία.
- Είναι ενδιαφέρον ότι μια μελέτη εντόπισε μεταβολίτες, οι οποίοι περιελάμβαναν τέσσερις γνωστούς (καπροϊκό οξύ, ταυρίνη, στεαραμίδιο και λινολεϊκό οξύ) και πέντε άγνωστους (C₂₆H₄₃CIN₄S₃, C₂₆H₅₁N₅O₄, C₉H₁₆O₃S, C₂₃H₃₀N₂S, και 221), που μπορούσαν να διακρίνουν τον καρκίνο του μαστού σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες, ανεξάρτητα από τον τύπο του καρκίνου του μαστού, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα έως και 100% καθώς και με υψηλή ακρίβεια . Ωστόσο, αυτά πρέπει να επικυρωθούν. [82]
- Μια προοπτική μελέτη μεταβολομικής ορού προσδιόρισε περαιτέρω ότι οι ασθενείς με BC εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα διμεθυλδωδεκανίου, γαλακτόζης και α-γλυκερυλ στεατικού σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα γλυκοπυρανοσίδης, τετραδεκανίου, μαννόζης και βενζολίου 1,2 δικαρβοξυλικού οξέος ήταν μεταξύ των

ικανών να διαφοροποιηθούν ασθενών BC βάσει σταδιοποίησης, βαθμολόγησης και νεοεπικουρική κατάσταση .

- Τα επίπεδα τεσσάρων διαφορετικών μεταβολιτών σε δείγματα πλάσματος ασθενών με BC (Λοκτανοϋλκαρνιτίνη, 5-οξοπρολίνη, υποξανθίνη και εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ) προτάθηκαν να σχετίζονται με παθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου . Οι συγγραφείς έχουν επίσης αναφέρει τη χρησιμότητα των επιπέδων θρεονίνης, ισολευκίνης, γλουταμίνης και λινολενικού οξέος ορού ως προγνωστικοί βιοδείκτες των αποκρίσεων στη νεοεπικουρική θεραπεία, ασθενών με BC .

- Οι Jobard et al. ανέλυσαν δείγματα αίματος EBC και προχωρημένων BC ασθενών και προσδιόρισαν ότι τα επίπεδα ισταμίνης, αλανίνης και βεταΐνης στην κυκλοφορία ήταν αυξημένα στο EBC, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να προσφέρουν προγνωστική αξία για τη σταδιοποίηση του ασθενούς.

Ενώ οι πρόοδοι στις στοχευμένες και μη στοχευμένες μεταβολομικές αναλύσεις, παρέχει την ευκαιρία να βοηθήσουμε στη διάγνωση και αξιολόγηση ασθενών με BC, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στις μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα, οι ειδικοί για τον ασθενή παράγοντες, όπως η υπεργλυκαιμία, το ποτό, το κάπνισμα και η παχυσαρκία μπορούν όλοι να περιπλέξουν τις προσπάθειες για αποσαφήνιση της συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων του μεταβολίτη και της κατάστασης BC .[69]

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Παρά την πρόσφατη πρόοδο στη διάγνωση και τη θεραπεία, ο καρκίνος του μαστού εξακολουθεί να είναι η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες παγκοσμίως. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών με κλινικές δυνατότητες για την ανίχνευσή του στο αρχικό του στάδιο και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά απαραίτητη.

Η υγρή βιοψία έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή ως μη επεμβατική μεθοδολογία, η οποία χρησιμεύει για τη λήψη βασικών πληροφοριών όγκου μέσω της ανίχνευσης κυκλοφορούντων βιοδεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου και την παρακολούθηση της θεραπείας. Όλοι οι βιοδείκτες που ανιχνεύονται στην υγρή βιοψία, συμπεριλαμβανομένων των CTCs, cfDNA, ctDNA, miRNAs, lncRNAs και EVs, έχουν πολλά υποσχόμενη αξία στη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη της θεραπείας. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της υγρής βιοψίας έναντι της βιοψίας ιστού είναι η διαχρονική παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε «πραγματικό χρόνο». Η έγκαιρη ανίχνευση κυκλοφορούντων βιοδεικτών (CBs-

Circulating Biomarkers) σε προσβάσιμα σωματικά υγρά, όπως το αίμα ή τα ούρα, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την επιβίωση για άτομα που έχουν επιβαρυνθεί με καρκίνο.

Τα τέσσερα πιο κοινά CBs με σημαντική διαγνωστική και προγνωστική αξία, είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα κυκλοφορούντα ειδικά νουκλεϊκά οξέα (ctDNA, ctRNA, miRNAs, lnRNAs), τα εξωκυτταρικά κυστίδια, και τα αυτοαντισώματα. Αυτοί οι βιοδείκτες απελευθερώνονται από τις θέσεις του όγκου σε περιφερειακά υγρά, επομένως μπορούν να ανιχνευθούν και να αναλυθούν. Η παρουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία έχει σαν αποτέλεσμα μια συνεχή εκκένωση νουκλεϊκών οξέων που προέρχονται από όγκους και εξωσωμάτων. Με τη ανίχνευση αυτών των CBs σε κλινικά δείγματα, μπορεί να πραγματοποιηθεί ουσιαστικά «υγρή βιοψία». Λόγω της πρόσφατης προόδου στην ανάπτυξη τεχνολογιών γονιδιακής ενίσχυσης και προσδιορισμού με μεθόδους αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), οι υγρές βιοψίες μπορούν να έχουν πρόσβαση σε περισσότερους βιοδείκτες σχετικούς με τον καρκίνο. Έτσι, το μοριακό προφίλ των υγρών βιοψιών είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για την ανίχνευση βιοδεικτών καρκίνου. [83]

3.1.1 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα της υγρής βιοψίας έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη προηγμένων μεθόδων και πλατφορμών που συνδυάζουν διαφορετικές επιστημονικές προσεγγίσεις για τη βελτίωση της ευαισθησίας, της ειδικότητας και της ακρίβειας.

Οι νέες πλατφόρμες βασίζονται σε συνδυασμούς τεχνολογιών όπως η μικρορευστομηχανική, που επιτρέπει τον διαχωρισμό και την απομόνωση κυττάρων ή μορίων από δείγματα αίματος με ακρίβεια, οι ανοσολογικοί προσδιορισμοί, που ενισχύουν την ανίχνευση βιοδεικτών μέσω της χρήσης εξειδικευμένων αντισωμάτων, και οι τεχνικές αλληλούχισης (sequencing), που παρέχουν λεπτομερή γενετική και επιγονιδωματική πληροφόρηση. Επιπλέον, οι μέθοδοι φυσικού ή χημικού διαχωρισμού, όπως η φυγοκέντρωση ή η χρήση νανοσωματιδίων, ενσωματώνονται στις πλατφόρμες για την απομόνωση συγκεκριμένων βιοδεικτών από περίπλοκα βιολογικά δείγματα.

Σημαντικό χαρακτηριστικό των σύγχρονων πλατφορμών είναι η δυνατότητά τους να συνδυάζουν πολλές τεχνολογίες και μεθόδους σε ένα ενιαίο σύστημα. Για παράδειγμα, πλατφόρμες όπως το CellSearch, το CytoSorter και το EpiSpot συνδυάζουν φυσικούς διαχωρισμούς και ανοσολογικές τεχνικές για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό CTCs, ενώ συστήματα που βασίζονται στην αλληλούχιση RNA (όπως το RNA-Seq) συνδυάζουν μικρορευστομηχανική και γενετική ανάλυση για τη μελέτη του ctRNA. Αυτή η διεπιστημονική προσέγγιση έχει αυξήσει τη διαγνωστική ισχύ και την κλινική χρησιμότητα της υγρής βιοψίας. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα και η αλληλεπικάλυψη πολλών τεχνολογιών καθιστούν τη σαφή ταξινόμηση των μεθόδων μια δύσκολη διαδικασία. Αυτή η πολυδιάστατη φύση των νέων εργαλείων καθιστά αναγκαία μια ολιστική προσέγγιση για την κατανόηση και την αξιολόγηση των τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση κυκλοφορούντων βιοδεικτών στον καρκίνο του μαστού.

Παρακάτω θα εξετάσουμε τις βασικότερες τεχνολογίες και πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των βιοδεικτών αυτών, καθώς και τις αρχές λειτουργίας τους. Ο στόχος είναι να κατανοήσουμε πώς αυτές οι μέθοδοι συμβάλλουν στην έγκαιρη διάγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία του πρώιμου καρκίνου του μαστού.

3.1.1.1 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ

Η ανοσομαγνητική τεχνολογία βασίζεται στη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στα οποία είναι δεσμευμένα ειδικά αντισώματα ή πεπτίδια, τα οποία δεσμεύονται με τη σειρά τους σε στόχους κυττάρων ή μορίων που υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα όπως η EpCAM (Επιθηλιακό Κυτταρικό Μόριο Πρόσδεσης). Τα μαγνητικά σφαιρίδια προστίθενται στο δείγμα (π.χ., αίμα), και δεσμεύουν τα κύτταρα-στόχους μέσω των αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος.[84]

Σύστημα CellSearch®: Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες για την απομόνωση και την ανίχνευση CTCs. Το σύστημα της CellSearch® είναι το μόνο εγκεκριμένο από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την απαρίθμηση

των CTCs στο πλήρες αίμα. Μέχρι σήμερα, το σύστημα CellSearch θεωρείται ως το χρυσό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση των CTCs. Το σύστημα παρουσιάζει μια εξαιρετικά τυποποιημένη και αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για την ανίχνευση κυττάρων όγκου σε πλήρες αίμα.[85]

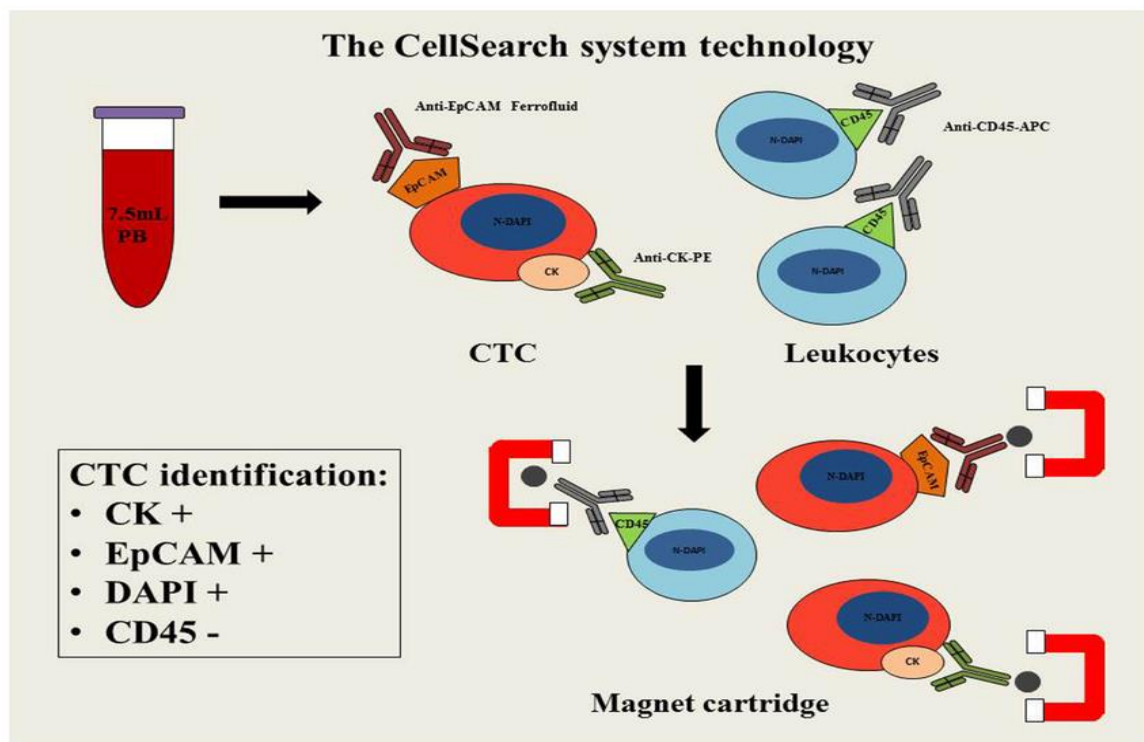
Σήμερα, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την απομόνωση CTCs, βασίζεται στη σύλληψη κυττάρων που εκφράζουν το επιφανειακό μόριο επιθηλιακών κυττάρων προσκόλλησης (EpCAM). Η EpCAM θεωρείται μια κοινή πρωτεΐνη-δείκτης καρκίνων που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα και εμπλέκεται σε αρκετούς καρκινικούς κυτταρικούς μηχανισμούς. Η τεχνολογία CellSearch® εφαρμόστηκε στον καρκίνο του μαστού ήδη το 2004 σε μια μελέτη που έδειξε ότι ο αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν πριν από τη θεραπεία θα μπορούσε να προβλέψει την επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Εν συντομία, αυτή η μέθοδος βασίζεται στην εξαγωγή 7,5 mL αίματος σε ειδικούς σωλήνες που φυγοκεντρούνται για να διαχωριστούν τα στερεά συστατικά του αίματος από το πλάσμα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια σιδηρορευστού επικαλυμμένα με αντισώματα στόχευσης EpCAM, τα CTCs διαχωρίζονται μαγνητικά από το μεγαλύτερο μέρος των άλλων κυττάρων που υπάρχουν στο αίμα. Στη συνέχεια, τα CTCs χρωματίζονται με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των κυτοκερατινών (CK18 και CK19) που είναι ειδικές για τα επιθηλιακά κύτταρα. Η μη ειδική χρώση των αιμοποιητικών κυττάρων εξετάζεται με αντιχρώση με αντισώματα δείκτη λευκοκυττάρων (CD45). Το φυσίγγιο που περιέχει χρωματισμένα CTCs σαρώνεται για να ποσοτικοποιήσει τα κύτταρα όγκου. **(εικόνα 11)**

Τα τελευταία δέκα χρόνια, έχει αυξηθεί ο αριθμός των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούν EpCAM για την ανίχνευση CTC στο αίμα ασθενών με καρκίνωμα, όπως Magsweeper, MACS, Strep-Tactin, CTC-Chip και GO Chip.

Οι πρόσφατες κλινικές μελέτες έχουν δείξει την προγνωστική αξία της ανίχνευσης και απαρίθμησης CTCs σε πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο του μαστού χρησιμοποιώντας το σύστημα CellSearch®. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η ανίχνευση των CTCs κατά τη στιγμή της διάγνωσης και σε διαφορετικά χρονικά σημεία παρακολούθησης κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας μπορεί να έχει προγνωστική αξία για

πρώιμους ασθενείς με καρκίνο του μαστού. αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι η
απαρίθμηση CTC μπορεί να βελτιώσει την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού.[86]
Με βάση τα δεδομένα CellSearch® στο BC, η 8η έκδοση του Εγχειριδίου Σταδιοποίησης
Καρκίνου της Αμερικανικής Μικτής Επιτροπής για τον Καρκίνο (AJCC) για το BC έχει
αναγνωρίσει τα CTCs ως προγνωστικό παράγοντα (Amin et al., 2017). Οι ασθενείς
πρώιμης BC με ≥ 1 CTC ανά 7,5 mL αίματος ή οι μεταστατικοί ασθενείς με BC με ≥ 5
CTC ανά 7,5 mL αίματος θεωρούνται ως ασθενείς με υψηλότερο κίνδυνο για κακή
πρόγνωση (Amin et al., 2017).[87]



Εικόνα 11: Η τεχνολογία του συστήματος CellSearch, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs). Τα CTCs διαχωρίζονται μέσω αντισωμάτων EpCAM που είναι συνδεδεμένα με μαγνητικά σωματίδια (ferrofluid). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επισημαίνονται με αντισώματα κυτταροκερατίνης (CK) και DAPI για την ταυτοποίησή τους, ενώ τα λευκά αιμοσφαίρια (Leukocytes) επισημαίνονται με αντισώματα CD45. Ο μαγνητικός διαχωρισμός πραγματοποιείται σε ειδικές κασέτες (magnet cartridge) που απομονώνουν τα CTCs βάσει της θετικής τους έκφρασης σε CK, EpCAM και DAPI, και αρνητικής σε CD45.

(Προσαρμοσμένο από: "Clinical applications of circulating tumor cells in lung cancer patients by CellSearch system" (Truini et al., 2014). *Frontiers in Oncology*, 4, 242.

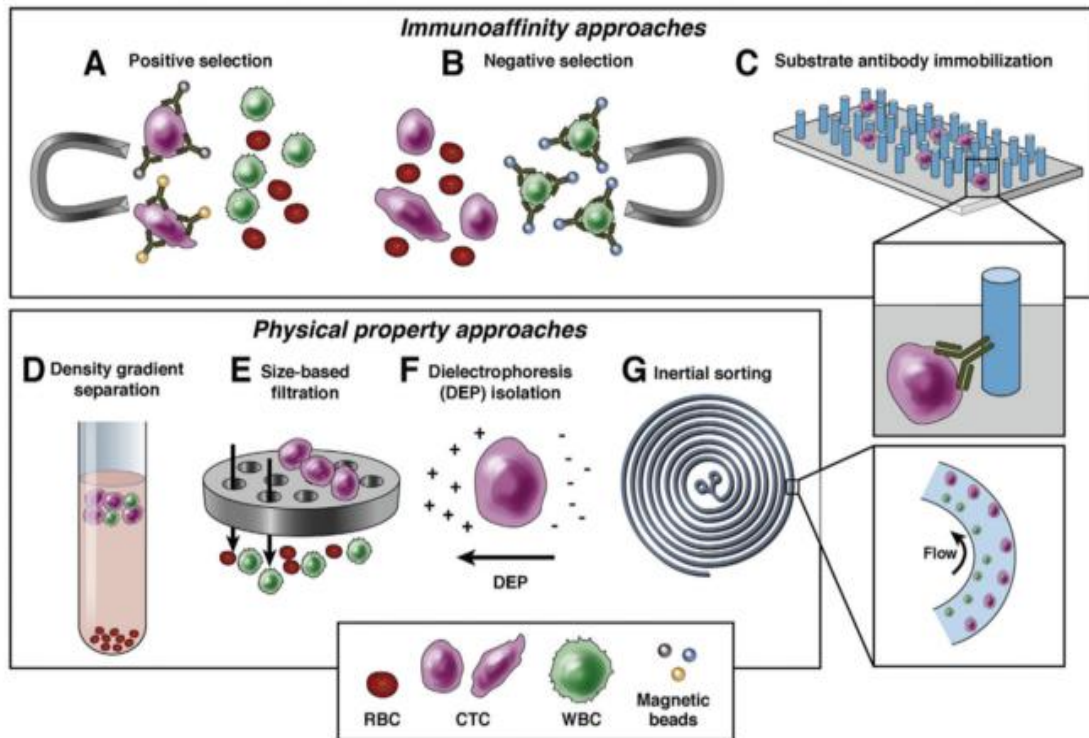
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00242>)

3.1.1.2 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΒΑΣΕΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ

Αυτές οι στρατηγικές απομόνωσης βασίζονται στις βιοφυσικές ιδιότητες των κυττάρων (π.χ., μέγεθος, πυκνότητα, ακαμψία, ηλεκτρικό φορτίο, και ελαστικότητα) και όχι σε ειδικούς δείκτες (όπως πρωτεΐνες). Είναι ιδιαίτερα σημαντικές διότι δεν απαιτούν τη χρήση αντισωμάτων ή άλλων μορίων για τη σήμανση και απομόνωση των κυττάρων. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν Μικρορευστομηχανική Απομόνωση (Microfluidics-Based Size Exclusion), η οποία χρησιμοποιεί μικρορευστομηχανικά τσιπ με διατάξεις καναλιών για τη διαχωριστική απομόνωση κυττάρων ή σωματιδίων βάσει του μεγέθους ή της φυσικής τους ακαμψίας, ή Νανομεμβράνες (Nanomembrane-Based Isolation), με τη χρήση των οποίων μπορεί να γίνει απομόνωση εξωσωμάτων ή μικροκυστιδίων. **(εικόνα 12)**

Οι φυσικές παράμετροι έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απομόνωση CTCs μέσω εκμεταλλεύονται τις διαφορετικές γεωμετρικές και μηχανικές ιδιότητες μεταξύ των CTCs και των κυττάρων του αίματος. Επομένως, είναι επιτακτική ανάγκη να έχουμε μια σαφή κατανόηση των φυσικών διαφορών πριν από την καθιέρωση τεχνολογιών απομόνωσης CTCs με βάση το μέγεθος.

Η συσκευή **ScreenCell Cyto** μιας χρήσης έχει την ικανότητα να απομονώνει σπάνια, σταθεροποιημένα κύτταρα όγκου με υψηλό ποσοστό ανάκτησης και επιτρέπει επίσης την απομόνωση ζωντανών κυττάρων. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση εξωσωμάτων. Αυτή η μέθοδος διαχωρίζει τα μακρομόρια με βάση το μέγεθός τους.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση στρατηγικών εμπλουτισμού για CTCs με βάση τις βιολογικές και φυσικές τους ιδιότητες. Ανοσοσυγγένεια: (Α) Θετική επιλογή επιτρέπει τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό με βάση τις εκφρασμένες πρωτεΐνες σε CTC. (Β) Η αρνητική επιλογή αφαιρεί τα ανεπιθύμητα κύτταρα χρησιμοποιώντας αντισώματα όπως CD45 (C) Ακίνητοποίηση CTCs. (D) Προσεγγίσεις κλίσης πυκνότητας που επιτρέπουν τον διαχωρισμό CTCs με βάση τις πυκνότητές τους. (Ε) Διήθηση με βάση το μέγεθος των κυττάρων (F) Η διηλεκτροφόρηση (DEP) χρησιμοποιεί το διηλεκτρικό φορτίο κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης των CTCs σε ένα αγωγικό μέσο. (G) Μικρορευστο-υδροδυναμική που χρησιμοποιεί αδράνεια κυψέλης για την ταξινόμηση των CTCs σε διακριτά μικρορευστικά κανάλια. (Προσαρμοσμένο από: "Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy" (Marrugo-Ramírez, Mir, & Samitier, 2018). International Journal of Molecular Sciences, 19(10), 2877.

<https://doi.org/10.3390/ijms19102877>

3.1.1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

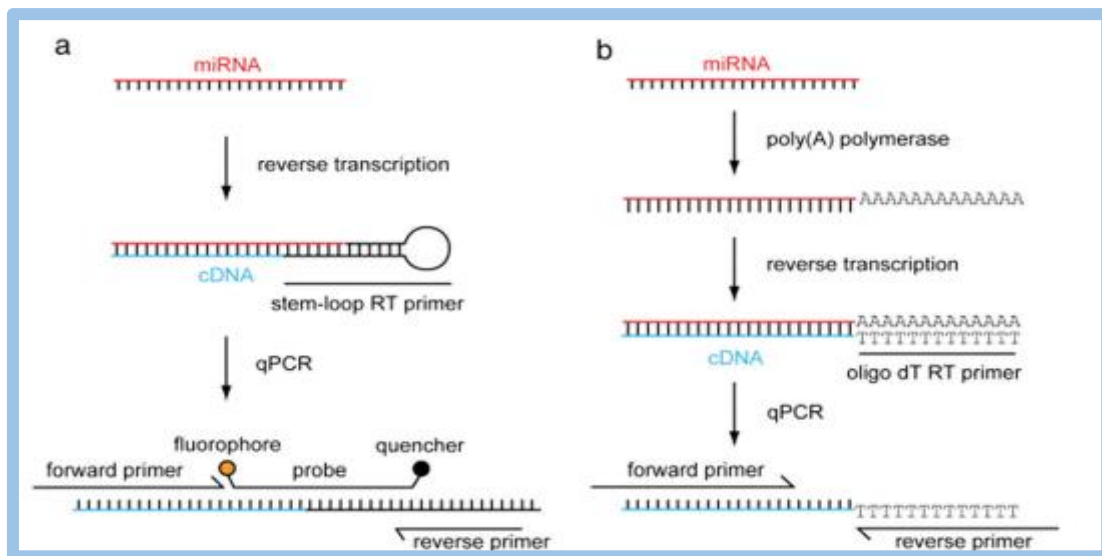
Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) στην υγρή βιοψία, είναι κρίσιμες για την ανίχνευση και ανάλυση κυκλοφορούντων βιοδεικτών (όπως ctDNA, miRNAs, lncRNAs κ.ά). Χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων, επιγενετικών τροποποιήσεων, και γονιδιακής έκφρασης.

Η RT-PCR (Reverse Transcription PCR): Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Είναι μια γρήγορη και φθηνή μέθοδος για την ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων. Ωστόσο, η ευαισθησία του είναι πολύ χαμηλή για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο υπόβαθρο DNA άγριου τύπου, με συχνότητα αλληλόμορφων 10–20%.

RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction):

Βασίζεται και αυτή στην αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA ακολουθούμενη από μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενώ η συσσώρευση του προϊόντος της αντίδρασης παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο.

Στην περίπτωση της ανάλυσης miRNA, η RT-qPCR προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως ευαισθησία, ευρύ δυναμικό εύρος, λιγότερη εισαγωγή δείγματος και καλύτερη ακρίβεια.[85] (εικόνα 13)



Εικόνα 13: Μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης miRNA με RT-qPCR. a) Αντίστροφη μεταγραφή με εκκινητή βρόχου: Κάθε miRNA μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA χρησιμοποιώντας έναν ειδικό εκκινητή βρόχου. Στη συνέχεια, το cDNA ενισχύεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και ενός υδρολόμενου ανιχνευτή. Η Taq πολυμεράση υδρολύει τον ανιχνευτή, διαχωρίζοντας το φθορίζον φθοροφόρο από τον ανιχνευτή απόσβεσης φθορισμού (quencher), επιτρέποντας την ανίχνευση του σήματος. **b) Πολυαδενυλίωση και αντίστροφη μεταγραφή:** Τα miRNAs πολυαδενυλιώνονται (προσθήκη πολυ-A ουράς) με τη χρήση πολύ-A πολυμεράσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδιο dT. Το cDNA ενισχύεται μέσω ειδικών εκκινητών και παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής.

(Προσαρμοσμένο από: "Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection"
(Shiddiky, M. J. A. [Ed.], n.d.).

Η ψηφιακή PCR (dPCR-digital PCR): Είναι μια προηγμένη παραλλαγή της PCR που χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) με εξαιρετική ακρίβεια. Το δείγμα διαχωρίζεται σε χιλιάδες ή εκατομμύρια μικροσκοπικά τμήματα. Η κλασματοποίηση του δείγματος γίνεται αξιοποιώντας είτε **α)** την τεχνολογία μικρορευστονικής (microfluidics) είτε **β)** την τεχνολογία των μικροσταγονιδίων-γαλακτωμάτων. Κάθε τμήμα περιέχει είτε ένα μόριο στόχου είτε κανένα. Κάθε τμήμα υποβάλλεται σε ανεξάρτητη ενίσχυση PCR. Μετά την ολοκλήρωση της PCR, ανιχνεύονται τα τμήματα που περιέχουν προϊόν PCR (θετικά τμήματα) και καταμετρούνται [74]

Λόγω του ότι η αξιόπιστη ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων (όπως η μεθυλίωση) στον καρκίνο του μαστού, παραμένει προκλητική λόγω των χαμηλών επιπέδων διαθεσιμότητας ctDNA και της απουσίας τεχνολογιών μεθυλίωσης DNA (Site-specific DNA methylation), οι ερευνητές για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, αξιοποίησαν ψηφιακές τεχνολογίες PCR για να αξιολογήσουν την κατάσταση ctDNA ασθενών με διάφορους καρκίνους, επιτυγχάνοντας επιτυχή ανίχνευση ctDNA στο 48% και >75% των EBC και προχωρημένου BC αντίστοιχα. Στη δοκιμή c-TRAK TN (NCT03145961), η ψηφιακή PCR χρησιμοποιήθηκε για την προοπτική παρακολούθηση του ctDNA σε πρώιμους ασθενείς με TNBC (Triple-Negative Breast Cancer) ή ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο μετά από νεοεπικουρική θεραπεία (NAC- Neoadjuvant Chemotherapy) ως μέσο καθοδήγησης των θεραπευτικών προσπαθειών, αποδεικνύοντας έτσι την κλινική αξία αυτής της μεθόδου ανίχνευσης. [69]

Οι συνήθεις χρησιμοποιούμενες πλατφόρμες dPCR, περιλαμβάνουν συστήματα σταγονιδίων όπως η ψηφιακή PCR σταγονιδίων (**ddPCR- Droplet Digital PCR**) και πλατφόρμες που βασίζονται στη μικρορευστομηχανική για παράλληλη PCR.

Οι εξελίξεις στην ψηφιακή PCR, όπως η ψηφιακή σταγονοειδής PCR (ddPCR) και η **τεχνολογία BEAMing** (που ενσωματώνει πολλαπλές τεχνικές για τη βελτίωση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της ανίχνευσης μεταλλάξεων), επιτρέπουν την απόλυτη ποσοτικοποίηση των συχνοτήτων αλληλόμορφων έως και 0,01%. Και οι δύο τεχνολογίες

έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να ανιχνεύσουν μεταλλάξεις PIK3CA στο ctDNA του πλάσματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού .[86]

Ψηφιακή PCR σταγονιδίων - DdPCR (Droplet Digital PCR) :

Αποτελεί μια υπερευαίσθητη και με υψηλή ακρίβεια μοριακή τεχνική, που μπορεί να ανιχνεύσει εξαιρετικά σπάνια γενετικά συμβάντα. Επίσης ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί πολύ μικρές ποσότητες του επιθυμητού στόχου. Το δείγμα PCR (DNA, RNA ή cDNA) αναμιγνύεται με αντιδραστήρια και διαχωρίζεται σε χιλιάδες ή εκατομμύρια μικροσκοπικά σταγονίδια. Κάθε σταγονίδιο λειτουργεί ως ανεξάρτητος μικροαντιδραστήρας. Η PCR διεξάγεται ξεχωριστά σε κάθε σταγονίδιο. Αν ένα σταγονίδιο περιέχει το στόχο, η PCR τον ενισχύει. Αν δεν τον περιέχει, το σταγονίδιο παραμένει αρνητικό. Μετά την PCR, τα σταγονίδια περνούν μέσα από ένα φθορισμόμετρο. Τα θετικά σταγονίδια (που περιέχουν το ενισχυμένο προϊόν) ανιχνεύονται μέσω του σήματος φθορισμού. Η αναλογία θετικών σταγονιδίων προς τον συνολικό αριθμό σταγονιδίων χρησιμοποιείται για την υπολογιστική εκτίμηση της απόλυτης συγκέντρωσης των μορίων στόχου στο αρχικό δείγμα, χωρίς την ανάγκη πρότυπης καμπύλης. Η τεχνολογία μικροσταγονιδίων-γαλακτωμάτων αποτελεί ένα διαφανικό σύστημα νερού-ελαίου (water-oil emulsion), στο οποίο δημιουργούνται σταγονίδια που περιβάλλονται από έλαιο (μικύλλια) τα οποία σχηματίζουν ένα σύνολο μικροαντιδραστήρων για την πραγματοποίηση της dPCR. [74]

Η ευαισθησία DdPCR βασίζεται στην ποσότητα των σταγονιδίων. Το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα ddletlet, DdPCR είναι ικανό να παράγει 20.000 σταγονίδια μεγέθους νανολίτρων. (εικόνα 14) Αυτός ο αριθμός έχει ενισχυθεί με τη χρήση του συστήματος RainDrop dPCR, το οποίο έχει την ικανότητα να παράγει έως και 10 εκατομμύρια σταγονίδια μεγέθους πικολίτρων. Ωστόσο, η μέθοδος ddPCR έχει περιορισμούς, όπως μεγάλους χρόνους επεξεργασίας σταγονιδίων και δυσκολίες στην παραγωγή σταγονιδίων. Η προσέγγιση BEAMing ενσωματώνει πολλαπλές τεχνικές για τη βελτίωση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της ανίχνευσης μεταλλάξεων. [86] (εικόνα 14)

Πλατφόρμα BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics):

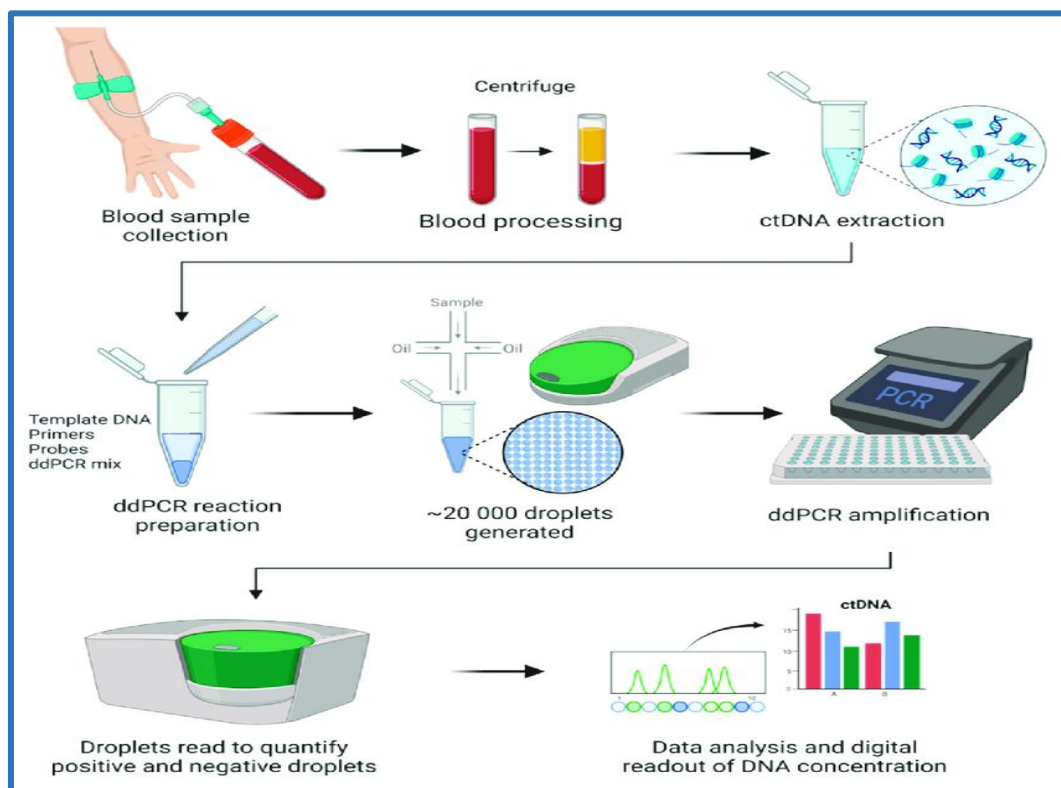
Η πλατφόρμα BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics) είναι μια καινοτόμος τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη ποσοτική ανίχνευση και παρακολούθηση σπάνιων βιολογικών δεικτών, όπως το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs). Χρησιμοποιείται συχνά σε εφαρμογές υγρής βιοψίας, καθώς προσφέρει έναν πολύ ακριβή και ευαίσθητο τρόπο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μεταλλάξεων και άλλων γενετικών μεταβολών σε υγρά δείγματα, όπως το αίμα.

Η συμβατική PCR πραγματοποιεί μία αντίδραση ανά δείγμα και παρέχει ένα σήμα. Το BEAMing περιλαμβάνει τον καταμερισμό της διαδικασίας PCR σε πολλές μεμονωμένες αντιδράσεις για την παροχή υψηλής ανάλυσης ανίχνευσης σπάνιων αλληλουχιών DNA. Κατά την εκτέλεση του BEAMing, κάθε μόριο DNA σε ένα δείγμα ενισχύεται και μετατρέπεται σε ένα μόνο μαγνητικό σωματίδιο στο οποίο δεσμεύονται χιλιάδες αντίγραφα DNA πανομοιότυπων σε σειρά με το αρχικό μόριο DNA. Τα προκύπτοντα μαγνητικά σωματίδια (σφαιρίδια) είναι μια αναπαράσταση ενός προς ένα, των μορίων DNA έναρξης σε ένα δεδομένο δείγμα και διαμερισματοποιούνται σε μικρογαλακτώματα νερό-σε-έλαιο έτσι ώστε κάθε γαλακτώμα να περιέχει μόνο ένα εκμαγείο μορίου DNA. Ένα επόμενο στάδιο ενίσχυσης εκτελείται εντός κάθε γαλακτώματος. Στη συνέχεια εφαρμόζεται κυτταρομετρία ροής για την αξιολόγηση της διακύμανσης εντός του αρχικού πληθυσμού των μορίων DNA.

Το BEAMing έχει σχεδιαστεί για να αξιολογεί εκατοντάδες εκατομμύρια μεμονωμένα μόρια DNA με τυπικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η τεχνολογία αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ανιχνεύει αξιόπιστα το μεταλλαγμένο ctDNA ακόμη και όταν η μετάλλαξη υπάρχει ως σπάνιο συμβάν, σε επίπεδο τόσο χαμηλό όσο 0,01% περιέχει μόνο ένα εκμαγείο μορίου DNA. [88]

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και τον έλεγχο του ctDNA με συγκεκριμένες μεταλλάξεις και για τον εντοπισμό σπάνιων μεταλλάξεων, αλλά αυτή η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μόνο γνωστές μεταλλάξεις. Το BEAMing δεν απαιτεί εξοπλισμό εκτός από έναν μαγνητικό αναδευτήρα, έναν κυκλοφορητή θερμοκρασίας και ένα κυτταρόμετρο ροής, τα οποία είναι διαθέσιμα παντού. Ο Dressman και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το BEAMing για να μετατρέψουν ένα μόνο μόριο DNA σε

φθορίζοντα μαγνητικά σωματίδια για να ανιχνεύσουν και να μετρήσουν γενετικές παραλλαγές.[89] Τόσο το ddPCR όσο και το BEAMing έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να ανιχνεύσουν μεταλλάξεις PIK3CA στο ctDNA του πλάσματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. [86]



Εικόνα 14: Διαδικασία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυκλοφορούντος DNA όγκου (ctDNA) μέσω ddPCR (ψηφιακής σταγονοειδούς PCR). Η διαδικασία περιλαμβάνει: Συλλογή δείγματος αίματος. Επεξεργασία αίματος με φυγοκέντρηση για διαχωρισμό του πλάσματος. Εξαγωγή του ctDNA από το πλάσμα. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης ddPCR με προσθήκη DNA, εκκινητών και ανιχνευτών. Δημιουργία ~20.000 σταγονιδίων μέσω μικρορευστοποίησης. Ανίχνευση του ctDNA με ενίσχυση μέσω PCR. Ανάγνωση σταγονιδίων για τον προσδιορισμό θετικών και αρνητικών σταγονιδίων. Ψηφιακή ανάλυση των δεδομένων και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του ctDNA. (Προσαρμοσμένο από: "Molecular methods in cancer diagnostics: a short review" (Budhbaware, Rathored, & Shende, 2024). *Annals of Medicine*, 56(1), 2353893. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2353893>)

3.1.1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Οι μέθοδοι που βασίζονται στον προσδιορισμό αλληλουχίας (sequencing) στην υγρή βιοψία είναι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (cfDNA), κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) και άλλων βιοδεικτών που ανιχνεύονται στο αίμα. Αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τις γονιδιακές μεταλλάξεις, την επιγονιδιακή τροποποίηση και άλλες γενετικές ανωμαλίες, παρέχοντας μια μη επεμβατική προσέγγιση για τη διάγνωση και την παρακολούθηση του καρκίνου. [85] **(εικόνα 15)**

Next-Generation Sequencing (NGS) – Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς:

Είναι υψηλής απόδοσης τεχνολογία αλληλούχησης που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών περιοχών του γονιδιώματος. Η μέθοδος στηρίζεται σε μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τον κατακερματισμό του DNA σε τυχαία σημεία με αποτέλεσμα την δημιουργία εκατομμυρίων τυχαίου μεγέθους θραυσμάτων. Ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα καθορισμένης αλληλουχίας (adapters) στη συνέχεια, προσδένονται με τα θραύματα DNA με τη βοήθεια της λιγάσης. Ακολουθεί επιλογή του κατάλληλου μεγέθους θραυσμάτων. Τα θραύματα κατάλληλου μεγέθους που φέρουν στα άκρα τους “adapters” αποτελούν την προς αλληλούχηση βιβλιοθήκη (library). Οι βιβλιοθήκες ποσοτικοποιούνται και στη συνέχεια γίνεται αλληλούχηση στην κατάλληλη NGS πλατφόρμα.

Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιείται ταυτόχρονα σε όλα τα θραύσματα, τα οποία είναι δεσμευμένα σε ειδικά σφαιρίδια προκειμένου να ενισχυθούν (Μαζική παράλληλη αλληλούχηση-massively parallel sequencing). Οι πλατφόρμες NGS αναβαθμίζονται συνεχώς. Καποιες από αυτές είναι οι Illumina/Solexa, οι πλατφόρμες Ion Torrent κ.ά. [74] Το NGS είναι ικανό να αναγνωρίζει και να ποσοτικοποιεί ταυτόχρονα γνωστές και άγνωστες αλληλουχίες και επίσης επιτρέπει πολυπλεκτική ανάλυση έκφρασης του miRNA από διάφορες πηγές δείγματος σε ένα μόνο πείραμα.

Η τεχνολογία **Sequencing-by-synthesis**, είναι μία από τις τεχνολογίες NGS που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό νέων υπογραφών ή πινάκων miRNA λόγω

των δεδομένων αλληλουχίας μεγάλου βάθους που παρέχει τα οποία επιτρέπουν την ακριβή ποσοτικοποίηση των ειδών miRNA. [85]

Η επανάσταση στις Μαζικές Παράλληλες Αλληλουχίσεις Επόμενης Γενιάς (NGS), άνοιξε μια νέα εποχή στην εξατομικευμένη ιατρική. Η ευαισθησία αυτών των μεθόδων επιτρέπει την ανίχνευση ειδικών για τον ασθενή χρωμοσωμικών δομικών ανωμαλιών, παραλλαγών του αριθμού αντιγράφων και πολυμορφισμών απλού νουκλεοτιδίου (SNPs) τόσο σε δείγματα ιστού όσο και σε υγρές βιοψίες. [86]

To RNA-seq (RNA sequencing): Είναι μια εξειδικευμένη εφαρμογή του NGS που επικεντρώνεται στην ανάλυση του RNA. Το RNA εξάγεται από το δείγμα (συνήα από κυκλοφορούντα ελεύθερα RNA, cfRNA, ή RNA από εξωσώματα), μεταγράφεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) μέσω αντίστροφης μεταγραφάσης, κόβεται σε μικρότερα θραύσματα και προστίθενται ειδικοί προσαρμογείς για να είναι συμβατά με την πλατφόρμα αλληλούχησης και αλληλουχείται με υψηλής απόδοσης πλατφόρμες αλληλούχησης (π.χ., Illumina, Ion Torrent).

Τα δεδομένα RNA-seq αναλύονται για να προσδιοριστεί η γονιδιακή έκφραση, τα επίπεδα RNA και τυχόν γενετικές ή επιγενετικές τροποποιήσεις.[90] Οι Hong et al. Έκανε σύγκριση διαφορετικών στρατηγικών ανίχνευσης miRNA και σημείωσε σημαντικές διακυμάνσεις στην ταχύτητα, το κόστος και την απόδοση, αποκαλύπτοντας ότι το miRNA-Seq μπορεί να επιτύχει υψηλό βαθμό οικονομικής απόδοσης όταν χρησιμοποιείται για κατάλληλες αναλύσεις δειγμάτων.[69]

To CAPP-Seq (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing): Προσδιορίζει αλλαγές στο ctDNA/cfDNA χρησιμοποιώντας μεγάλες γονιδιωματικές βιβλιοθήκες και εξατομικευμένες υπογραφές ακολουθίας. Μπορεί να εντοπίσει πολλαπλές μεταλλάξεις σε ασθενείς με τον ίδιο τύπο καρκίνου και να αξιολογήσει την ετερογένεια του όγκου. Είχε προηγουμένως αποδειχθεί ότι **είναι ικανό να αναγνωρίσει τα φορτία του όγκου πριν από την ιατρική απεικόνιση**. Μπορεί να αναγνωρίσει πολλούς κύριους τύπους μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένων των εισαγωγών, διαγραφών, παραλλαγών μεμονωμένων νουκλεοτιδίων, παραλλαγών αντιγραφής και αναδιατάξεων, αλλά δεν μπορεί να αναγνωρίσει συγχωνεύσεις.

To Tam-Seq (Targeted Amplicon Sequencing): Επιτρέπει μια πολύ συγκεκριμένη και ευαίσθητη ανάλυση και μπορεί να ανιχνεύσει επίπεδα DNA τόσο χαμηλά όσο 2% χρησιμοποιώντας εκκινητές για την επισήμανση και την αναγνώριση γονιδιωματικών αλληλουχιών. Έχει μειωμένο χρόνο και κόστος αλληλούχισης και μπορεί ταυτόχρονα να αλληλουχήσει εκατομμύρια μόρια DNA. Ωστόσο, η επιθυμητή ακολουθία πρέπει να χαρακτηριστεί προηγουμένως για να λειτουργήσει η μεθοδολογία.

To WES (Whole-Exome Sequencing): Παρέχει χαρακτηρισμό και ανάλυση όλων των υπάρχουσών μεταλλάξεων όγκου, και έτσι μπορεί να εντοπίσει πιθανά ογκογονίδια και γονίδια καταστολής όγκου. Ωστόσο, η ευαισθησία του μπορεί να είναι χαμηλότερη από άλλες μεθόδους, καθώς περιλαμβάνει εξωτικές αλλοιώσεις. Χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος και υψηλή απόδοση.

To WGS (Whole-Genome Sequencing): Αξιολογεί ολόκληρο το γονιδίωμα του όγκου για να προσδιορίσει χαρακτηρισμένες και επιβλαβείς αλλοιώσεις μαζί με παραλλαγές άγνωστης σημασίας. Έχει μεγάλες δυνατότητες για μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση όλων των μεταλλάξεων όγκου, αλλά περιορίζεται από τη διασφάλιση ποιότητας, ηθικά ζητήματα, χρόνο και κόστος. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δύσκολη εκτός εξειδικευμένων κέντρων. [90]

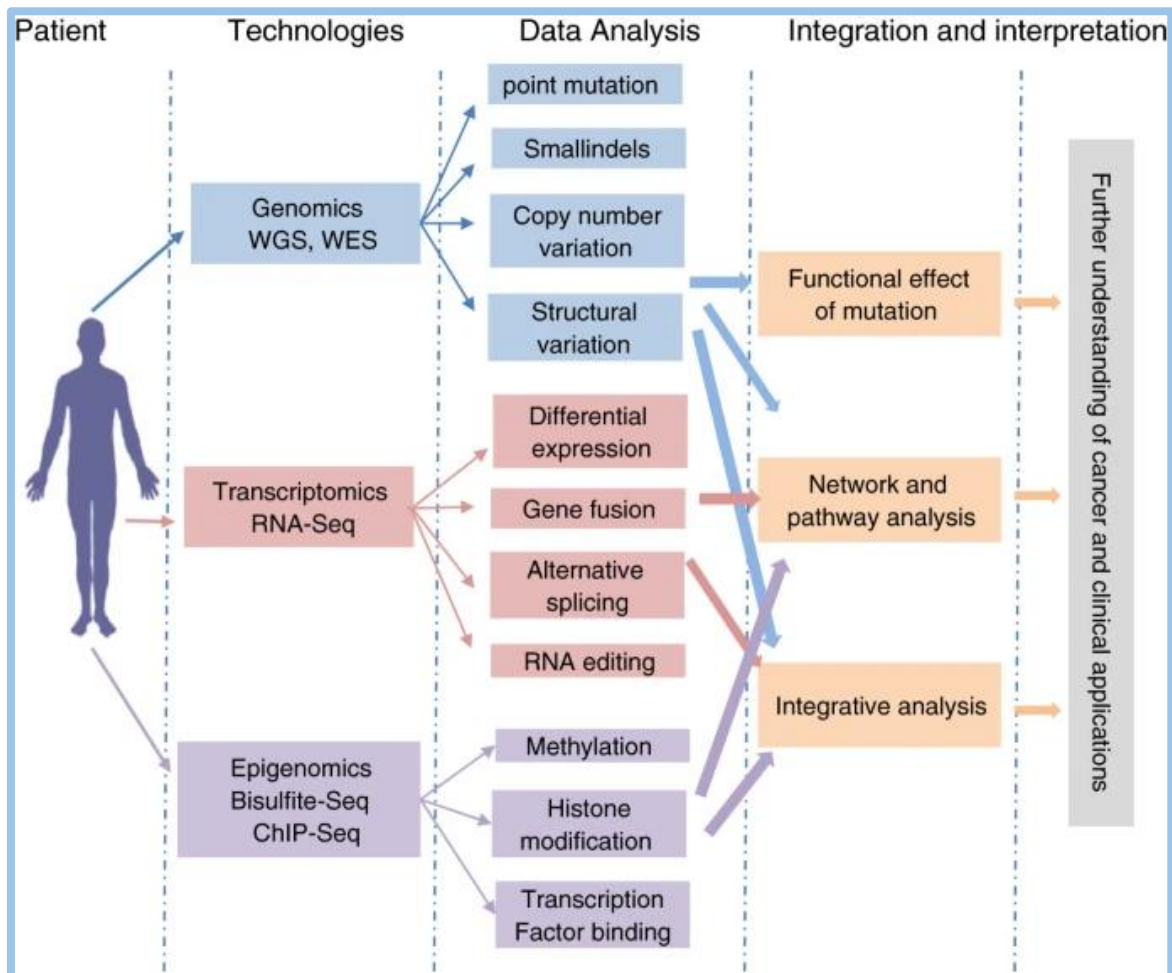
Παρόλο που έχουν αναφερθεί μελέτες απόδειξης της ιδέας, οι αναλύσεις ctDNA με προσεγγίσεις WGS, φαίνεται να είναι κάπως περιορισμένες από τη χαμηλή αφθονία του κλάσματος ctDNA στο συνολικό cfDNA, τα μικρά μήκη θραυσμάτων ctDNA, καθώς και από τα υψηλά ποσοστά σφάλματος στην ανίχνευση σπάνιων παραλλαγές αλληλόμορφων. Ως εκ τούτου, αναπτύσσονται στοχευμένες προσεγγίσεις για αναλύσεις ctDNA που στοχεύουν στον συγκεκριμένο εντοπισμό μεταλλάξεων ειδικών για τον καρκίνο που έχουν εντοπιστεί στον πρωτοπαθή όγκο. [86]

To WGBS-Seq (Whole-Genome Bisulfite Sequencing): Είναι το χρυσό πρότυπο στην ανάλυση μεθυλίωσης DNA. Παρέχει μία μόνο μέτρηση κυτοσίνης και έχει πολύ υψηλή ακρίβεια. Ενώ μπορεί να ανακαλύψει μερικώς μεθυλιωμένους τομείς σε καρκινικά κύτταρα, το DNA μπορεί να υπάρχει σε διάφορους βαθμούς αποικοδόμησης και επομένως αυτή η μέθοδος μπορεί να έχει μειωμένη ευαισθησία. [90] Οι Gao et al. σχεδίασε μια

βελτιωμένη προσέγγιση ctDNA WGBS για να επιτρέψει την αμερόληπτη αξιολόγηση της κατάστασης μεθυσίας ctDNA χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους δειγμάτων πλάσματος, διακρίνοντας επιτυχώς τους ασθενείς με BC βάσει της κατάστασης HR.[69]

Επί του παρόντος, υπάρχουν αρκετές στοχευμένες πειραματικές διαδικασίες NGS που έχουν επικυρωθεί σε δείγματα ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Το 2019, κυκλοφόρησε το πρώτο προσαρμοσμένο τεστ ctDNA που βασίζεται σε NGS, το Signatera™ (<https://www.natera.com/oncology/signatera-advancedcancer-detection>). Ο στόχος αυτής της τεχνολογίας είναι να βελτιώσει την ανίχνευση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου μετά από χειρουργική επέμβαση καθώς και την έγκαιρη ανίχνευση υποτροπής της νόσου. [86]



Εικόνα 15: Μια ολοκληρωμένη διαδικασία ανάλυσης δεδομένων των μεθόδων αλληλούχησης: WGS, WES: Τα γονιδιωματικά δεδομένα (Genomics) αναλύονται για σημειακές μεταλλάξεις, μεταβολές αριθμού αντιγράφων, μικρές εισαγωγές/διαγραφές (small indels) και δομικές αλλαγές. RNA-Seq: Τα μεταγραφωματικά δεδομένα (Transcriptomics) αξιολογούνται για διαφορική έκφραση, γονιδιακή

σύντηξη, εναλλακτική συρραφή (alternative splicing) και RNA επεξεργασία. Bisulfite-Seq, ChIP-Seq: Τα επιγονιδιωματικά δεδομένα (Epigenomics) επικεντρώνονται σε μεθυλίωση, τροποποιήσεις ιστονών και δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων. Ακολουθεί ανάλυση δεδομένων, όπου γίνεται ερμηνεία των μεταβολών σε γονιδιώματα, μεταγραφώματα και επιγονιδιώματα για τη συσχέτιση με καρκινικά μονοπάτια και λειτουργικές επιδράσεις μεταλλάξεων. Η ενσωμάτωση και η ερμηνεία τέλος, περιλαμβάνουν ολοκληρωμένες αναλύσεις δικτύων και μονοπατιών παρέχοντας βαθύτερη κατανόηση του καρκίνου και ενισχύουν την εφαρμογή κλινικών προσεγγίσεων. (Προσαρμοσμένο από: "Next generation sequencing in cancer research and clinical application" (Shyr & Liu, 2013). Biological Procedures Online, 15(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-15-4>)

3.1.1.5 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ – (Microfluidics)

Η μικρορευστομηχανική, βασίζεται σε εξειδικευμένες πλατφόρμες που περιλαμβάνουν μικροσκοπικά κανάλια, αισθητήρες και συσκευές εμπλουτισμού. Η τεχνολογία Microfluidics μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην υγρή βιοψία για απομόνωση CBs (βάση μεγέθους, πυκνότητας ή μηχανικών ιδιοτήτων), για ανάλυση (ανοσομαγνητική απομόνωση, NGS ή ddPCR για ανίχνευση μεταλλάξεων ή μεθυλίωσης), καθώς και για εμπλουτισμό.

Μερικά παραδείγματα μικρορευστομηχανικών πλατφορμών είναι:

Η πλατφόρμα CTC-Chip, που χρησιμοποιείται για απομόνωση CTCs χρησιμοποιώντας ανοσολογική ή φυσική αρχή (π.χ., μέγεθος), η **Lab-on-a-Chip** (πολυλειτουργικές πλατφόρμες που μπορούν να ενσωματώσουν όλα τα βήματα ανάλυσης απομόνωσης, εμπλουτισμού και ανίχνευσης) και η **iChip** (υβριδικό σύστημα που συνδυάζει φυσικές και ανοσολογικές ιδιότητες για την απομόνωση CTCs). Μεταξύ αυτών, η πλατφόρμα μικρορευστομηχανικής lab-on-a-chip, είναι η κύρια πλατφόρμα η οποία θα μπορούσε να ενσωματώσει την προετοιμασία, την αντίδραση και την ανίχνευση δείγματος σε μια ενιαία διαδικασία (He και Zeng, 2016, Li et al., 2020). Ορισμένες πλατφόρμες μικρορευστομηχανικής για CTCs χρησιμοποιούν ομοεστιακή μικροσκοπία φθορισμού που οδηγείται από μια κεντρική αυτό-οργανωμένη συστοιχία υπερπαραμαγνητικών σωματιδίων εντός του μικροκαναλιού που επιτρέπουν τη δημιουργία μιας ανθεκτικής συστοιχίας. Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί επίσης, πολυάριθμες τεχνολογίες

που χρησιμοποιούν την μικρορευστομηχανική για την απομόνωση και την ανίχνευση εξωσωμάτων με πολλά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή απόδοση, ταχεία ανάλυση, χαμηλή εισαγωγή δειγμάτων και αυτοματοποιημένη ανάλυση σε κλινικές συνθήκες. Μια από αυτές είναι η ExoChip η οποία χρησιμοποιείται για τη σύλληψη εξωσωμάτων μέσω αντισωμάτων ή άλλων χημικών τροποποιήσεων.

Η ανάπτυξη υγρών βιοψιών έχει επιταχυνθεί με την τεχνολογία Microfluidics (Egatz-Gomez et al., 2016; Iliescu et al., 2019), η οποία παρέχει νέα και αποτελεσματικά μέσα για την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση, την παρακολούθηση και την ανταπόκριση στη θεραπεία του καρκίνου (Gholizadeh et al., 2017; He and Herr, 2010). Επί του παρόντος, η διαδικασία σύλληψης, διαχωρισμού και ανίχνευσης αυτών των δεικτών πραγματοποιείται στα σχεδιασμένα μικροκανάλια και θαλάμους (Armbrecht et al., 2020; Sun et al., 2020). [91]

ΣΥΣΤΗΜΑ CytoSorter®: Το σύστημα CytoSorter® είναι ένα σύστημα διαχωρισμού, δέσμησης και ανάλυσης CTCs, που χρησιμοποιεί μια ειδικά σχεδιασμένη πλατφόρμα μικρορευστομηχανικής, όπου το δείγμα αίματος διοχετεύεται μέσω μικροκαναλιών και επιτυγχάνει τον διαχωρισμό των κυττάρων με βάση το μέγεθος, το σχήμα ή άλλες φυσικές ιδιότητες. Τα CTCs αναγνωρίζονται και παγιδεύονται με βάση την έκφραση ειδικών πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους (π.χ., EpCAM ή άλλες καρκινικές επιφανειακές πρωτεΐνες) καθώς το εσωτερικό της συσκευής είναι επικαλυμμένο με αντισώματα που στοχεύουν ειδικά τις επιφανειακές πρωτεΐνες των CTCs. Τα απομονωμένα CTCs μπορούν να χρωματιστούν με φθορίζοντες δείκτες και να αναλυθούν χρησιμοποιώντας τεχνικές μικροσκοπίας ή άλλες μεθόδους, όπως PCR ή αλληλούχιση.

Η τεχνολογία CytoSorter® χρησιμοποιεί τη θετική επιλογή χρησιμοποιώντας ένα τσιπ νανοσυστοιχίας στρεπταβιδίνης. Το μικρορευστο τσιπ μπορεί να επικαλυφθεί με οποιοδήποτε σημαντικό με βιοτίνη αντίσωμα σύλληψης για να εμπλουτίσει τα επιθυμητά κύτταρα. Το πιο κοινό αντίσωμα σύλληψης CTC είναι τα μόρια προσκόλλησης αντι-επιθηλιακών κυττάρων (EpCAM). Το σύστημα CytoSorter® CTC έχει επικυρωθεί στον BC (Jin et al., 2020). [87]

3.1.1.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες που η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει, είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CA 15-3, κυκλοφορούντα θραύσματα του υποδοχέα HER2), ειδικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των EVs, όπως οι tetraspanins (CD63, CD81), και επίσης, αν και δεν ανιχνεύει απευθείας DNA/RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές για την ανίχνευση εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs) ή εξωσωμάτων και CTCs που περιέχουν γενετικό υλικό.

Η αρχή στην οποία βασίζεται η ELISA για την ανίχνευση εξωσωμικών βιοδεικτών, συνήθως περιλαμβάνει την άμεση ακινητοποίηση των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων σε μια πλάκα μικροβυθισμάτων που ακολουθείται από αποκλεισμό με έναν παράγοντα αποκλεισμού. Μετά τον αποκλεισμό, εισάγεται ένα αντίσωμα αναγνώρισης για να συνδεθεί με συγκεκριμένα αντιγόνα που υπάρχουν στην επιφάνεια του βιοδείκτη. Τέλος, ένα αντίσωμα με επισημάνση HRP χρησιμοποιείται για ειδική και ευαίσθητη ανάγνωση μέσω ενός σταδίου ενίσχυσης ενζυματικού σήματος. Ένα χρωματομετρικό υπόστρωμα όπως το TMB χρησιμοποιείται για την ανάγνωση της δοκιμασίας.

EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT): Είναι μια εξειδικευμένη, ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ζωντανών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) και κυκλοφορούντων κυττάρων προερχόμενων από όγκους (CTPs) μέσω της ανίχνευσης των πρωτεϊνών που εκκρίνουν ή απελευθερώνουν αυτά τα κύτταρα. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ELISA και ανιχνεύει ειδικά CTCs και διάσπαρτα κύτταρα όγκου σε ασθενείς με καρκίνο. Η τεχνική βασίζεται στην ανίχνευση πρωτεϊνών που παράγονται από λειτουργικά CTCs και DTCs (Disseminated Tumor Cells- Διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα) σε συνδυασμό με αρνητικό εμπλουτισμό. Το EPISPOT αποφεύγει την άμεση επαφή με τα κύτταρα-στόχους και η ανίχνευση των CTCs βασίζεται σε πρωτεΐνες που αποβάλλονται κατά τη διάρκεια βραχυπρόθεσμης καλλιέργειας. [85] Επιπλέον, για την ανίχνευση πρωτεϊνών, εφαρμόζεται η EpiSpot με βάση αντισώματα κατά της κυτταροκερατίνης (anti-CK), η οποία συνδυάζεται ειδικά με πρωτεΐνη ειδικότητας όγκου που απελευθερώνεται από CTCs.[69] Επιπλέον, διατίθενται στο εμπόριο kit EV ELISA

για τον ποσοτικό προσδιορισμό κοινών πρωτεϊνών EVs, όπως οι τετρασπανίνες CD63, CD9 ή CD81.[83]

3.1.1.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΙΧΝΗΛΑΤΗΣΗΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ-NTA (NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS)

Το NTA είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον χαρακτηρισμό του μεγέθους και της συγκέντρωσης των εξωσωμάτων. Η κατανομή μεγέθους των βιολογικών σωματιδίων που κυμαίνεται μεταξύ 50 nm και 1 mM μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας NTA. Τα εξωσωμικά σωματίδια, αρχικά ακτινοβολούνται από μια δέσμη λέιζερ και το προκύπτον σκεδαζόμενο φως παρακολουθείται χρησιμοποιώντας ένα οπτικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια αναλύεται από λογισμικό επεξεργασίας εικόνας. Το λογισμικό παρακολουθεί τον ρυθμό διάχυσης των εξωσωμάτων μέσω του οπτικού πεδίου. Η διάμετρος του εξωσώματος προέρχεται από το ρυθμό της κίνησης Brown, χρησιμοποιώντας τη σχέση Stokes-Einstein που εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το ιξώδες του αιωρούμενου.[85]

3.1.1.8 ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ NanoString nCounter

Το NanoString nCounter, είναι μια προηγμένη πλατφόρμα που προσφέρει ακριβή, ποσοτική και πολλαπλή ανάλυση βιοδεικτών για την υγρή βιοψία, επιτρέποντας την ανίχνευση και παρακολούθηση γενετικών και επιγενετικών χαρακτηριστικών με εξαιρετική ευαισθησία. Η τεχνολογία NanoString nCounter βασίζεται στην υβριδοποίηση μορίων RNA/DNA με ειδικούς ανιχνευτές (probes), που παρέχουν ακριβή και ποσοτική μέτρηση των γονιδίων ή των βιοδεικτών του δείγματος χωρίς να απαιτείται αλληλούχηση ή PCR. Αντί να ενισχύει το DNA ή το RNA, η τεχνολογία αυτή ενσωματώνει πολύ συγκεκριμένους ανιχνευτές που συνδέονται με τα στόχους τους, και οι οποίοι στη συνέχεια ανιχνεύονται με ηλεκτρονικό σύστημα. [92]

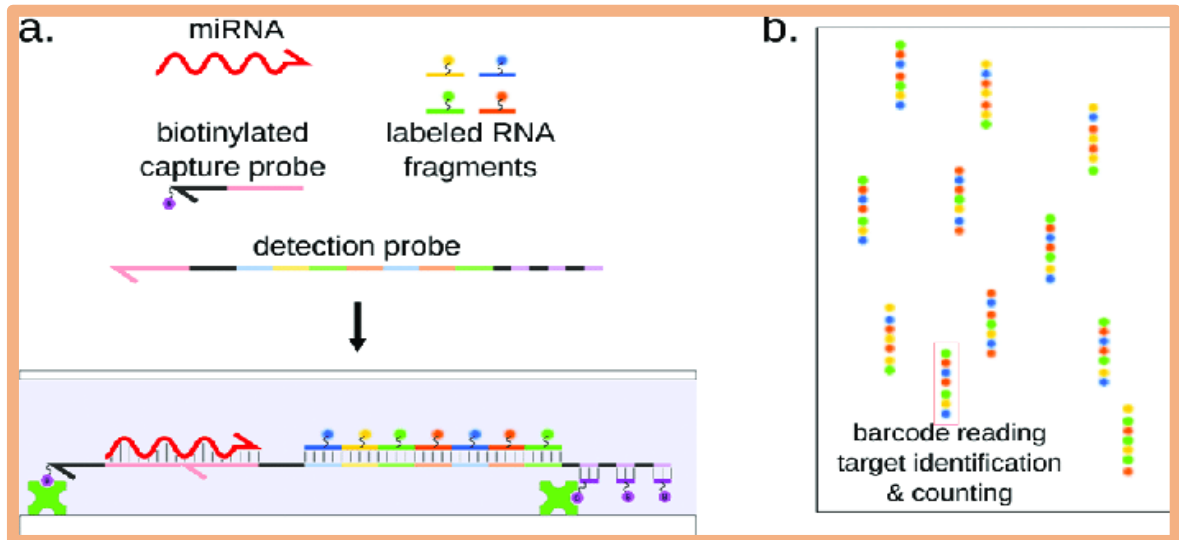
Η τεχνολογία NanoString χαρακτηρίζεται από ένα σύστημα διπλού ανιχνευτή που περιέχει έναν συνδυασμό ειδικού ανιχνευτή σύλληψης στόχου και μοναδικού, χρωματικά κωδικοποιημένου ανιχνευτή αναφοράς που επιτρέπει εξαιρετικά πολυπλεκτική αντίδραση. Κάθε γραμμωτός κώδικας με χρωματική κωδικοποίηση συγκεκριμένου στόχου προσαρτάται σε έναν μόνο στόχο. Ο ειδικός ανιχνευτής που αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό

γονίδιο ενδιαφέροντος που μπορεί να μετρηθεί μεμονωμένα χωρίς ενίσχυση. Αυτό επιτρέπει σε ένα πάνελ έως και 800 γονιδίων να πολυπλέκονται σε ένα μόνο αντίδραση. Οι δοκιμασίες που βασίζονται σε NanoString περιλαμβάνουν γενικά τρία κύρια στάδια: **1)** Υβριδισμό, **2)** Καθαρισμό και ακινητοποίηση και **3)** Μέτρηση και ανάλυση. Κατά τη διάρκεια του υβριδισμού, ένας πληθυσμός RNA είναι αναμεμειγμένα με τους ανιχνευτές. Κάθε μόριο στόχος, χωρίς να χρειάζεται ενίσχυση, υβριδοποιείται απευθείας με τους μοριακούς γραμμωτούς κώδικες. Παρέχεται «σύλληψη» και ένας ανιχνευτής «αναφοράς» για κάθε γονίδιο ενδιαφέροντος. Ο αισθητήρας σύλληψης επιτρέπει το σύμπλεγμα ανιχνευτή-στόχου που σχηματίστηκε για να ακινητοποιηθεί για τη συλλογή δεδομένων ενώ ο ρεπόρτερ ανιχνευτής περιέχει σήμα για ανίχνευση. Μετά τον υβριδισμό, περίσσεια σύλληψης και οι ανιχνευτές αναφοράς αφαιρούνται και τα σύμπλοκα ανιχνευτή-στόχου συνδέονται, ακινητοποιούνται και ευθυγραμμίζονται στην κασέτα nCounter. Τέλος, τα δοχεία δειγμάτων τοποθετούνται στο nCounter Digital αναλυτή για συλλογή δεδομένων. Κάθε χρωματικά κωδικοποιημένος γραμμωτός κώδικας αντιπροσωπεύει ένα μόνο μόριο στόχο. Το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στόχου μετράται μετρώντας τον αριθμό των φορών που ανιχνεύεται ο χρωματικά κωδικοποιημένος γραμμικός κώδικας του γονιδίου στόχου. [93] **(εικόνα 16)**

Η τεχνολογία NanoString έχει γίνει ολοένα και πιο δημοφιλής την τελευταία δεκαετία λόγω της ικανότητάς της να ανιχνεύει εκφράσεις πολλαπλών γονιδίων με εξαιρετικά ευαίσθητο, ακριβή και αναπαραγωγίμο τρόπο. Η τεχνολογία NanoString nCounter, ως μια νέα πεοσέγγιση μοριακής ανάλυσης, αποκτά διαδεδομένη χρήση σε κλινικά περιβάλλοντα καθώς μπορεί να ξεπεράσει ορισμένους κοινούς περιορισμούς που σχετίζονται με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Σε σύγκριση με την PCR, η τεχνολογία NanoString δεν περιλαμβάνει βήματα ενίσχυσης, γεγονός που ελαχιστοποιεί σημαντικά την πιθανότητα μόλυνσης. Το NanoString μετρά τον αριθμό των μεταγραφών mRNA απευθείας με «μοριακή μέτρηση», καθώς έως και 800 έγχρωμοι ανιχνευτές μπορούν να εκτελεστούν ταυτόχρονα σε μία μόνο αντίδραση. Είναι ένα σύστημα που βασίζεται σε υβριδισμό που επιτρέπει την ακριβή ανίχνευση πολυπλεξικών γονιδιακών εκφράσεων χωρίς καμία ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αντίστροφη μεταγραφή. Η τεχνολογία αυτή, επιτρέπει την ανάλυση 12 δειγμάτων σε μία μόνο δοκιμή. Απαιτείται λιγότερο από 1 ώρα hands on time

και η γονιδιακή αλληλουχία μπορεί να επιτευχθεί το πολύ εντός 2 ημερών. Τα πλεονεκτήματα του NanoString είναι τεράστια και ποικίλα, γεγονός που το κάνει να είναι ένα πιθανό εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφών γονιδίων. [92]



Εικόνα 16: Αρχή του συστήματος Nanostring nCounter. (α) Το miRNA γεφυρώνει μεταξύ βιοτινυλιωμένου ανιχνευτή σύλληψης, επιτρέποντας την ακινητοποίηση σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και έναν ανιχνευτή ανίχνευσης που φέρει έναν συνδυασμό φθορίζοντων ετικετών που επιτρέπουν την αναγνώριση του miRNA στόχου. (β) Τα ακινητοποιημένα σύνολα ετικετών μετρώνται, καθένα από αυτά αναφέρει τη σύλληψη ενός μόνο μορίου miRNA. (Προσαρμοσμένο από "Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs" (Jet, Gines, Rondelez, & Taly, 2021). Chemical Society Reviews, 50(6), 4141–4161. <https://doi.org/10.1039/d0cs00609b>)

3.1.1.9 ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ DNA/RNA (microarrays)

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών αντιπροσωπεύει την πιο πρόσφατη και συναρπαστική πρόοδο στην εφαρμογή της τεχνολογίας που βασίζεται στον υβριδισμό. Οι μικροσυστοιχίες (microarrays) είναι μια τεχνολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων γονιδίων ή βιολογικών μορίων. Αποτελούνται από ένα μικρό γυάλινο ή πλαστικό τσιπ, πάνω στο οποίο βρίσκονται προσδεδεμένες προκαθορισμένες αλληλουχίες DNA ή RNA (ανιχνευτές).

Το γενετικό υλικό (DNA ή RNA) από το δείγμα, επισημαίνεται με φθορίζουσα ουσία και εφαρμόζεται στην επιφάνεια του microarray και στη συνέχεια υβριδοποιείται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες στον ανιχνευτή.

Ειδικός σαρωτής ανιχνεύει την ένταση του φθορισμού, που αντιπροσωπεύει την παρουσία ή την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ή μορίων. Το επίπεδο έκφρασης λαμβάνεται μετά την αφαίρεση του υποβάθρου, την κανονικοποίηση και τελικά τη σύνοψη των σημάτων από διαφορετικούς ανιχνευτές ειδικούς για το ίδιο γονίδιο ή μεταγραφή.[94]

Οι μικροσυστοιχίες DNA έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων-στόχων μέσω υβριδισμού ειδικής αλληλουχίας με γνωστούς ανιχνευτές ακινητοποιημένους σε στερεά υποστρώματα. Η ανίχνευση του miRNA χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες βασίζεται στον ευαίσθητο και ειδικό υβριδισμό του στοχευόμενου miRNA σε συμπληρωματικούς ανιχνευτές DNA. Πολλές πλατφόρμες μικροσυστοιχιών έχουν χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του RNA σε όλο το γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένων των GeneChip (Affymetrix), miRCURY LNA (Exiqon) και SurePrint (Agilent). Οι μέθοδοι που βασίζονται σε μικροσυστοιχίες μπορούν να μετρήσουν πολλά miRNAs ταυτόχρονα, αλλά η κλινική τους χρησιμότητα περιορίζεται από ειδικούς ανιχνευτές που απαιτούνται, εξειδικευμένο εξοπλισμό και διαδικασίες υβριδισμού που περιορίζουν έναν συγκεκριμένο στόχο σε περιορισμένα σημεία που παρατηρούνται εύκολα με όργανα φθορισμού ή απεικόνισης. [86]

3.1.1.10 Η ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ RareCyte®

Η πλατφόρμα **RareCyte®** περιλαμβάνει διόγκωση και εξάπλωση των CTCs σε διαφάνειες, αυτοματοποιημένη πολυπαραμετρική χρώση φθορισμού, αυτοματοποιημένη μικροσκοπική απεικόνιση και ανάλυση και ενσωματωμένη ανάκτηση ενός κυττάρου. Η αρχή λειτουργίας που επιτρέπει την ολοκληρωμένη συλλογή των CTCs είναι η διαφορετική πυκνότητα του ενδιάμεσου λευκοκυτταρικού στρώματος των εμπύρηνων κυττάρων από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) και το πλάσμα. Η μέθοδος βασίζεται στην «επέκταση» της στιλπνής στρώσης, που εισήχθη από τους Levine και Wardlaw ως το σύστημα ποσοτικής στιλβωτικής στρώσης. Ένας πλωτήρας με καθορισμένη πυκνότητα τοποθετείται μέσα σε έναν τριχοειδή σωλήνα, ο οποίος είναι γεμάτος με δείγμα αίματος. Μετά τη φυγοκέντρωση του σωλήνα, η στιλπνή στρώση «διογκώνεται» στον χώρο που περιβάλλει τον πλωτήρα. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων μπορεί να υπολογιστεί με τον προσδιορισμό του γραμμικού χώρου που καταλαμβάνεται μετά την απεικόνιση.

.ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: Το σύστημα προετοιμασίας δειγμάτων επιτρέπει την ολοκληρωμένη και αναπαραγώγιμη συλλογή και μεταφορά εμπύρηνων κυττάρων από αίμα σε αντικειμενοφόρους μικροσκοπίου. Δεδομένου ότι τα CTCs είναι πυρηνωμένα κύτταρα, η πυκνότητά τους εμπίπτει στο εύρος των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs), τα οποία είναι πυκνότερα από το πλάσμα, αλλά λιγότερο πυκνά από τα RBC. Το σύστημα συλλέγει κύτταρα κατά πυκνότητα, χωρίς να λαμβάνει υπόψη το μέγεθος ή την έκφραση πρωτεΐνης. Αυτό ξεπερνά τους περιορισμούς των φίλτρων και των μικρορευστικών συσκευών που δεν θα συλλέξουν CTCs που δεν είναι μεγαλύτερα από τα WBCs καθώς και μεθόδων επιφανειακής ανοσοσύλληψης που βασίζονται σε πρωτεΐνες οι οποίες μπορεί να μην εκφράζονται σε όλα τα CTCs.

Το πλήρες αίμα συλλέγεται στο σωληνάριο συλλογής αίματος RareCyte (BCT) και είναι σταθερό για έως και 72 ώρες. Το αίμα τοποθετείται σε ένα σωλήνα διαχωρισμού που περιέχει έναν εσωτερικό πλωτήρα που έχει πυκνότητα παρόμοια με τα εμπύρηννα κύτταρα του αίματος. Μετά τη φυγοκέντρηση, η στιλβωτική στρώση «διαστέλλεται» εντός του χώρου μεταξύ του σωλήνα και του πλωτήρα, πάνω από το στρώμα RBCs και κάτω από το πλάσμα. Εφαρμόζεται ένας εξωτερικός στεγανοποιητικός δακτύλιος που σφίγγει τον σωλήνα πάνω στον πλωτήρα για να δημιουργήσει ένα φυσικό φράγμα μεταξύ των στρωμάτων RBCs και της στρώσης φλοιού. Το πλάσμα συλλέγεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση DNA χωρίς κύτταρα. Ένα ρευστό μετατόπισης (~1,13 g/cm³) προστίθεται πάνω από τον πλωτήρα και ένας συλλέκτης εισάγεται που συνδέει τα περιεχόμενα του σωλήνα διαχωρισμού με έναν σωλήνα απομόνωσης που περιέχει ένα ελαφρώς λιγότερο πυκνό ρευστό (~1,10 g/cm³) που διαχωρίζει περαιτέρω τα συστατικά του αίματος.

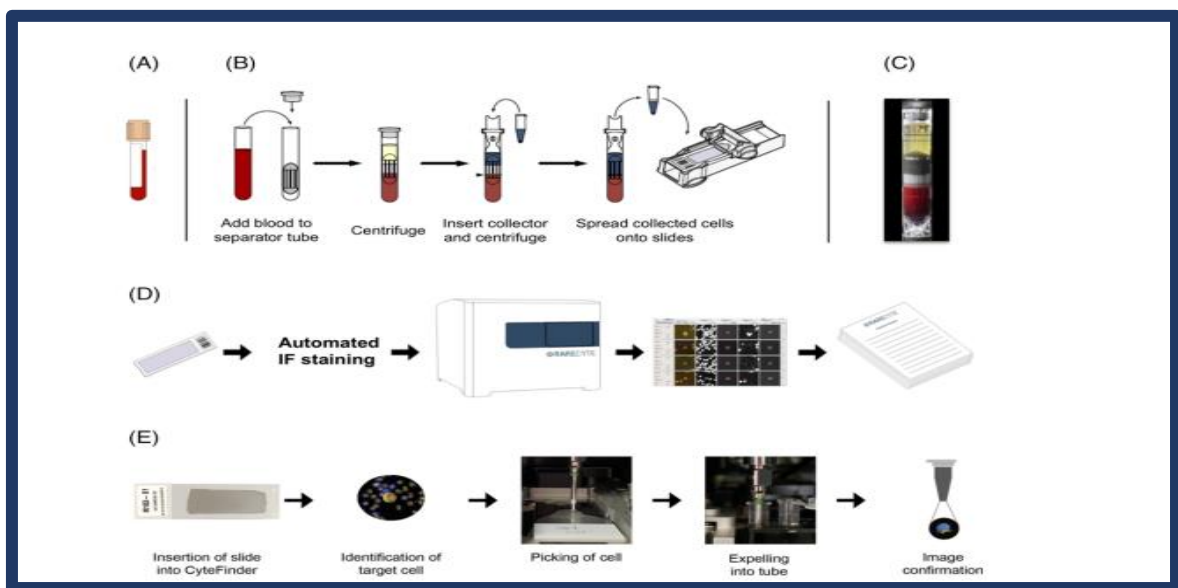
ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΧΡΩΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ: Η προετοιμασμένη διαφάνεια περιέχει CTCs, εάν υπάρχουν, σε ένα υπόβαθρο WBCs. Μόλις εμφανιστούν στη διαφάνεια, τα CTCs μπορούν να ταυτοποιηθούν, να χαρακτηριστούν από φαινότυπο και να αναλυθούν σε μοριακό επίπεδο. Οι τέσσερις κανονικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των επιθηλιακών CTCs είναι μια πυρηνική χρωστική, ο δείκτης αποκλεισμού WBC CD45 και οι επιθηλιακοί δείκτες CTC EpCAM και cytokeratin (CK). Δεδομένου ότι το σύστημα απεικόνισης μπορεί να αναλύσει έξι κανάλια φθορισμού, δύο ή τρεις επιπλέον ερευνητικοί βιοδείκτες μπορούν να

αξιολογηθούν ταυτόχρονα στα αναγνωρισμένα CTCs, ανάλογα με το εάν οι επιθηλιακοί δείκτες βρίσκονται σε ξεχωριστά κανάλια ή συνδυάζονται σε ένα.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ: Οι πλάκες τοποθετούνται στο αυτοματοποιημένο μικροσκόπιο σάρωσης φθορισμού της πλατφόρμας και σαρώνονται με αντικειμενική μεγέθυνση 10×. Η βαθμίδα του μικροσκοπίου χρησιμοποιεί μια κινηματική βάση που καθιερώνει εξαιρετικά αναπαραγωγίμη τοποθέτηση της πλάκας. Οι εικόνες διαφανειών αναλύονται με ενσωματωμένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας, που αναλύει αυτόματα τις εικόνες για να βρει και να βαθμολογήσει υποψήφια CTCs σε περίπου 10 λεπτά ως εξής. Τα αντικείμενα με σήμα σε CK ή EpCAM αναγνωρίζονται. Στη συνέχεια ελέγχονται από το λογισμικό για σήμα CD45, το οποίο, εάν υπάρχει, προκαλεί την απόρριψη του αντικειμένου. Αυτό αποκλείει σχεδόν όλα τα WBCs και έχει ως αποτέλεσμα ένα σύνολο υποψήφιων CTCs. Αυτά ταξινομούνται από ένα μοντέλο μηχανικής μάθησης που βασίζεται σε ένα μεγάλο σύνολο που καθορίζουν μια βαθμολογία πιθανότητας (0–100) να είναι «αληθινό» CTC. Το μοντέλο εκπαιδεύεται σε ένα σύνολο δεδομένων >10.000 CTCs από διάφορους τύπους καρκίνου που έχει επιβεβαιωθεί από παρατηρητές ότι έχουν έναν «αληθινό» επιθηλιακό φαινότυπο CTC. Οι εικόνες παρουσιάζονται με σειρά βαθμολογίας, από υψηλή σε χαμηλή, που λήγει σε μια βαθμολογία αποκοπής κατωφλίου 15 που επιλέχθηκε για να διατηρήσει περίπου το 99% του "αληθούς" CTC ενώ αποκλείουν περίπου το 90% των "ψευδών" υποψηφίων αντικειμένων στο σύνολο δεδομένων. Η τελική ταξινόμηση ενός κυττάρου ως CTC απαιτεί επιβεβαίωση του σήματος φθορισμού, σήμα είτε για CK είτε για EpCAM ή και για τα δύο και απουσία σήματος CD45.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΟΥ: Το όργανο απεικόνισης ενσωματώνει ένα σύστημα συλλογής συζευγμένο με υγρό πάνω από τη βαθμίδα ολίσθησης για την ανάκτηση μεμονωμένων CTC. Το άκρο της βελόνας του απομακρύνει μηχανικά το κύτταρο από την επιφάνεια της πλάκας και το εναποθέτει σε έναν σωλήνα απεικόνισης για οπτική επιβεβαίωση. Το σύστημα είναι εξαιρετικά αυτοματοποιημένο και έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να μην απαιτεί υψηλή τεχνική ικανότητα. Το ποσοστό επιτυχούς ανάκτησης κυττάρων είναι 80-90%. Επειδή οι αντικειμενοφόροι μπορεί να αποθηκευτούν και να αρχειοθετηθούν μετά τη χρώση, το μεμονωμένο CTC μπορεί να

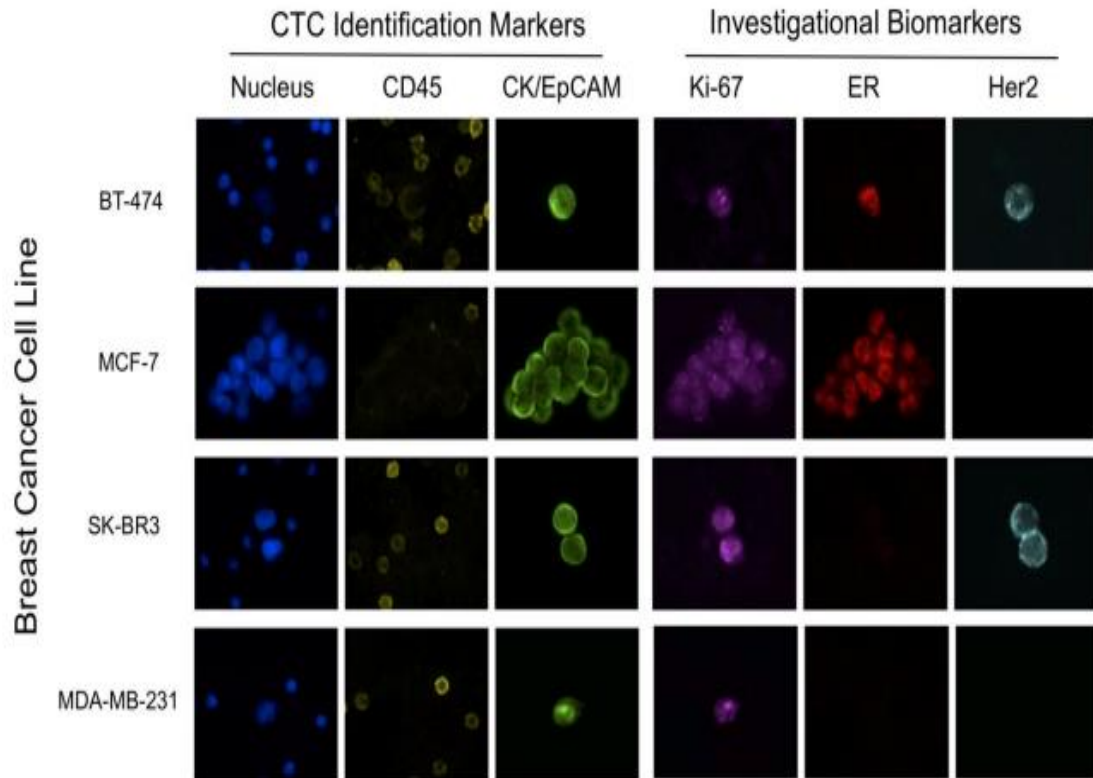
ανακτηθεί για μοριακή ανάλυση αναδρομικά. Τα ανακτηθέντα κύτταρα είναι κατάλληλα για ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος με μεθόδους που είναι συμβατές με σταθερά δείγματα. (Έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος για την προετοιμασία και την ανάλυση μονοκυττάρου ζωντανών κυττάρων). Το παρασκευασμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορους τύπους ανάλυσης, όπως PCR, φασματομετρία μάζας, συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό και στη συνέχεια NGS.[95] (εικόνες 17 και 18)



Εικόνα 17: Ροή εργασιών προετοιμασίας χρώσης και ανάλυσης CTCs πλατφόρμας RareCyte.

A. Συλλογή δειγμάτων στο AccuCyte BCT B. Συλλογή πυρηνωμένων κυττάρων με βάση την πυκνότητα και μεταφορά σε αντικειμενοφόρους πλάκες. C. Σωλήνας διαχωρισμού AccuCyte μετά από φυγοκέντρηση. D. Χρώση διαφανειών και λήψη εικόνων σάρωσης. E. Ανάλυση εικόνων από το σύστημα CytelFinder. (Προσαρμοσμένο από: "The RareCyte® platform for next-generation analysis of circulating tumor cells: RareCyte platform CTC analysis" (Kaldjian et al., 2018). Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 93(12), 1220–1225.

<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23619>



Εικόνα 18: Δοκιμασία CTC καρκίνου του μαστού έξι παραμέτρων που ενσωματώνει ερευνητικούς βιοδείκτες ER, Her2 και Ki-67. Κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που αντιπροσωπεύουν διάφορους φαινοτύπους ER και Her2, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το σύστημα AccuCyte. (Προσαρμοσμένο από: "Novel multi-parameter assays for investigational phenotyping of circulating tumor cells" (Ericson et al., n.d.). RareCyte, Inc.)

3.1.1.11 Η ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ CellSeed

Η CellSeed Technology, προσφέρει μια καινοτόμο πλατφόρμα που διευκολύνει όχι μόνο την απομόνωση των CTCs αλλά και την ανάπτυξή τους in vitro, επιτρέποντας στους ερευνητές να διερευνήσουν σημαντικές πτυχές της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων. Η δυνατότητα διατήρησης ζωντανών και ακέραιων CTCs δημιουργεί νέες ευκαιρίες για τη μελέτη των μηχανισμών μετάστασης, την ανάλυση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, καθώς και τη δοκιμή φαρμάκων σε πραγματικό χρόνο. Οι Krol et al. χρησιμοποίησε την πλατφόρμα χειρισμού υγρών CellSeed και νανοδομημένες πλάκες επικαλυμμένες με οξείδιο τιτανίου για την επίτευξη της διάτμησης δωρεάν ανίχνευση CTCs,

συλλαμβάνοντας με επιτυχία και αποτελεσματικά αυτά τα κύτταρα από κλινικά δείγματα διατηρώντας παράλληλα τη μορφολογία τους. [69]

Η σύλληψη συστάδων CTCs από το αίμα ασθενών με καρκίνο είναι μια πρόκληση. Όχι μόνο οι συστάδες είναι πολύ αραιωμένες στην περιφερειακή κυκλοφορία των ασθενών, αλλά μπορεί επίσης να υποστούν αποσυσσωμάτωση κατά την επεξεργασία με μικρορευστικές συσκευές λόγω συνεχούς διατμητικής τάσης. Για το σκοπό αυτό, έγινε προσπάθεια για δημιουργία μιας νέας μεθόδου για την αναγνώριση CTCs που θα μπορούσε να διατηρήσει πλήρως τόσο τη βιολογική όσο και τη φαινοτυπική ακεραιότητα των CTC-clusters σε ένα δεδομένο δείγμα αίματος, σκοπίμως σχεδιασμένη για την αποφυγή διατμητικού στρες.

Για να επιτευχθεί η τυποποίηση της προετοιμασίας των πλακών, χρησιμοποιήθηκε μια προσαρμοσμένη πλατφόρμα χειρισμού υγρών CellSeed, για αυτοματοποιημένη σπορά και στερέωση κυττάρων απευθείας σε αντικειμενοφόρους πλάκες SBS-CTC (Smart BioSurface) με εστιακά σημεία πρόσφυσης με βάση την ιντεγκρίνη. Μονιμοποιήθηκαν όλοι οι τύποι κυττάρων με υψηλή απόδοση και χωρίς διάτμηση. Η καθιέρωση της τεχνολογίας SBS-CTC σε συνδυασμό με τη συσκευή CellSeed επέτρεψε την αξιολόγηση της φυσιολογικής σύνθεσης CTCs σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού (από μια ομάδα 58 ασθενών, εκ των οποίων οι 30 ήταν ανώνυμοι υγιείς δότες και οι 28 ήταν ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού πριν από τη χειρουργική θεραπεία).

Εντυπωσιακά, ανιχνεύθηκαν συστάδες CTCs (τόσο μεμονωμένα όσο και καρκινικά κύτταρα συσσωματωμένα με κύτταρα του ανοσοποιητικού) σε πέντε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Η συντριπτική πλειονότητα (29/30) των υγιών δωτών κατέληξε αρνητικά τόσο για μεμονωμένα CTCs όσο και για CTC clusters, όπως αναμενόταν, με εξαίρεση έναν δότη στον οποίο βρέθηκε ένα μόνο CTC. [96,97]

3.1.1.12 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ -MS (Mass Spectrometry)

Επί του παρόντος, οι ανοσοδοκιμασίες χρησιμοποιούνται κυρίως για τον συνηθισμένο ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρκινικών βιοδεικτών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η στοχευμένη φασματομετρία μάζας (MS) έχει αναδειχθεί ως ένα πολύτιμο ποσοτικό εργαλείο για δείκτες όγκου.

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια διαγνωστική τεχνική που επιτρέπει την εξαιρετικά εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέτρηση των κυκλοφορούντων βιοδεικτών στις υγρές βιοψίες. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν εφαρμόσει το MALDI-TOF MS για τον εντοπισμό ή την παρακολούθηση βιοδεικτών. Το MALDI-TOF MS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την πρωτεομική ανάλυση διαφόρων καρκίνων.[98]

Οι συσσωρευμένες αλλοιώσεις του DNA αλλάζουν την εκδήλωση των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, στις υγρές βιοψίες, η βαθειά ανάλυση πρωτεώματος πιθανότατα θα παρέχει ανεκτίμητες πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο σε όλα τα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου. Οι νέες τεχνολογίες πρωτεϊνών έχουν επείγουσα ζήτηση για την εκπλήρωση των στόχων που έχουν τεθεί για την ανακάλυψη βιοδεικτών σε υγρές βιοψίες. Στην ανάλυση υγρής βιοψίας, με τις τεχνικές και μεθοδολογικές προόδους, η σύγχρονη MS υιοθετεί κυρίως την προετοιμασία δειγμάτων που έχει σχεδιαστεί για το σκοπό αυτό μαζί με υγρή χρωματογραφία (LC). Μια υποθετική διάταξη LC-MS περιλαμβάνει πέψη δείγματος που ακολουθείται από τιτλοδότηση πεπτιδίου. Τα αραιωμένα πεπτιδικά κλάσματα ιονίζονται και χαρακτηρίζονται σε έναν αναλυτή μάζας. Λόγω των πολύπλοκων χαρακτηριστικών των βιορευστών, ιδιαίτερα του αίματος, έχουν γίνει προσπάθειες για την αύξηση του αριθμού των πρωτεϊνών που πρέπει να χαρακτηριστούν με ακρίβεια.

Ένα βασικό πλεονέκτημα της MS για υγρή βιοψία, είναι ότι επιτρέπει πρωτεομική έρευνα χωρίς υποθέσεις (ολικές πρωτεΐνες και τροποποιημένες μορφές), καθιστώντας την μια προτιμώμενη προσέγγιση ανίχνευσης βιοδεικτών στο πρώιμο στάδιο [99]

Το MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη διαλογή ενός δείγματος χωρίς προηγούμενη γνώση των στόχων (μη στοχευμένο MS) όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό προεπιλεγμένων αναλυτών (στοχευμένο MS). Το μη στοχευμένο MS είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανακάλυψη νέων υποψηφίων βιοδεικτών, ενώ το στοχευμένο MS είναι πιο κατάλληλο για την ανάπτυξη και την επικύρωση ανάλυσης βιοδεικτών λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας και ακρίβειάς του σε σύγκριση με το μη στοχευμένο MS. Σε ένα τυπικό πρόγραμμα εργασίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνικών βιοδεικτών από υγρές βιοψίες μέσω στοχευμένου MS, οι πρωτεΐνες χωνεύονται σε πεπτίδια πριν από το διαχωρισμό τους μέσω υγρής χρωματογραφίας (LC) και ανάλυση μέσω MS/MS. Μπορεί να προστεθεί ένα στάδιο εξάντλησης ή εμπλουτισμού

πρωτεϊνών ή πεπτιδίων για την αφαίρεση πρωτεϊνών υψηλής αφθονίας από το δείγμα ή ο εμπλουτισμός των αναλυτών-στόχων, γεγονός που βελτιώνει την ανίχνευση των λιγότερο άφθονων καρκινικών βιοδεικτών. Αυτό είναι ιδιαίτερα απαραίτητο για την ανάλυση του ορού ή του πλάσματος, καθώς οι 22 πιο άφθονες πρωτεΐνες αποτελούν το 99% της μάζας πρωτεΐνης ορού, αλλά εφαρμόζεται επίσης συνήθως σε άλλους τύπους δειγμάτων όπως τα ούρα ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.[100]

3.1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ- ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Αν και η υγρή βιοψία έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη βιοψία ιστού, υπάρχουν προκλήσεις που πρέπει να επιλυθούν πριν εφαρμοστεί στην κλινική πράξη.

Μια θεμελιώδης προϋπόθεση για την ανάπτυξη διαγνωστικών κυκλοφορούντων βιοδεικτών (CBs), είναι η ικανότητα μέτρησης των CBs στα σωματικά υγρά, με επαρκή ακρίβεια και ευαισθησία. Ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των CBs έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από πολλούς περιορισμούς, όπως προαναλυτικές παραλλαγές, τεχνικά προβλήματα στην qRT-PCR, ανάλυση δεδομένων και κανονικοποίηση.[85]

Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα, η κλινική εφαρμογή στην υγρή βιοψία δεν είναι πλήρως εδραιωμένη και απαιτεί τη διενέργεια πολυκεντρικών κλινικών μελετών με μια μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα που εμποδίζει την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη είναι η έλλειψη μιας τυποποιημένης διαδικασίας. Επιπλέον, είναι δύσκολο να ανιχνευθούν οι βιοδείκτες στο πρώιμο στάδιο του καρκίνου του μαστού, καθώς οι συγκεντρώσεις τους στα βιορευστά είναι πολύ χαμηλές.

Οι προκλήσεις για τα CTCs είναι η απομόνωση καθώς και το όριο ανίχνευσης. Ο αριθμός των CTCs στο αίμα είναι χαμηλός και αραιωμένος από τα αιμοσφαίρια, καθιστώντας την ανίχνευσή τους τεχνικά δύσκολη, ιδιαίτερα στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.[83] Η πολύπλοκη επιφάνειά των CTCs και η συνολική ετερογένειά τους δυσκολεύει περαιτέρω την ανίχνευσή τους. Επιπλέον, ανάλογα με το στάδιο και τον τύπο του καρκίνου, τα CTCs παρουσιάζουν διακυμάνσεις στο μέγεθος, στο βαθμό έκφρασης επιφανειακής πρωτεΐνης και στις φυσικές ιδιότητες. Επομένως, απαιτούνται εξαιρετικά

ευαίσθητες και ειδικές στρατηγικές ανάλυσης για τη λήψη της μέγιστης συλλογής CTCs.[85]

Ένα εμπόδιο στην ανίχνευση του ctDNA στα πρώιμα στάδια του καρκίνου, είναι η χαμηλή συγκέντρωσή του, σε σχέση με τη συνολική συγκέντρωση του cfDNA. Τα πρώιμα στάδια των καρκίνων έχουν περίπου <0,1% ctDNA (10 αντίγραφα ctDNA ανά 5 mL), σε αντίθεση με ~1% σε μη μεταστατικούς ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο και στο στάδιο IV 100–1000 αντίγραφα ανά 5 mL (έως 10%). Ως εκ τούτου, η τεχνική ανίχνευση του ctDNA στα πρώιμα στάδια του καρκίνου είναι πολύ δύσκολη και απαιτεί εξαιρετικά ευαίσθητες τεχνολογίες.

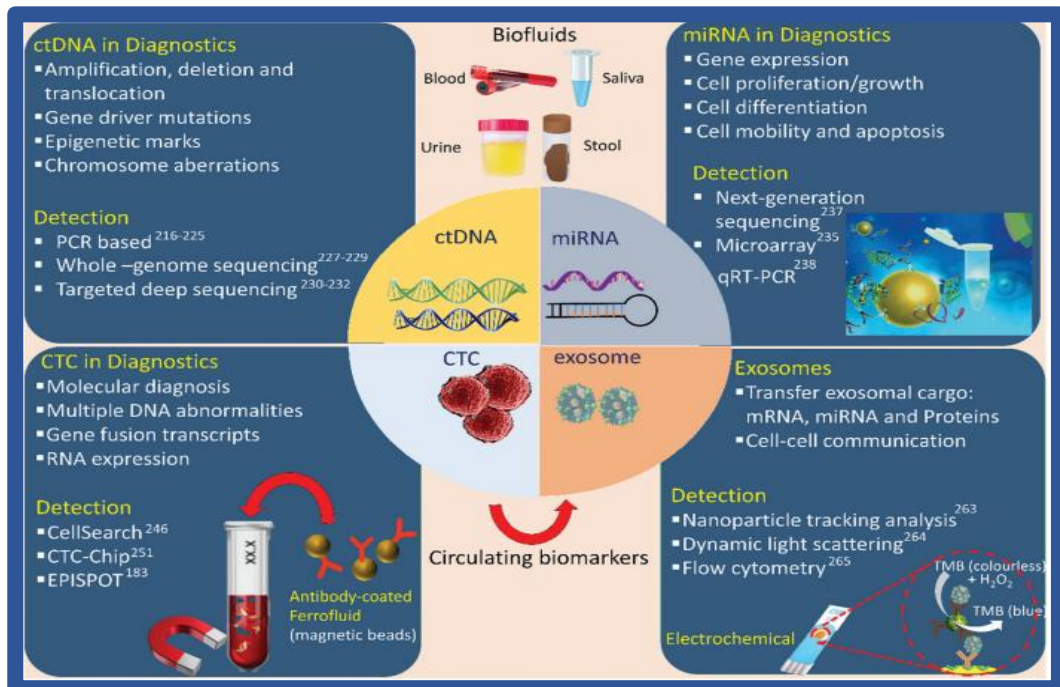
Μια άλλη πρόκληση της χρήσης του cfDNA για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, είναι η ανάγκη για προηγούμενη γνώση των ειδικών για τον όγκο παραλλαγών. Υπάρχουν προκλήσεις στη μετάφραση ενός ακριβούς και αξιόπιστου πάνελ κυκλοφορούντων miRNAs σε κλινικό περιβάλλον, λόγω της χαμηλής τους ποσότητας, των διαφορών στο μέγεθος της κοόρτης, στη συλλογή, στον τύπο του δείγματος, στην επεξεργασία και στην τρέχουσα αδυναμία ανίχνευσης νέων miRNAs. Δεν υπάρχει επίσης σημαντική επικάλυψη στα πάνελ miRNA στις διάφορες μελέτες, κάτι το οποίο αντικατοπτρίζει την περίπλοκη έκφραση των miRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Όσον αφορά στα εξωσώματα, απαιτείται η τυποποίηση της εκχύλισής τους, η οποία μπορεί να αποκλείσει προσμίξεις, όπως σωματίδια λιποπρωτεϊνών και συμπλέγματα πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι μέθοδοι πρέπει να είναι γρήγορες και βολικές για εφαρμογή στην κλινική πράξη. Ωστόσο, η τρέχουσα μέθοδος απομόνωσης για τα εξωσώματα είναι η υπερφυγοκέντρωση, η οποία είναι κουραστική.[83]

Στη χρήση της πλατφόρμας Cellsearch, η αποτελεσματικότητα της ανάλυσης εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης των αντιγόνων στόχου EpCAM και κυτταροκερατίνης, τα οποία μπορεί να ποικίλλουν αξιοσημείωτα και επίσης το EpCAM ρυθμίζεται προς τα κάτω από διαδικασίες όπως το EMT.

Συνοψίζοντας, παρά την πρόσφατη τεχνολογική πρόοδο, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλές προκλήσεις που εμποδίζουν την κλινική εφαρμογή των τεχνολογιών που βασίζονται στην μικρορευστομηχανική. Πολλά τσιπ χωρίς αυτοματοποίηση, απαιτούν χειροκίνητα παρασκευάσματα δειγμάτων, κάτι το οποίο δυσκολεύει την εφαρμογή τους σε κλινικές συνθήκες. [85]

Παρόλα αυτά, προηγμένες τεχνικές όπως η NGS, μπορούν να ανιχνεύσουν εξαιρετικά αραιωμένα προϊόντα όγκου. Μόλις καθιερωθούν τυπικές και εφικτές μέθοδοι, αυτές οι τεχνολογίες ωφελούν τόσο τους ασθενείς όσο και τους κλινικούς γιατρούς, καθώς είναι σχετικά φθηνές και μη επεμβατικές για τη διάγνωση και την παρακολούθηση καρκίνων πρώιμου σταδίου. Τέλος, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ο συνδυασμός διαφορετικών συστατικών του όγκου, δηλαδή προσεγγίσεις πολλαπλής ωμικής, προκειμένου να ικανοποιηθεί η ανάγκη αυτή στην κλινική πράξη. [83] (εινόνες 19 και 20)



Εικόνα 19: Μέθοδοι ανίχνευση κυκλοφορούντων βιοδεικτών σε σχέση με την φύση του βιοδείκτη καθώς και σε σχέση με το είδος της ανάλυσης. (Προσαρμοσμένο από: "Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection" (Soda et al., 2019). Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine, 7(43), 6670–6704. <https://doi.org/10.1039/c9tb01490j>)

Detection Method	Biomarker
RT-qPCR/ digital PCR	CTCs, ctDNA, miRNA, lncRNA, proteins
RareCyte system	CTCs
CellSearch system	CTCs, CECs
CytoSorter system	CTCs
CellSeed system	CTCs
EpiSpot	CTCs, proteins
WGBS	ctDNA, proteins
NGS	CTCs, ctDNA, miRNA
Microarray	miRNA
NanoString nCounter	miRNA, EVs
miRNA-seq	miRNA
MS	EVs, cellular metabolites, proteins
ELISA	CTCs, Evs, miRNA, proteins
NTA	EVs

Εικόνα 20: Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων βιοδεικτών. Παρουσιάζονται στην πρώτη στήλη οι μέθοδοι και στη δεύτερη στήλη οι αντίστοιχοι ανιχνευόμενοι βιοδείκτες. (Προσαρμοσμένο από "Circulating tumor biomarkers in early-stage breast cancer: characteristics, detection, and clinical developments" (Qiu et al., 2023). *Frontiers in Oncology*, 13, 1288077.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1288077>)

3.1.3 ΑΞΙΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

Ο όρος «Υγρή Βιοψία» (LB), εισήχθη για πρώτη φορά το 2013 σε σχέση με την ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) σε ασθενείς με καρκίνο και στη

συνέχεια επεκτάθηκε σε νουκλεϊκά οξέα χωρίς κύτταρα (cfNAs) στο αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά. Επιπλέον, τα cfNAs περιλαμβάνουν κυκλοφορούν DNA χωρίς κύτταρα (cfDNA), εξωσώματα, microRNAs (miRNAs), άλλα μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNAs) και κυκλοφορούντα μεταγραφήματα γονιδίων (cfRNA) η απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από τους περισσότερους καρκίνους σε οποιοδήποτε στάδιο της νόσου.

Η μελέτη της υγρής βιοψίας, άνοιξε την προοπτική μιας μη επεμβατικής μεθόδου διάγνωσης και χαρακτηρισμού όγκων, η οποία έχει εφαρμοστεί στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου, στον εντοπισμό θεραπευτικών στόχων και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία για ιατρική ακριβείας, όπως καθώς και η αποκάλυψη μηχανισμών εξέλιξης της νόσου. [101] Αυτή η μέθοδος παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την παρουσία κακοήθειας, την πρόοδο της νόσου και την απόκριση στις θεραπείες, χωρίς να απαιτείται η επεμβατική λήψη ιστού, όπως συμβαίνει στις παραδοσιακές βιοψίες. Σημαντικό πλεονέκτημα της υγρής βιοψίας είναι η δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, συμβάλλοντας στην εξατομίκευση των θεραπευτικών προσεγγίσεων.

3.1.3.1 ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

Η ροή εργασιών της ανάλυσης LB (Liquid Biopsy), είναι ένας πολύπλοκος συνδυασμός πολλών βημάτων, τα οποία δεν έχουν ακόμη φθάσει σε πλήρη τυποποίηση και μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον υπό μελέτη βιοδείκτη. Επιπλέον, η προαναλυτική φάση μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το υπό διερεύνηση βιορευστό. Η διαδικασία ξεκινά με τη φάση της αιμοληψίας, η οποία μπορεί να απαιτήσει τη σταθεροποίηση του δείγματος και περιλαμβάνει αποθήκευση και μεταφορά. Αυτή η φάση είναι κοινή για όλους τους υπο ανίχνευση κυκλοφορούντες βιοδείκτες, ενώ οι επόμενες φάσεις περιλαμβάνουν ροές εργασίας διαφορετικής πολυπλοκότητας, με βάση την φύση και τη μέθοδο ανίχνευσης του βιοδείκτη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για διαχωρισμό του αίματος και εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος εάν ο στόχος της μελέτης είναι η ανάλυση των cfNAs. Εναλλακτικά, απαιτείται μια φάση εμπλουτισμού/απομόνωσης εάν το αντικείμενο της ανάλυσης περιέχεται σε κύτταρα ή κυστίδια που προέρχονται από όγκο (CTCs ή εξωσώματα) πριν από ένα βήμα χρώσης/απεικόνισης ή την εξαγωγή βιομορίων από τα εμπλουτισμένα παρασκευάσματα.

Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι η προαναλυτική φάση για την ανάλυση LB δεν μπορεί να οριστεί μοναδικά και ότι ο όρος αναφέρεται σε πολλές διαφορετικές διαδικασίες, όχι μόνο με βάση το υπόστρωμα επιλογής (πλάσμα, καρκινικά κύτταρα ή κυστίδια) αλλά και με βάση τη μέθοδο ανίχνευσης που θα πραγματοποιηθεί. Κατά συνέπεια, μπορεί να διατυπωθεί ένας προφανής αλλά χρήσιμος ορισμός της προαναλυτικής ροής εργασιών, συμπεριλαμβανομένων όλων των φάσεων που προηγούνται της αναλυτικής εξέτασης. Εδώ, τα cfNAs αναφέρονται ως νουκλεϊκά οξέα που λαμβάνονται από δείγματα πλάσματος ή ορού (χωρίς φάση προ-εμπλουτισμού), ενώ τα νουκλεϊκά οξέα που σχετίζονται με κύτταρα ή κυστίδια θα θεωρούνται ότι λαμβάνονται από ένα στάδιο εμπλουτισμού και/ή απομόνωσης, όπως συνήθως εκτελείται για τη διερεύνηση νουκλεϊκών οξέων σε εξωσώματα και CTCs.

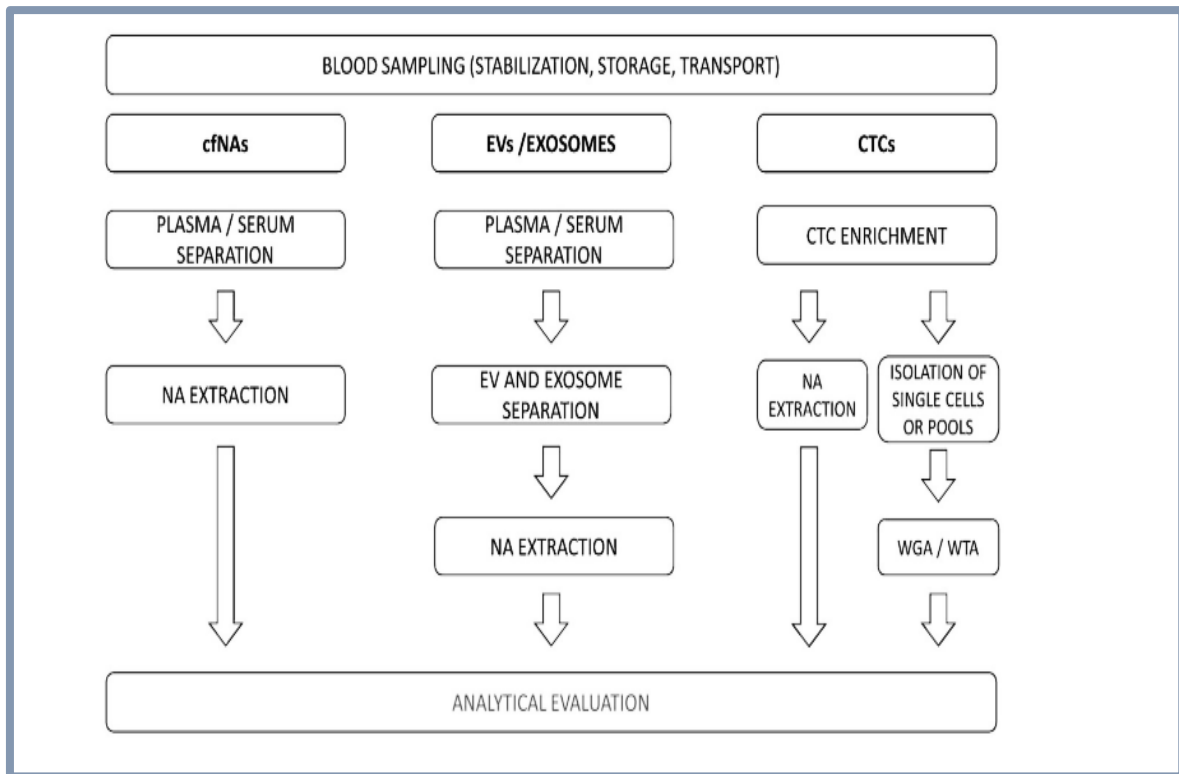
Κατά την προαναλυτική διαδικασία είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

Προετοιμασία δείγματος: Η σωστή συλλογή και επεξεργασία του βιολογικού υγρού είναι κρίσιμη για την απομόνωση των βιοδεικτών.

Επιλογή μεθόδων ανάλυσης: Η χρήση κατάλληλων τεχνικών, όπως η PCR, η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) ή η κυτταρομετρία ροής, εξαρτάται από τον τύπο του βιοδείκτη και τον σκοπό της ανάλυσης.

Ποιοτικός έλεγχος: Η διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων απαιτεί την εφαρμογή ελέγχων ποιότητας σε κάθε στάδιο της διαδικασίας.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων: Η σωστή ερμηνεία των δεδομένων είναι απαραίτητη για την κλινική τους εφαρμογή, λαμβάνοντας υπόψη πιθανούς περιορισμούς και παραμέτρους που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. **(εικόνα 21)**



Εικόνα 21: Προαναλυτική διαδικασία αναλόγως του προς ανάλυση βιοδείτη καθώς και της ακολουθούμενης αναλυτικής μεθόδου. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει απομόνωση και εμπλουτισμό με διάφορες μεθόδους. (Προσαρμοσμένο από: "The pre-analytical phase of the liquid biopsy" (Salvianti et al., 2020). New Biotechnology, 55, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.006>)

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα βασικά προαναλυτικά βήματα στα οποία πρέπει να δοθεί προσοχή αναλόγως της φύσης του βιοδείκτη:

CTCs: Όσον αφορά τα CTCs, οι κύριες προαναλυτικές κρίσιμες πτυχές, σχετίζονται με την ευθραυστότητά τους. Στην πραγματικότητα, τείνουν να αποικοδομούνται μέσα σε λίγες ώρες όταν συλλέγονται σε τυπικούς σωλήνες συλλογής αίματος (π.χ. σωλήνες που περιέχουν EDTA). Επιπλέον, τα CTCs είναι σπάνια, ειδικά στα αρχικά στάδια της νόσου, και ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλή συχνότητα. Απαιτούνται τυποποιημένα προαναλυτικά πρωτόκολλα για τη διασφάλιση αξιόπιστων και αποτελεσματικών μεθόδων για την ανίχνευση CTC καθώς και για τον μοριακό τους χαρακτηρισμό.

Συλλογή δειγμάτων. Η πρώτη προαναλυτική πτυχή είναι κοινή σε όλες τις αναλύσεις CTCs. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το αίμα συλλέγεται σε σωλήνες K3EDTA,

απαιτώντας ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ της αιμοληψίας και της επεξεργασίας του δείγματος, προκειμένου να αποφευχθεί η κυτταρική λύση. Οι θρόμβοι (ή μικροθρόμβοι) παρεμβαίνουν σε δύο από τις κύριες κατηγορίες διαδικασιών εμπλουτισμού CTCs (διήθηση και ανοσομαγνητική σύλληψη).

Εμπλουτισμός: Είναι μια προαναλυτική μεταβλητή που επηρεάζει την καταμέτρηση CTCs. Ο εμπλουτισμός, αποτελείται από μια ποικιλία μεθόδων που βασίζονται σε δύο κύριες προσεγγίσεις: **1)** Τον εμπλουτισμό που βασίζεται στην αναγνώριση των πρωτεϊνών-δείκτη και **2)** Τον εμπλουτισμό που βασίζεται στις φυσικές ιδιότητες των κυττάρων. Η επιλογή μεθόδου εμπλουτισμού μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα, επιλέγοντας διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων.

Μοριακός χαρακτηρισμός: Η ανάλυση εμπλουτισμένων δειγμάτων CTCs απαιτεί ένα βήμα απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος που μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα. Δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα ειδικές μελέτες για την εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος από CTCs, αλλά ενόψει της κλινικής εφαρμογής του χαρακτηρισμού τους, οι έρευνες για αυτό θα ήταν ευπρόσδεκτες. Για τον μοριακό χαρακτηρισμό μεμονωμένων CTCs, πρέπει να ληφθούν υπόψη δύο πρόσθετα βήματα: **(i) απλή απομόνωση**, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με χειροκίνητες, χρονοβόρες, χαμηλής απόδοσης μεθόδους, ή πολύ ακριβά εξελιγμένα όργανα όπως όπως το σύστημα DEPArray και οι μικρορευστικές συσκευές. **(ii) ενίσχυση του γονιδιώματος/μεταγραφώματος** των μεμονωμένων κυττάρων.

cfDNA: Το πρώτο θέμα που πρέπει να εξεταστεί είναι η **επιλογή του προς ανάλυση βιορευστού**. Αν και η πλειονότητα των μελετών για το cfDNA πραγματοποιούνται στο πλάσμα, αρκετοί συγγραφείς χρησιμοποιούν ορό ως πηγή cfDNA. Επιπλέον, ο ορός φαίνεται να έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε cfDNA, αλλά έχει αποδειχθεί ότι αυτό μπορεί να αποδοθεί στη μόλυνση του γονιδιωματικού DNA που προκαλείται από τη λύση των λευκοκυττάρων κατά τη διαδικασίθα πήξης.

Επιλογή σωλήνων συλλογής αίματος: Η επιλογή σωλήνων συλλογής αίματος μπορεί να έχει μεγάλο αντίκτυπο στην αναλυτική φάση. Οι πιο συνηθισμένες συσκευές συλλογής είναι οι σωλήνες που περιέχουν K2/K3EDTA, οι οποίοι απαιτούν ένα μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ της αιμοληψίας και της επεξεργασίας του δείγματος, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η λύση των λευκοκυττάρων που συμβαίνει μετά τη λήψη προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του DNA με την πάροδο του χρόνου. Μελέτες σχετικά με τη

συγκέντρωση DNA σε σωλήνες K3EDTA αναφέρουν μη ομοιόμορφα αποτελέσματα σχετικά με τη σταθερότητα αυτής της παραμέτρου για έως και 4, 6 και 8 ώρες από τη συλλογή ή ακόμη και για 24 ώρες, καθιστώντας προφανές ότι η σταθεροποίηση της αιμοληψίας είναι προϋπόθεση για την αναπαραγωγικότητα των αναλυτικών δεδομένων. Διαφορετικές συσκευές συλλογής με συντηρητικά αντιδραστήρια είναι πλέον διαθέσιμες, μεταξύ των οποίων οι σωλήνες BCT DNA χωρίς κύτταρα (Streck, La Vista, Nebraska, Η.Π.Α.), έχουν αποδειχθεί ότι αποτρέπουν τη μόλυνση του γονιδιωματικού DNA κατά την αποθήκευση του δείγματος για έως και 14 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι χρόνοι αποθήκευσης πλάσματος πριν από την εκχύλιση του cfDNA. Έχουν σημασία μεταξύ των προαναλυτικών παραγόντων. Στην πραγματικότητα, ενώ η αποθήκευση στο πλάσμα για 2 εβδομάδες στους -80°C και για 4 εβδομάδες στους -20°C προφανώς δεν έχει καμία επίδραση στην εκχύλιση του cfDNA, καθώς και σε τρεις κύκλους κατάψυξης-απόψυξης, μεγαλύτερες περίοδοι αποθήκευσης στους -80°C (5-21 μήνες) μπορεί να προκαλέσουν μειωμένη απόδοση cfDNA.

Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης: Είναι ένας από τους σημαντικότερους προαναλυτικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις αναλύσεις cfDNA. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων που βασίζονται σε διαφορετικές αρχές, όπως η απομόνωση φάσης, οι στήλες περιστροφής με μεμβράνη πυριτίου και τα μαγνητικά σφαιρίδια και είναι δύσκολο να επιλεγεί η καλύτερη απόδοση. Η κύρια πρόκληση είναι η χαμηλή ποσότητα cfDNA που κυκλοφορεί στο αίμα, που απαιτεί πολύ υψηλή ευαισθησία.

.cfRNA: Παραγοντες που επηρεάζουν την χρήση σε κλινικό περιβάλλον είναι αποικοδόμηση του cfRNA και το αυξανόμενο RNA υποβάθρου που προέρχεται από λευκοκύτταρα που μπορεί να εμποδίσει την ανίχνευση στόχων που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα.

Επιπλέον, προαναλυτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν παράγοντες που σχετίζονται με το δείγμα, όπως η επιλογή μήτρας (ορός ή πλάσμα), η αιμόλυση, η μόλυνση από αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα και ο χρόνος συλλογής δείγματος, η επεξεργασία του, οι συνθήκες αποθήκευσης και οι μέθοδοι απομόνωσης.

Σωλήνες συλλογής αίματος: Αλλαγές στη σταθερότητα του cfRNA μπορεί να συμβούν κατά την επεξεργασία, την αποστολή και την αποθήκευση του αίματος. Έτσι, το πρώτο βήμα προς την τυποποίηση των προαναλυτικών μεταβλητών είναι η σταθεροποίηση του

δείγματος τη στιγμή της αιμοληψίας. Έχουν αναπτυχθεί ειδικοί σωλήνες συλλογής αίματος που περιέχουν αντιδραστήρια που αναστέλλουν τη RNase και εμποδίζουν τη μη ειδική απελευθέρωση του RNA υποβάθρου.

Αξιολόγηση της ακεραιότητας του cfRNA μετά την απομόνωση: Είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η ακεραιότητα του cfRNA μετά την απομόνωση προκειμένου να φτάσουμε σε αξιόπιστα αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης, κάτι που δεν είναι εφικτό με συμβατικές μεθόδους, π.χ. τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, η οποία δεν έχει την ευαισθησία να ανιχνεύσει χαμηλές ποσότητες κυκλοφορούντος cfRNA.

Είναι διαθέσιμες επίσης, πολλές μέθοδοι για την εξαγωγή των κυκλοφορούντων miRNAs, μεταξύ των οποίων οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τεχνικές με βάση τη φαινόλη που σχετίζονται ή όχι με στήλες πυριτίου και τεχνικές χωρίς φαινόλη μαζί με στήλες για απομόνωση RNA.

Οι προαναλυτικές πτυχές που αξίζει να διερευνηθούν σχετικά με τα lncRNAs, περιλαμβάνουν την **πηγή των lncRNAs (πλάσμα/ ορό)**, τη σημασία της εξάλειψης των κυτταρικών συστατικών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ποσοτικοποίησή τους και τις μεθόδους εκχύλισης. Δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμες συστηματικές μελέτες που να συγκρίνουν διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης.

ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ: Ο χαρακτηρισμός και η απομόνωση των εξωσωμάτων είναι τεχνικά προκλητική: Οι προαναλυτικές μεταβλητές (συλλογή δειγμάτων, αποθήκευση, μεταφορά, απομόνωση εξωσωμάτων, RNA/πρωτεΐνη) μπορεί να επηρεάσουν το μέγεθος, τη μορφολογία, την απόδοση και τη σταθερότητα των εξωσωμάτων καθώς και αναλυτικές μεθόδους για τον χαρακτηρισμό τους για μεταγενέστερες εφαρμογές όπως μελέτες βιοδεικτών, προφίλ miRNA/mRNA, πρωτεομική και/μεταβολομική, λειτουργικές μελέτες (π.χ. σηματοδότηση κυττάρων-κυττάρων) και βασική βιολογική έρευνα (π.χ. ρόλος στην ογκογένεση).

Τα μη-EV RNAs είναι ασταθή στο αίμα λόγω της έκθεσης σε RNases και τα προφίλ RNA μπορεί να αλλάξουν σημαντικά μετά τη συλλογή αίματος. Αντίθετα, το EV-RNA, ως μέρος του φορτίου των κυστιδίων, προστατεύεται από την ενζυμική δραστηριότητα. Τα EV RNAs, σε συνδυασμό με μη EV RNAs, είναι ένας πολύ ενδιαφέρον στόχος για ανάλυση LB. Η περιεκτικότητα σε RNA των Evs, έχει αναλυθεί χρησιμοποιώντας RNA-seq, συστοιχίες υβριδισμού και άλλες μεθόδους, αποκαλύπτοντας το πλήρες φάσμα των

προηγούμενως γνωστών μεταγραφών, συμπεριλαμβανομένων των miRNAs και άλλων ειδών μικρών ncRNAs όπως τα Piwi-αλληλεπιδρώντα RNAs (piRNAs) καθώς και mRNAs, tRNAs, lncRNAs και rRNAs.

Συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία δειγμάτων: Η συλλογή υγρών που περιέχουν EVs πρέπει να είναι ήπια για να ελαχιστοποιηθεί η κυτταρική λύση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση κυστιδίων από ενδοκυτταρικά διαμερίσματα με συνολική μείωση της καθαρότητας του δείγματος. Επιπλέον, η αποθήκευση δειγμάτων αίματος μετά τη φλεβοτομή αυξάνει τη συγκέντρωση εξωσωμάτων στο πλάσμα με την πάροδο του χρόνου, υποδεικνύοντας την απελευθέρωση εξωσωμάτων από τα κύτταρα του αίματος κατά την αποθήκευση. Ο χρόνος αποθήκευσης πριν από τη φυγοκέντρωση, η μεταφορά (ιδιαίτερα η ανακίνηση του δείγματος και η φυσική καταπόνηση), η επιλογή του πρωτοκόλλου φυγοκέντρωσης και η θερμοκρασία αποθήκευσης αναφέρεται ότι επηρεάζουν την ανάλυση κατάντη.

Απομόνωση εξωσωμάτων: Το απομονωμένο παρασκεύασμα EV γενικά περιέχει ένα μείγμα (συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων, μικροκυστιδίων και αποπτωτικών σωμάτων), αλλά δεν έχει καθιερωθεί μια ταξινόμηση δείκτη για τη διάκριση των υποομάδων EVs. Δεν έχει επιτευχθεί συναίνεση σχετικά με μια μέθοδο «χρυσού προτύπου» για την απομόνωση και/ή τον καθαρισμό των εξωσωμάτων και την παροχή παρασκευασμάτων με σημαντική απόδοση αξιόπιστης ποιότητας. η επιλογή μπορεί να εξαρτάται τόσο από τον συγκεκριμένο σκοπό όσο και από τις κατάντη εφαρμογές που χρησιμοποιούνται επιπλέον του όγκου του δείγματος και του επιθυμητού βαθμού καθαρότητας.

Μέθοδοι υπερφυγοκέντρωσης: Αυτές οι τεχνικές (σε συνδυασμό ή όχι με διαβαθμίσεις πυκνότητας) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και τυποποιημένες διαδικασίες. Οι μέθοδοι (με τις οποίες μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία μεγάλοι όγκοι δειγμάτων) επιτρέπουν τη λήψη παρασκευασμάτων εμπλουτισμένων με μεγάλα EVs (κυρίως μικροκυστίδια) και μικρά EVs (κυρίως εξωσώματα) με τη χρήση διαφορετικών φυγόκεντρων δυνάμεων. Επιπλέον, προκειμένου να αυξηθεί η καθαρότητα των απομονωθέντων EVs, μπορεί να πραγματοποιηθεί υπερφυγοκέντρωση σε διαβαθμίσεις πυκνότητας σακχαρόζης ή ιδιοξανόλης. Με αυτή τη διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί η εξάλειψη μη EV υλικού ή θραυσμάτων λόγω βλάβης (σπάσιμο κυστιδίων, σύντηξη ή συσσώρευση κατά την υπερφυγοκέντρωση). Παρόλο που μπορεί να ληφθεί μεγάλος

αριθμός εξωσωμάτων, η υπερφυγοκέντρωση παρουσιάζει αρκετούς τεχνικούς περιορισμούς, όπως οι κατάλληλες απαιτήσεις εξοπλισμού, η χρονοβόρα ροή εργασίας και η έλλειψη αυτοματισμού.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ:

Α) Μέθοδοι που βασίζονται στις διαφορές μεγέθους (ή μοριακού βάρους) μεταξύ διαφορετικών τύπων EVs. Εφαρμόζεται χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) και υπερδιήθηση. Συγκεκριμένα, το SEC έχει χαμηλό αντίκτυπο στην ακεραιότητα των EVs, επιτρέπει τη διατήρηση της λειτουργίας τους και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την ανάλυση των EVs πλάσματος. Η υπερδιήθηση είναι γρήγορη και δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό. Τόσο η υπερδιήθηση όσο και η SEC μπορούν να αφαιρέσουν ρύπους (π.χ. πρωτεΐνες) και μπορούν να εφαρμοστούν κατόπιν άλλων μεθόδων εμπλουτισμού.

Β) Μέθοδοι ανοσοσυγγένειας: Οι μέθοδοι ανοσοσυγγένειας διαχωρίζουν ειδικά τα EVs μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντιγόνων της μεμβράνης και ακινητοποιημένων αντισωμάτων ή υποδοχέων μεμβράνης και των προσδεμάτων τους.

Γ) Μέθοδοι που βασίζονται σε μικρορευστά: Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούν συσκευές μικρορευστομηχανικής που βασίζονται τόσο στις φυσικές όσο και στις βιοχημικές ιδιότητες των εξωσωμάτων όπως το μέγεθος και η πυκνότητα.

Ανάλυση ακέραιου εξωσώματος: Η οπτική ταυτοποίηση των εξωσωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί για να επιβεβαιωθεί η παρουσία τους και η καθαρότητα του παρασκευάσματος και συνήθως εκτελείται με ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) και ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA). Η κυτταρομετρία ροής σε συνδυασμό με ειδικά αντισώματα για την ανάλυση υποομάδων εξωσωμάτων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως ποιοτικός έλεγχος. Αυτές οι τεχνικές απαιτούν εξειδικευμένα, ακριβά όργανα και εφαρμόζονται κυρίως σε μελέτες χαρακτηρισμού εξωσωμάτων.

ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΣΕ ΥΓΡΑ ΣΩΜΑΤΟΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ: Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει τη χρήση LBs που βασίζονται σε σωματικά υγρά, π.χ. σάλιο και ούρα, για την ανίχνευση συστατικών του όγκου ή μοριακών δεικτών. Οι LBs που βασίζονται σε βιορευστά εκτός αίματος, δυνητικά προσφέρουν πλεονεκτήματα έναντι του αίματος λόγω των μη επεμβατικών χαρακτηριστικών και της γειννίας με τον όγκο. Η

συλλογή ούρων και σάλιου (τα βιορευστά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά) είναι εντελώς μη επεμβατική, σχετικά ασφαλής, οικονομική και με τις κατάλληλες οδηγίες, μπορεί να πραγματοποιηθεί στο σπίτι χωρίς επαγγελματίες ή ειδικές εγκαταστάσεις. Οι γονιδιακές αλλοιώσεις του όγκου που συνήθως ανιχνεύονται στο ctDNA του πλάσματος έχουν επίσης βρεθεί στο ctDNA των ούρων ασθενών με καρκίνο. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν την πιθανή κλινική συνάφεια της ανάλυσης συγκεκριμένων σωματικών υγρών ανάλογα με την ανατομική θέση του όγκου προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία. Τα σωματικά υγρά χωρίς αίμα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πηγή κυττάρων όγκου που περιέχονται σε ένα ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση του δείγματος. Ορισμένες συσκευές συλλογής με ειδικά συντηρητικά για το ctDNA είναι διαθέσιμες για το σάλιο και τα ούρα. [101]

3.2 ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Η υγρή βιοψία, σε συνδυασμό με εξαιρετικά ευαίσθητες μοριακές τεχνολογίες και προηγμένα πρωτόκολλα βιοπληροφορικής, θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την ενδοογκική ετερογένεια καθώς και τη μοριακή εξέλιξη μιας μακρινής μεταστατικής βλάβης, κάτι που δεν είναι δυνατό για συμβατικές βιοψίες ιστού, λόγω του ότι το δείγμα μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικό όλων των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, είναι δυνατή η έγκαιρη διάγνωση και διαλογή, η πρόβλεψη της πρόγνωσης, η πρώιμη ανίχνευση υποτροπής σε εντοπισμένο και τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού, η ταυτοποίηση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (MRD) και η διαχρονική παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου καθώς και η παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Παρόλα αυτά, απαιτούνται επείγοντως πιο ευαίσθητες μέθοδοι ανίχνευσης για τη βελτίωση της κλινικής εφαρμογής της υγρής βιοψίας. Τα χαμηλά επίπεδα CTCs και ctDNA στον καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου, μαζί με την έλλειψη ctDNA που εκκρίνεται από ορισμένους όγκους, μπορεί να περιπλέξει περαιτέρω την ανίχνευση. Επιπλέον, τα γενετικά πρότυπα σε πρωτογενείς όγκους και μεταστάσεις ποικίλλουν

σημαντικά από ασθενή σε ασθενή. Σε αυτή την ανασκόπηση, παρουσιάζονται οι τρέχουσες αναπτυγμένες τεχνικές ανίχνευσης υγρής βιοψίας στον καρκίνο του μαστού, εστιάζοντας κυρίως σε πρόσφατες μελέτες.[83]

Εξωσώματα και εξωκυτταρικά κυστίδια (Evs): Τα EVs είναι πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες στην υγρή βιοψία. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της κλινικής εγκυρότητάς τους στον καρκίνο του μαστού. Αξιοσημείωτα, έχει αποδειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν περισσότερα εξωσώματα από τα φυσιολογικά κύτταρα ως απόκριση σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η υποξία στο μικροπεριβάλλον του όγκου.[102] Επιπλέον, τα εξωσώματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού περιέχουν ξεχωριστό RNA και πρωτεΐνη από υγιείς δότες. [103]

Τα Evs αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο πρόσφατους βιοδείκτες στον τομέα της υγρής βιοψίας. Συνεπώς, η κλινική εφαρμογή των EVs είναι ακόμη ανώριμη και δεν υπάρχει τυπική μέθοδος ανίχνευσης για τον καρκίνο του μαστού. Απαιτούνται περισσότερες κλινικές μελέτες για να επιβεβαιωθεί η κλινική συνάφεια των Evs και να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα των αναλύσεων που βασίζονται σε EVs.[104] Σε αντίθεση με τα CTCs, τα οποία ως επί το πλείστον απελευθερώνονται στο αίμα, τα EVs υπάρχουν σε μια ποικιλία σωματικών υγρών και μπορούν να εμπλουτιστούν πιο εύκολα για μεταγενέστερη ανάλυση. Έχει αποδειχθεί ότι τα EVs, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου και ξεκινούν το σχηματισμό της θέσης προμετάστασης, παίζουν ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία. Τα κυστίδια που προέρχονται από όγκο φέρουν επίσης το μοριακό αποτύπωμα που αντανακλά τη γενετική κατάσταση των γονικών καρκινικών κυττάρων. Τα EVs έχουν αποδειχθεί ως διαγνωστικοί, προγνωστικοί και θεραπευτικοί παράγοντες σε κλινικές συνθήκες και έχουν επίσης συσχετιστεί με αντοχή στα φάρμακα. [105]

Ο συνδυασμός διαφορετικών τεχνικών ανίχνευσης σε μια πλατφόρμα μικρορευστών θα μπορούσε να επιτύχει εξατομικευμένη βοήθεια για την κλινική εφαρμογή των EVs στον καρκίνο του μαστού. Με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας, οι μικρορευστικές συσκευές αναμένεται να αποκτήσουν καλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία.[83]

miRNAs: Για την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού, τα miRNAs ερευνήθηκαν επίσης ως προγνωστικοί βιοδείκτες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Χρησιμοποιώντας πάνελ

Exiqon miRCURY microRNA RT-PCR, οι Huo et al. διερεύνησε τα επίπεδα έκφρασης 11 miRNAs μεταξύ ασθενών με, και χωρίς υποτροπή, και εντόπισε επτά miRNAs, τέσσερα ρυθμιζόμενα προς τα πάνω (miR-21-5p, miR-194-5p, miR-205-5p και miR-375) και τρεις μειωμένες ρυθμίσεις (miR-376c-3p, miR382-5p και miR-411-5p) για υποτροπιάζοντες ασθενείς. [106]

Οι Madhavan et al. καθιέρωσε ένα προγνωστικό πρότυπο πάνελ miRNA (PROMPT), που περιλαμβάνει 16 miRNA, δηλαδή miR-141, miR-144, miR-193b, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-210, miR-215, miR-365, miR-375, miR-429, miR-486-5p, miR-801, miR-1260 και miR-1274a, που συσχετίζονται με OS και RFS. Επομένως, αυτά τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για μεταστατικό καρκίνο του μαστού, που μπορούν να βοηθήσουν στη λήψη της απόφασης για τη θεραπεία. [107]

Οι Shimomura et al. ανέλυσε τους ορούς 1280 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού και έδειξε ότι ο συνδυασμός πέντε miRNAs (miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p και miR-6875-5p) ήταν ικανός για την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού με 97,6% ευαισθησία και 82,9% ειδικότητα. [108] Ομοίως, οι Cui et al. ανέλυσε εκ νέου το σύνολο δεδομένων από τους Shimomura et al. και αποκάλυψε μια ομάδα τριών miRNAs (miR-1246, miR-6756-5p και miR-8073), προκειμένου να δημιουργηθεί ένα μοντέλο καταρράκτη νευρωνικών δικτύων (cascade neural network model) το οποίο μπορεί να διαγνώσει με επιτυχία τον καρκίνο του μαστού. Έδειξε 97,1% ακρίβεια σε 429 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 895 υγιείς μάρτυρες (AUC = 0,971, ευαισθησία = 96,7%, ειδικότητα = 97,2%). Επομένως, αυτές οι μελέτες απέδειξαν τη σκοπιμότητα του miRNA στην υγρή βιοψία για έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. [109]

Στη μελέτη των Rodríguez-Martínez et al., η έκφραση του miRNA σε 53 ασθενείς μετρήθηκε πριν και μετά τη νεοεπικουρική θεραπεία, δείχνοντας ότι τα επίπεδα των κυκλοφορούντων εξωσωματικών miR-21 και miR-105 ήταν σημαντικά υψηλότερα στους μεταστατικούς ασθενείς, σε σύγκριση με τους μη μεταστατικούς, καθώς και στους μάρτυρες. [110] Μια πρόσφατα αναπτυγμένη τεχνική για την ανίχνευση του miRNA ονομάζεται φασματοσκοπία Raman ενισχυμένης επιφάνειας (SERS) με νανοκολώνες Ag Ag (SMGAPs). Η ηλεκτροχημική αναγωγή στους προκαταμεμημένους σπόρους νανοσωματιδίων χρυσού 40 nm (sGNP) χρησίμευσαν ως ικρίωματα για την ανάπτυξη ιόντων αργύρου και μια δομή ασημιού σε σχήμα νανοκολώνας αναπτύχθηκε με επιτυχία

στην επιφάνεια του υποστρώματος του χρυσού. Τα miR-21 και miR-155 εφαρμόστηκαν ως διαγνωστικός στόχος SERS. Τα όρια ανίχνευσης κάθε επισημασμένου στόχου ήταν 451 zmol και 1,65 amol, αντίστοιχα.[83]

ctDNA: Οι Rodriguez et al. αξιολόγησε τη χρησιμότητα του ctDNA στη διάγνωση ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού συγκρίνοντας τις μεταλλάξεις PIK3CA και TP53 βιοψιών ιστού και δειγμάτων πλάσματος χρησιμοποιώντας τεχνολογία ρμωσμένου ενισχυτή NGS TruSeq (Illumina SafeSEQ (Sysmex Inostics) που βασίζεται σε αμπλικόν και πάνελ χαμηλής εισαγωγής προσαΠαραδόξως, ανακάλυψαν ότι ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA του πλάσματος). επέτρεψε την ταυτοποίηση επιπρόσθετων μεταλλάξεων TP53 και PIK3CA στο ctDNA που δεν ανιχνεύθηκαν στον προσδιορισμό αλληλουχίας βιοψίας όγκου.

Η μελέτη αυτή υποδεικνύει ότι ανάλυση του ctDNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση του πρώιμου καρκίνου του μαστού και υπογραμμίζει τη σημασία του ctDNA του πλάσματος ως ακριβούς εναλλακτικής λύσης στη βιοψία ιστού. [111]

Οι Bartnykaite et al. διερεύνησε τη συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNPs) στο MDM2 (rs2279744, rs937283, rs937282) και MDM4 (rs1380576, rs4245739) και του καρκίνου του μαστού του σταδίου I–II. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι γονότυποι rs937283 AG, rs937282 CG, rs1380576 CC και rs4245739 AA συνδέθηκαν με τον καρκίνο του μαστού HR+ και πρότειναν ότι μπορεί να είναι χρήσιμοι διαγνωστικοί βιοδείκτες.[112] Οι Zhang et al. ανέπτυξε μια νέα μεθοδολογία για την ανίχνευση του ctDNA σχεδιάζοντας ένα πάνελ βασισμένο σε δεδομένα COSMIC, που καλύπτει 136 γονίδια και ενσωματώνεται με την αναφορά απεικόνισης μαστού και την ταξινόμηση συστήματος δεδομένων (BI-RADS). Είναι αξιοσημείωτο ότι η προγνωστική αξία αυτού του συνδυασμού βελτιώθηκε από 74,2% σε 92%. [113]

Επιγονιδιωματικές μελέτες έχουν επίσης αναφέρει τη χρήση συστοιχιών Illumina για την προοπτική αξιολόγηση δειγμάτων με στόχο την αποσαφήνιση της συσχέτισης μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA του αίματος και του κινδύνου BC, όπως στη μελέτη Sister Study και στη μελέτη EPIC-Italy . Στη δοκιμή I-SPY291 (NCT 27406347), οι ερευνητές ανέλυσαν δείγματα πλάσματος από ασθενείς με EBC πριν από το NAC και μπόρεσαν να χρησιμοποιήσουν εξαιρετικά βαθιά αλληλουχία ολόκληρων εξονίων για να ανιχνεύσουν

16 ειδικές για τον ασθενή μεταλλάξεις στο ctDNA, ενώ αποκάλυψαν επίσης ότι η δυναμική κάθαρσης του ctDNA σχετίζονται με τις απαντήσεις NAC. ([69])

Οι McDonald et al. ανέπτυξε μια στοχευμένη ψηφιακή αλληλουχία (TARDIS) του ctDNA, που μπορεί να είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για την πρόβλεψη της pCR (pathological Complete Response) σε νεοεπικουρική θεραπεία σε πρώιμους και τοπικά προχωρημένους καρκίνους του μαστού. Το TARDIS χρησιμοποιεί ταυτόχρονο βαθύ προσδιορισμό αλληλουχίας ειδικών για τον ασθενή πάνελ, που αποτελούνται από πολλαπλές μεταλλάξεις όγκου ως βιοδείκτες ctDNA για την παρακολούθηση της νόσου στο προεγχειρητικά, καθώς και για την ανίχνευση της ελάχιστης υπολοιπούμενης νόσου (MRD -Minimal Residual Disease). Με την εφαρμογή αυτής της ευαίσθητης τεχνολογίας, οι McDonald et al. ανέλυσε το πλάσμα για μεταλλάξεις πριν από τη νεοεπικουρική θεραπεία και ανίχνευσε ctDNA στο 100% των δειγμάτων. Στη συνέχεια, το ctDNA παρακολουθήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία της νεοεπικουρικής θεραπείας και, αναμενόμενα, τα επίπεδα ctDNA ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο, σε σύγκριση με αυτούς που εμφάνισαν pCR. Επομένως, το TARDIS είναι ένα πολλά υποσχόμενο τεστ που καταδεικνύει την κλινική σημασία του ctDNA ως βιοδείκτη για την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία και την ανίχνευση και επιτήρηση MRD στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. [114]

CTCs: Αρκετές έρευνες έδειξαν ότι η απαρίθμηση των CTCs θα μπορούσε να είναι ένα ανεξάρτητο προγνωστικό εργαλείο για ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού, παρά τη σπανιότητά τους στο αίμα ασθενών με EBC. [115]

Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε ότι ο συνδυασμός αλληλουχίας RNA μονοκυττάρου με ανάλυση CTCs επιτρέπει την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων και αλλαγών στους αριθμούς αντιγράφων ογκογονιδίων. Αυτή η ενοποίηση προσφέρει βαθύτερη εικόνα για την ετερογένεια των CTCs και βοηθά στον εντοπισμό διαφορετικών υποτύπων καρκίνου. Ως αποτέλεσμα, ενισχύει την κατανόηση των μοριακών οδών που εμπλέκονται στην εξέλιξη και την πρόγνωση του καρκίνου, επιτρέποντας προβλέψεις για αλλαγές στα χαρακτηριστικά του όγκου και την ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα. Αυτές οι εξελίξεις ανοίγουν νέους δρόμους για την περαιτέρω ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών. [116]

Κλινικά, η αξιολόγηση του αριθμού και των μοριακών χαρακτηριστικών των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες όγκου, οι οποίες είναι πιο ακριβείς, έγκαιρες και σχετικές από την ανάλυση ιστού πρωτοπαθούς όγκου που λαμβάνεται μέσω χειρουργικής επέμβασης. Αυτό παρέχει νέες ιδέες για εξατομικευμένη θεραπεία και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη λήψη κλινικών αποφάσεων. [117]

Η ταχεία πρόοδος των αναλυτικών τεχνολογιών που εστιάζονται στη **μεταβολομική** και οι μελλοντικές προσπάθειες για την ενσωμάτωση αυτών των πλατφορμών, μπορεί να βελτιώσουν την κλινική χρησιμότητα συγκεκριμένων μεταβολιτών ως βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων.

Σε ορισμένες αναφορές, ένας συνδυασμός προσεγγίσεων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και αέριας χρωματογραφίας-τετραπολικής φασματομετρίας μάζας (GC-qMS) έχουν χρησιμοποιηθεί για μεταβολομικές αναλύσεις δειγμάτων ούρων και ιστού μαστού από ασθενείς BC και υγιείς μάρτυρες, αποκαλύπτοντας ότι το αλλοιωμένο γαλακτικό.

Ο μεταβολισμός της βαλίνης, του ασπαρτικού και της γλουταμίνης παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με BC. Jasbi et al. ήταν επίσης σε θέση να διεξάγουν με επιτυχία μεταβολομικές αναλύσεις μέσω μιας στοχευμένης προσέγγισης LC-MS/MS που αποκάλυψε χαρακτηριστικές αλλαγές στον μεταβολισμό αργινίνης/προλίνης, στο μεταβολισμό της τρυπτοφάνης και στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων σε ασθενείς με EBC.

Χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας εκρόφησης/ιονισμού λέιζερ ενισχυμένης με νανοσωματίδια (NPELDI-MS), οι Huang et al. μπόρεσαν να ανιχνεύσουν γρήγορα μεταβολικά αποτυπώματα ορού στον BC, επιτυγχάνοντας υψηλά επίπεδα ακρίβειας (88%) [69]

Συμπεράσματα:

Ο καρκίνος του μαστού, ειδικά στα πρώιμα στάδια, παραμένει μια σημαντική πρόκληση για τη σύγχρονη ιατρική. Η διερεύνηση και η χρήση κυκλοφορούντων βιοδεικτών αποτελούν μία από τις πιο ελπιδοφόρες εξελίξεις, καθώς επιτρέπουν τη μη επεμβατική ανίχνευση, την ακριβή παρακολούθηση και την εξατομικευμένη προσέγγιση στη θεραπεία.

Η ραγδαία πρόοδος της τεχνολογίας, όπως η ανάπτυξη προηγμένων πλατφορμών ανάλυσης και η εξέλιξη της μικρορευστομηχανικής, προσφέρει νέες δυνατότητες για την αναγνώριση μοριακών υπογραφών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αυτή η ταχύτητα στις εξελίξεις δεν αποτελεί μόνο έναν λόγο αισιοδοξίας για τη διαχείριση του καρκίνου του μαστού, αλλά και μια προοπτική που μπορεί να αλλάξει συνολικά το πεδίο της ογκολογίας.

Καθώς οι βιοδείκτες συνεχίζουν να μελετώνται και να ενσωματώνονται στην κλινική πράξη, αναμένεται να συμβάλλουν σε καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών. Το μέλλον της έρευνας στον τομέα αυτό φαίνεται να είναι λαμπρό, προσφέροντας ελπίδα τόσο για την έγκαιρη διάγνωση όσο και για την αποτελεσματική θεραπεία του καρκίνου.

Βιβλιογραφία

1. *New horizon for breast cancer biomarker discoveries: What might the liquid biopsy of nipple aspirate fluidhold?* Ferdinando Mannello. Clinical Applications Volume 11, Issue 9-10 Sep 2017
2. Identification of cell-free circulating epigenomic biomarkers for early diagnosis and response to therapies in breast cancer patients Pooja Ratre Suresh Thareja Pradyumna Kumar. (n.d.). *Mishra International Review of Cell and Molecular Biology*, 30.
3. Hons, M., & Md, E. (2015). *Plastic and reconstructive surgery: Approaches and techniques* Editor(s): Ross D. Farhadieh BSc(Med).
4. Breast Cancer Nursing Care and Management Editor(s): Victoria Harmer RN, BSc (Hons), Diploma (Breast Care). (2010).
5. Breast Anatomy for the Interventionalist Author links open overlay panel Robert A. (2014). *Jesinger MD Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, 17, 3–9.
6. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research Donna T. (2010). *Journal of Midwifery & Women's Health*, 52(6), 543–650.
7. *Fundamentals of Cancer Detection, Treatment, and Prevention* Surya K. (n.d.). 151–177.

8. The molecular pathology of breast cancer progression† Alessandro Bombonati, Dennis C Sgroi First published. (2010). The Journal of Pathology, 265(1).
9. ESMO: Breast Cancer: Guide for Patients – Greek. European Society for Medical Oncology (ESMO): Elżbieta Senkus-Konefka; Fatima Cardoso; Jean-Yves Douillard; Claire Bramley; Francesca Longo και Svetlana Jezdic. ESMO Patient Advocates Working Group (Europa Donna): Tanja Spanic Εκπροσώπους της European Oncology Nursing Society (EONS): Deborah Fenlon και Anita Margulies
10. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΟΠΕ – 9η Έκδοση Ζ. Σαριδάκη, Ν. Τσουκαλάς, Α. Μπούτης, Μ. Νικολάου, Α. Χριστοπούλου Σ. Αγγελάκη, Ε. Σαλούστρος Α. Αρδαβάνης, Μ. Αυγουστίδου, Μ. Γεωργιάδου, Ν. Διαμαντόπουλος, Ε. Ζαΐρη, Γ. Ζαρκαβέλης, Ε. Καραμητρούσης, Στ. Κόκκαλη, Λ. Κοντοβίνης, Η. Κοττέας, Α. Κουμαριανού, Κ. Κουτσούκος, Α. Κυριαζόγλου, Α. Κωνσταντής, Ι. Κωτσαντής, Γ. Λαζαρίδης, Σ. Λέββα, Μ. Λιόντος, Κ. Λόγα, Χ. Μαραγκός , Δ. Μαυρουδής, Ε. Μοιρογιώργου, Ι. Μπουκοβίνας, Ο. Νικολάτου-Γαλίτη, Π. Οικονομοπούλου, Γ. Παππάς, Μ. Παρασκευά, Γ. Πενθερουδάκης, Γ. Ρηγάκος, Γ. Ρίζος, Α. Σκολαρίκη, Α. Τζοβάρας, Ε. Τιμοθεάδου, Κ. Τσαπακίδης, Κ. Τσιγαρίδας, Ε. Φούντζηλα ΑΘΗΝΑ, 2023
11. Elaibi, H. K., Mutlag, F. F., Halvacı, E., Aygun, A., & Sen, F. (2025). Review: Comparison of traditional and modern diagnostic methods in breast cancer. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 242(116258), 116258.
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2024.116258>

12. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures Dharambir Kashyap 1, Deeksha Pal 2, Riya Sharma 3, Vivek Kumar Garg 4, Neelam Goel 5, Deepika Koundal 6, Atef Zaguia 7, Shubham Koundal 4, Assaye Belay 8. (2023). *Assaye Belay 8 BioMed Research International*Received, 5.
13. Screening Stella Winters 1, Charmaine Martin 1, Daniel Murphy 1, Navkiran K Shokar 2 Progress in. (2017). *Molecular Biology and Translational Science*, 151, 1–32.
14. Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review by Sergiusz Łukasiewicz 1ORCID, Marcin Czezelewski 2, Alicja Forma 2ORCID, Jacek Baj 3ORCID, Robert Sitarz 1,3,* and Andrzej Stanisławek 1,4 Cancers. (2021). *Breast Cancer-Epidemiology*, 13(17)
15. De Silva, S., Tennekoon, K. H., & Karunanayake, E. H. (2019). Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 11, 71–80. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S185870>
16. Filippini, S. E., & Vega, A. (2013). Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18(4), 1358–1372. <https://doi.org/10.2741/4185>
17. Yoshimura, A., Imoto, I., & Iwata, H. (2022). Functions of breast cancer predisposition genes: Implications for clinical management. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7481. <https://doi.org/10.3390/ijms23137481>

18. Paul, A., & Paul, S. (2014). The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 19(4), 605–618. <https://doi.org/10.2741/4230>
19. Giordano, A., & Wiley, M. M. P. J. (2011). *Cancer Epigenetics : Biomolecular Therapeutics in Human Cancer by* (Sons, Ed.).
20. Ma, L., Li, C., Yin, H., Huang, J., Yu, S., Zhao, J., Tang, Y., Yu, M., Lin, J., Ding, L., & Cui, Q. (2023). The mechanism of DNA methylation and miRNA in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9360. <https://doi.org/10.3390/ijms24119360>
21. Sawan, C., & Herceg, Z. (2010). Histone modifications and cancer. *Advances in Genetics*, 70, 57–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4>
22. Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Mestanova, V., Franekova, M., Kassayova, M., Bojkova, B., Uramova, S., Zubor, P., Janikova, K., Danko, J., Samuel, S. M., Büsselberg, D., & Kubatka, P. (2019). Fluctuations of histone chemical modifications in breast, prostate, and colorectal cancer: An implication of phytochemicals as defenders of chromatin equilibrium. *Biomolecules*, 9(12), 829. <https://doi.org/10.3390/biom9120829>
23. Current Advances in Breast Cancer Research: a Molecular Approach
Suman, ShankarSuman, Garimaand more Bentham Science Publishers 2020
24. Slaney, C. Y., Rautela, J., & Parker, B. S. (2013). The emerging role of immunosurveillance in dictating metastatic spread in breast cancer. *Cancer Research*, 73(19), 5852–5857. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1642>

25. Göbel, A., Dell’Endice, S., Jaschke, N., Pählig, S., Shahid, A., Hofbauer, L. C., & Rachner, T. D. (2021). The role of inflammation in breast and prostate cancer metastasis to bone. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5078. <https://doi.org/10.3390/ijms22105078>
26. Ciarka, A., Piątek, M., Pęksa, R., Kunc, M., & Senkus, E. (2024). Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Prognostic and predictive significance across molecular subtypes. *Biomedicines*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040763>
27. Stanton, S. E., & Disis, M. L. (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 4, 59. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>
28. Neagu, A.-N., Bruno, P., Johnson, K. R., Ballestas, G., & Darie, C. C. (2024). Biological basis of breast cancer-related disparities in precision oncology era. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/ijms25074113>
29. Loke, S. Y., & Lee, A. S. G. (2018). The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990), 92, 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.12.025>
30. Freitas, A. J. A. de, Causin, R. L., Varuzza, M. B., Calfa, S., Hidalgo Filho, C. M. T., Komoto, T. T., Souza, C. de P., & Marques, M. M. C. (2022). Liquid biopsy as a tool for the diagnosis, treatment, and monitoring of breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9952. <https://doi.org/10.3390/ijms23179952>
31. Rzhetskiy, A. S., Sagitova, G. R., Karashaeva, T. A., Morozov, A. O., Fatyanova, A. S., Kazantseva, V. V., Joosse, S. A., Zvyagin, A. V., & Warkini, M. E. (2024). A comprehensive review and meta-analysis of CTC isolation methods in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 206(104579), 104579. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104579>
32. Munoz-Arcos, L. S., Nicolò, E., Serafini, M. S., Gerratana, L., Reduzzi, C., & Cristofanilli, M. (2023). Latest advances in clinical studies of circulating tumor

- cells in early and metastatic breast cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 381, 1–21. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2023.07.005>
33. Bae, S. Y., Kamalanathan, K. J., Galeano-Garces, C., Konety, B. R., Antonarakis, E. S., Parthasarathy, J., Hong, J., & Drake, J. M. (2024). Dissemination of circulating tumor cells in breast and prostate cancer: Implications for early detection. *Endocrinology*, 165(4). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqae022>
34. Pang, S., Xu, S., Wang, L., Wu, H., Chu, Y., Ma, X., Li, Y., Zou, B., Wang, S., & Zhou, G. (2023). Molecular profiles of single circulating tumor cells from early breast cancer patients with different lymph node statuses. *Thoracic Cancer*, 14(2), 156–167. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14728>
35. Yu, T., Wang, C., Xie, M., Zhu, C., Shu, Y., Tang, J., & Guan, X. (2021). Heterogeneity of CTC contributes to the organotropism of breast cancer. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 137(111314), 111314. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111314>
36. Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 404. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
37. Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., Isakoff, S. J., Ciciliano, J. C., Wells, M. N., Shah, A. M., Concannon, K. F., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6119), 580–584. <https://doi.org/10.1126/science.1228522>
38. Wei, Y., Yang, W., Huang, Q., Chen, Y., Zeng, K., Chen, J., & Chen, J. (2023). Clinical significance of circulating tumor cell (CTC)-specific microRNA (miRNA) in breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 177, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2022.12.005>
39. Krol, F. D., Schwab, R., Carbone, M., Ritter, S., Marzia, L., De Marni, G., Stepien, G. M., Franchi, A., Zanardi, M. D., Rissoglio, A., Covelli, G., Guidi, D.,

- Scarinci, F., Castro-Giner, L., Mazzearella, C., Doglioni, F., Borghi, P., Milani, C., Walter, P., & Weber. (n.d.). Detection of clustered circulating tumour cells in early breast cancer Ilona. Nicola Aceto British Journal of Cancer, 125, 23–27
40. Circulating tumour cell clusters: isolation, biological significance and therapeutic implications Author affiliations• Yufan Yang¹. (n.d.). In Guanyin Huang¹ , Jingru.
41. Capuozzo, M., Ferrara, F., Santorsola, M., Zovi, A., & Ottaiano, A. (2023). Circulating tumor cells as predictive and prognostic biomarkers in solid tumors. Cells (Basel, Switzerland), 12(22), 2590. <https://doi.org/10.3390/cells12222590>
42. Wen, X., Pu, H., Liu, Q., Guo, Z., & Luo, D. (2022). Circulating tumor DNA-A novel biomarker of tumor progression and its favorable detection techniques. Cancers, 14(24), 6025. <https://doi.org/10.3390/cancers14246025>
43. Bath, I. S., Mitra, A., Rood, S., Kopetz, S., Menter, D., & Li, S. (2019). CTC analysis: an update on technological progress. Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 212, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.07.003>
44. Use of ctDNA in early breast cancer: analytical validity and clinical potential François Panet, Andri Papakonstantinou, Maria Borrell. (n.d.).
45. Circulating tumor DNA in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis Sudepto Saha. (n.d.). In Yusha Araf & Salman Khan Promon Journal of the Egyptian National Cancer Institut.
46. Xu, J., Gao, H., Guan, X., Meng, J., Ding, S., Long, Q., & Yi, W. (2024). Circulating tumor DNA: from discovery to clinical application in breast cancer. Frontiers in Immunology, 15, 1355887. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1355887>
47. Dabi, Y., Bendifallah, S., Suisse, S., Haury, J., Touboul, C., Puchar, A., Favier, A., & Daraï, E. (2022). Overview of non-coding RNAs in breast cancers. Translational Oncology, 25(101512), 101512. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101512>

48. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers Maria Amorim. (2016). Jerónimo Journal of Translational Medicine.
49. Klinge, C. M. (2018). Non-coding RNAs in breast cancer: Intracellular and intercellular communication. Non-Coding RNA, 4(4), 40.
<https://doi.org/10.3390/ncrna4040040>
50. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA Review Open access Published: 17 March. (2015). 17.
51. Lu, C., Wei, D., Zhang, Y., Wang, P., & Zhang, W. (2021). Long non-coding RNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer: Progress and prospects. Frontiers in Oncology, 11, 710538.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.710538>
52. Wang, Y., Bu, N., Luan, X.-F., Song, Q.-Q., Ma, B.-F., Hao, W., Yan, J.-J., Wang, L., Zheng, X.-L., & Maimaitiyiming, Y. (2024). Harnessing the potential of long non-coding RNAs in breast cancer: from etiology to treatment resistance and clinical applications. Frontiers in Oncology, 14, 1337579.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1337579>
53. Zhang, F., Li, L., & Fan, Z. (2022). circRNAs and their relationship with breast cancer: a review. World Journal of Surgical Oncology, 20(1), 373.
<https://doi.org/10.1186/s12957-022-02842-5>
54. Zhao, W., Dong, M., Pan, J., Wang, Y., Zhou, J., Ma, J., & Liu, S. (2019). Circular RNAs: A novel target among non-coding RNAs with potential roles in malignant tumors (Review). Molecular Medicine Reports, 20(4), 3463–3474.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10637>
55. Advances in circular RNAs and their roles in breast Cancer Xuehui Wang &. (2018). Lin Fang Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.
56. Bao, H., Li, J., Zhao, Q., Yang, Q., & Xu, Y. (2024). Circular RNAs in breast cancer: An update. Biomolecules, 14(2), 158.
<https://doi.org/10.3390/biom14020158>

57. Huang, J., Yu, S., Ding, L., Ma, L., Chen, H., Zhou, H., Zou, Y., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2021). The dual role of circular RNAs as miRNA sponges in breast cancer and colon cancer. *Biomedicines*, 9(11), 1590. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111590>
58. Q&A: What are exosomes, exactly? James R. (2016). James R. Edgar *BMC Biology*, 14.
59. Chu, Y. L., Li, H., Ng, P. L. A., Kong, S. T., Zhang, H., Lin, Y., Tai, W. C. S., Yu, A. C. S., Yim, A. K. Y., Tsang, H. F., Cho, W. C. S., & Wong, S. C. C. (2020). The potential of circulating exosomal RNA biomarkers in cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20(7), 665–678. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1745064>
60. Lakshmi, S., Hughes, T. A., & Priya, S. (2021). Exosomes and exosomal RNAs in breast cancer: A status update. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990), 144, 252–268. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.11.033>
61. afari, S. H., Saadatpour, Z., Salmaninejad, A., Momeni, F., Mokhtari, M., Nahand, J. S., Rahmati, M., Mirzaei, H., & Kianmehr, M. (2018). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5200–5213. <https://doi.org/10.1002/jcp.26379>
62. Sharma, A., & Johnson, A. (2020). Exosome DNA: Critical regulator of tumor immunity and a diagnostic biomarker. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1921–1932. <https://doi.org/10.1002/jcp.29153>
63. Bhattacharya, B., Dhar, R., Mukherjee, S., Gorai, S., Devi, A., Krishnan, A., Alexiou, A., & Papadakis, M. (2023). Exosome DNA: An untold story of cancer. *Clinical and Translational Discovery*, 3(4). <https://doi.org/10.1002/ctd2.218>
64. Wang, X., Zhong, W., Bu, J., Li, Y., Li, R., Nie, R., Xiao, C., Ma, K., Huang, X., & Li, Y. (2019). Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 58(5), 674–685. <https://doi.org/10.1002/mc.22960>

65. Inubushi, S., Kuniyasa, T., Kuniyasu, M., Inoue, S., Yamamoto, M., Yamashita, Y., Miki, M., Mizumoto, S., Baba, M., Hoffman, R. M., & Tanino, H. (2024). Serum exosomes expressing CD9, CD63 and HER2 from breast-cancer patients decreased after surgery of the primary tumor: A potential biomarker of tumor burden. *Cancer Genomics & Proteomics*, 21(6), 580–584. <https://doi.org/10.21873/cgp.20474>
66. Li, H., & Tie, X.-J. (2024). Exploring research progress in studying serum exosomal miRNA-21 as a molecular diagnostic marker for breast cancer. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 26(9), 2166–2171. <https://doi.org/10.1007/s12094-024-03454-z>
67. Lee, J., Ghosh, S., & Srivastava, S. (2017). Exosomes: A valuable biomedical tool in biomarker discovery and development. In *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection* (pp. 50–63). John Wiley & Sons, Ltd.
68. Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6478), eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
69. Qiu, J., Qian, D., Jiang, Y., Meng, L., & Huang, L. (2023). Circulating tumor biomarkers in early-stage breast cancer: characteristics, detection, and clinical developments. *Frontiers in Oncology*, 13, 1288077. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1288077>
70. Varzaru, V. B., Eftenoiu, A.-E., Vlad, D. C., Vlad, C. S., Moatar, A. E., Popescu, R., & Cobec, I. M. (2024). The influence of tumor-specific markers in breast cancer on other blood parameters. *Life (Basel, Switzerland)*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/life14040458>
71. Criscitiello, C. (2012). Tumor-associated antigens in breast cancer. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 7(4), 262–266. <https://doi.org/10.1159/000342164>
72. Kabel, A. M. (2017). Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences*, 3(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.01.001>

73. Seale, K. N., & Tkaczuk, K. H. R. (2022). Circulating biomarkers in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 22(3), e319–e331. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.09.006>
74. Ανδρέας Σκορίλας, 2020, ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ – ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ , “BROKEN HILL PUBLISHERS LTD” p.107,123
75. O’Hanlon, D. M., Kerin, M. J., O’Boyle, C., Grimes, H., & Given, H. F. (1996). Tissue polypeptide specific antigen (TPS) in breast cancer--an initial evaluation. *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 22(1), 38–41. [https://doi.org/10.1016/s0748-7983\(96\)91385-2](https://doi.org/10.1016/s0748-7983(96)91385-2)
76. Ahn, S. K., Moon, H.-G., Ko, E., Kim, H. S., Shin, H.-C., Kim, J., You, J. M., Han, W., & Noh, D.-Y. (2013). Preoperative serum tissue polypeptide-specific antigen is a valuable prognostic marker in breast cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 132(4), 875–881. <https://doi.org/10.1002/ijc.27727>
77. Breast Cancer: Serum TPS as a Biomarker Reference work entry pp 417-427 Cite this reference work entry Biomarkers in Cancer Dong-Young Noh. (n.d.).
78. D’Alessandro, R., Roselli, M., Ferroni, P., Mariotti, S., Spila, A., Aloe, S., Carone, M. D., Abbolito, M. R., Carlini, S., Perri, P., Ricciotti, A., Botti, C., Conti, F., Vici, P., Chiappetta, N. R., Cognetti, F., Buonomo, O., & Guadagni, F. (2001). Serum tissue polypeptide specific antigen (TPS): a complementary tumor marker to CA 15-3 in the management of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 68(1), 9–19. <https://doi.org/10.1023/a:1017903724176>
79. Jayapaul, J., Arns, S., Lederle, W., Lammers, T., Comba, P., Gätjens, J., & Kiessling, F. (2012). Riboflavin carrier protein-targeted fluorescent USPIO for the assessment of vascular metabolism in tumors. *Biomaterials*, 33(34), 8822–8829. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.036>

80. Prakash, N., Michael, O., Stoler, J., Kopicko, J., Kissinger, P., Shailaja, G., & Madhwa, H. G. (n.d.). Elevation of Serum Riboflavin Carrier Protein in Breast Cancer¹.
81. Karande, A. A., Sridhar, L., Gopinath, K. S., & Adiga, P. R. (2001). Riboflavin carrier protein: a serum and tissue marker for breast carcinoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 95(5), 277–281. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010920\)95:5<277::aid-ijc1047>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010920)95:5<277::aid-ijc1047>3.0.co;2-y)
82. Li, J., Guan, X., Fan, Z., Ching, L.-M., Li, Y., Wang, X., Cao, W.-M., & Liu, D.-X. (2020). Non-invasive biomarkers for early detection of breast cancer. *Cancers*, 12(10), 2767. <https://doi.org/10.3390/cancers12102767>
83. Wu, H.-J., & Chu, P.-Y. (2022). Current and developing liquid biopsy techniques for breast cancer. *Cancers*, 14(9), 2052. <https://doi.org/10.3390/cancers14092052>
84. Kumar, J., Basak, S., Kalkal, A., & Packirisamy, G. (2022). Recent advances in nanotechnology and microfluidic-based approaches for isolation and detection of circulating tumor cells (CTCs). *Nano-Structures & Nano-Objects*, 31(100886), 100886. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2022.100886>
85. Soda, N., Rehm, B. H. A., Sonar, P., Nguyen, N.-T., & Shiddiky, M. J. A. (2019). Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, 7(43), 6670–6704. <https://doi.org/10.1039/c9tb01490j>
86. Tellez-Gabriel, M., Knutsen, E., & Perander, M. (2020). Current status of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes in breast cancer liquid biopsies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9457. <https://doi.org/10.3390/ijms21249457>
87. Jin, L., Fan, W.-H., Luan, Y., Wu, M., & Zhao, W. (2021). Evaluation of circulating tumor cells as a prognostic biomarker for early recurrence in stage II-

- III breast cancer patients using CytoSorter® system: a retrospective study. PeerJ, 9(e11366), e11366. <https://doi.org/10.7717/peerj.11366>
88. García-Foncillas, J., Alba, E., Aranda, E., Díaz-Rubio, E., López-López, R., Tabernero, J., & Vivancos, A. (2017). Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. *Annals of Oncology*, 28(12), 2943–2949. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx501>
89. Wang, Y.-H., Song, Z., Hu, X.-Y., & Wang, H.-S. (2021). Circulating tumor DNA analysis for tumor diagnosis. *Talanta*, 228(122220), 122220. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122220>
90. Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
91. Zhuang, J., Xia, L., Zou, Z., Yin, J., Lin, N., & Mu, Y. (2022). Recent advances in integrated microfluidics for liquid biopsies and future directions. *Biosensors & Bioelectronics*, 217(114715), 114715. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114715>
92. Eastel, J. M., Lam, K. W., Lee, N. L., Lok, W. Y., Tsang, A. H. F., Pei, X. M., Chan, A. K. C., Cho, W. C. S., & Wong, S. C. C. (2019). Application of NanoString technologies in companion diagnostic development. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19(7), 591–598. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1623672>
93. Tsang, H.-F., Xue, V. W., Koh, S.-P., Chiu, Y.-M., Ng, L. P.-W., & Wong, S.-C. C. (2017). NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(1), 95–103. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1268533>
94. Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., & Yang, Q. (n.d.). Circulating tumor cells: biology and clinical significance Danfeng Lin (F. Zhu, D. Zhou, S. Zheng, Y. Chen, & J. Zhou, Eds.).

95. Kaldjian, E. P., Ramirez, A. B., Sun, Y., Campton, D. E., Werbin, J. L., Varshavskaya, P., Quarre, S., George, T., Madan, A., Blau, C. A., & Seubert, R. (2018). The RareCyte® platform for next-generation analysis of circulating tumor cells: RareCyte platform CTC analysis. Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 93(12), 1220–1225. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23619>
96. Krol, I., Schwab, F. D., Carbone, R., Ritter, M., Picocchi, S., De Marni, M. L., Stepien, G., Franchi, G. M., Zanardi, A., Rissoglio, M. D., Covelli, A., Guidi, G., Scarinci, D., Castro-Giner, F., Mazzarella, L., Doglioni, C., Borghi, F., Milani, P., Kurzeder, C., ... Aceto, N. (2021). Detection of clustered circulating tumour cells in early breast cancer. British Journal of Cancer, 125(1), 23–27. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01327-8>
97. Pečinka, L., Gregorová, J., Moráň, L., Růžicková, T., Kovačovicová, P., Almáši, M., & Pour, L. (n.d.). Liquid biopsy of peripheral blood using mass spectrometry detects primary extramedullary disease in multiple myeloma patients Monika Vlachová.
98. Pečinka, L., Gregorová, J., Moráň, L., Růžicková, T., Kovačovicová, P., Almáši, M., & Pour, L. (n.d.). Liquid biopsy of peripheral blood using mass spectrometry detects primary extramedullary disease in multiple myeloma patients Monika Vlachová. Luděk Pour,
99. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies Zhiyong Ding. (n.d.). 21.
100. Recent developments in mass-spectrometry-based targeted proteomics of clinical cancer biomarkers Deborah Wenk, Charlotte Zuo. (2024). Thomas Kislinger & Lusia Sepiashvili Clinical Proteomics.
101. Salvianti, F., Gelmini, S., Costanza, F., Mancini, I., Sonnati, G., Simi, L., Pazzagli, M., & Pinzani, P. (2020). The pre-analytical phase of the liquid biopsy. New Biotechnology, 55, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.006>
102. Pečinka, L., Gregorová, J., Moráň, L., Růžicková, T., Kovačovicová, P., Almáši, M., Pour, L., Prakash, N., Michael, O., Stoller, J., Kopicko, J., Kissinger, P., Shailaja, G., & Madhwa, H. G. (2006). Liquid biopsy of peripheral blood using

- mass spectrometry detects primary extramedullary disease in multiple myeloma patients Monika Vlachová. Luděk Pour. References Article Multi-Omic Analysis Identifies Metabolic Biomarkers for the Early Detection of Breast Cancer and Therapeutic Response Prediction Huajie Song, 1.
103. Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B., Hu, W., Wang, L., Zhao, W., & Zhou, J. (2017). Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, 8(25), 41717–41733. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16684>
104. Li, D., Lai, W., Fan, D., & Fang, Q. (2021). Protein biomarkers in breast cancer-derived extracellular vesicles for use in liquid biopsies. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 321(5), C779–C797. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00048.2021>
105. György, B., Hung, M. E., Breakefield, X. O., & Leonard, J. N. (2015). Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(1), 439–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124630>
106. Huo, D., Clayton, W. M., Yoshimatsu, T. F., Chen, J., & Olopade, O. I. (2016). Identification of a circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. *Oncotarget*, 7(34), 55231–55248. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10485>
107. Madhavan, D., Peng, C., Wallwiener, M., Zucknick, M., Nees, J., Schott, S., Rudolph, A., Riethdorf, S., Trumpp, A., Pantel, K., Sohn, C., Chang-Claude, J., Schneeweiss, A., & Burwinkel, B. (2016). Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis*, 37(5), 461–470. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw008>
108. Shimomura, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono, M., Takeshita, F., Niida, S., Shimizu, C., Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Tamura, K., & Ochiya, T. (2016). Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Science*, 107(3), 326–334. <https://doi.org/10.1111/cas.12880>

109. Cui, X., Li, Z., Zhao, Y., Song, A., Shi, Y., Hai, X., & Zhu, W. (2018). Breast cancer identification via modeling of peripherally circulating miRNAs. PeerJ, 6, e4551. <https://doi.org/10.7717/peerj.4551>
110. De Miguel-Pérez, D., Ortega, F. G., García-Puche, J. L., Robles-Fernández, I., Exposito, J., Martorell-Marugan, J., Carmona-Sáez, P., Rolfo, C., Ilyine, H., Lorente, J. A., & Legueren, M. (n.d.). Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy Alba Rodríguez-Martínez.
111. Chin, Y. M., Takahashi, Y., Chan, H. T., Otaki, M., Fujishima, M., Shibayama, T., Miki, Y., Ueno, T., Nakamura, Y., & Low, S.-K. (2021). Ultradeep targeted sequencing of circulating tumor DNA in plasma of early and advanced breast cancer. Cancer Science, 112(1), 454–464. <https://doi.org/10.1111/cas.14697>
112. Bartnykaitė, A., Savukaitytė, A., Ugenskienė, R., Dauksaitė, M., Korobeinikova, E., Gudaitienė, J., & Juozaitytė, E. (2021). Associations of MDM2 and MDM4 polymorphisms with early-stage breast cancer. Journal of Clinical Medicine, 10(4), 866. <https://doi.org/10.3390/jcm10040866>
113. Parallel Analyses of Somatic Mutations in Plasma Circulating Tumor DNA (ctDNA) and Matched Tumor Tissues in Early-Stage Breast Cancer Xianyu Zhang; Weiwei Zhao; Wei Wei; Zilong You; Xiaohua Ou; Mingming Sun; Yanling Yin ORCID logo ; Xiaoyan Tang; Zhen Zhao; Changming Hu; Feifei Liu ORCID logo ; Junhao Deng; Linlin Mao; Danyan Zhou; Yuxia Ren; Xiaoxia Li; Shangfei Zhang; Chang Liu ORCID logo ; Jingshu Geng; Guodong Yao; Bingbing Song; Yupeng Liu ORCID logo ; Dalin Li; Yongdong Jiang. (n.d.).
114. McDonald, B. R., Contente-Cuomo, T., Sammut, S.-J., Odenheimer-Bergman, A., Ernst, B., Perdigones, N., Chin, S.-F., Farooq, M., Mejia, R., Cronin, P. A., Anderson, K. S., Kosiorek, H. E., Northfelt, D. W., McCullough, A. E., Patel, B. K., Weitzel, J. N., Slavin, T. P., Caldas, C., Pockaj, B. A., & Murtaza, M. (2019). Personalized circulating tumor DNA analysis to detect residual disease

- after neoadjuvant therapy in breast cancer. Science Translational Medicine, 11(504), eaax7392. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax7392>
115. Müller, V., Banys-Paluchowski, M., Friedl, T. W. P., Fasching, P. A., Schneeweiss, A., Hartkopf, A., Wallwiener, D., Rack, B., Meier-Stiegen, F., Huober, J., Rübner, M., Hoffmann, O., Müller, L., Janni, W., Wimberger, P., Jäger, B., Pantel, K., Riethdorf, S., Harbeck, N., ... DETECT study group. (2021). Prognostic relevance of the HER2 status of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients screened for participation in the DETECT study program. ESMO Open, 6(6), 100299. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100299>
116. Latest Research Progress of Liquid Biopsy in Tumor-A Narrative Review Hua JiangORCID IcoLatest Research Progress of Liquid Biopsy in Tumor-A Narrative Review Hua JiangORCID Icon Pages 1031-1042 | Received. (1031).
117. Qu, Y., Wan, J., Li, R., Li, X., Li, H., Li, Y., Huang, S., Zhang, T., Yang, D., & Chen, D. (2024). Research history, current trends, and future prospects of Liquid biopsy in triple-negative breast cancer: An analysis from a global perspective. In Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4203189/v1>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.