



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοριακοί βιοδείκτες παρακολούθησης
αντικαρκινικών θεραπειών

Ανδρουτσοπούλου Αθηνά

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκορίλας Ανδρέας

Πάτρα, Ιανουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («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.



Μοριακοί βιοδείκτες παρακολούθησης αντικαρκινικών θεραπειών

Ανδρουτσοπούλου Αθηνά

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:
Σκορίλας Ανδρέας
Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:
Σίδερης Διαμαντής
Καθηγητής Βιοχημείας,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού προγράμματος της Σχολής Θετικών Επιστημών & Τεχνολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση» το ακαδημαϊκό έτος 2024-2025.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου Σκορίλα Ανδρέα για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους του καθηγητές που συνάντησα κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού τόσο στις ΟΣΣ όσο και στα εργαστήρια για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τον Δημήτρη για την στήριξη, την κατανόηση και την προτροπή να κυνηγάω τα όνειρα μου.

Ανδρουτσοπούλου Αθηνά,
Μοριακοί βιοδείκτες παρακολούθησης αντικαρκινικών θεραπειών

Στην μητέρα μου

Περίληψη

Οι βιοδείκτες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύγχρονη ιατρική, ιδιαίτερα στην ανίχνευση, τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. Κατηγοριοποιούνται βάσει της διαγνωστικής, προγνωστικής και θεραπευτικής τους εφαρμογής, καθώς και βάσει της γενετικής τους μορφολογίας, σε γενετικούς, επιγενετικούς, πρωτεϊνικούς και μεταβολικούς δείκτες. Η ανίχνευσή τους και η αξιολόγηση των δεδομένων τους μέσω σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) και η υγρή βιοψία, υπογραμμίζουν τη σημασία τους στην εξατομικευμένη ιατρική και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών θεραπειών. Παρά τις προκλήσεις στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων, η μελλοντική ενασχόληση με αυτούς θα συνεχίσει να είναι κρίσιμη για τη θεραπευτική πορεία των ασθενών.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι να μελετήσει τους μοριακούς βιοδείκτες και να αναδείξει τη χρησιμότητά τους στη σύγχρονη κλινική πρακτική και την εξατομικευμένη αντικαρκινική θεραπεία.

Λέξεις – Κλειδιά

Βιοδείκτης, όγκος, καρκίνος, εξατομικευμένη θεραπεία

Molecular biomarkers for monitoring anticancer therapies, Athina Andoutsopoulou

Abstract

Biomarkers play a crucial role in modern medicine, particularly in the detection, diagnosis, and treatment of cancer. They are categorized based on their diagnostic, prognostic, and therapeutic applications, as well as their genetic morphology, into genetic, epigenetic, protein, and metabolic markers. Their detection and the evaluation of their data through modern analytical techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), next-generation sequencing (NGS), and liquid biopsy, emphasize their importance in personalized medicine and improving the effectiveness of cancer treatments. Despite the challenges in discovering new biomarkers and validating analytical methods, future engagement with them will continue to be critical for the therapeutic journey of patients.

The purpose of this master's thesis is to study molecular biomarkers and highlight their usefulness in modern clinical practice and personalized cancer therapy.

Key words

Biomarkers, tumor, cancer, personalized medicine

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iii
Abstract.....	iv
Κατάλογος Εικόνων/Σχημάτων.....	vi
Κατάλογος Πινάκων.....	ix
Συνοτομογραφίες & Ακρωνύμια	x
Εισαγωγή.....	1
1. Ορισμός Βιοδεικτών & Βασικές κατηγορίες βιοδεικτών και εφαρμογές	2
1.1 Διαγνωστικός Βιοδείκτης	3
1.2 Προγνωστικός Βιοδείκτης.....	4
1.3 Προβλεπτικός Βιοδείκτης.....	4
1.4 Βιοδείκτης Παρακολούθησης	6
1.5 Βιοδείκτης Ασφάλειας.....	8
1.6 Φαρμακοδυναμικός Βιοδείκτης ή Βιοδείκτη Απόκρισης.....	8
1.7 Βιοδείκτης Κινδύνου	9
1.8 Άλλες ταξινομήσεις.....	9
2. Μοριακοί βιοδείκτες και ο ρόλος τους στις αντικαρκινικές θεραπείες.....	11
2.1 Γενετικός Βιοδείκτης.....	11
2.2 Επιγενετικός Βιοδείκτης.....	13
2.3 Πρωτεϊνικός Βιοδείκτης.....	13
2.4 Μεταβολικός Βιοδείκτης.....	15
2.5 Κυτταρικός και ανοσολογικός βιοδείκτες	15
2.6 Βιοδείκτης μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων (miRNAs).....	17
3. Μέθοδοι και αναλυτικές τεχνικές παρακολούθησης βιοδεικτών.....	19
3.1 Μοριακές Και Γενετικές Αναλύσεις.....	20
3.1.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	20
3.1.2 Αλληλούχηση Sanger	25
3.1.3 Αλληλούχηση Επομένης Γενιάς (Next generation sequencing - NGS).....	26
3.2 Τεχνικές Ανάλυσης Πρωτεϊνών.....	31
3.2.1 Προσδιορισμός με ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA).....	31

3.2.2 Φασματομετρία μάζας (MS).....	37
3.2.3 Ανοσοαποτύπωση – Μέθοδος Wester Blotting.....	42
3.3 Μέθοδοι ανάλυσης βιοδεικτών βασισμένοι στην απεικόνιση.....	44
3.3.1 Ανοσοϊστοχημεία (IHC).....	44
3.3.2 Υβριδισμός in situ: FISH και CISH.....	46
3.3.3 Κυτταρομετρία ροής.....	47
3.4 Τεχνικές Υγρής Βιοψίας.....	50
4. Αντικαρκινικές θεραπείες και παρακολούθηση αποτελεσματικότητας.....	54
4.1 Ιστορική ανασκόπηση θεραπειών για την αντιμετώπιση του καρκίνου.....	54
4.2 Παρακολούθηση Αποτελεσματικότητας Θεραπείας.....	55
4.2.1 Καρκίνος του μαστού.....	56
4.2.2 Καρκίνος του πνεύμονα.....	59
4.2.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	65
5. Μελλοντικές τάσεις και προκλήσεις.....	68
5.1 Ανακάλυψη νέων βιοδεικτών.....	68
5.2 Νέες τεχνικές ανάλυσης.....	72
5.2.1 Νανοτεχνολογία.....	72
5.2.2 Multi-Omics και εξατομικευμένη Ιατρική.....	75
5.2.3 AI και Big Data στην Ιατρική.....	77
5.3 Νέες θεραπείες.....	80
5.3.1 mRNA εμβόλια.....	80
5.3.2 CRISPR και γονιδιακή θεραπεία.....	83
5.4 Ηθικοί προβληματισμοί.....	88
6. Συμπέρασμα -Συζήτηση.....	91
7. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	92

Κατάλογος Εικόνων/Σχημάτων

Εικόνα 1: Κατηγορίες βιοδεικτών - Προσαρμογή από (Bodaghi et al., 2023).....	3
Εικόνα 2: DNA από ελεύθερα κύτταρα και κακοήγη κύτταρα σε κυκλοφορία. Τα CTCs εξαπλώνονται σε όλα τα αιμοφόρα αγγεία μετά τη διαφυγή από τις αρχικές θέσεις και σχηματίζουν μεταστάσεις στα περιφερειακά όργανα. Νεκρά καρκινικά κύτταρα ή επεκτεινόμενα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν DNA χωρίς κύτταρα (cf-DNAs) στο κυκλοφορία του αίματος. RBC = ερυθρά αιμοσφαίρια, WBC = λευκά αιμοσφαίρια (Das et al., 2024).....	16
Εικόνα 3: Η εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχησης. (Satam et al., 2023).....	27
Εικόνα 4: Επισκόπηση των διαφόρων τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) με διαφορετικές πλατφόρμες και αρχές. (Guan et al., 2012).....	30
Εικόνα 5: Σχηματική παρουσίαση βασικών τύπων ELISA: Α. άμεση, Β. έμμεση, Γ. σάντουιτς, Δ. ανταγωνιστική - Ag: αντιγόνο, Ab: αντίσωμα, Ε: ένζυμο, S: υπόστρωμα. (Aydin, 2015)	36
Εικόνα 6: Αρχή φασματομετρίας μαζών. Δείγμα μορίων (M) ιονίζονται και ποσοστό μοριακών ιόντων M^+ διαχωρίζονται δημιουργώντας θραύσματα (f1, f2 κ.α.). Οι μάζες των μοριακών ιόντων και των θραυσμάτων ιόντων προσδιορίζονται και απεικονίζονται σε διάγραμμα σε σχέση με την αφθονία (relative abundance). (Wait, 1993).....	38
Εικόνα 7: Μια γενική περιγραφή ενός κυτταρόμετρου ροής που δείχνει ένα όργανο ταξινόμησης ικανό να απομονώνει μεμονωμένα κύτταρα. Στα δεξιά της εικόνας παρουσιάζονται παραδείγματα πιθανών αναλύσεων. (Robinson et al., 2023)	48
Εικόνα 8: Οι εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής περιλαμβάνουν ανάλυση κυτταρικού DNA/RNA, φαινοτυπικό χαρακτηρισμό, ροή ιόντων, μικροβιακή ανάλυση, κυτοκίνες, φυτικό DNA και μια ποικιλία επιπρόσθετων δοκιμασιών. (Robinson et al., 2023)	50
Εικόνα 9: Υγρά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κυκλοφορούντες βιοδείκτες. (Freitas et al., 2022).....	51
Εικόνα 10: Το 50-60% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ είναι αδενοκαρκινώματα, ενώ το 20-30% είναι πλακώδες καρκίνωμα. Μοριακές αλλοιώσεις του αδενοκαρκινώματος που σχετίζονται με καρκινικούς βιοδείκτες. (Guo et al., 2022).....	61
Εικόνα 11: Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σε κυτταρολογικό επίχρισμα: α) χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, β) θετική αντίδραση ανοσοϊστοχημείας (IHC) με CD56, μπλοκ κυττάρων. Αδενοκαρκίνωμα με αδενικό πρότυπο σε βιοψία ιστού: γ) χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, δ) θετική αντίδραση IHC με papsin Α. Πλακώδες καρκίνωμα, με τυπικά χαρακτηριστικά σε κυτταρολογικό επίχρισμα: ε) χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, f) θετική αντίδραση IHC με p40. Έκφραση του προγραμματισμένου λιγάνου θανάτου 1 (PD-L1) σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε μπλοκ κυττάρων: g) Ποσοστό όγκου >50%, αντισώματα: Ventana SP-263. (Charpidou et al., 2024).....	62
Εικόνα 12 Συχνότητα κοινών μοριακών αλλοιώσεων που προκαλούν καρκίνο	

και οι στοχευμένες θεραπείες τους στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. (Charpidou et al., 2024).....	63
Εικόνα 13: Ψηφιακές αναλύσεις μορίων σε επίπεδο ενός μορίου. (Li et al., 2024).....	74
Εικόνα 14: Ανοσοαπόκριση που βασίζεται σε εμβόλια mRNA.....	82
Εικόνα 15: Το πρώτο CRISPR βρέθηκε στο E. coli. Ως αποτέλεσμα της ανάλυσης γονιδίου iar στο E.coli, βρέθηκε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία καθοδικά του γονιδίου iar. Το σύμπλεγμα γονιδίων cas αναγνωρίστηκε επίσης στην περιοχή αυτή. (Ishino et al., 2018).....	84
Σχήμα 1: Διάγραμμα ενίσχυσης θραυσμάτων DNA με PCR. (Caixeta et al., 2014).....	23
Σχήμα 2: Αρχές θεραπείας στον πρώιμο καρκίνο του μαστού – Περίληψη των γενικών στρατηγικών θεραπείας καθώς μπορεί να διαφέρουν λόγω των χαρακτηριστικών του όγκου και της νόσου και των προτιμήσεων των ασθενών. (Harbeck and Gnant, 2017)	57
Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση στρατηγικών θεραπείας για τον καρκίνο του μαστού. (Guo et al., 2022).....	59
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών. (McDermott et al., 2013)	69

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 : Κλινική σημασία προβλεπτικών βιοδεικτών σε Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) (Yun et al, 2020).....	6
Πίνακας 2: Παραδείγματα ενζύμων που χρησιμοποιούνται ως δείκτες σε ανοσολογικές δοκιμές και πιθανά χρωμογόνων και χρώματα των σχηματιζόμενων συμπλοκών. (Boguszevska et al., 2019).....	39
Πίνακας 3: Τεχνικές μοριακής ανάλυσης και κλινική εφαρμογή. (Charpidou et al., 2024).....	64
Πίνακας 4: Ορισμοί όρων που αξιολογούνται στην αναλυτική επικύρωση.(McDermott et al., 2013).....	70

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ACE	Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης
ADC	Αδενοκαρκίνωμα
AFP	Άλφα-Φετοπρωτεΐνη (Alpha-Fetoprotein)
AI	Τεχνητή νοημοσύνη
ALK	Υποδοχέα κινάσης τυροσίνης
AML	Οξεία μυελογενής λευχαιμία
AP	Αλκαλική φωσφατάση
B-Gal	Βήτα-γαλακτοσιδάση
BRCA	Γονίδιο υπεύθυνο για τον κληρονομούμενο καρκίνο μαστού
CA 125	Καρκινικό αντιγόνο 125
CEA	Καρκινοεμβρυικό Αντιγόνο
cDNA	Συμπληρωματικό DNA
ctDNA	Κυκλοφορούν καρκινικό DNA
CI	Χημικός ιοντισμός
CISH	Χρωμογόνος in situ υβριδισμός
CK-19	Κυτταροκερατίνη 19
CNNS	Συνελεκτικά νευρωνικά δίκτυα
CRISPR	Ομαδοποιημένες κανονικά διασπαρμένες βραχείες παλινδρομικές επαναλήψεις
CTCs	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
dNTPs	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
ddNTPs	Διδεοξυ-νουκλεοτίδια
DL	Βαθιά μάθησης
DLBCL	Διάχυτο μεγάλο Β-κυτταρικό λέμφωμα DLBCL
EGFR	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EI	Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων
ELISA	Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση
ER	Υποδοχέας οιστρογόνων
ESI	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
FAP	Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση
FITC	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
FISH	Υβριδισμός φθορισμού in situ
GLUTs	Μεταφορείς γλυκόζης
HbA1c	Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
HCG:	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (Human Chorionic Gonadotropin)
HER-2	Ανθρώπινος υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
HRP	Υπεροξειδάση του χρένου
ICR	Ιοντικός κυκλοτρονικός ιοντισμός
ICI	Αναστολείς σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors)
IHC	Ανοσοϊστοχημεία

IPMNs	Ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα
ISH	In situ υβριδοποίησης
LC	Υγρή χρωματογραφία
LDH	Γαλακτική αφυδρογονάση (Lactate Dehydrogenase)
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (Low -Density Lipoprotein)
MALDI	Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και λείζερ
ML	Μηχανική μαθηση
miRNA	Μικροπυρηνικό RNA
MLH1	Γονίδιο μηχανισμού επιδιόρθωσης ασυμφωνιών DNA
MMR	Γονίδια επιδιορθώσεων λανθασμένων ζευγών
MS	Φασματομετρία μάζας
MSI	Μικροδορυφορική αστάθεια
MSS	Μικροδορυφορική σταθερότητα
NGS	Αλληλούχηση επόμενης γενιάς
NSCLC	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
PD-L1	Δείκτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
PSA	Ειδικό προστατικό αντιγόνου
ROS1	Πρωτο-ογκογονίδιο τυροσινινο-πρωτεϊνικής κινάσης
RT-qPCR	Ποσοτική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
RNA Seq.	Αλληλούχηση RNA
SCC	Πλακώδες καρκίνωμα
SCLC	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERS	Επιφανειακή ενίσχυση σκέδασης Raman
SPR	Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων
TKI	Αναστολείς τυροσινικής κινάσης
TMB	Φορτίο μεταλλάξεων όγκου
TNM	Σύστημα σταδιοποίησης
TOF	Αναλυτής «Χρόνου Πτήσης»
WES	Εξονική αλληλούχηση
WGS	Πλήρης γονιδιωματική αλληλούχηση

Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ασθένειες της σύγχρονης εποχής, με παγκόσμια εξάπλωση και μεγάλη θνησιμότητα. Από τα τέλη του 18ου αιώνα, η επίπτωση της νόσου έχει αυξηθεί σημαντικά, καθιστώντας τον καρκίνο τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Οι επιστημονικές και τεχνολογικές ανακαλύψεις, όπως η ανακάλυψη των ακτίνων Χ στα τέλη του 19ου αιώνα, έθεσαν τις βάσεις για τη μελέτη των βιολογικών και παθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων. Η εξέλιξη συνεχίστηκε με την ανάπτυξη κυτταροτοξικών φαρμάκων, τη χημειοθεραπεία, καθώς και την εισαγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων και αναστολέων σημείων ελέγχου, βελτιώνοντας την επιβίωση και την ποιότητα ζωής των ασθενών. (Falzone et al., 2018)

Οι καρκινικοί βιοδείκτες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στις σύγχρονες θεραπείες κατά του καρκίνου. Χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου, την αξιολόγηση της ανταπόκρισης ή της αντοχής στα φάρμακα, καθώς και για την έγκαιρη ανίχνευση υποτροπών. Παράλληλα, αποτελούν θεμελιώδες εργαλείο για την εξατομικευμένη θεραπεία, παρέχοντας κρίσιμες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του όγκου του ασθενούς, τη διαστρωμάτωση κινδύνου και την επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής προσέγγισης. Από τους περίπου 4000 βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σε διάφορους θεραπευτικούς τομείς, το 26% αφορά την ογκολογία, υπογραμμίζοντας τη σημασία τους.

Η ανακάλυψη κατάλληλων βιοδεικτών παραμένει μια σημαντική πρόκληση. Ο ιδανικός βιοδείκτης πρέπει να είναι εύκολα ανιχνεύσιμος, αξιόπιστος, οικονομικός, και να διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Επιπλέον, απαιτείται να έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης στα πρώιμα στάδια της νόσου και να αντικατοπτρίζει με ακρίβεια το φορτίο του όγκου, διευκολύνοντας τη συνεχή παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Με τη συνεχή εξέλιξη της τεχνολογίας και της μοριακής βιολογίας, η ανακάλυψη καινοτόμων βιοδεικτών

προσφέρει ελπίδα για βελτιωμένη διάγνωση, θεραπεία και επιβίωση των ασθενών με καρκίνο. (Purkayastha et al.,2023)

1. Βιοδείκτες: Ορισμός και Κατηγορίες

Στον τομέα των βιοδεικτών παρατηρείται συχνά σύγχυση λόγω της χρήσης συνώνυμων όρων, όπως βιολογικοί δείκτες, υποκατάστατοι δείκτες, υποκατάστατα τελικά σημεία, ενδιάμεσα τελικά σημεία, ενδιάμεσοι δείκτες και τελικά σημεία βιοδεικτών. Για τον λόγο αυτό, το 2000 η Ομάδα Εργασίας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ (NIH) καθιέρωσε έναν επίσημο ορισμό του όρου «βιοδείκτης». Σύμφωνα με τον ορισμό αυτόν, βιοδείκτης είναι «οποιοδήποτε χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και να διακρίνει φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις, καθώς και τις φαρμακολογικές αποκρίσεις του οργανισμού σε μια συγκεκριμένη θεραπεία». Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται ευρέως στα πρώιμα στάδια επιστημονικών ερευνών και κλινικών δοκιμών για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των υπό μελέτη θεραπειών. Παίζουν καθοριστικό ρόλο σε τομείς όπως η διάγνωση ασθενειών και η παρακολούθηση της συνολικής κατάστασης της υγείας του ασθενούς. (Aronson and Ferner, 2017)

Καθώς η εξατομικευμένη ιατρική αναπτύσσεται ταχύτατα στον τομέα της υγειονομικής φροντίδας, η χρήση δεδομένων όπως κλινικές πληροφορίες, γονιδιωματικά προφίλ, γενετικά χαρακτηριστικά και περιβαλλοντικοί παράγοντες, προσφέρει νέες δυνατότητες για την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών.

Οι βιοδείκτες αποτελούν θεμελιώδη εργαλεία για την εφαρμογή της εξατομικευμένης ιατρικής καθώς παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την πρόγνωση, την πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε φαρμακευτικές παρεμβάσεις και τον καθορισμό της κατάλληλης δοσολογίας. Συμβάλλουν στην παρακολούθηση των θετικών αλλά και των ανεπιθύμητων επιδράσεων, διευκολύνοντας τη μέτρηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας μιας θεραπείας πριν από την εφαρμογή της.

Οι βιοδείκτες σύμφωνα με την εφαρμογή τους, κατηγοριοποιούνται σε επτά διακριτούς τύπους, με καθέναν από αυτούς να εξυπηρετεί έναν συγκεκριμένο σκοπό: τη διάγνωση, την παρακολούθηση, την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων και την αξιολόγηση των αντιδράσεων στις ιατρικές θεραπείες.[5]



Εικόνα 1: Κατηγορίες βιοδεικτών - Προσαρμογή από (Bodaghi et al., 2023)

1.1 Διαγνωστικός Βιοδείκτης

Ο διαγνωστικός βιοδείκτης αποτελεί εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση μιας ασθένειας πριν εμφανιστούν συμπτώματα, την επιβεβαίωση της παρουσίας μιας πάθησης και την κατηγοριοποίησης ασθενειών, επιτρέποντας την έγκαιρη διάγνωση

και την εξατομίκευση των θεραπειών. Για παράδειγμα, ο σακχαρώδης διαβήτης ανιχνεύεται μέσω των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, ενώ η κατηγοριοποίηση του διάχυτου μεγάλου Β-κυτταρικού λεμφώματος (DLBCL) βασίζεται στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης.

Η ανάπτυξη τέτοιων βιοδεικτών απαιτεί καινοτόμες προσεγγίσεις και αυστηρές διαδικασίες αξιολόγησης. Παρόλο που ένας βιοδείκτης μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητική ακρίβεια και αξιοπιστία, η επικύρωση παραμένει καθοριστική για τη διασφάλιση της επαναληψιμότητας και της οικονομικής αποδοτικότητας. Όταν οι μέθοδοι ανάλυσης δεν επικυρώνονται επαρκώς, μπορεί να δημιουργηθούν παρερμηνείες σχετικά με την πραγματική αξία του βιοδείκτη. (Al-Tashi et al., 2023; Yun et al., 2020)

1.2 Προγνωστικός Βιοδείκτης

Οι προγνωστικοί βιοδείκτες παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες για την πρόγνωση μιας ασθένειας, την εξέλιξή της ή την πιθανότητα υποτροπής σε άτομα που ήδη πάσχουν. Αντίθετα με τους προβλεπτικούς βιοδείκτες, που αξιολογούν την απόκριση σε θεραπεία, και τους βιοδείκτες κινδύνου, που εκτιμούν την πιθανότητα ανάπτυξης μιας νόσου, οι προγνωστικοί βιοδείκτες επικεντρώνονται στην πορεία μιας υπάρχουσας κατάστασης. Ειδικότερα, οι προγνωστικοί βιοδείκτες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξατομικευμένη φροντίδα του ασθενούς καθώς επιτρέπουν την προσαρμογή των θεραπευτικών επιλογών στις ανάγκες του, βελτιστοποιώντας τη θεραπεία και ενισχύοντας τα κλινικά αποτελέσματα.

1.3 Προβλεπτικός Βιοδείκτης

Οι προβλεπτικοί βιοδείκτες επιτρέπουν την εκτίμηση της πιθανότητας ένα άτομο ή μια ομάδα ατόμων να ωφεληθεί ή να υποστεί αρνητικές επιδράσεις από μια θεραπεία ή έναν περιβαλλοντικό παράγοντα. Αυτό αξιολογείται μέσω κλινικών μελετών, στις οποίες οι συμμετέχοντες που έχουν προσλάβει ή όχι τον βιοδείκτη,

κατανέμονται τυχαία σε ομάδες θεραπείας ή ελέγχου (placebo). Στη συνέχεια, οι διαφορές στα αποτελέσματα συγκρίνονται με βάση την παρουσία, απουσία ή τα επίπεδα του βιοδείκτη.

Η χρήση των προβλεπτικών βιοδεικτών ενισχύει την εξατομικευμένη ιατρική, επιτρέποντας την επιλογή θεραπειών που είναι πιο αποτελεσματικές για συγκεκριμένες ομάδες ασθενών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι ασθενείς με HER-2 θετικό καρκίνο του μαστού (ανθρώπινος υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 - HER-2), ανταποκρίνονται πιο αποτελεσματικά στη θεραπεία με το φάρμακο Herceptin.

Η αξιοποίηση των βιοδεικτών στη στοχευμένη θεραπεία συχνά παρουσιάζει προκλήσεις, ιδιαίτερα όταν η κατηγοριοποίησή τους δεν είναι σαφής. Ένας τέτοιο παράδειγμα είναι η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL), ένας βιοδείκτης που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της χοληστερόλης και λειτουργεί τόσο ως δείκτης ευαισθησίας/κινδύνου όσο και ως προγνωστικός δείκτης. Τα αυξημένα επίπεδα LDL σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο για αθηροσκλήρωση, εγκεφαλικό επεισόδιο ή καρδιακά επεισόδια. Θεραπείες όπως οι στατίνες, οι αναστολείς απορρόφησης χοληστερόλης (π.χ. εζετιμίμπη) και οι αναστολείς PCSK9 μειώνουν τη LDL, περιορίζοντας τον κίνδυνο σοβαρών καρδιαγγειακών επεισοδίων.

Ωστόσο, η διάκριση μεταξύ προγνωστικών και προβλεπτικών βιοδεικτών δεν είναι πάντοτε διακριτή, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση και λάθη. Για παράδειγμα, εάν ένας προγνωστικός βιοδείκτης χαρακτηριστεί λανθασμένα ως προβλεπτικός, υπάρχει ο κίνδυνος υπερεκτίμησης της αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας, περιορίζοντας τη χρήση της. Αντίστροφα, εάν ένας προβλεπτικός βιοδείκτης θεωρηθεί προγνωστικός, μπορεί να αγνοηθούν διαφοροποιήσεις στην απόκριση συγκεκριμένων ομάδων ασθενών. Για παράδειγμα πρωτεΐνη - δείκτης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-L1, αρχικά θεωρήθηκε ότι καθορίζει αποκλειστικά την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας για ασθενείς με υψηλή έκφραση PD-L1. Όμως σύμφωνα με μεταγενέστερες μελέτες, παρατηρήθηκε ότι και

ασθενείς με χαμηλή έκφραση μπορούν να ωφεληθούν. Η λανθασμένη ταξινόμηση θα μπορούσε να περιορίσει την πρόσβαση σε αποτελεσματικές θεραπείες και να αυξήσει την τιμή του φαρμάκου, επιβαρύνοντας τόσο τους ασθενείς όσο και τα συστήματα υγείας.

Η σωστή κατηγοριοποίηση των βιοδεικτών είναι κρίσιμη για την αποφυγή τέτοιων σφαλμάτων, με θετικές συνέπειες για τους ασθενείς, τους ιατρούς και τη φαρμακευτική βιομηχανία καθώς προάγει τη βελτίωση της εξατομικευμένης θεραπείας και τη δίκαιη πρόσβαση στις καινοτόμες θεραπείες. (Al-Tashi et al., 2023)

Προγνωστικοί Βιοδείκτες	Κλινική Σημασία
Μεταλλάξεις Del 17p/TP53	Προβλέπει κακή ανταπόκριση σε χημειο-ανοσοθεραπεία
Μεταλλάξεις NOTCH1	Προβλέπει κακή ανταπόκριση σε θεραπεία με Anti-CD20
CD49d	Αναστέλλει τη διακίνηση κυττάρων κατά τη θεραπεία με νέου στόχου με φάρμακα BCR
Κατάσταση μετάλλαξης γονιδίου IGHV	Δίνει τις πιθανότητες για μακροχρόνια ύφεση σε νεότερους, υγιείς ασθενείς με M-IGHV κατά τη χρήση φαρμάκων BCR
Συνολικοί καρυότυποι	Πρόβλεψη κακής ανταπόκρισης σε θεραπεία με χημειο-ανοσοθεραπεία όταν εμφανίζονται σύνθετοι καρυότυποι με μεγάλες δομικές ανωμαλίες
MicroRNAs	MiR-34a: σχετίζεται με νόσο ανθεκτική στη χημειοθεραπεία MiR-155: προβλέπει την ανταπόκριση στη θεραπεία

Πίνακας 1 : Κλινική σημασία προβλεπτικών βιοδεικτών σε Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) (Yun et al., 2020)

1.4 Βιοδείκτης Παρακολούθησης

Οι βιοδείκτες παρακολούθησης χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της πορείας μιας νόσου ή ιατρικής κατάστασης με την πάροδο του χρόνου. Γίνονται

επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για την αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου, την ανίχνευση έκθεσης σε ιατρικά ή περιβαλλοντικά προϊόντα, καθώς και για τον εντοπισμό των επιδράσεών τους. Λόγω της ευρύτητας του ρόλου τους, οι βιοδείκτες παρακολούθησης συχνά επικαλύπτονται με άλλες κατηγορίες βιοδεικτών.

Στην κλινική πρακτική, βιοδείκτες όπως η αρτηριακή πίεση και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) παρακολουθούνται τακτικά σε ασθενείς που ακολουθούν σχετικές θεραπείες. Οι μεταβολές στις τιμές αυτών των δεικτών μπορούν να υποδηλώσουν αλλαγές στην κλινική κατάσταση του ασθενούς. Παρ' όλα αυτά, οι αποφάσεις για τη θεραπευτική προσέγγιση παραμένουν συχνά σύνθετες και ενίοτε αμφιλεγόμενες. Αυτό συμβαίνει επειδή δεν υπάρχει πάντοτε σαφής καθορισμός για το ποιο είναι το ιδανικό χρονικό διάστημα μεταξύ των μετρήσεων ή ποια πρέπει να είναι η ακριβής θεραπευτική πορεία που πρέπει να ακολουθηθεί. Επιπλέον, η αξιολόγηση της κατάστασης βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εμπειρική κρίση του θεράποντος ιατρού, καθώς πολλές από τις κλινικές παραμέτρους που επηρεάζουν την απόφαση συχνά δεν ορίζονται με ακρίβεια.

Οι βιοδείκτες παρακολούθησης χρησιμοποιούνται, επίσης για την εκτίμηση της εξέλιξης ορισμένων παθήσεων. Για παράδειγμα, τα επίπεδα του καρκινικού αντιγόνου 125 (CA 125) παρακολουθούνται σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, ενώ η μέτρηση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της εξάπλωσης μεταστάσεων στον καρκίνο του προστάτη.

Εκτός από τη διάγνωση και την παρακολούθηση νόσων, οι βιοδείκτες παρακολούθησης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη φαρμάκων. Αξιοποιούνται για την εκτίμηση της επίτευξης των επιθυμητών θεραπευτικών αποτελεσμάτων και για τη διασφάλιση της ασφάλειας του ασθενούς. Είναι σημαντικό να παρακολουθείται η ηπατική λειτουργία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης φαρμάκων, ώστε να αποφεύγεται η ηπατοτοξικότητα.

1.5 Βιοδείκτης ασφάλειας

Ένας βιοδείκτης ασφάλειας μετράται είτε πριν είτε μετά την έκθεση σε μια ιατρική παρέμβαση ή έναν περιβαλλοντικό παράγοντα, με στόχο την εκτίμηση της πιθανότητας της παρουσίας μιας τοξικότητας ως ανεπιθύμητης επίδρασης. Σε πολλές θεραπείες, η παρακολούθηση της τοξικότητας στο ήπαρ, στα νεφρά ή στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι απαραίτητη για να διασφαλιστεί ότι η θεραπεία μπορεί να συνεχιστεί με ασφάλεια.

Οι βιοδείκτες ασφάλειας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την αναγνώριση ανεπιθύμητων παρενεργειών κατά τη διάρκεια μιας θεραπείας. Για παράδειγμα, το ηλεκτροκαρδιογράφημα χρησιμεύει ως βιοδείκτης ασφάλειας για την παρακολούθηση ανεπιθύμητων ενεργειών κατά τη χρήση αντιαρρυθμικών φαρμάκων. Παράλληλα, με τους βιοδείκτες ασφάλειας παρακολουθούνται οι πληθυσμοί που εκτίθενται σε περιβαλλοντικούς κινδύνους και αξιολογούνται οι συνέπειες από μια τέτοια έκθεση.

1.6 Φαρμακοδυναμικός Βιοδείκτης ή Βιοδείκτης απόκρισης

Φαρμακοδυναμικός ή αποκρίσιμος βιοδείκτης ονομάζεται εκείνος του οποίου οι μετρήσεις επηρεάζονται από ιατρικά ή περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αυτού του τύπου οι βιοδείκτες έχουν ευρεία εφαρμογή τόσο στην ανάπτυξη νέων θεραπειών όσο και στις κλινικές μελέτες, καθώς διευκολύνουν τη λήψη συμπερασμάτων σχετικά με την αποτελεσματικότητα ή μη ενός φαρμάκου, την πορεία της θεραπείας και την πρόγνωση.

Μερικές από τις πιθανές χρήσεις των φαρμακοδυναμικών βιοδεικτών περιλαμβάνουν την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας, τον καθορισμό της σωστής δοσολογίας, τη διακοπή της θεραπείας σε περίπτωση απουσίας αποτελεσμάτων, καθώς και τον έλεγχο της ασφάλειας του φαρμάκου, τις πιθανές παρενέργειες την παρακολούθηση των πιθανών παρενεργειών και την

καταγραφή τους. Επιπλέον, αν ένα φάρμακο δεν δείξει επαρκή αποτελέσματα κατά τη διάρκεια των δοκιμών, η περαιτέρω ανάπτυξή του μπορεί να διακοπεί. Για παράδειγμα, εάν μια θεραπεία για υπέρταση ή διαβήτη δεν προκαλέσει την αναμενόμενη μείωση σε βασικούς δείκτες, όπως η αρτηριακή πίεση ή τα επίπεδα γλυκόζης, θεωρείται προτιμότερο να εγκαταλειφθεί. Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων συχνά παρουσιάζει δυσκολίες. Ορισμένοι βιοδείκτες, όπως οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (ACE), ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορές στις τιμές μεταξύ ασθενών που λαμβάνουν την ίδια δόση, χωρίς όμως να αντικατοπτρίζουν τη μακροχρόνια θεραπευτική αποτελεσματικότητα.

1.7 Βιοδείκτης Κινδύνου

Ένας βιοδείκτης ευαισθησίας/κινδύνου είναι εκείνος που υποδεικνύει την πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας ή ιατρικής κατάστασης σε ένα άτομο που δεν έχει προς το παρόν συμπτώματα ή διάγνωση για τη συγκεκριμένη κατάσταση. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA (BRCA1 & BRCA2) συνδέονται με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η έννοια αυτή μοιάζει με εκείνη των προγνωστικών βιοδεικτών, με τη βασική διαφορά ότι στους βιοδείκτες κινδύνου, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου, ενώ στους προγνωστικούς βιοδείκτες, το ενδιαφέρον αφορά στην πρόγνωση μετά την αρχική διάγνωση. Αυτοί οι τύποι βιοδεικτών αποτελούν τη βάση για την πραγματοποίηση επιδημιολογικών μελετών που εξετάζουν τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ασθενειών. (Califf, 2018)

1.8 Άλλες Ταξινομήσεις

Εκτός από την παραπάνω ταξινόμηση με βάση τις εφαρμογές τους που αναπτυχθήκαν παραπάνω, οι βιοδείκτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τα χαρακτηριστικά τους, τη γενετική γνώση και τη μοριακή βιολογία που ενσωματώνουν. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι βιοδείκτες απεικόνισης, οι οποίοι προσφέρουν τη δυνατότητα λήψης ποσοτικών και τοπογραφικά εντοπισμένων

πληροφοριών, οι οποίες παρακολουθούνται μέσω τεχνικών απεικόνισης, όπως η μαγνητική τομογραφία (MRI). Επίσης, σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι μοριακοί βιοδείκτες, οι οποίοι βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων μορίων, όπως πρωτεΐνες ή ένζυμα, καθώς και οι βιοδείκτες νουκλεϊκών οξέων, που σχετίζονται με γονίδια, RNA ή DNA

Με βάση τη γενετική γνώση και τη μοριακή βιολογία, οι βιοδείκτες ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες: σε βιοδείκτες φυσικής ιστορίας, οι οποίοι συνδέονται με την πορεία και την εξέλιξη μιας νόσου, σε βιοδείκτες δραστηριότητας φαρμάκου, οι οποίοι μετρούν την επίδραση ενός φαρμάκου στον οργανισμό, και σε υποκατάστατους δείκτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως αντικαταστάτες κλινικών τελικών σημείων, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες χωρίς την ανάγκη πλήρους κλινικής παρακολούθησης.

Επιπλέον, με βάση τη μοριακή κατανόηση, υπάρχουν βιοδείκτες που προσφέρουν κρίσιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη του καρκίνου, τον τύπο του, τις πιθανότητες υποτροπής και τις βέλτιστες θεραπευτικές επιλογές. Αυτοί συμβάλλουν ιδιαίτερα στην εξατομίκευση της θεραπείας και στη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων. (Purkayastha et al., 2023)

2. Μοριακοί Βιοδείκτες και Ρόλος τους στις Αντικαρκινικές Θεραπείες

Οι μοριακοί βιοδείκτες είναι ζωτικής σημασίας καθώς παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τη διάγνωση, την πρόγνωση, την απόκριση στη θεραπεία και την εξατομικευμένη κλινική προσέγγιση. Στον τομέα του καρκίνου, ένας μοριακός βιοδείκτης ορίζεται ως ένα χαρακτηριστικό που αξιολογείται για να υποδηλώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, την παρουσία του ή την πρόγνωση του ασθενούς. Οι βιοδείκτες αυτοί μπορεί να είναι μοριακά, κυτταρικά ή φυσιολογικά χαρακτηριστικά ή να εντοπίζονται μέσω τεχνικών απεικόνισης. Εντοπίζονται σε ιστούς ή σωματικά υγρά και είτε παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα είτε από φυσιολογικά κύτταρα που αντιδρούν στην παρουσία καρκίνου.

Η μελέτη των βιοδεικτών περιλαμβάνει την ανάλυση όγκων και σωματικών υγρών για την ανίχνευση αλλαγών σε βιομόρια, όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες ή άλλα μόρια. Αυτές οι αλλαγές ανιχνεύονται είτε μέσω βιοψίας όγκου είτε μέσω μη επεμβατικών διαδικασιών, όπως η ανάλυση δειγμάτων αίματος (ορός ή πλάσμα), σάλιου, επιχρισμάτων στοματικής κοιλότητας, κοπράνων ή ούρων.

Οι πληροφορίες που εξάγονται από τη μέτρηση των βιοδεικτών είναι πολύτιμες για:

- Τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου,
- Την εξατομικευμένη θεραπεία και τη διαμόρφωση θεραπευτικών στρατηγικών,
- Την πρόβλεψη της απόκρισης στα φάρμακα, και
- Την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. (Sarhadi and Armengol, 2022)

2.1 Γενετικοί Βιοδείκτες

Η γενετική πληροφορία, η οποία αφορά τη σειρά των νουκλεοτιδίων του DNA, επηρεάζει κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες. Διάφορες γενετικές αλλοιώσεις όπως

μεταλλάξεις ή ανωμαλίες στο γενετικό υλικό, διαταράσσουν την ισορροπία συμβάλλοντας στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ένα βασικό χαρακτηριστικό του καρκίνου. Αυτές οι γενετικές αλλαγές παρεμβαίνουν στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και πολλαπλασιασμού, ενώ επηρεάζουν σημαντικά τα γονίδια που σχετίζονται με την καταστολή όγκων, την επιδιόρθωση του DNA και τα πρώτο-ογκογονίδια διευκολύνοντας την ανάπτυξη και επιβίωση καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, η εμφάνιση του καρκίνου συνδέεται στενά με γενετικές μεταβολές που ενισχύουν τη δυνατότητα των κυττάρων να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και να επιβιώνουν.

Οι μεταλλάξεις και οι γονιδιακές αλλαγές αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες καρκίνου παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τις υποκείμενες γενετικές διεργασίες που προωθούν την ανάπτυξη και την εξέλιξή του. Παραδείγματα βιοδεικτών που βασίζονται σε τέτοιες μεταβολές περιλαμβάνουν:

Μετάλλαξη BRAF V600E: Προκαλεί ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης και βοηθά στην επιλογή στοχευμένων θεραπειών σε ασθενείς με μελάνωμα.

Μεταλλάξεις EGFR (Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας): Μεταλλάξεις όπως οι διαγραφές εξονίου 19 και η μετάλλαξη L858R αυξάνουν την ευαισθησία στους αναστολείς EGFR σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).

Μεταλλάξεις KRAS: Παρουσιάζονται στο 30-40% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου, ενεργοποιώντας σηματοδοτικές οδούς που επηρεάζουν την ανταπόκριση στις θεραπείες.

Μεταλλάξεις BRCA1/BRCA2: Αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού και ωοθηκών, ενώ κατευθύνουν την επιλογή εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Υπερέκφραση HER-2: Συνδέεται με επιθετική μορφή καρκίνου του μαστού και γαστρικού καρκίνου. Η θεραπεία με αντισώματα κατά του HER-2 αποτελεί σημαντική στρατηγική αντιμετώπισης. (Das et al., 2024)

2.2 Επιγενετικοί Βιοδείκτες

Οι επιγενετικοί δείκτες ανιχνεύουν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που δεν προκαλούνται από μεταλλάξεις αλλά από επιγενετικούς παράγοντες. Οι αλλαγές στον τρόπο έκφρασης του φαινοτύπου μπορεί να περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών και μη κωδικοποιητικά RNA. Η μεθυλίωση το DNA μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή δράσης σημαντικών ογκονοκατασταλτικών γονιδίων ή σε υπερέκφραση ογκογονιδίων. Τροποποιήσεις των ιστονών και στην οργάνωση της χρωματίνης επηρεάζει τη μεταγραφή, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τις διαδικασίες επιδιόρθωσης και αντιγραφής του DNA. Αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι παρούσες σε όλους τους τύπους ανθρώπινων κακοηθειών και συχνά εμφανίζονται σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου, κάνοντας τους επιγενετικούς βιοδείκτες ιδιαίτερα χρήσιμους για τη διάγνωση, προσφέροντας ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Ένα παράδειγμα επιγενετικού βιοδείκτη είναι το γονίδιο MLH1, ένα γονίδιο επιδιόρθωσης ασυμφωνιών DNA, όπου η υπερμεθυλίωση του οδηγεί σε καρκίνο του παχέος εντέρου. Επίσης, ανίχνευση τροποποιήσεων των ιστονών είναι πιθανή δείκτες υποτροπής αλλά και ένδειξη πλήρους θεραπείας του ασθενούς. Ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) που εμφάνισαν συνολική ακετυλίωση των ιστονών, παρουσίασαν καλύτερη πρόγνωση στην ανάλυση επιβίωσης σε σύγκριση με ασθενείς με συνολικά μεθυλιωμένες ή μη τροποποιημένες ιστόνες, οι οποίες σχετίστηκαν με δυσμενέστερη πρόγνωση. (Kamińska et al., 2018)

2.3 Πρωτεϊνικοί Βιοδείκτες

Το πρωτεϊνωμα είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο σύστημα που περιλαμβάνει πλήθος πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλοεπιδρούν μέσω δυναμικών διαμοριακών σχέσεων και

υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Επειδή οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των μοριακών διεργασιών, τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα, οι πρωτεϊνικοί βιοδείκτες συνδέονται στενά με την ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου.

Αυτοί οι βιοδείκτες ανιχνεύονται σε βιολογικά υγρά, όπως το αίμα και σε άλλους ιστούς, παρέχοντας πληροφορίες για τη δραστηριότητα ή την παρουσία του καρκίνου. Στον καρκίνο του παγκρέατος, για παράδειγμα, πρωτεΐνες ανιχνεύονται σε διάφορα σωματικά υγρά, όπως η χολή, τα πεπτικά ένζυμα και τα ούρα. Αυτές οι πρωτεΐνες αναδεικνύονται ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες, με εφαρμογές που περιλαμβάνουν:

- Την έγκαιρη διάγνωση
- Τη σταδιοποίηση της νόσου
- Την πρόγνωση της θεραπευτικής ανταπόκρισης
- Την παρακολούθηση της πορείας των ασθενών

Στην κλινική πράξη, οι περισσότεροι καρκινικοί βιοδείκτες που έχουν εγκριθεί από τον FDA είναι μεμονωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ανιχνεύονται στον ορό του αίματος. Κάποια ενδεικτικά παραδείγματα πρωτεϊνικών βιοδεικτών είναι:

Χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG), α-φετοπρωτεΐνη (AFP) και γαλακτική αφυδρογονάση (LDH): Χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σταδιοποίηση και την παρακολούθηση της θεραπείας στον καρκίνο των όρχεων.

HER-2: Η υπερέκφρασή του συνδέεται με επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού και του γαστρικού καρκίνου.

Κυτοκερατίνες: Αποτελούν δείκτες κυτταρικής διαφοροποίησης και ανιχνεύονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, παρέχοντας πληροφορίες για την ανάπτυξη και την πρόγνωση.

2.4 Μεταβολικοί Βιοδείκτες

Οι μεταβολίτες και οι μεταβολικές οδοί είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Οι μεταβολικές διεργασίες τροποποιούνται στα καρκινικά κύτταρα ώστε να υποστηρίξουν τις αυξημένες ενεργειακές και βιοσυνθετικές τους ανάγκες. Στο πλαίσιο αυτό, οι μεταβολικοί βιοδείκτες που προκύπτουν παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου. Ενδεικτικά παραδείγματα μεταβολικών βιοδεικτών είναι:

Γαλακτικό οξύ: Η αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος στους ιστούς όγκου ή στον ορό του αίματος αποτελεί χαρακτηριστικό της ενεργοποιημένης γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα.

Μεταφορείς γλυκόζης (GLUTs): Η υπερέκφραση του GLUT1 διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα, υποστηρίζοντας την ενεργειακή τους απαίτηση και την ανάπτυξή τους.

Η κατανόηση των μεταβολικών οδών και των σχετικών βιοδεικτών ανοίγει νέες δυνατότητες για στοχευμένη θεραπεία, επιτρέποντας την ανάπτυξη φαρμάκων που παρεμβαίνουν σε κρίσιμα στάδια του καρκινικού μεταβολισμού. (Das et al., 2024)

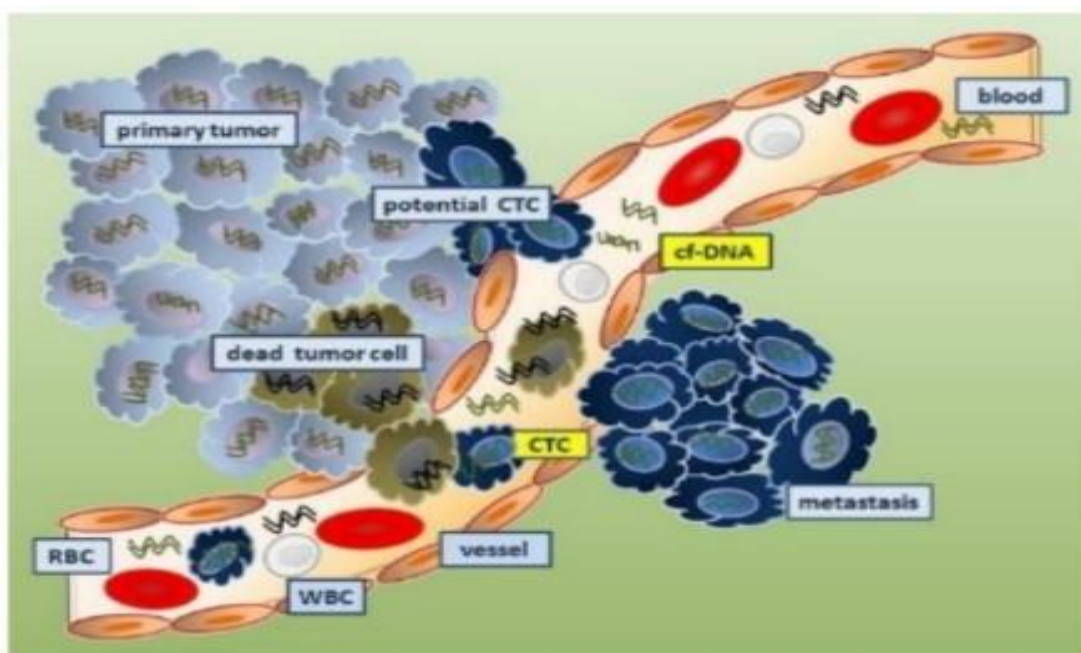
2.5 Κυτταρικοί & Ανοσολογικοί Βιοδείκτες

Οι σύγχρονες κλινικές πρακτικές έχουν αξιοποιήσει με επιτυχία τα καρκινικά και τα ανοσοποιητικά κύτταρα ως πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες για την πρόγνωση συγκεκριμένων κακοηθειών. Σε προχωρημένα στάδια των καρκινικών όγκων, τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για τη νόσο.

Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (CTCs)

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) αποτελούν σημαντικούς και αποτελεσματικούς βιοδείκτες για την πρόγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνο. Η παρουσία των CTCs έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την επιβίωση των ασθενών με επεμβατικό καρκίνο του μαστού. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας, τα CTCs θεωρούνται καλύτεροι προγνωστικοί δείκτες σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς δείκτες όγκου, όπως το αντιγόνο CA27-29. Στους ασθενείς που υποβάλλονται σε συστηματική θεραπεία για μεταστατικό καρκίνο του μαστού, τα CTCs παρέχουν πρώιμη και ακριβή ένδειξη για την πρόοδο της νόσου και την επιβίωση. Επιπλέον, η παρουσία θεραπευτικών στόχων στα CTCs μπορεί να επηρεάσει την επιλογή ενός αποτελεσματικού θεραπευτικού σχήματος, ενώ η αξιολόγηση της αντίδρασης στη θεραπεία μπορεί να γίνει μετά τον αρχικό κύκλο φαρμακευτικής αγωγής.

Για τη μοριακή διάγνωση των CTCs χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως η αλληλούχηση DNA, η αλληλούχηση RNA, η υβριδοποίηση RNA in situ και η αλληλούχηση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.



Εικόνα 2: DNA από ελεύθερα κύτταρα και κακοήγη κύτταρα σε κυκλοφορία. Τα CTCs εξαπλώνονται σε όλα τα αιμοφόρα αγγεία μετά τη διαφυγή από τις αρχικές θέσεις και σχηματίζουν μεταστάσεις στα περιφερειακά όργανα. Νεκρά καρκινικά κύτταρα ή επεκτεινόμενα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν DNA χωρίς κύτταρα (cf-DNAs) στο κυκλοφορία του αίματος. RBC = ερυθρά αιμοσφαίρια, WBC = λευκά αιμοσφαίρια (Das et al., 2024)

Ανοσολογικοί Βιοδείκτες

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να διακρίνει τα αυτοαντιγόνων (self-antigens) από τα ξένα αντιγόνα (foreign antigens), προάγοντας τη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και ενεργοποιώντας την ανοσολογική αντίδραση απέναντι τους. Σε διάφορους τύπους όγκων όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου αλλά και σε μεταστάσεις στο ήπαρ, η μέτρηση των ανοσοκυττάρων στους εξεταζόμενους ιστούς έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση αξιόπιστων και κλινικά χρήσιμων βιοδεικτών.

Οι μακροφάγοι και τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι τα πιο συχνά ανοσοκύτταρα που συνδέονται με τα κλινικά αποτελέσματα στις θέσεις των όγκων. Η ιστοπαθολογική εξέταση των λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο έχει επιβεβαιωθεί ως αξιόπιστος και προγνωστικά χρήσιμος βιοδείκτης.

2.6 Βιοδείκτες Μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων (microRNAs)

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά, μη κωδικοποιητικά RNAs που σχετίζονται με κλινικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων καρκίνου και μπορεί να λειτουργήσουν ως δείκτες διάγνωσης ή πρόγνωσης. Ρυθμίζουν τη μεταγραφή των mRNAs-στόχων τους, ευνοώντας την καρκινογένεση, τη μετάσταση, την ανοσολογική διαφυγή και την αγγειογένεση. Οι δείκτες microRNA που σχετίζονται με τον καρκίνο μπορούν να ανιχνευθούν σε σωματικά υγρά, επιτρέποντας την παρακολούθηση ατόμων με καρκίνο μέσω λιγότερο επεμβατικών μεθόδων.

Η πρώτη αναφορά για την απορρύθμιση των microRNAs στον καρκίνο δημοσιεύθηκε το 2002, και αφορούσε δύο ομάδες miRNAs (miR-16 και miR-15) σε μια μελέτη για τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Το 2015, μια μελέτη για το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου αποκάλυψε ότι η έκφραση του miRNA-483-3p ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το υγιές δείγμα. Οι υψηλές τιμές του miRNA-483-3p συνδέθηκαν με ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα (IPMNs), ενώ η έκφραση του miRNA-21 σχετίστηκε με μεταστάσεις στο ήπαρ και στους λεμφαδένες ($p < 0.01$). Τα miRNAs λειτουργούν είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια είτε ως ογκογονίδια. Συγκεκριμένα, τα miR-18a, miR-205-5p και miR-155 αναστέλλουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα, τη διείσδυση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, ενώ τα miR-494, miR-17-3p και miR-598 διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.

Για τη διάγνωση πιθανών βιοδεικτών σε επίπεδο έκφρασης RNA, μερικές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τη διαφορική σύγκριση, η ποσοτική αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με χρήση αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR), τις τεχνικές με χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (bead-based approaches) και την ανάλυση μικροσυστοιχιών (micro-array analysis). (Das et al., 2024)

3. Μέθοδοι και Αναλυτικές Τεχνικές Παρακολούθησης Βιοδεικτών

Η ανάλυση βιοδεικτών αποτελεί κρίσιμο εργαλείο για την κατανόηση της βιολογίας των ασθενειών, την εξέλιξή τους και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των θεραπειών. Η πρόοδος στις τεχνολογίες ανάλυσης έχει επιτρέψει την ανάπτυξη εξειδικευμένων μεθόδων όπως γενετικές αναλύσεις, η πρωτεομική, η μεταβολομική και οι τεχνικές απεικόνισης κ.α., που διευκολύνουν την ανακάλυψη και την εφαρμογή νέων βιοδεικτών.

Εκτός από τη διάγνωση, οι τεχνικές αυτές συμβάλλουν στην παρακολούθηση της θεραπείας, στη μελέτη της φαρμακοδυναμικής και τη βελτιστοποίηση των εξατομικευμένων θεραπειών. (Bodaghi et al., 2023)

Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση βιοδεικτών και την παρακολούθηση αντικαρκινικών θεραπειών βασίζονται σε μοριακές και γενετικές αναλύσεις όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και η αλληλούχηση τμημάτων DNA (Sanger και επομένης γενιάς - NGS). Περιλαμβάνονται επίσης μέθοδοι εστιασμένες στην ανάλυση πρωτεϊνών όπως ο προσδιορισμός ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA), η ανοσοαποτύπωση Western Blotting και η ανάλυση με χρήση φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry - MS). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανάλυσης βιοδεικτών που βασίζονται στην απεικόνιση, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοϊστοχημείας (Immunohistochemistry - IHC), της in situ υβριδοποίησης (In Situ Hybridization - ISH) και της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry). Ίσως η κυριότερη και πιο χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της θεραπείας είναι η τεχνική υγρής βιοψίας.

3.1 Μοριακές Και Γενετικές Αναλύσεις

3.1.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην καρκινογένεση προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών. Ένα από τα βασικά εργαλεία σε αυτόν τον τομέα είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), με ιδιαίτερη έμφαση στη χρήση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-qPCR). (Amatori et al., 2017)

Η PCR, η οποία ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis το 1983 (Νόμπελ Χημείας 1993), αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Αξιοποιώντας τον φυσικό μηχανισμό αντιγραφής του DNA, επιτρέπει την ταχεία παραγωγή και ενίσχυση επιλεγμένων τμημάτων DNA, τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο.

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της PCR είναι ότι, με τη χρήση μιας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (π.χ. Taq πολυμεράση) και του κατάλληλου ζεύγους εκκινήτων (primers), μπορούμε να κατευθύνουμε την πολυμεράση στη σύνθεση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, οδηγώντας σε εκθετική ενίσχυση (amplification) της αλληλουχίας-στόχου.

Η διαδικασία της PCR βασίζεται σε τρία βασικά στάδια:

1. **Αποδιάταξη (Denaturation):** Θέρμανση στους 94-95°C για 5 λεπτά ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων του DNA και να διαχωριστούν.
2. **Επίδεση (Annealing):** Μείωση της θερμοκρασίας (55-65°C) ώστε να επιτευχθεί η συμπληρωματική πρόσδεση του ειδικά και σωστά επιλεγμένου

ζεύγους εκκινητών στις επιλεγμένες αλληλουχίες DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών.

3. **Επιμήκυνση (Extension):** Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72° C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της Taq πολυμεράσης και επέκταση της αλληλουχίας-στόχο. Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας.

Στο τέλος της διαδικασίας, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 95°C ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες και να ξεκινήσει νέος κύκλος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για περίπου 25-35 κύκλους.

Η επιτυχία της PCR εξαρτάται από διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση, την ειδικότητα και την ακρίβεια της ενίσχυσης του DNA. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία είναι οι εξής:

Δείγμα DNA: Η ποιότητα και η καθαρότητα του αρχικού δείγματος DNA είναι κρίσιμες για την αποφυγή αναστολής της αντίδρασης. Όσο λιγότερες προσμίξεις υπάρχουν (πρωτεΐνες, άλατα ή οργανικοί διαλύτες), τόσο καλύτερη η απόδοση της αντίδρασης.

DNA πολυμεράση: Το ένζυμο πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση πολυμερών μορίων, όπως το DNA και το RNA, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στη νέα αλυσίδα με βάση μια πρότυπη αλληλουχία. Στην PCR, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πολυμεράση είναι η Taq DNA πολυμεράση, η οποία είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες, καθώς η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται στους 95°C. Προστίθεται μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή καθ' όλη τη διάρκεια των κύκλων. Εκτός από τη δυνατότητα αυτοματοποίησης της PCR, η χρήση της Taq πολυμεράσης συμβάλλει επίσης στη βελτίωση της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης της αντίδρασης.

Επιλογή εκκινητών (primers): Ο σχεδιασμός και η επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών είναι κρίσιμη για την ειδικότητα και την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, καθώς επηρεάζει καθοριστικά την επιτυχία ή την αποτυχία της. Οι κατάλληλοι εκκινητές είναι μικρές αλληλουχίες DNA (ολιγονουκλεοτίδια), μήκους 18-25 νουκλεοτιδίων, οι οποίες δεν είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών. Επιπλέον, η περιεκτικότητά τους σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40-60% για μεγαλύτερη σταθερότητα. Τέλος, η θερμοκρασία τήξης (T_m) των δύο εκκινητών πρέπει να είναι παρόμοια, ώστε να υβριδοποιούνται ταυτόχρονα. Διάφορα λογισμικά βιοπληροφορικής μπορούν να βοηθήσουν στον σχεδιασμό των εκκινητών.

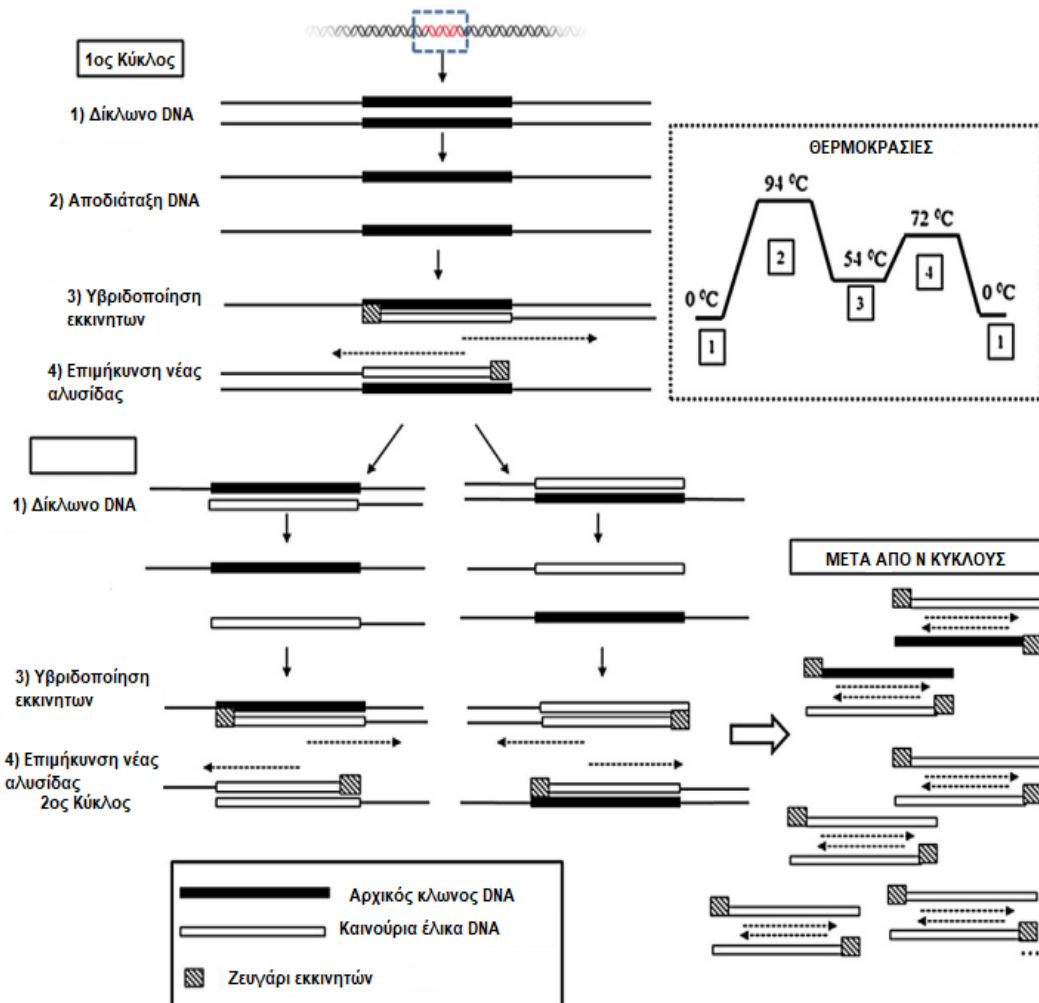
Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} : Στην αντίδραση προστίθενται ιόντα Mg^{2+} , τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της DNA πολυμεράσης και την αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR. Χαμηλή συγκέντρωση ιόντων οδηγεί σε χαμηλή ενίσχυση, ενώ η υψηλή συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδική ενίσχυση και σε παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων.

Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs): Τα dNTPs είναι τα δομικά στοιχεία που χρησιμοποιεί η πολυμεράση για τη σύνθεση νέου DNA. Αυξημένη συγκέντρωση dNTPs αυξάνει την πιθανότητα λαθών από την πολυμεράση, ενώ πολύ χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να περιορίσει τη σύνθεση DNA.

Αριθμός κύκλων PCR: Καθώς η PCR βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης, ο αριθμός κύκλων επηρεάζει την απόδοση της αντίδρασης. Αν επιλεγούν λιγότεροι κύκλοι (<20) θα οδηγήσει σε ανεπαρκή ενίσχυση, ενώ πάνω από 40 αυξάνεται η πιθανότητα να παραχθούν μη ειδικά προϊόντα και διμερή. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 25-35.

Η χρήση φθορίζουσών χρωστικών ή ειδικών ανιχνευτών με φθορίζουσες ετικέτες ενισχύει την ανάλυση. Ο συνδυασμός της PCR με την αντίστροφη μεταγραφή

επιτρέπει την ανάλυση του mRNA, ενισχύοντας περαιτέρω την κατανόηση της μοριακής βάσης του καρκίνου.



Σχήμα 1 : Διάγραμμα ενίσχυσης θραυσμάτων DNA με PCR. (Caixeta et al., 2014)

Όπως αναφέρθηκε, η RT-qPCR είναι μια πολύ σημαντική παραλλαγή καθώς παρέχει τη δυνατότητα όχι μόνο ανίχνευσης αλλά και ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης σε πραγματικό χρόνο. Η τεχνική αυτή αξιοποιεί την υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια για τη ανίχνευση και τη μελέτη γενετικών αλλαγών, όπως μεταλλάξεις, ανωμαλίες, μεθυλίωση του DNA, την έκφραση συγκεκριμένων ογκογονιδίων και γονιδίων καταστολής όγκων, συμβάλλοντας σημαντικά στην εξατομικευμένη ιατρική.

Έτσι, είναι δυνατή η ανάπτυξη θεραπειών που είναι προσαρμοσμένες στις μοριακές ιδιαιτερότητες κάθε ασθενούς βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα των αντικαρκινικών θεραπειών και αυξάνοντας την πιθανότητα επιτυχούς αντιμετώπισης της νόσου. (Garibyan and Avashia, 2013)

Ιδιαίτερα, καθώς οι μεταστάσεις αποτελούν τη βασική αιτία θνησιμότητας στους ασθενείς με καρκίνο, η ανίχνευση των CTCs παίζει καθοριστικό ρόλο στη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου. Τα CTCs που αποκολλώνται από τον πρωτογενή όγκο και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, αποτελούν βασική αιτία των απομακρυσμένων μεταστάσεων και η παρουσία τους συνδέεται με δυσμενέστερη πρόγνωση και μειωμένη επιβίωση.

Η τεχνική της RT-qPCR έχει αναδειχθεί ως μια από τις πιο ευαίσθητες και ειδικές μεθόδους για την ανίχνευση τους επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίων-δεικτών που εκφράζονται σε αυτά τα κύτταρα. Αρχικά, το RNA απομονώνεται από το δείγμα, μετατρέπεται σε cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης, και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για PCR σε πραγματικό χρόνο.

Η επιλογή των κατάλληλων γονιδίων-δεικτών αποτελεί κρίσιμο στάδιο στη διαδικασία της PCR, καθώς ορισμένα γονίδια εκφράζονται και σε φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, γεγονός που περιορίζει την εξειδίκευση της ανίχνευσής τους. Παρ' όλα αυτά, γονίδια όπως η κυτταροκερατίνη 19 (CK-19), που εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), που υπερεκφράζεται σε επιθηλιακούς όγκους, και το Mammaglobin A (hMAM), το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως σε γυναικολογικές κακοήθειες, όπως ο καρκίνος του μαστού, συγκαταλέγονται στους συχνά αξιοποιούμενους δείκτες. (Andergassen et al., 2016)

3.1.2 Αλληλούχηση Sanger

Με τον όρο αλληλούχηση περιγράφεται ο προσδιορισμός της σειράς των νουκλεοτιδίων σε ένα μόριο DNA. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αλληλούχησης τερματισμού αλυσίδας, γνωστή και ως μέθοδος Sanger, είναι μία από τις πρώτες μεθόδους αλληλούχησης και παραμένει χρήσιμη μέχρι και σήμερα. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger το 1977 (για την οποία βραβεύτηκε με το Νόμπελ Χημείας το 1980) και παραμένει θεμελιώδης για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του DNA. (Kim et al., 2011)

Ονομάζεται αλληλούχηση τερματισμού αλυσίδας, επειδή η χρήση διδεοξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) σταματά τη σύνθεση του DNA, δημιουργώντας θραύσματα διαφορετικού μήκους, τα οποία αναλύονται στη συνέχεια για την αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας.

Κύρια σημεία της μεθόδου:

1. **Επιμήκυνση DNA:** Χρησιμοποιείται ενισχυμένο τμήμα DNA ή συμπληρωματικό DNA (cDNA). Προστίθεται εκκινητής με συμπληρωματικές βάσεις ως προς την αλληλουχία-στόχο, μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ως υπόστρωμα, καθώς και Taq πολυμεράση ώστε να υβριδοποιηθεί με τον εκκινητή και να επιμηκυνθεί η αλυσίδα. Επίσης προστίθεται μ μικρή ποσότητα διδεοξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs). Η διαφορά των ddNTPs με τα dNTPs είναι ότι από τα ddNTPs απουσιάζει η υδροξυλομάδα στον 3' άνθρακα του σακχάρου
2. **Παραγωγή θραυσμάτων:** Με την εισαγωγή σε τυχαία σημεία των ddNTPs, λόγω έλλειψης της υδροξυλομάδας στη θέση 3' όταν προστίθενται στην αλυσίδα εμποδίζουν την προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων και σταματούν την επιμήκυνση. Έτσι παράγονται θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους που καταλήγουν σε συγκεκριμένες βάσεις

3. **Ανάλυση αλληλουχίας:** Τα θραύσματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση (συνήθως από πήκτωμα αγαρόζης) και ανιχνεύονται μέσω φθορισμού ή ραδιοσημάτων. (Crossley et al., 2020)

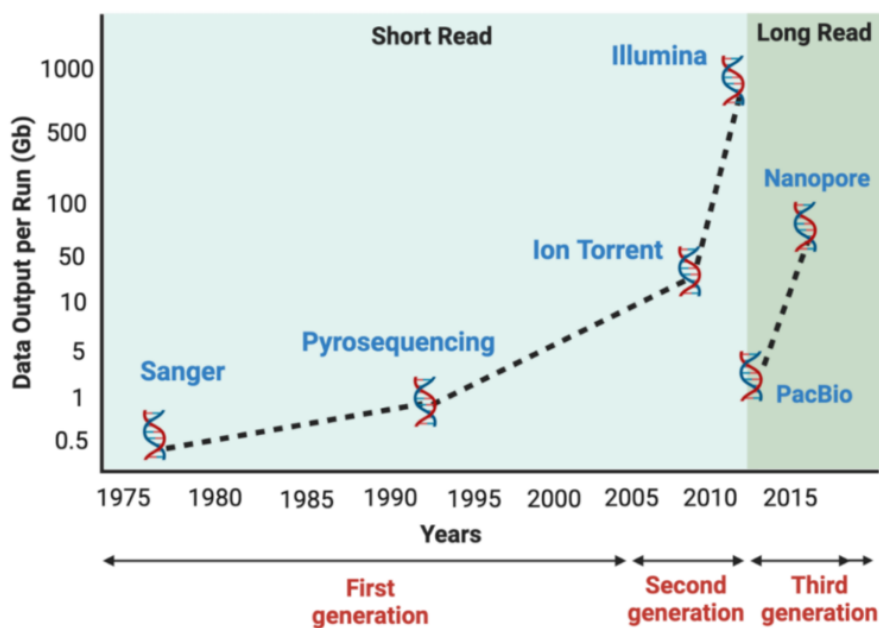
Η μέθοδος Sanger αποτέλεσε την κύρια τεχνολογία για την αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος στο Human Genome Project (HGP), αποδεικνύοντας την ακρίβεια και αξιοπιστία της. Παρά τις απαιτήσεις σε χρόνο και κόστος, αποτέλεσε πρότυπο για να αναγνωριστούν τα πρώτα τμήματα του ανθρώπινου γονιδιώματος, βοηθώντας στην καταγραφή και την κατηγοριοποίηση του ανθρώπινου DNA.

Πλέον έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αλληλούχηση όπως η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) που είναι ταχύτερες, οικονομικότερες και ικανές να καλύπτουν μεγαλύτερα τμήματα DNA. Ωστόσο, η Sanger παραμένει το «χρυσό πρότυπο» την επικύρωση αποτελεσμάτων από NGS αλλά και για μικρές και εξειδικευμένες εφαρμογές και συνεχίζει να αποτελεί μια σημαντική βάση για την κατανόηση και ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, ενισχύοντας την αξιοπιστία των δεδομένων σε ερευνητικά και κλινικά πεδία. (Kim et al., 2011; Crossley et al., 2020)

3.2.3 Αλληλούχηση Επομένης Γενιάς (Next generation sequencing - NGS)

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνολογικές επαναστάσεις στη γενετική ανάλυση και την ιατρική. Αναπτύχθηκε για να ξεπεράσει τους περιορισμούς της παραδοσιακής μεθόδου Sanger, η οποία, αν και αξιόπιστη, χαρακτηριζόταν από υψηλό κόστος και περιορισμένη παραγωγικότητα δεδομένων. Αντίθετα, η NGS επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχηση χιλιάδων θραυσμάτων DNA ή RNA, προσφέροντας ταχύτερη, οικονομικότερη και ευρύτερη ανάλυση γονιδιακών πληροφοριών.

Χάρη στις δυνατότητές της, η NGS έχει πλέον καθιερωθεί ως βασικό εργαλείο τόσο στη βασική έρευνα όσο και στην κλινική ιατρική, συμβάλλοντας καθοριστικά στην εξατομικευμένη θεραπεία. [17]



Εικόνα 3: Η εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχησης. (Guan et al., 2012)

Οι κυριότερες τεχνικές που αξιοποιούν αυτήν την τεχνολογία περιλαμβάνουν:

- **Πλήρης Γονιδωματική Αλληλούχηση (Whole-Genome Sequencing - WGS):** Εστιάζει στη χαρτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος, περιλαμβάνοντας τόσο τις κωδικές όσο και τις μη κωδικές περιοχές.
- **Εξονική Αλληλούχηση (Whole-Exome Sequencing - WES):** Εστιάζει αποκλειστικά στις περιοχές των εξονίων, μειώνοντας το κόστος και αυξάνοντας το βάθος κάλυψης.
- **Αλληλούχηση RNA (RNA Seq.):** Εξετάζει την έκφραση γονιδίων, τη σύνθεση πρωτεϊνών και τις μεταγραφικές μεταβολές μέσω ανάλυσης τμημάτων RNA.

- **Επιγενετική Αλληλούχηση (Epigenetic Sequencing):** Αναλύει επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι οποίες επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων.

Αφού λοιπόν επιλεγεί η καταλληλότερη τεχνική για το μόριο στόχος που θα αναλυθεί, γίνεται κατακερματισμός σε μικρότερα θραύσματα μέσω μηχανικών (π.χ. υπερήχων) ή ενζυματικών μεθόδων. Προστίθενται ειδικές αλληλουχίες (adapters) στα άκρα των θραυσμάτων και πολλαπλασιάζονται μέσω PCR, δημιουργώντας τη βιβλιοθήκη αλληλούχησης.

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της αλληλούχησης με τη μέθοδο NGS, όπου επιτρέπεται η μαζική και ταυτόχρονη αλληλούχηση μεγάλου αριθμού θραυσμάτων. Κάθε φορά εισάγεται ένα συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο και ανιχνεύεται μέσω φθορισμού ή ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται με έκπλυση και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Λόγω του μεγάλου όγκου των πληροφοριών έχουν αναπτυχθεί διάφορες πλατφόρμες NGS που χρησιμοποιούν διαφορετικές τεχνολογίες και πρωτόκολλα για την ανάλυση γενετικού υλικού και διευκολύνουν την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων γονιδίων, τη μείωση κόστους και χρόνου, καθώς και την εφαρμογή στην εξατομικευμένη ιατρική.

Οι κυριότερες πλατφόρμες είναι:

Illumina (HiSeq, MiSeq, NovaSeq): Χρησιμοποιεί τη μέθοδο "sequencing by synthesis" που επιτρέπει την παράλληλη αλληλούχηση εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA. Τα DNA θραύσματα προσδένονται σε ένα flow cell και ενισχύονται μέσω bridge PCR. Κάθε νουκλεοτίδιο που ενσωματώνεται φθορίζει με διαφορετικό χρώμα και ανιχνεύεται από κάμερα. Είναι κατάλληλη για WES, WGS και RNA-Seq.

Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific): Βασίζεται στην ανίχνευση ιόντων υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων. Ανιχνεύει αλλαγές στο

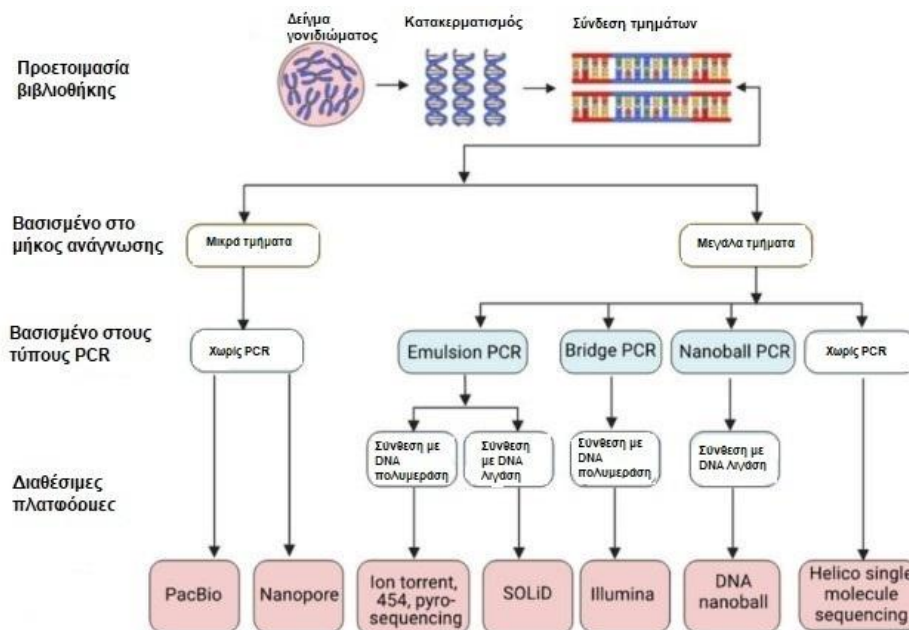
pH κατά την προσθήκη νέων νουκλεοτιδίων. Είναι οικονομική μέθοδος καθώς χρησιμοποιούνται ημιαγωγοί και δεν απαιτεί φθορισμός. Έχει εφαρμογή στην κλινική διάγνωση και την ανίχνευση μεταλλάξεων.

Oxford Nanopore: Χρησιμοποιεί νανοπόρους για τη μέτρηση αλλαγών στο ρεύμα καθώς περνούν θραύσματα DNA ή RNA. Παρέχει γρήγορες αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο, είναι φορητή και χαμηλού κόστους.

PacBio (Pacific Biosciences): Με την τεχνολογία Single-Molecule Real-Time (SMRT), ανιχνεύονται μακριές αλληλουχίες DNA σε πραγματικό χρόνο. Χρησιμοποιείται για WGS, επιγενετικές αναλύσεις και πολύπλοκες περιοχές γονιδιώματος.

Roche 454: Παλαιότερη πλατφόρμα βασισμένη στην πυροαλληλούχηση. Όταν προστίθεται ένα νέο νουκλεοτίδιο, η απελευθέρωση πυροφωσφορικού οδηγεί σε εκπομπή φωτός. Χρησιμοποιούνταν για μικρές αναλύσεις, αλλά έχει πλέον αντικατασταθεί από πιο σύγχρονες τεχνολογίες.

Μετά την αλληλούχηση, γίνεται συλλογή αποτελεσμάτων για επεξεργασία και ανάλυση με κατάλληλα βιοπληροφορικά εργαλεία.



Εικόνα 4: Επισκόπηση των διαφόρων τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) με διαφορετικές πλατφόρμες και αρχές. (Guan et al., 2012)

Η NGS έχει επαναπροσδιορίσει την προσέγγιση στην ογκολογία, παρέχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων, γενετικών συγχωνεύσεων και επιγενετικών τροποποιήσεων. Χρησιμοποιώντας πλατφόρμες όπως την Illumina και Ion Torrent, μπορούν να ταυτοποιηθούν μεταλλάξεις που σχετίζονται με διάφορες μορφές καρκίνου καθώς και για την επιλογή θεραπευτικής προσέγγισης όπως:

Μη-Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα (NSCLC): Εντοπίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο EGFR, κρίσιμες για τη χορήγηση αναστολέων τυροσινικής κινάσης (TKI).

Καρκίνος Παχέος Εντέρου: Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταγωγικού σήματος RAS και κατά συνέπεια τις KRAS, NRAS, και BRAF επηρεάζουν την επιλογή μονοκλωνικών αντισωμάτων για στοχευμένη θεραπεία.

Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML): Ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα γονίδια FLT3 και NPM1, οι οποίες επηρεάζουν την επιλογή κατάλληλης θεραπείας.

Μελάνωμα: Εντοπίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF, καθοριστικές για τη χρήση στοχευμένων φαρμάκων (αναστολείς BRAF).

Καρκίνος Προστάτη: Η ανάλυση του γονιδίου AR-V7 συνδέεται με αντοχή στις αντιανδρογόνες θεραπείες.

Επιπλέον, η NGS χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κληρονομικών καρκίνων μέσω των γονιδίων BRCA1 και BRCA2, προσφέροντας λύσεις για τη διαχείριση ασθενών με κληρονομική προδιάθεση.

Τέλος, η NGS διευκολύνει την παρακολούθηση της απόκρισης στις αντικαρκινικές θεραπείες μέσω της ανάλυσης κυκλοφορούντος DNA (ctDNA). Με την ανάλυση αυτή, αναγνωρίζονται μεταλλάξεις που συνδέονται με την πρόοδο του καρκίνου ή την ανάπτυξη αντοχής στις θεραπείες, ενώ διαμορφώνεται το μοριακό προφίλ τόσο του ασθενούς όσο και του όγκου. Αυτό επιτρέπει την προσαρμογή των θεραπειών στις ιδιαίτερες γενετικές ανάγκες του ασθενούς, τη βελτιστοποίηση των δόσεων των φαρμάκων και τη μείωση των παρενεργειών. Η NGS αποτελεί πλέον ακρογωνιαίο λίθο στη διαχείριση του καρκίνου, προωθώντας την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και βελτιώνοντας τις προοπτικές για τους ασθενείς. (Crossley et al., 2020; Guan et al., 2012)

3.2. Τεχνικές Ανάλυσης Πρωτεϊνών

3.2.1 Προσδιορισμός με ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA)

Η ELISA αποτελεί μια ισχυρή διαγνωστική μέθοδο που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών. Στην προσπάθεια για έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, η ανίχνευση πρωτεϊνών και ολιγονουκλεοτιδίων που εμφανίζονται μόνο στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η μέθοδος ELISA, λόγω της ευαισθησίας και της ακρίβειάς της αναδεικνύεται ως εργαλείο κλειδί σε αυτή τη διαδικασία. (Arya and Estrela, 2018)

Είναι μια ανοσοχημική μέθοδος που βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων για την αναγνώριση συγκεκριμένων αντιγόνων με κύριο χαρακτηριστικό τη χρήση ένζυμων. Αναπτύχθηκε από τους Engvall και Perlmann το 1971, με βάση την αρχή της ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA) αλλά με χρήση ενζύμων αντί για ραδιενεργών ισοτόπων. Αυτή η καινοτομία επέτρεψε την ασφαλέστερη και ακριβέστερη μέτρηση αντιγόνων, ξεκινώντας από τη μέτρηση ανοσοσφαιρίνης IgG. Η εφαρμογή της ELISA επεκτάθηκε σύντομα στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης, δείχνοντας την ευρεία δυναμική της.

Η μέθοδος ELISA περιλαμβάνει τη σύνδεση ενός ενζύμου ως ιχνηθέτης σε ένα αντίσωμα ή αντιγόνο, το οποίο παράγει ανιχνεύσιμο σήμα, όπως φωταύγεια, χρωματική αλλαγή ή φθορισμό, όταν έρθει σε επαφή με το κατάλληλο υπόστρωμα. Η ανίχνευση του σήματος μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι, με χρήση φασματοφωτόμετρου ή φθορισμόμετρου. Η πορεία και το αποτέλεσμα της αντίδρασης εξαρτώνται από τη δομή των συστατικών και τρόπο σύνδεσης.

Ως αντιγόνο ορίζεται μια πρωτεΐνη που προκαλεί ανοσοχημική αντίδραση, ενώ ως αντίσωμα αναφέρονται οι πρωτεΐνες (ανοσοσφαιρίνες) που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα (πλασματοκύτταρα) κατά τη διάρκεια χυμικής ανοσοαπόκρισης που ενεργοποιείται με την εισαγωγή του αντιγόνου στον οργανισμό. Τα αντισώματα δεσμεύουν τα αντιγόνα με σκοπό την προστασία του οργανισμού.

Παρά τις διάφορες παραλλαγές της, οι βασικές αρχές της μεθόδου χωρίζονται σε τέσσερα διακριτά στάδια:

1. Στο πρώτο στάδιο, το αντιγόνο δεσμεύεται σε μία στερεή επιφάνεια, συνήθως σε μικροπλάκες ή σωλήνες, οι οποίοι προσροφούν το αντιγόνο και το αντίσωμα χωρίς να επηρεάζονται τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος.

2. Στο επόμενο στάδιο προστίθεται το ένζυμο, το οποίο συνδέεται με το αντίσωμα ή το αντιγόνο χωρίς να επηρεάζεται το καταλυτικό του κέντρο. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα ένζυμα: η βήτα-γαλακτοσιδάση (B-Gal), η οξειδάση της γλυκόζης (Glucose Oxidase), η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) και η αλκαλική φωσφατάση (AP). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη παραλλαγή της μεθόδου ELISA.
3. Στο επόμενο στάδιο προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο αντιδρά με το ένζυμο και παράγει ανιχνεύσιμο σήμα. Για παράδειγμα, η AP σε συνδυασμό με το υπόστρωμα p-νιτροφαινυλοφωσφορικό παράγει κίτρινο χρώμα, ενώ η HRP σε συνδυασμό με το χρωμογόνο υπόστρωμα ο-φαινυλενοδιαμίνη παράγει καφέ χρώμα. Στην περίπτωση της B-gal, αντί για χρώμα, η αντίδραση παράγει φως (φθορισμό).
4. Στο τελευταίο στάδιο, γίνεται ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση του χρωμογόνου προϊόντος. Η μέτρηση των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα και μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους ανίχνευσης, ανάλογα με το είδος του ενζύμου και του υποστρώματος που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιούνται η AP ή η HRP, η μέτρηση πραγματοποιείται με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 400-600 nm. Για την μέτρηση των αποτελεσμάτων με B-gal απαιτείται φθορισμόμετρο, καθιστώντας αυτή τη μέθοδο πιο ευαίσθητη και με μεγάλη ακρίβεια, αλλά και πιο κοστοβόρα.

Ένζυμο	Χρωμογόνες ουσίες	Χρώμα
Υπεροξειδάση του χρένου (HRP)	O-φαινυλενοδιαμίνη (OPD)	Πορτοκαλί
	3,3-διαμινοβενζιδίνη (DAB)	Καφέ
	3-amino-9-ethylcarbazole	Κόκκινο
	Τετραμεθυλοβενζιδίνη(TBM)	Κίτρινο
	Διμεθυλοφορμαμίδιο (AEC)	Ροζ
	2'-Αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη -6- σουλφονικό οξύ (ABTS)	Πράσινο
Αλκαλική φωσφατάση (AP)	φωσφορική ναφθόλη AS-MX + Fast blue B	Μπλε
	φωσφορική ναφθόλη AS-TR + φουζίνη	Κόκκινο
	5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδυλ-φωσφορικό & μπλε νιτροτετραζόλιο	Μπλε Indigo
βήτα-γαλακτοσιδάση (B-Gal)	6-βρωμο-2-Ναφθυλ-β-D-γαλακτοσίδιο & Fast Blue B	Μπλε-μωβ
	5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ-β-D-γαλακτοσίδιο & Fast Blue B	Μπλε-πράσινο
οξειδάση της γλυκόζης (Glucose Oxidase)	Μεθοθειική φαιναζίνη & μπλε νιτροτετραζόλιο	Μπλε-μωβ

Πίνακας 2: Παραδείγματα ενζύμων που χρησιμοποιούνται ως δείκτες σε ανοσολογικές δοκιμές και πιθανά χρωμογόνων και χρώματα των σχηματιζόμενων συμπλοκών. (Boguszevska et al., 2019)

Οι ενζυμικοί ανοσοπροσδιορισμοί διακρίνονται σε δύο γενικές κατηγορίες: τις ομογενείς και τις ετερογενείς ανοσοχημικές μεθόδους. Στις ομογενείς μεθόδους, τα ένζυμα αδρανοποιούνται κατά τη σύνδεσή τους με το αντίσωμα και δεν απαιτείται στάδιο πλύσης για την απομάκρυνση των ελεύθερων αντιγόνων από το μέσο. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και υψηλό κόστος.

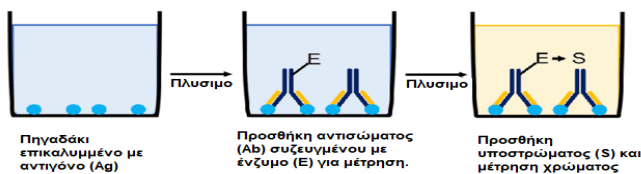
Για τον λόγο αυτό, οι ετερογενείς ανοσοχημικές μέθοδοι είναι πιο κοινές. Προσφέρουν υψηλότερη ευαισθησία αλλά απαιτούν στάδιο πλύσης για την

απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντιγόνων από το σύστημα, μετά την αλληλεπίδραση αντιγόνου και αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μία ετερογενή μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ακριβή μέτρηση αυτών των ουσιών. Επιπλέον, η ανάπτυξη διαφόρων τύπων ELISA έχει συμβάλει στη βελτίωση της ειδικότητας και της αξιοπιστίας της μεθόδου. Οι κυριότερες παραλλαγές της είναι οι εξής:

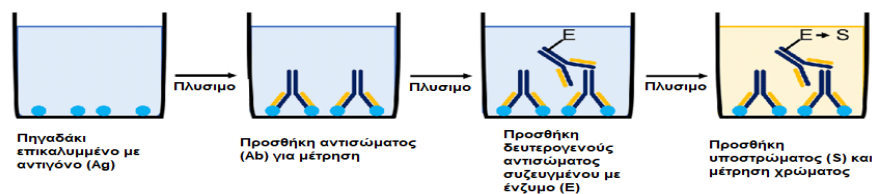
1. **Άμεση ELISA (Direct Elisa):** Στην άμεση μέθοδο ELISA, το αντιγόνο δεσμεύεται απευθείας στην επιφάνεια και στη συνέχεια προστίθεται το αντίσωμα που είναι συζευγμένο με το ένζυμο. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί απευθείας το αντιγόνο ως σταθερό υπόστρωμα, και η αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα προκαλεί την παραγωγή χρωματικού προϊόντος που μετράται φασματομετρικά.
2. **Έμμεση ELISA (Indirect ELISA):** Στην έμμεση μέθοδο ELISA, το αντίσωμα δεσμεύεται στην επιφάνεια και στη συνέχεια προστίθεται το αντιγόνο. Ακολουθεί η προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο. Αυτός ο τύπος ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων στα δείγματα, με πιο σύνθετο σύστημα ενζυμικής αντίδρασης.
3. **Σάντουιτς ELISA (Sandwich ELISA):** Στην μέθοδο Sandwich ELISA, το αντιγόνο δεσμεύεται στην επιφάνεια μέσω του πρώτου αντισώματος και έπειτα προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα (συνήθως με το ένζυμο) το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο σε διαφορετική περιοχή του. Αυτή η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση αρκετά μικρών ποσοτήτων αντιγόνων.
4. **Ανταγωνιστική ELISA (Competitive ELISA):** Στην ανταγωνιστική μέθοδο ELISA, το αντιγόνο και το επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται για την κάλυψη περισσότερων θέσεων δέσμευσης του αντισώματος. Η αντίδραση αυτή αξιολογείται από τη μέτρηση της ποσότητας του χρωμογόνου προϊόντος που παράγεται. Όταν η ποσότητα του αντιγόνου ή του αντισώματος που

αναλύεται είναι χαμηλή τότε παρατηρείται υψηλή απορρόφηση, ενώ μεγαλύτερες ποσότητες παράγουν χαμηλή απορρόφηση. (Aydin, 2015)

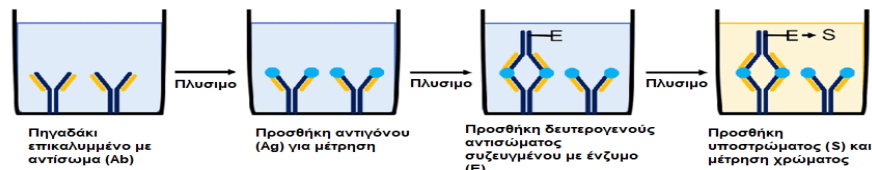
A. ΑΜΕΣΗ ELISA



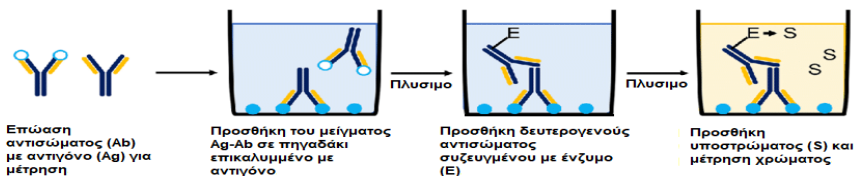
B. ΕΜΜΕΣΗ ELISA



Γ. ΣΑΝΤΟΥΙΤΣ ELISA



Δ. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ELISA



Εικόνα 5: Σχηματική παρουσίαση βασικών τύπων ELISA: A. άμεση, B. έμμεση, Γ. σάντουιτς, Δ. ανταγωνιστική - Ag: αντιγόνο, Ab: αντίσωμα, E: ένζυμο, S: υπόστρωμα. (Aydin, 2015)

Τα τελευταία χρόνια η ηλεκτροχημική ELISA (Electrochemical ELISA) έχει κερδίσει έδαφος. Είναι μια παραλλαγή της κλασικής μεθόδου ELISA, η οποία χρησιμοποιεί ηλεκτροχημική ανίχνευση για την ποσοτικοποίηση του σήματος. Αντί για χρωμογόνα που παράγουν χρωματική αλλαγή, η ηλεκτροχημική ELISA βασίζεται στη μέτρηση ηλεκτροχημικών σημάτων που παράγονται κατά τη δράση ενός ενζύμου πάνω σε ένα ειδικό υπόστρωμα. Είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για την ανίχνευση βιοδεικτών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, χαρακτηριστικό που είναι σημαντικό για τη διάγνωση του

καρκίνου σε αρχικά στάδια. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές ενίσχυσης του σήματος, όπως η χρήση νανοϋλικών και υβριδικών επιφανειών, για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία. (Arya and Estrela, 2018)

Η ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρώιμων καρκινικών βιοδεικτών, όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) και την AFP που συνδέονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Βοηθάει στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης του ασθενή στη θεραπεία παρακολουθώντας συγκεκριμένους βιοδείκτες που μπορούν να μειωθούν κατά τη διάρκεια της θεραπείας κάτι που υποδηλώνει θετική απόκριση στη θεραπεία. Επίσης, η μέτρηση του HER-2 στον καρκίνο του μαστού ή το CA-125 στον καρκίνο των ωοθηκών μπορεί να προβλέψει την πιθανότητα υποτροπής της νόσου. Τέλος, με την μέτρηση διαφόρων βιοδεικτών στον ορό του αίματος μπορεί να αξιολογηθεί η ύπαρξη πιθανών μεταστάσεων αλλά και να εντοπιστούν βιοδείκτες που καθοδηγούν στοχευμένες θεραπείες (π.χ. το PSA στον καρκίνο του προστάτη).

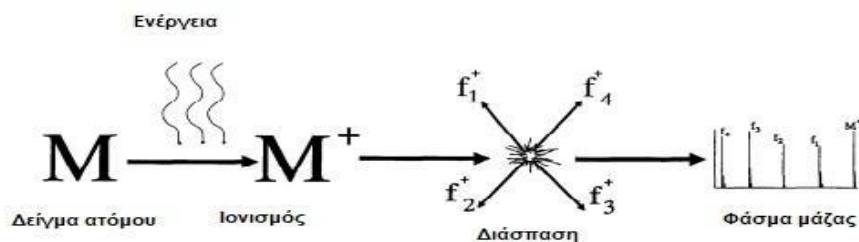
Συνεπώς, η ικανότητά της να ανιχνεύει χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνικών βιοδεικτών σε δείγματα αίματος, συμβάλλει καθοριστικά στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των ασθενών. (Aydin, 2015)

3.2.2 Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry – MS)

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry - MS) είναι μια θεμελιώδης τεχνική που βασίζεται στη μέτρηση της μοριακής μάζας μέσω του ιοντισμού και της ανάλυσης των παραγόμενων ιόντων. Τα τελευταία πενήντα χρόνια, η ανάπτυξη προηγμένων μεθόδων ιοντισμού έχει μεταμορφώσει τη φασματομετρία μάζας σε ένα εξαιρετικά ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό της μάζας, της δομής και της χημικής σύστασης μορίων. (Zaikin and Borisov, 2021)

Η MS είναι μια αναλυτική τεχνική που επιτρέπει την ανάλυση ατόμων, μορίων ή ιόντων, βασιζόμενη στη σχέση μάζας προς φορτίο (m/z). Η βασική της αρχή περιλαμβάνει:

1. Την ιοντοποίηση των μορίων του δείγματος.
2. Τον διαχωρισμό των ιόντων με βάση τη σχέση m/z .
3. Την ανίχνευση των ιόντων για αναγνώριση και ποσοτικοποίησή τους.



Εικόνα 6: Αρχή φασματομετρίας μαζών. Δείγμα μορίων (M) ιονίζονται και ποσοστό μοριακών ιόντων M⁺ διαχωρίζονται δημιουργώντας θραύσματα (f₁, f₂ κ.α.).

Οι μάζες των μοριακών ιόντων και των θραυσμάτων ιόντων προσδιορίζονται και απεικονίζονται σε διάγραμμα σε σχέση με την αφθονία (relative abundance). (Wait, 1993)

Όλα τα φασματόμετρα μάζας αποτελούνται από:

- Μια πηγή ιόντων για την παραγωγή τους.
- Έναν αναλυτή για τον διαχωρισμό τους.
- Έναν ανιχνευτή για την καταγραφή τους.

Η επιλογή του κατάλληλου αναλυτή είναι σημαντική για τις βιολογικές εφαρμογές και καθορίζεται από κάποια βασικά χαρακτηριστικά όπως το εύρος μάζας, την απόδοση μετάδοσης σήματος (και κατ' επέκταση τη συνολική ευαισθησία), τη συμβατότητα με τεχνικές ιοντισμού και την επιλογή συσκευών εισαγωγής.[24]

Η διακριτική ικανότητα (resolution, R) είναι επίσης κρίσιμη, καθώς ο αναλυτής πρέπει να διαχωρίζει μάζες που απέχουν ελάχιστα μεταξύ τους.

Οι κύριοι τύποι αναλυτών είναι:

1. **Τετραπολικός Αναλυτής Μαζών (Quadrupole Mass Spectrometer - QMS):**
Είναι ο συνηθέστερος τύπος, με μικρό μέγεθος, χαμηλό κόστος και μεγάλη ανθεκτικότητα. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους που δρουν ως ηλεκτρόδια. Έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα, καθώς μπορεί να διαχωρίσει λόγους μάζας που διαφέρουν κατά μία μονάδα. Συχνά συνδυάζεται με τεχνικές όπως LC-MS και GC-MS.
2. **Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time-of-Flight - TOF):** Θετικά ιόντα παράγονται μετά από βομβαρδισμό του δείγματος με παλμούς ηλεκτρονίων, ιόντων ή φωτονίων, συχνά μέσω λείζερ. Μετρά τον χρόνο που απαιτείται για να φτάσουν τα ιόντα στον ανιχνευτή. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και ανάλυση, καλύπτοντας μεγάλο εύρος μαζών. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη MALDI για ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, όπως πρωτεΐνες και μεταβολίτες, σε εφαρμογές πρωτεομικής και μεταβολομικής. (Scoog et al., 2007)
3. **Μαγνητικός Αναλυτής (Magnetic Sector):** Χρησιμοποιεί μαγνητικά πεδία για να διαχωρίσει ιόντα ανάλογα με την εκτροπή τους. Τα βαριά ιόντα υφίστανται μικρότερη εκτροπή σε δεδομένη ένταση πεδίου. Είναι μέθοδος υψηλής ακρίβειας, αλλά απαιτεί μεγάλο και δαπανηρό εξοπλισμό. Χρησιμοποιείται για ισοτοπικές αναλύσεις και μετρήσεις υψηλής ευαισθησίας. (Wait, 1993)
4. **Αναλυτής Κυκλοτρονικής Αντήρησης Ιόντων με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR):** Χρησιμοποιεί μαγνητικά πεδία (παγίδα ιόντων) για να συγκρατήσει τα ιόντα σε κυκλικές τροχιές και μετρά τη συχνότητά τους μέσω του μετασχηματισμού Fourier. Παρέχει εξαιρετική διακριτική ανάλυση και είναι ιδανικός για δομικές μελέτες με ευρεία εφαρμογή στην πρωτεομική. (Scoog et al., 2007)

Αντίστοιχα, χρησιμοποιούνται δυο κατηγορίες πηγών ιόντων. Οι πηγές χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τις πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources) και τις πηγές εκρόφησης (desorption sources).

Πηγές αέριας φάσης: Το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται. Μια παλιά, αλλά ιδιαίτερα διαδεδομένη μέθοδος είναι ο ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI). Τα μόρια του δείγματος συγκρούονται με ηλεκτρόνια που προέρχονται από θερμαινόμενη μεταλλική ίνα, αποκτώντας θετικό φορτίο.

Επειδή συχνά προκαλείται εκτεταμένη θραύση μορίων και περιορίζεται η ανίχνευση μοριακών ιόντων, η χρήση ήπιων τεχνικών ιοντισμού, όπως ο χημικός ιονισμός (Chemical Ionization, CI), μειώνει την περίσσεια ενέργειας και περιορίζει τη θραύση.

Πηγές εκρόφησης: Οι μέθοδοι εκρόφησης περιλαμβάνουν τεχνικές ιοντισμού, στις οποίες τα ιονισμένα μόρια του δείγματος εξάγονται απευθείας από τη συμπυκνωμένη φάση (στερεή ή υγρή) στο κενό του φασματογράφου μάζας, χωρίς να έχει προηγηθεί η μετατροπή τους σε ουδέτερους ατμούς. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανάλυση μη πτητικών ή θερμικά ασταθών δειγμάτων. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν τον ιοντισμό πεδίου (Field Ionization - FI), την εκρόφηση πεδίου (Field Desorption - FD) και την εκρόφηση πλάσματος (Plasma Desorption - PD). Ανάμεσα στις σημαντικότερες μεθόδους είναι ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization - ESI) και ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI). (Wait, 1993; Scoog et al., 2007)

Οι μέθοδοι MALDI και ESI έθεσαν τα θεμέλια για την ανάλυση μακρομορίων υψηλού μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες και οι νουκλεονικές αλυσίδες, μόρια που συχνά σχετίζονται με τον καρκίνο και συνέβαλλαν καθοριστικά στην ανάπτυξη τομέων όπως η πρωτεομική και η μεταβολομική.

Η αρχή της μεθόδου MALDI βασίζεται στην απορρόφηση της ακτινοβολίας λέιζερ από μήτρα, η οποία ενισχύει τον ιονισμό των μορίων. Δεν είναι κατάλληλη για την ανάλυση πτητικών ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους, λόγω των απωλειών που παρατηρούνται κατά την εισαγωγή τους στο κενό. Εφαρμόζεται ευρέως σε πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και πεπτίδια. Αντίθετα, η ESI καθώς δημιουργεί πολλαπλά φορτισμένα ιόντα από μόρια σε υγρή φάση, διευκολύνει την ανάλυση

μεγάλων πολικών πρωτεϊνών, όμως συχνά υπάρχουν προβλήματα καταστολής ιόντων λόγω αλληλεπίδρασης με τη μήτρα του δείγματος.

Οι συγκεκριμένες τεχνικές έχουν ευρεία εφαρμογή στη αναγνώριση καρκινικών βιοδεικτών καθώς ανιχνεύουν και αναγνωρίζουν πρωτεΐνες και μεταβολίτες που σχετίζονται με καρκινικές διεργασίες μέσω υψηλής ευαισθησίας ιονισμού.

Τέλος, η χρήση των συζευγμένων μεθόδων MALDI-MS και ESI-MS μαζί με συμπληρωματικές τεχνικές (π.χ., CID, ETD) βελτιώνει την απόκτηση πληροφοριών για μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs), όπως η φωσφορυλίωση, που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην καρκινογένεση.

Η χρήση της φασματομετρίας μαζών συζευγμένη με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας (Liquid chromatography – LC) ή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High pressure liquid chromatography -HPLC) επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ποσοτική ανάλυση σύνθετων μειγμάτων, όπως τα καρκινικά κύτταρα. (Zaikin and Borisov, 2021)

Ιδιαίτερα η LC–MS/MS) χρησιμοποιείται για την ανάλυση καρκινικών βιοδεικτών. Είναι μία μέθοδος ξεπερνά τους περιορισμούς των παραδοσιακών ανοσοδοκιμασιών και χαρακτηρίζεται από:

- Υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και ειδικότητα.
- Ευκολία προσαρμογής σε διαφορετικούς τύπους βιολογικών δειγμάτων.
- Δυνατότητα πολυπλεξίας για ταυτόχρονη μέτρηση πολλών βιοδεικτών.

Ωστόσο, η εφαρμογή της συνοδεύεται από προκλήσεις, όπως η ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό, το υψηλό κόστος απόκτησης και συντήρησης του εξοπλισμού, καθώς και οι χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων.

Παρά τα παραπάνω μειονεκτήματα, η LC-MS/MS συγκαταλέγεται στις σημαντικότερες μεθόδους για την ανάλυση διαγνωστικών, προγνωστικών και

θεραπευτικών βιοδεικτών Ένα παράδειγμα είναι η παρακολούθηση της θυρεοσφαιρίνης (Tg) σε ασθενείς με καρκίνο του θυροειδούς αδένος έπειτα από θυρεοειδεκτομή. Τα αποτελέσματα της μεθόδου δεν επηρεάζονται από την παρουσία αντισωμάτων, σε αντίθεση με τις ανοσοχημικές τεχνικές. (Wenk et al., 2024)

3.2.3 Ανοσοαποτύπωση – Μέθοδος Wester Blotting

Η μέθοδος Western blotting αναπτύχθηκε το 1979 και βασίζεται στην τεχνική του Southern blotting. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση DNA, αλλά στη συνέχεια προσαρμόστηκε για την ανίχνευση πρωτεϊνών με τη βοήθεια αντισωμάτων. Η τεχνική επικεντρώνεται στην ανάλυση και ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, με τη χρήση αντισωμάτων που συνδέονται με την πρωτεΐνη στόχο.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη χρήση δύο αντισωμάτων:

- Το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύεται με την πρωτεΐνη στόχο.
- Το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με το πρωτογενές και φέρει κάποιο ανιχνεύσιμο σήμα επιτρέποντας την οπτικοποίηση της πρωτεΐνης στη γέλη ή στη μεμβράνη.

Η μέθοδος Western blotting έχει ευρεία χρήση στη βιοχημεία, τη μοριακή βιολογία και την κλινική διάγνωση για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε δείγματα. Οι πιο κοινές χρήσεις περιλαμβάνουν την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε μείγμα πρωτεϊνών και τη ημιποσοτική ανάλυση προσδιορισμού της ποσότητας της πρωτεΐνης σε διάφορα δείγματα. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα του Western blotting έναντι άλλων τεχνικών, όπως η ELISA και η IHC, είναι ότι παρέχει πληροφορίες για τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης.

Η μέθοδος Western blotting είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων που διαρκεί 2–3 ημέρες, ανάλογα με διάφορους παράγοντες και τα διαφορετικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την βέλτιστη ανίχνευση του σήματος.

Τα κύρια στάδια της μεθόδου είναι:

1. Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), μια τεχνική ηλεκτροφόρησης που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθός τους.
2. Μεταφορά πρωτεϊνών από τη γέλη σε μεμβράνη. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν νιτροκυτταρίνη, PVDF και κυτταρίνη.
3. Ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου, μέσω μεθόδων όπως η χημειοφωταύγεια, η χρωματική αντίδραση ή η ραδιοϊσοτοπική ανίχνευση. Το σήμα που παράγεται από το δευτερογενές αντίσωμα επιτρέπει την οπτικοποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

Η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως στη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης, στην ανίχνευση αντιγόνων που σχετίζονται με λοιμώξεις, στην παρακολούθηση μεταβολών πρωτεϊνών και στην ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών, συμβάλλοντας στη διάγνωση, την πρόγνωση και την κατανόηση των μηχανισμών της νόσου. (Sule et al., 2023)

Η μέθοδος SDS-PAGE και Western blotting έχει ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη του καρκίνου του μαστού. Παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού και ανάλυσης πρωτεϊνών από σύνθετα δείγματα, όπως ορός αίματος, ασκητικό υγρό και εκχυλίσματα από συμπαγείς όγκους.

Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γλυκοπρωτεϊνών που συνδέονται με την κακή πρόγνωση και τη μεταστατική ικανότητα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα

είναι η χρήση του Helix pomatia agglutinin, ενός δείκτη που σχετίζεται με δυσμενείς εκβάσεις στον καρκίνο του μαστού.

Έχει επίσης συμβάλλει στη διάγνωση της νόσου, καθώς η ανάλυση διαφορετικών μορφών της πρωτεΐνης MUC-1 mucin μπορεί να διαχωρίσει το φυσιολογικό από το κακοήθες επιθήλιο του μαστού. Αυτές οι αναλύσεις οδήγησαν στην ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία έχουν σημαντική αξία τόσο στην έρευνα όσο και στην κλινική εφαρμογή. (Osborne and Brooks, 2006)

3.3 Μέθοδοι ανάλυσης βιοδεικτών βασισμένοι στην απεικόνιση

3.3.1 Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry - IHC)

Η ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry - IHC) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και απεικόνιση πρωτεϊνών σε ιστούς μέσω ειδικής αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση συγκεκριμένων αντιγόνων στους ιστούς, καθιστώντας την ιδιαίτερα πολύτιμη για την κλινική πρακτική και ιδιαίτερα για τη διάγνωση καρκίνου.

Η αρχή της μεθόδου χρονολογείται από το 1930 αλλά αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1940, όταν ο Coons και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν επισημασμένα αντισώματα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate - FITC) για τον εντοπισμό αντιγόνων του πνευμονιόκοκκου σε μολυσμένα δείγματα.

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε στερεά δείγματα ιστών ή κυττάρων που έχουν ληφθεί μέσω βιοψίας. Αρχικά, γίνεται μικροτομή του ιστού και στη συνέχεια επώαζεται με το κατάλληλο αντίσωμα. Τα αντισώματα συνδέονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα στον ιστό, και η παρουσία τους παρατηρείται μέσω μικροσκοπίου κοινής ή φθορίζουσας ακτινοβολίας, με τη βοήθεια ενός χρωστικού παράγοντα. Για την ανίχνευση,

χρησιμοποιούνται και άλλα ένζυμα ως δείκτες, όπως η HRP και η AP, ενώ η χρήση κολλοειδούς χρυσού επεκτάθηκε για την αναγνώριση ανοσοϊστοχημικών αντιδράσεων τόσο στο φως όσο και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Άλλοι δείκτες περιλαμβάνουν ραδιενεργά στοιχεία, ενώ η ανοσοαντίδραση μπορεί να παρατηρηθεί και με ακτινογραφία.

Ο κύριος στόχος της IHC είναι να εκτελεί τους περισσότερους χρωματισμούς με την ελάχιστη ζημιά στα κύτταρα ή στους ιστούς, χρησιμοποιώντας την ελάχιστη δυνατή ποσότητα αντισώματος, και βοηθάει στην τυποποίηση όγκων και στους δείκτες όγκου. (Duraiyan et al., 2012)

Επιπλέον, χρησιμοποιούνται άλλες τεχνικές, όπως ο ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence), η πολλαπλή ανοσοϊστοχημεία (multiplex IHC), στην οποία χρησιμοποιούνται διαφορετικά αντισώματα για τη χρώση του ίδιου τμήματος ιστού, και ο πολλαπλός ανοσοφθορισμός (mIF). Ακόμα, νεότερες τεχνικές, όπως η ενίσχυση σήματος με τυραμίδα και οι νανοκρύσταλλοι κβαντικών τελειών, οι οποίες προσφέρουν υψηλότερη ευαισθησία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Παράδειγμα αυτής της εφαρμογής αποτελεί ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), ο οποίος είναι ο πιο διαδεδομένος προβλεπτικός βιοδείκτης στον καρκίνο του μαστού και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ενδοκρινικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού μέσω της μεθόδου IHC. Άλλοι προβλεπτικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες που ανιχνεύονται με αυτή τη μέθοδο περιλαμβάνουν τον υποδοχέα προγεστερόνης (PR), τον HER-2, το Ki-67, την αναπλαστική κινάση του λεμφώματος (ALK), το πρωτο-ογκογονίδιο ROS1, την πρωτεΐνη επιδιόρθωσης ασυμφωνίας DNA (MMR), τον νευροτροφικό υποδοχέα τυροσίνης κινάσης (NTRK) και η PD-L1. Αυτοί οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται συνήθως στην κλινική πρακτική για διάφορους συμπαγείς όγκους. (Passaro et al., 2024)

3.3.2 Υβριδισμός in situ: FISH και CISH

Η ανίχνευση με χρήση υβριδοποίησης in situ είναι πολύ σημαντική στην εξατομικευμένη ιατρική. Συγκεκριμένα, ο υβριδισμός φθορισμού in situ (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) χρησιμοποιείται για την απεικόνιση και τον εντοπισμό συγκεκριμένων γονιδίων ή αλληλουχιών DNA/RNA σε χρωμοσώματα ή κύτταρα που παρουσιάζουν γενετικές ανωμαλίες, όπως μετατοπίσεις, αναστροφές, εισαγωγές, διαγραφές και ενισχύσεις νουκλεοτιδίων. Σε αρκετές περιπτώσεις, χρησιμοποιείται και ο χρωμογόνος in situ υβριδισμός (Chromogenic In Situ Hybridization - CISH), ιδιαίτερα στον τομέα της μοριακής παθολογίας και ογκολογίας. Βασική αρχή της μεθόδου και για τις δύο αναλύσεις είναι ότι στις περιοχές ενδιαφέροντος προσδένονται και υβριδοποιούνται συγκεκριμένες ενώσεις, επιτρέποντας την ανίχνευση και την εκτίμησή τους. Βασική διαφορά των δύο μεθόδων είναι η επιλογή της χρωμογόνου ουσίας. Στην CISH, η υπό ανάλυση περιοχή επισημαίνεται με βιοτίνη ή διγοξιγενίνη, ενώ στη FISH χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες.

Για ανιχνευτές επισημασμένους με βιοτίνη, χρησιμοποιείται στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση του χρένου (HRP-streptavidin) για την ανίχνευση. Στην περίπτωση ανιχνευτών με προσδεμένη διγοξιγενίνη, χρησιμοποιείται αρχικά ένα αντίσωμα κατά της διγοξιγενίνης, το οποίο είναι επισημασμένο με φλουορεσκεΐνη, και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα κατά της φλουορεσκεΐνης συζευγμένο με HRP. Τα σήματα καταμετρώνται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

Οι δύο μέθοδοι είναι εξίσου σημαντικές τόσο για την αναγνώριση καρκινικών δεικτών όσο και για την επιλογή θεραπευτικής προσέγγισης. Για παράδειγμα, η CISH παρουσιάζει 97,5% ευαισθησία και 94% ειδικότητα στην ανίχνευση της γονιδιακής ενίσχυσης του γονιδίου HER-2. Και οι δύο τεχνικές είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους και παρουσιάζουν σχεδόν ίση απόδοση κατά τις δοκιμές ενίσχυσης γονιδίων. Ωστόσο, η

CISH μπορεί να εμφανίζει χαμηλότερη ευαισθησία για ενισχύσεις χαμηλού επιπέδου λόγω της παρουσίας πολυσωμίας του χρωμοσώματος 17.

Η επιλογή των μεθόδων εξαρτάται από την εφαρμογή και τις απαιτήσεις της ανάλυσης, ωστόσο η FISH χρησιμοποιείται περισσότερο λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου είναι σημαντική η ανίχνευση μικρών αλλαγών στο DNA ή το RNA. Είναι ταχύτερη μέθοδος όμως με υψηλότερο κόστος καθώς απαιτείται συγκεκριμένος εξοπλισμός (μικροσκόπιο φθορισμού). Τελευταία η CISH κερδίζει έδαφος καθώς έχει χαμηλότερο κόστος και δεν απαιτείται ιδιαίτερος εξοπλισμός. (Chrzanowska et al., 2020)

3.3.3 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

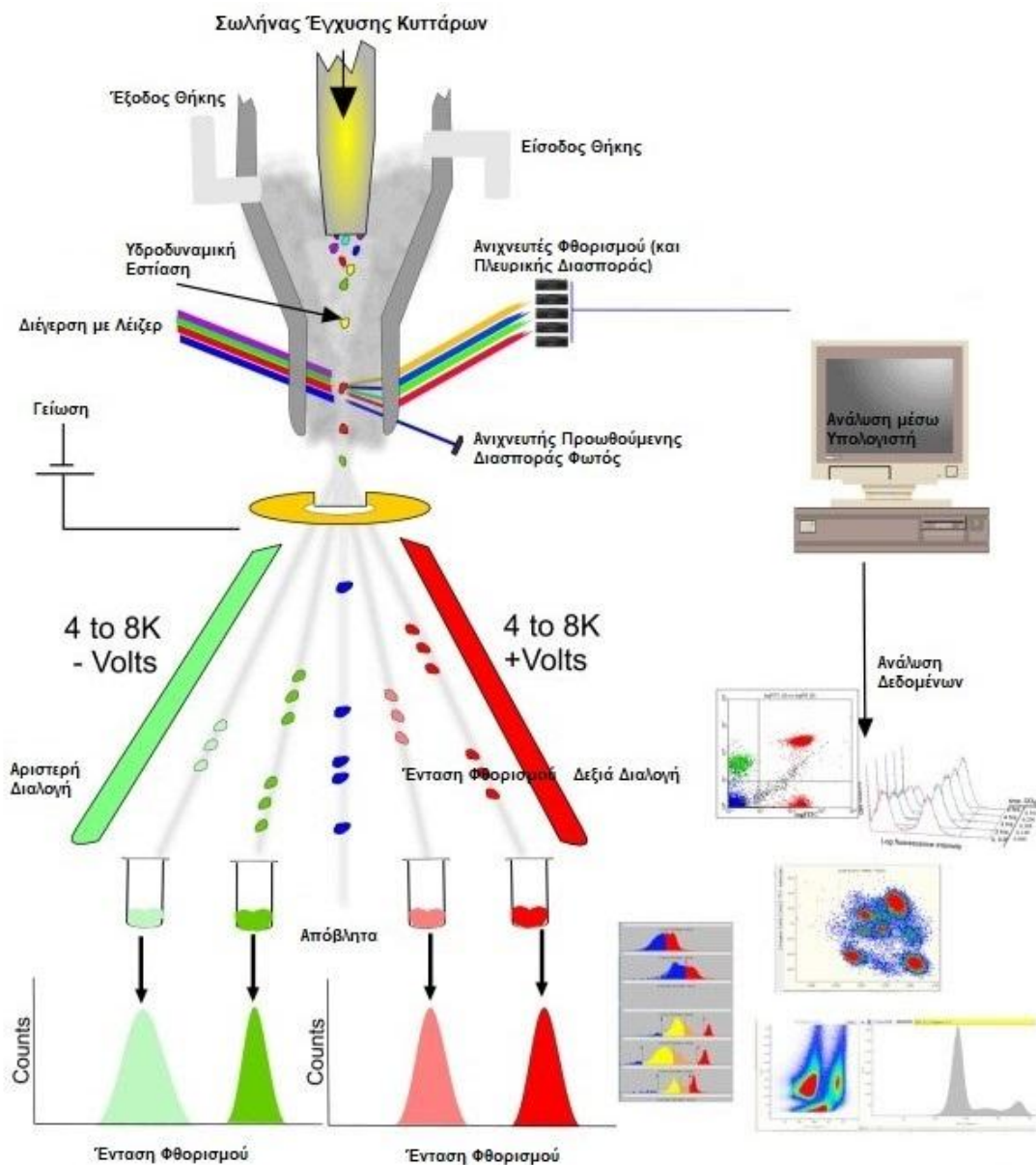
Η κυτταρομετρία περιλαμβάνει διάφορες τεχνολογίες για την ανάλυση κυττάρων όπως τη φασματική κυτταρομετρία και η μαζική κυτταρομετρία με την κυτταρομετρία ροής να αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για την ταχεία και πολυπαραμετρική ανάλυση κυττάρων.

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων ή σωματιδίων σε αιώρημα, χρησιμοποιώντας ακτίνες λέιζερ για τη μέτρηση σημάτων διάχυσης και φθορισμού.

Τα βασικά στοιχεία ενός κυτταρόμετρου ροής περιλαμβάνουν τρία βασικά συστήματα:

- **Το υδροδυναμικό σύστημα ροής:** Συνήθως αποτελείται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Διοχετεύει το δείγμα στο σημείο που βρίσκεται το λέιζερ ή στο σημείο ανάλυσης.
- **Το οπτικό Σύστημα:** Περιλαμβάνει λέιζερ και φωτοπολλαπλασιαστές, που ανιχνεύουν φθορίζοντα σήματα με τη βοήθεια εξειδικευμένων φίλτρων.

- Το ηλεκτρονικό Σύστημα Ανάλυσης Δεδομένων: Μετατρέπει τα σήματα φωτός σε ψηφιακά δεδομένα προς ανάλυση. (McKinnon, 2018)



Εικόνα7: Μια γενική περιγραφή ενός κυτταρόμετρου ροής που δείχνει ένα όργανο ταξινόμησης ικανό να απομονώνει μεμονωμένα κύτταρα. Στα δεξιά της εικόνας παρουσιάζονται παραδείγματα πιθανών αναλύσεων. (Robinson et al., 2023)

Η κυτταρομετρία ροής έχει ευρείες εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως η ανοσολογία, η ιολογία και η βακτηριολογία ενώ έχει σημαντικό ρόλο στον εντοπισμό καρκινικών βιοδεικτών για τη διάγνωση και την παρακολούθηση αντικαρκινικών θεραπειών. Ιδιαίτερα χρησιμοποιείται στην:

1. Ανάλυση φαινοτύπου καρκινικών κυττάρων: Επιτρέπει την ταυτοποίηση και κατηγοριοποίηση καρκινικών κυττάρων βάσει επιφανειακών ή ενδοκυττάρων δεικτών, με χρήση αντισωμάτων που παραγάγουν φθορισμό. Παράδειγμα ο CD34 για βλαστοκύτταρα και ο PD-L1 για ανοσοθεραπείες.

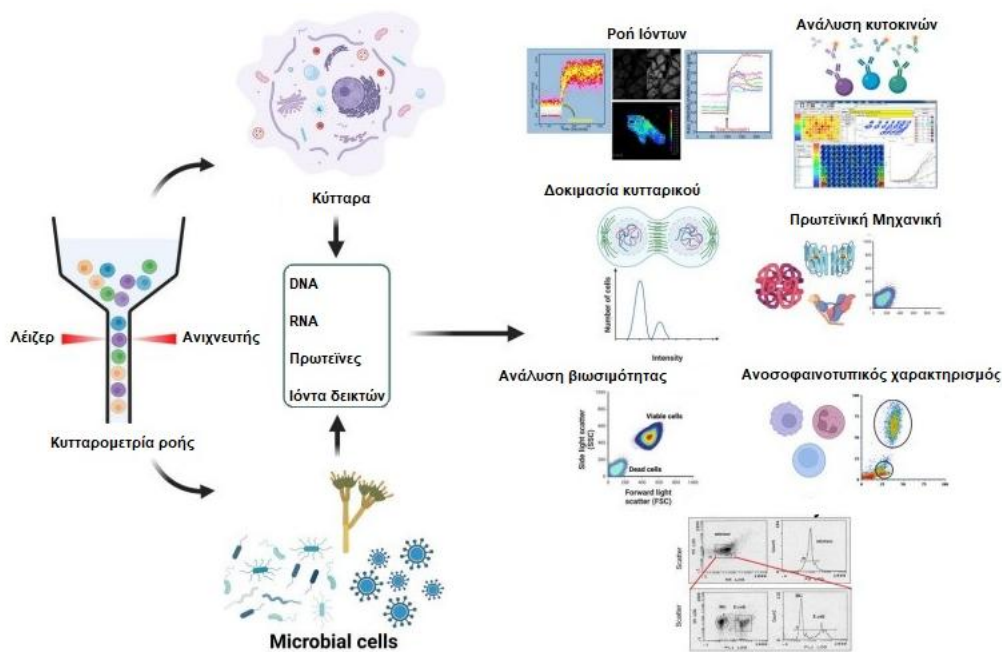
2. Παρακολούθηση αντικαρκινικών θεραπειών: Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ανοσολογικής απόκρισης σε αντικαρκινικές θεραπείες, όπως οι ανοσοθεραπείες με αναστολείς σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors - ICIs). Επίσης ανιχνεύει την κυτταρική απόπτωση ή την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπείες με χρήση ειδικών δεικτών.

3. Αναγνώριση ετερογένειας όγκου: Με τη κυτταρομετρία ροής αναγνωρίζονται σπάνιες υποομάδες κυττάρων, όπως τα καρκινικά βλαστοκύτταρα, που παίζουν ρόλο στην αντίσταση στις θεραπείες.

4. Μέτρηση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs): Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανιχνεύσει και να αναλύσει CTCs, τα οποία αποτελούν δείκτη για μεταστάσεις και βοηθούν στην παρακολούθηση της πορείας της νόσου.

5. Δυνατότητες πολυπαραμετρικής ανάλυσης: Γίνεται ταυτόχρονη μέτρηση πολλών παραμέτρων (μέχρι και 30+ δείκτες).

Αυτά τα εργαλεία προσφέρουν ακριβή και αξιόπιστα δεδομένα, ενισχύοντας την εξατομικευμένη ιατρική και την ανάπτυξη νέων θεραπειών. (Robinson et al., 2023)



Εικόνα 8: Οι εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής περιλαμβάνουν ανάλυση κυτταρικού DNA/RNA, φαινοτυπικό χαρακτηρισμό, ροή ιόντων, μικροβιακή ανάλυση, κυτοκίνες, φυτικό DNA και μια ποικιλία επιπρόσθετων δοκιμασιών. (Robinson et al., 2023)

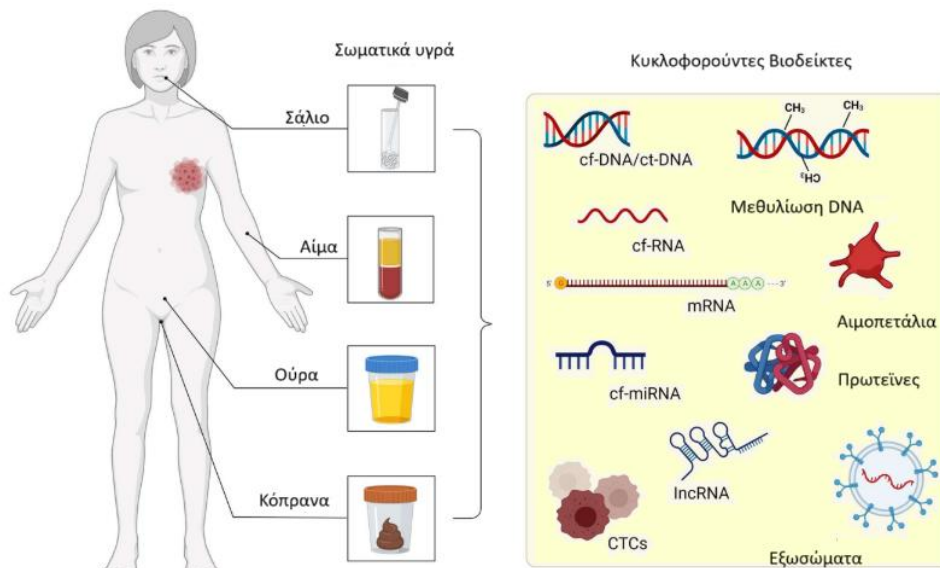
Οι τεχνολογικές εξελίξεις, όπως τα φθορίζοντα χρώματα και οι μέθοδοι ανάλυσης δεδομένων (π.χ. t-SNE, PCA), έχουν ενισχύσει την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα της κυτταρομετρίας ροής, καθιστώντας την ένα ανεκτίμητο εργαλείο για την έρευνα και την κλινική πρακτική. (McKinnon, 2018)

3.4 Τεχνικές Υγρής Βιοψίας

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια με πολλές παραμέτρους. Για να γίνει σωστή διάγνωση συνήθως απαιτείται να ληφθεί δείγμα από ιστό ή από τον όγκο για τη σωστή εκτίμηση και σταδιοποίηση της νόσου. Ωστόσο, η διεξαγωγή βιοψία πολλές φορές συνοδεύεται από περιορισμούς και κινδύνους, ενώ η ετερογένεια των όγκων δυσχεραίνει τη χρήση παραδοσιακών βιοδεικτών.

Η υγρή βιοψία αποτελεί μια επαναστατική και μη επεμβατική μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση και την ανάλυση βιολογικών δεικτών καρκίνου μέσω δειγμάτων αίματος ή άλλων σωματικών υγρών. Πλέον, αυτή η μέθοδος έχει κεντρικό ρόλο στη διάγνωση, την παρακολούθηση και την εξατομικευμένη θεραπεία σε νοσούντες ασθενείς.

Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές βιοψίες από ιστούς, η υγρή βιοψία προσφέρει μια συνολική εικόνα της κατάστασης του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Ως μη επεμβατική διαδικασία, η υγρή βιοψία παρέχει εύκολη πρόσβαση σε δείγματα που επιτρέπουν την παρακολούθηση του όγκου, καθιστώντας την εξαιρετικά χρήσιμη στην κλινική πρακτική. Τα δείγματα λαμβάνονται από την ανάλυση αίματος ή άλλων σωματικών υγρών και ελέγχονται για την παρουσία καρκινικών κυττάρων. Μέσω αυτής της ανάλυσης μπορούν να εντοπιστούν στοιχεία όπως DNA του όγκου, αποκαλύπτοντας πληροφορίες για τον τύπο του καρκίνου και για σημαντικές γενετικές μεταλλάξεις. Επίσης παρακολουθείται η πορεία της θεραπείας. (Li et al., 2022)



Εικόνα 9: Υγρά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κυκλοφορούντες βιοδείκτες. (Freitas et al., 2022)

Σήμερα, η υγρή βιοψία επικεντρώνεται στην ανίχνευση στοιχείων όπως:

Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (CTCs): Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα CTCs είναι κύτταρα που αποσπώνται από τον πρωτογενή ή μεταστατικό όγκο και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Συνήθως, τα καρκινικά κύτταρα που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα υφίστανται απόπτωση ή φαγοκυττάρωση. Ωστόσο, ορισμένα καταφέρνουν να διαφύγουν από αυτές τις διεργασίες και μπορούν να υποστούν επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition - EMT). Μέσω αυτής της διαδικασίας, τα κύτταρα αλλάζουν φαινότυπο, αποκτούν μεγαλύτερη ρευστότητα και διεισδυτικότητα, προσκολλώνται και διαπερνούν ευκολότερα τα αγγειακά τοιχώματα, δημιουργώντας έτσι απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Η υγρή βιοψία επιτρέπει την ανίχνευση και ανάλυση των CTCs από το αίμα ασθενών, συμβάλλοντας στην πρώιμη διάγνωση, στην πρόβλεψη μεταστάσεων, καθώς και στην ανίχνευση υποτροπής ή εξέλιξης της νόσου. Μέσω της μελέτης της μορφολογίας και των χαρακτηριστικών του όγκου, διευκολύνεται η αποτελεσματική παρακολούθηση της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία. Επιπλέον, η υγρή βιοψία υποστηρίζει τη χρήση εξατομικευμένων θεραπειών, παρέχοντας εξειδικευμένα φάρμακα που είναι κατάλληλα για τα χαρακτηριστικά του όγκου κάθε ασθενούς.

Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των CTC που έχουν ληφθεί από υγρή βιοψία περιλαμβάνουν κυρίως τον ανοσοφθορισμό, την NGS, τον υβριδισμό RNA in situ, ποσοτική PCR με φθορισμό και την κυτταρομετρία ροής.

Κυκλοφορούν DNA Όγκου (ctDNA): Το ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA) είναι DNA που δεν περιβάλλεται από κύτταρα, κυκλοφορεί στο αίμα και μπορεί να απομονωθεί από το πλάσμα. Προέρχεται από κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση ή νέκρωση. Τα επίπεδά του στο αίμα υγιών ατόμων είναι χαμηλά, όμως αυξάνονται σημαντικά

σε καταστάσεις ιστικής καταπόνησης (όπως άσκηση, φλεγμονή, χειρουργική επέμβαση ή ιστική βλάβη).

Το ctDNA περιέχει γενετικές πληροφορίες από καρκινικά κύτταρα και αποτελείται από θραύσματα DNA διπλής έλικας μήκους 160–200 ζευγών βάσεων. Η παρουσία του ctDNA στο αίμα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το στάδιο του όγκου, η μετάσταση και η αγγειακή διήθηση. Μπορεί να ανιχνευτεί μέσω μοριακών τεχνικών όπως PCR, ψηφιακή PCR, και NGS. Καθώς δίνει πληροφορίες για τις μεταλλάξεις και τις γενετικές αλλαγές, είναι χρήσιμο τόσο για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και όσο και της θεραπευτική ανταπόκριση του ασθενούς.

Εξωσώματα: Είναι μικροσκοπικά κυστίδια που απελευθερώνονται από κύτταρα και περιέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη φυσιολογία του όγκου. Συμμετέχουν στη μετάσταση, την αντοχή στα φάρμακα και την ανοσολογική διαφυγή. Τα εξωσώματα συλλέγονται από βιολογικά υγρά, όπως το αίμα, και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ctDNA και microRNAs. (Li et al., 2022)

Η υγρή βιοψία προσφέρει τη δυνατότητα εξατομικευμένης θεραπείας και παρακολούθησης των μεταστάσεων, συχνά πριν αυτές γίνουν εμφανείς μέσω απεικόνισης.

Στον καρκίνο του πνεύμονα, η ανίχνευση των CTCs και ctDNA χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR, διευκολύνοντας την προσαρμογή θεραπειών, όπως η ερλοτινίμη (erlotinib). Κατά την ανοσοθεραπεία, η υγρή βιοψία επιτρέπει την πρόβλεψη των ασθενών που θα ανταποκριθούν στη θεραπεία, ενώ παράλληλα παρακολουθεί τις αλλαγές στη νόσο. (Li et al., 2022)

Στον καρκίνο του μαστού, μεταλλάξεις στα γονίδια PIK3CA ανιχνεύονται μέσω του ctDNA, καθοδηγώντας τη χρήση στοχευμένων θεραπειών, όπως οι αναστολείς CDK4/6 (π.χ., παλμποσικλίμη - palbociclib). (Freitas et al., 2022)

4. Αντικαρκινικές Θεραπείες και παρακολούθηση αποτελεσματικότητας

4.1 Ιστορική ανασκόπηση θεραπειών για την αντιμετώπιση του καρκίνου

Η θεραπεία του καρκίνου έχει εξελιχθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, ξεκινώντας από τη χειρουργική επέμβαση και ακολουθώντας τις εξελίξεις στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, οι οποίες παραμένουν θεμελιώδεις πυλώνες στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Η χημειοθεραπεία εμφανίστηκε τον 20ό αιώνα ως θεραπεία για τα συμπτώματα του αερίου μουστάρδας, το οποίο χρησιμοποίησαν οι στρατιώτες κατά τη διάρκεια του Πρώτου και του Δεύτερου Παγκοσμίου Πολέμου. Η πρώτη χημειοθεραπεία, με την προσέγγιση του Gilman το 1943, περιλάμβανε τη χρήση αζώτου μουστάρδας για τη θεραπεία λεμφωμάτων. Στη συνέχεια, η ανάπτυξη αντιφολικών και αλκυλιωτικών φαρμάκων οδήγησε σε σημαντική πρόοδο στην θεραπεία λευχαιμιών και άλλων αιματολογικών καρκίνων.

Η χειρουργική θεραπεία εξελίχθηκε, περνώντας από ριζικές παρεμβάσεις σε πιο ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους. Παράλληλα, η ανακάλυψη των ακτίνων Χ στα τέλη του 19ου αιώνα και η συνεισφορά της Marie Curie επέτρεψαν την ανάπτυξη τεχνολογιών όπως η τρισδιάστατη ακτινοθεραπεία, προσφέροντας πιο στοχευμένες και ακριβείς θεραπείες.

Στην πιο πρόσφατη εποχή, η άφιξη της ανοσοθεραπείας και της νανοτεχνολογίας άλλαξε τα δεδομένα στη θεραπεία του καρκίνου, εισάγοντας νέες προσεγγίσεις που επιτρέπουν εξατομικευμένες και στοχευμένες θεραπείες. Η ανοσοθεραπεία, βασισμένη στη χρήση στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος (όπως αντισώματα, κυτταροκίνες και δενδριτικά κύτταρα), αποσκοπεί είτε στην άμεση καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, είτε στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς. Η ανοσοθεραπεία ξεκίνησε με τη χρήση πολυκλωνικών

αντισωμάτων, τα οποία όμως παρουσίασαν προβλήματα ανοσογονικότητας, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ωστόσο, η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων από τους Köhler και Milstein το 1975, ενίσχυσε δραματικά την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας. Σήμερα, η ανοσοθεραπεία περιλαμβάνει και πλήρως ανθρώπινα αντισώματα και ανοσοσυμπλέγματα, που παρέχουν μεγαλύτερη εξειδίκευση, λιγότερες παρενέργειες και καλύτερη ανοχή από τους ασθενείς.

Τέλος, η νανοτεχνολογία προωθεί την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων και την κατευθυνόμενη θεραπεία μέσω νανοσωματιδίων, προσφέροντας νέα εργαλεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου με μεγαλύτερη ακρίβεια και λιγότερες επιπτώσεις στον οργανισμό. (Arruebo et al., 2011)

4.2 Παρακολούθηση Αποτελεσματικότητας Θεραπείας

Με την πρόοδο των καινοτόμων τεχνολογιών, η αναγνώριση και η επικύρωση των βιοδεικτών έχει αναδειχθεί σε κεντρικό στοιχείο της εξατομικευμένης ιατρικής. Στον τομέα του καρκίνου, χρησιμοποιούνται ειδικές πληροφορίες από τους βιοδείκτες του όγκου για τη διάγνωση, το σχεδιασμό θεραπευτικών πλάνων, την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία ή την πρόγνωση του ασθενούς. Στόχος της εξατομικευμένης ιατρικής είναι να παρέχει στον ασθενή την κατάλληλη θεραπεία και δοσολογία τη σωστή χρονική στιγμή, με βάση τα ατομικά χαρακτηριστικά του, ξεπερνώντας τη λειτουργική διάγνωση της ασθένειάς του.

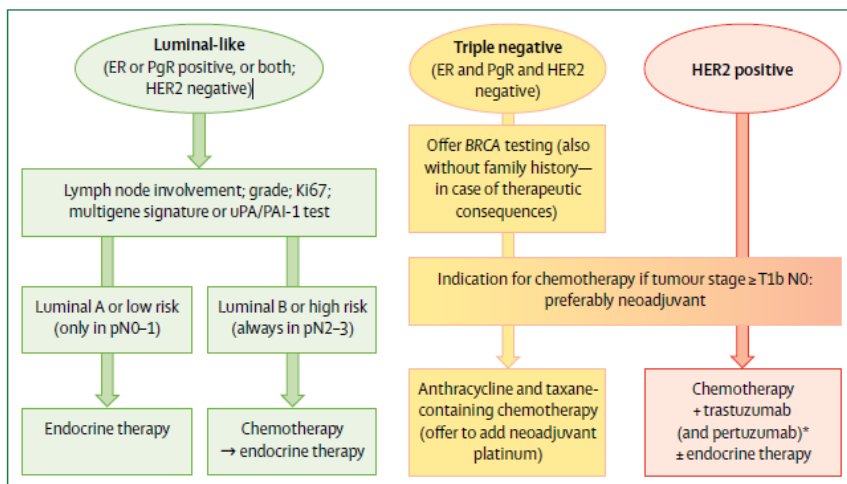
Η διαφοροποιημένη έκφραση των βιοδεικτών στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς, έχει καταστήσει τη μέτρηση πρωτεϊνικών ή νουκλεϊνικών οξέων χρήσιμη για την ανίχνευση εναλλακτικών στρατηγικών θεραπείας, μετά από αποτυχία της πρώτης θεραπείας. Οι νέες τεχνολογίες, όπως η NGS και η MS, επιτρέπουν τη μέτρηση των δειγμάτων ασθενών σε πραγματικό χρόνο, αναγνωρίζοντας νέους φαρμακευτικούς στόχους που ανταποκρίνονται στις ανάγκες του κάθε ασθενούς.

Η εξατομικευμένη ιατρική έχει διαφορετική σημασία για κάθε εμπλεκόμενο φορέα, από τους ασθενείς που επιθυμούν μια πιο ακριβή διάγνωση, μέχρι τις ρυθμιστικές αρχές που απαιτούν την αναγνώριση βιοδεικτών για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των θεραπειών. Η διαστρωμάτωση των ασθενών με βάση τους βιοδείκτες είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη φαρμάκων, καθώς επιτρέπει την προσαρμογή των θεραπειών στις ατομικές ανάγκες του ασθενούς. (Carrigan and Krahn, 2016)

4.2.1 Καρκίνος Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους τρεις πιο συχνούς καρκίνους παγκοσμίως μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Μόνο το 2012, σχεδόν 1,7 εκατομμύρια άνθρωποι διαγνώστηκαν από αυτή την ασθένεια με τη θνησιμότητα να αγγίζει το 30%. Το 2016 η θνησιμότητα μειώθηκε κατά 8% στην Β. Αμερική και την Ευρωπαϊκή ένωση, λόγω της έγκαιρης διάγνωσης και της ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπειών, παραμένοντας όμως η πρώτη πιο συχνή αιτία θανάτου στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες και η δεύτερη μετά από καρκίνο του πνεύμονα στις πιο ανεπτυγμένες χώρες. (Harbeck and Gnant, 2017)

Ο καρκίνος του μαστού κατατάσσεται σε τέσσερις βασικούς μοριακούς υποτύπους: luminal A και luminal B που αφορούν τους θετικά υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης (Estrogen Receptor – ER & Progesterone Receptor - PgR) αλλά αρνητικό για HER-2, τους HER-2 θετικούς και τους τριπλά αρνητικούς (βασικού τύπου -basal type). Ανάλογα με τον κάθε υπότυπο και τη σωστή σταδιοποίηση της ασθένειας, επιλέγεται και η κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση.



Σχήμα 2: Αρχές θεραπείας στον πρώιμο καρκίνο του μαστού – Περίληψη των γενικών στρατηγικών θεραπείας καθώς μπορεί να διαφέρουν λόγω των χαρακτηριστικών του όγκου και της νόσου και των προτιμήσεων των ασθενών. (Harbeck and Gnant, 2017)

Η έγκαιρή διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου βελτιώνουν σημαντικά την παροχή αποτελεσματικής θεραπείας. Η μαστογραφία αποτελεί μια προληπτική εξέταση και είναι μια συνήθης μέθοδος ανίχνευσης καρκίνου του μαστού, αν και σε νεότερες γυναίκες με υψηλή μαστική πυκνότητα έχει χαμηλή ευαισθησία (25–59%) για ανίχνευση νεοπλασιών.

Υπάρχουν βιοδείκτες διαγνωστικοί, προγνωστικοί και προβλεπτικοί για τη νόσο που είναι απαραίτητοι όχι μόνο για την έγκαιρη ανίχνευση και τον προσδιορισμό του τύπου του όγκου αλλά και για τον έλεγχο της νόσου κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή τον έλεγχο αντίστασης στη θεραπεία. Επειδή τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεγάλη ετερογένεια, συνήθως χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός βιοδεικτών αντί ενός μεμονωμένου. (Afzal et al., 2022)

Οι κυριότεροι βιοδείκτες για τον καρκίνο του μαστού για περιλαμβάνουν γενετικούς βιοδείκτες όπως οι υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα αντίστοιχα (ER, PR, HER-2). Επίσης τα γονίδια BRCA1/BRCA2

όπου μεταλλάξεις τους σχετίζονται με το 5-10% του κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Συνδέονται με την κλινική επιλογή χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα και θεραπεία με αναστολείς PARP.

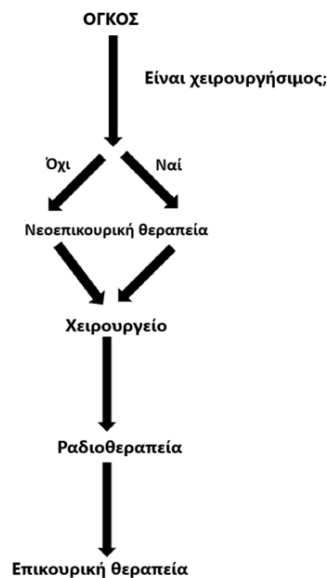
Ελέγχεται η μεθυλίωση του DNA σε γονίδια APC και RARβ2, οι πρωτεϊνικοί βιοδείκτες όπως η πρωτεΐνη Ki67 που συνδέεται με τις μεταστάσεις και οι CA15-3 και CEA που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία καθώς και προσδιορίζονται διάφορα κυκλοφορούντα μικρομόρια όπως miRNAs, cfDNA και circRNAs.

Κλασσική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική όπου γίνεται εκτομή του όγκου αλλά και η ακτινοθεραπεία για τη μείωση του κινδύνου επανεμφάνισης.

Παρόλα αυτά, σε πρώιμα στάδια ή πριν από το χειρουργείο για τη μείωση του όγκου, προτείνεται η χημειοθεραπεία σαν αντιμετώπιση. Χρησιμοποιούνται συνδυασμοί φαρμάκων όπως οι ταξάνες (docetaxel), οι ανθρακοκυκλίνες (epirubicin, doxorubicin) και αλκυλιούντες παράγοντες (cyclophosphamide). Σε μεταστατικό καρκίνο το μαστού, χορηγούνται συνδυασμοί φαρμάκων όπως ταξάνες μαζί με ανθρακοκυκλίνες. Συνδυασμοί πλατινούχων φαρμάκων όπως το cisplatin με άλλα φάρμακα, χρησιμοποιούνται για ανθεκτικές μορφές καρκίνου. Εξελιγμένα σχήματα που περιλαμβάνουν αντιμεταβολίτες όπως το gemcitabine, και το capecitabine.

Ο μοριακός υπότυπος του καρκίνου του μαστού παίζει σημαντικό ρόλο και επηρεάζει σημαντικά την επιλογή θεραπείας. Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού θετικό στους ορμονικούς υποδοχείς (είτε ER είτε PgR) επωφελούνται από ορμονοθεραπεία. Παρομοίως ασθενείς με HER-2 θετικό καρκίνο του μαστού επωφελούνται από στοχευμένη ανοσοθεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (Herceptin) βελτιώνοντας την επιβίωση των ασθενών καθώς ο συγκεκριμένος υπότυπος συνδέεται με κακή πρόγνωση.

Αντίθετα, ο τριπλά αρνητικός (βασικού τύπου) καρκίνος του μαστού, είναι αρνητικός για τους ορμονικούς υποδοχείς (ER και PgR) και τον HER2, δεν διαθέτει θεραπευτικό στόχο και, ως εκ τούτου, δεν αναμένεται να επωφεληθεί από την ορμονοθεραπεία ή τις μοριακά στοχευμένες θεραπείες. (Fisusi and Akala, 2019)



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση στρατηγικών θεραπείας για τον καρκίνο του μαστού. (Fisusi and Akala, 2019)

4.2.2 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί παγκόσμια υγειονομική πρόκληση καθώς έχει τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας και αποτελεί την κυρία αιτία θανάτων από καρκίνο. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (WHO), το 2020 διαγνωστήκαν 2.21 εκατομμύρια καινούριες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα ενώ καταγράφηκαν 1.8 εκατομμύρια θάνατοι. Φαίνεται λοιπόν πόσο μεγάλη είναι η ανάγκη για καλύτερες στρατηγικές όσον αφορά τη διάγνωση και την πρόγνωση καθώς το ποσοστό της πενταετή επιβίωση που δίνεται συνήθως είναι εξαιρετικά χαμηλό. Σε αυτό οφείλετε η καθυστερημένη διάγνωση (συνήθως στο τελευταίο στάδιο), καθώς και οι περιορισμένες επιλογές σε θεραπείες. Βασικό

εργαλείο των ερευνητών και των κλινικών γιατρών για να ανατρέψουν αυτή την κατάσταση είναι η ακριβέστερη σταδιοποίηση την νόσου αλλά και το ολοκληρωμένο μορφολογικό και γενετικό προφίλ της ασθένειας. (Charpidou et al., 2024)

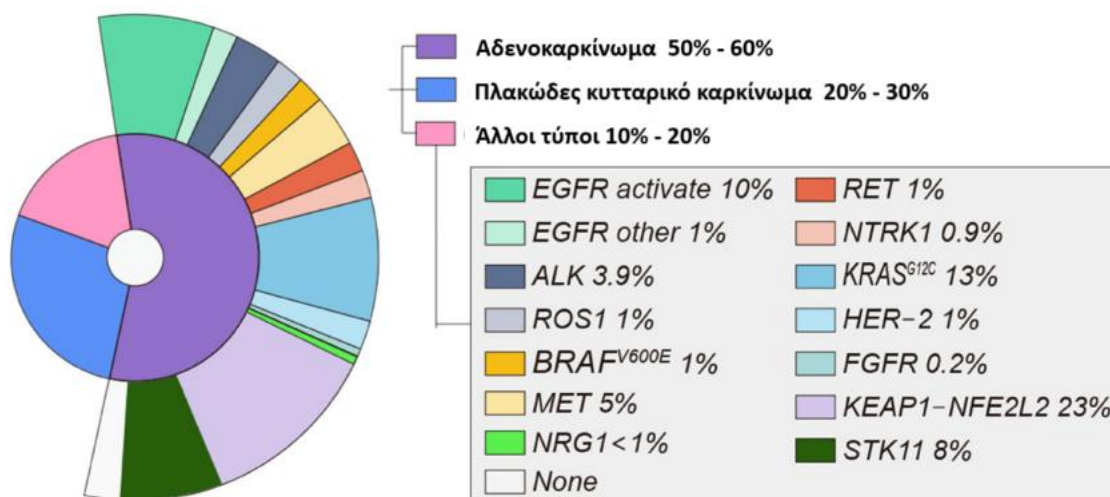
Η εξέλιξη των στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών και των νέων προσεγγίσεων ανοσοθεραπείας έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Ο κλινικός ιατρός για να επιλέξει την καταλληλότερη θεραπεία για τον ασθενή, εξετάζει παράγοντες όπως ο τύπος του καρκίνου, το στάδιο και η γενική κατάσταση του ασθενούς εξατομικεύοντας τη θεραπεία.

Η Αμερικανική Μικτή Επιτροπή για τον καρκίνο και το η Διεθνής Ένωση Καρκίνου πρότειναν το σύστημα σταδιοποίηση TNM (όγκος, κόμβος, μετάσταση). Ο όγκος ταξινομείται με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T- tumor), τη συμμετοχή των περιφερειακών λεμφαδένων (N - node) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M- metastasis). Ιδιαίτερη συμβολή έχουν οι απεικονιστικές μεθόδους όπως αξονική τομογραφία (CT), η ποζιτρονική υπολογιστική τομογραφία (PET/CT) και το υπερηχογράφημα. (Charpidou et al., 2024)

Παραδοσιακά, η ιστοπαθολογική εξέταση κατά τη διάγνωση καρκίνου πνεύμονα ταξινομούσε τους όγκους σε ευρείες κατηγορίες όπως ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC). Ο NSCLC ευθύνεται για το περίπου 85% όλων των τύπων καρκίνων του πνεύμονα, με δύο διακριτούς τύπους. Το αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma – ADC) που περιλαμβάνει το 50-60% των περιπτώσεως και το πλακώδες καρκίνωμα (squamous cell carcinoma – SCC).

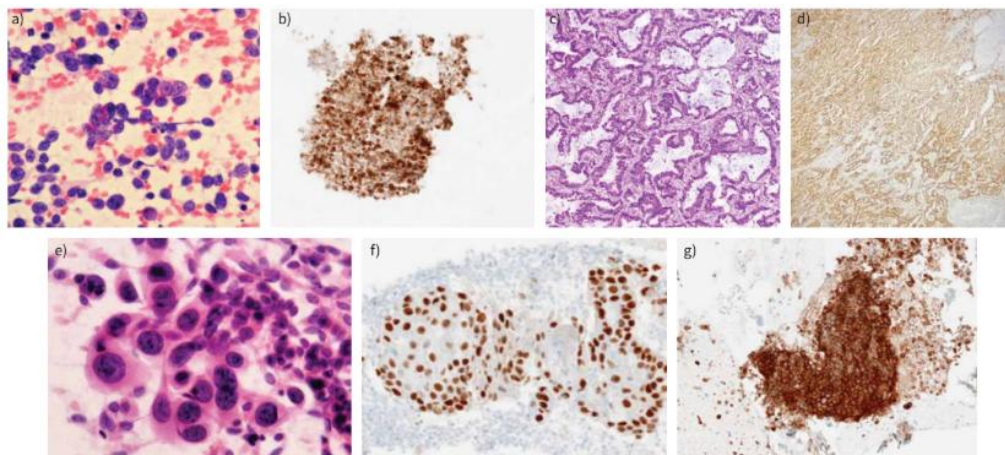
Με την πάροδο του χρόνου και την καλύτερη κατανόηση της μορφολογίας και της γενετικής του κάθε όγκου μέσω των τεχνικών αλληλούχησης (NGS), η κατηγοριοποίηση έχει αλλάξει. Πλέον, αναγνωρίζονται μεταλλάξεις που οδηγούν στην καρκινική ανάπτυξη όπως γονιδιακές μεταλλάξεις στον EGFR και στο γονίδιο BRAFV600E, στον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (ALK), στο πρωτο-ογκογονίδιο

τυροσινο-πρωτεϊνικής κινάσης ROS1. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα πέρα από τη χειρουργική προσέγγιση και την ακτινοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία, να έχουν αναπτυχθεί και στοχευμένες θεραπείες. (Guo et al., 2022)



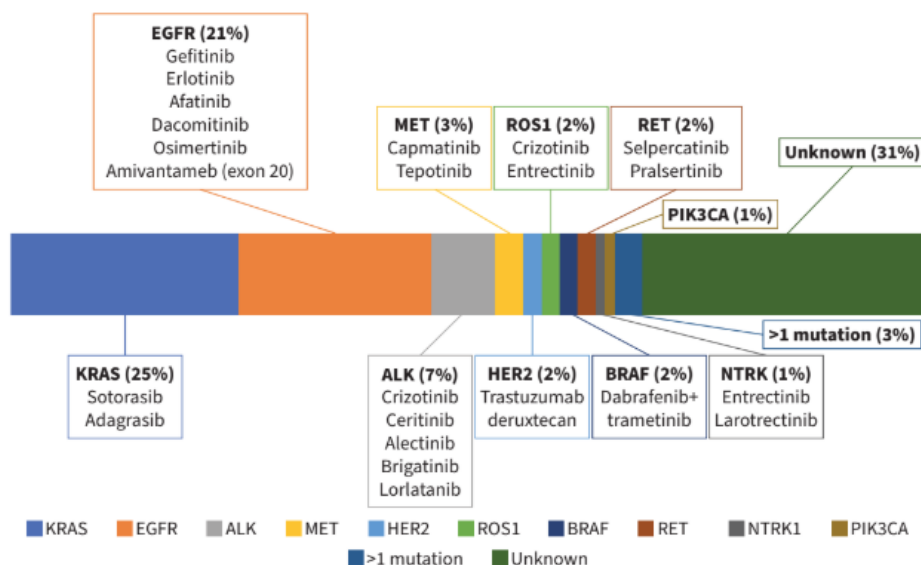
Εικόνα 10: Το 50-60% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ είναι αδενοκαρκινώματα, ενώ το 20-30% είναι πλακώδες καρκίνωμα. Μοριακές αλλοιώσεις του αδενοκαρκινώματος που σχετίζονται με καρκινικούς βιοδείκτες. (Guo et al., 2022)

Με τη χρήση της ανοσοϊστοχημεία (IHC) γίνεται διάγνωση κακοηθιών όγκων, όμως στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα η διάγνωση είναι περιορισμένης και χρησιμοποιείται κυρίως για τους τύπους SCLC και SCC. Στην περίπτωση του ADC, καθώς ο πνεύμονας συχνά αποτελεί δευτερογενής μετάσταση, αποτελεί διαγνωστική πρόκληση για τους ιστοπαθολόγους ώστε να αξιολογηθεί η επιλογή θεραπευτικής προσέγγισης. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα ευρύ φάσμα δεικτών IHC για τη διάγνωση μεταστατικών όγκων στον πνεύμονα. (Charpidou et al., 2024)



Εικόνα 11: Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σε κυτταρολογικό επίχρισμα: α) χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, β) θετική αντίδραση ανοσοϊστοχημείας (IHC) με CD56, μπλοκ κυττάρων. Αδενοκαρκίνωμα με αδενικό πρότυπο σε βιοψία ιστού: γ) χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, δ) θετική αντίδραση IHC με pepsin A. Πλακώδες καρκίνωμα, με τυπικά χαρακτηριστικά σε κυτταρολογικό επίχρισμα: ε) χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, ς) θετική αντίδραση IHC με p40. Έκφραση του προγραμματισμένου λιγάνου θανάτου 1 (PD-L1) σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε μπλοκ κυττάρων: ζ) Ποσοστό όγκου >50%, αντισώματα: Ventana SP-263. (Charpidou et al., 2024)

Με την καλύτερη κατανόηση της μοριακής βιολογίας του καρκίνου του πνεύμονα και των χαρακτηριστικών του όγκου και των μεταστάσεων, άνοιξε ο δρόμος για στοχευμένες αντικαρκινικές θεραπείες αποφεύγοντας την τοξικότητα των παραδοσιακών χημειοθεραπειών και βελτιώνοντας την πρόγνωση των ασθενών. Μερικές από αυτές είναι οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (TKI), τα μονοκλωνικά αντισώματα και οι στοχευμένες χημειοθεραπείες που χορηγούνται σε κύτταρα όγκου χρησιμοποιώντας λιποσώματα, νανοσωματίδια ή συζευγμένα φάρμακα με αντισώματα.



Εικόνα 12: Συχνότητα κοινών μοριακών αλλοιώσεων που προκαλούν καρκίνο και οι στοχευμένες θεραπείες τους στο αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα.

KRAS: ομόλογο του ογκογονιδίου *Kirsten rat sarcoma*, **EGFR:** υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, **ALK:** κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος, **MET:** πρωτο-ογκογονίδιο *MET*, υποδοχέας κινάσης τυροσίνης, **HER2:** ανθρώπινος υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2, **ROS1:** πρωτοογκογονίδιο *ROS1*, **BRAF:** πρωτοογκογονίδιο *B-Raf*, **RET:** πρωτοογκογονίδιο *rearranged during transfection*, **NTRK:** υποδοχέας της νευροτροφικής τροπομοσίνης κινάσης, **PIK3CA:** καταλυτική υπομονάδα α της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης-4,5-δισφωφορικής 3-κινάσης. (Charpidou et al., 2024)

Για να γίνει η μοριακή διάγνωση χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως:

PCR : Μοριακή ανάλυση ενός μόνο γονιδίου. Αξιόπιστη και ευαίσθητη ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων, όπως οι διαγραφές στο εξόνιο 19 ή οι μεταλλάξεις L858R του EGFR. Βοηθάει στην απόφαση θεραπείας με αναστολέα TKI στοχεύοντας πάρα πολλά γονίδια μεταξύ των οποίων το EGFR, KRAS και BRAF.

FISH: Ενδείκνυται κυρίως για τη μελέτη γονιδιακών συγχωνεύσεων και ενισχύσεων (ROS1 και NTRK).

IHC: Ιδιαίτερα για την ανίχνευση μεταλλάξεων/συγχωνεύσεων στον βιοδείκτη ALK. Χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για θεραπευτικές αποφάσεις.

NGS: Επιτρέπει τη μελέτη πολλών γονιδίων ταυτόχρονα μειώνοντας τον χρόνο και το κόστος.

Τεχνική Ανάλυσης	Τι ακριβώς κάνει;	Δείγμα που χρησιμοποιείται	Ποια είναι η κλινική σημασία;
IHC	Ανίχνευση έκφρασης πρωτεϊνών	Ιστός	Θεραπευτική απόφαση
PCR	Ανίχνευση γενετικής μετάλλαξης	Ιστός / Αίμα	Θεραπευτική απόφαση/ μηχανισμός μεταστάσεων
NGS	Ανίχνευση γενετικής μετάλλαξης Ενίσχυση Παράλειψη εξονίου	Ιστός / Αίμα	Θεραπευτική απόφαση/ μηχανισμός μεταστάσεων
FISH	Αναδιάταξη γονιδίων Ενίσχυση Παράλειψη εξονίου	Ιστός	Θεραπευτική απόφαση/ μηχανισμός μεταστάσεων

Πίνακας 3: Τεχνικές μοριακής ανάλυσης και κλινική εφαρμογή. (Charpidou et al., 2024)

Από το 2015, οι αναστολείς σημείων ελέγχου (Immune checkpoint inhibitors - ICIs) έχουν καταλάβει κεντρικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Διαφέρουν από τις κλασσικές θεραπείες, καθώς αντί να στοχεύουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα, επεμβαίνουν στους ανοσολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού, ανατρέποντας την ικανότητα των όγκων να διαφεύγουν από την ανοσολογική απόκριση. Έτσι, ενεργοποιούν την ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού για την καταστροφή των όγκων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές, οι ICIs συνιστώνται για την αντιμετώπιση προχωρημένου καρκίνου, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Η έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1 αποτελεί τον βασικό βιοδείκτη για την επιλογή ασθενών που θα επωφεληθούν από τη θεραπεία με ICIs, αν και άλλοι δείκτες, όπως το φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (TMB), ερευνώνται.

4.2.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μία από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου παγκοσμίως και ευθύνεται για περίπου το 10% των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο στις ανεπτυγμένες χώρες. Η συχνότητα εμφάνισής του έχει αυξηθεί σημαντικά εξαιτίας της γήρανσης του πληθυσμού, των ανθυγιεινών διατροφικών συνηθειών, του καπνίσματος, της μειωμένης φυσικής δραστηριότητας και της παχυσαρκίας.

Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου περιλαμβάνουν την ηλικία, καθώς συνήθως εμφανίζεται σε άτομα άνω των 50 ετών, και την κληρονομικότητα. Γενετικοί παράγοντες, όπως το σύνδρομο Lynch, το οποίο συνδέεται με μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2 και MSH6 που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA (Mismatch Repair genes – MMR), καθώς και η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis – FAP), η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία χιλιάδων πολύποδων στο έντερο, ευθύνονται για το 5-10% των περιπτώσεων. Παρόλα αυτά, η πλειονότητα των περιστατικών είναι σποραδική και σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες και τον τρόπο ζωής.

Η συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου ξεκινά από πολύποδες που εξελίσσονται σε αδenoκαρκινώματα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει από 10 έως 15 χρόνια και καθοδηγείται από συσσωρευμένες μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλαγές.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις μοριακές υποκατηγορίες:

1. **Μικροδορυφορική αστάθεια (MSI):** Τα μικροδορυφορικά τμήματα του DNA εμφανίζουν ασταθή συμπεριφορά. Χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις (ελλείψεις ή διπλασιασμό γονιδίων) και ανάπτυξη όγκων λόγω βλάβης στον

μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Αυτή η κατηγορία συνδέεται συχνά με το σύνδρομο Lynch, το οποίο επηρεάζει τα γονίδια MMR.

2. **Χρωμοσωμική αστάθεια (CIN):** Οι όγκοι αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν χρωμοσωμική αστάθεια, η οποία οδηγεί σε αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα. Συνήθεις μεταλλάξεις σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνουν τα γονίδια APC, TP53 και KRAS.
3. **Φαινότυπος υπερμεθυλίωσης νησίδων CpG (CIMP):** Αυτή η υποκατηγορία χαρακτηρίζεται από υπερβολική μεθυλίωση σε περιοχές CpG στο DNA. Είναι συχνά συνδεδεμένη με μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF.
4. **Μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS):** Σε αυτή την υποκατηγορία παρατηρούνται υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων χωρίς την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας. Τα μοριακά χαρακτηριστικά αυτής της κατηγορίας παραμένουν υπό διερεύνηση. (Kuipers et al., 2015)

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου περιλαμβάνει σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως η ενδοσκοπική και χειρουργική εκτομή, η συστηματική επικουρική χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, η στοχευμένη θεραπεία και η ανοσοθεραπεία. Ιδιαίτερα, η χρήση αναστολέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου (ICIs) έχει επιφέρει σημαντικές αλλαγές στις θεραπευτικές πρακτικές. Από το 2017, με την έγκριση φαρμάκων όπως η πεμπρολιζουμάμπη (Pembrolizumab), η θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) πραγματοποιείται μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του υποδοχέα PD-1, αποτελώντας βασικό στοιχείο της εξατομικευμένης θεραπείας.

Με την πρόοδο της ιατρικής επιστήμης, η χρήση κατάλληλων βιοδεικτών για τη διάγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση ασθενειών καθίσταται ολοένα και πιο σημαντική. Στην ανοσοθεραπεία, οι κύριοι βιοδείκτες που σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα των ICIs περιλαμβάνουν τον PD-L1, το φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (TMB) και τη μικροδορυφορική σταθερότητα (MSI).

Η MSI, ειδικότερα, λειτουργεί ως βιοδείκτης ευαισθησίας στην ανοσοθεραπεία για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, μέσω της ανάλυσης δειγμάτων ιστού. Παρόλο που ο βιοδείκτης MSI-H/dMMR θεωρείται αρκετά υποσχόμενος, τα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία (30-70% σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο) παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις, γεγονός που υποδεικνύει ότι κάποιοι ασθενείς δεν επωφελούνται από αυτήν τη μέθοδο. Σε αντίθεση, σε ασθενείς με μικροδορυφορικά σταθερό καρκίνο (MSS), παρατηρείται ανταπόκριση στη θεραπεία, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε διαγνωστικά σφάλματα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της MSI περιλαμβάνουν την IHC, την PCR και την αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS).

Το φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (TMB) συνδέεται επίσης με την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία και λειτουργεί ως προβλεπτικός βιοδείκτης κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αυξημένα επίπεδα TMB στο πλάσμα σχετίζονται με θετική πρόγνωση σε συνδυασμένη θεραπεία αναστολέων PD-L1 (δουρβαλουμάμπη - durvalumab) και CTLA4 (τρεμελιμουμάμπη - tremelimumab) σε ασθενείς με MSS καρκίνο. Ωστόσο, η χρησιμότητα του TMB υπόκειται σε περιορισμούς λόγω της ετερογένειας των όγκων και των επιδράσεων της κυτταροτοξικής θεραπείας στις γονιδιακές μεταβολές.

Η χρήση της υγρής βιοψία έχει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση, στην ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD), την επιλογή θεραπείας, τους μηχανισμούς αντίστασης και την παρακολούθηση, καθώς και στη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο. Καθώς είναι μια μη επεμβατική μέθοδος η ανίχνευση CTCs, cfDNA, RNA ή καρκινικών κυττάρων σε σωματικά υγρά είναι πολύ άμεση. Επίσης, οι μεταβολές στον αριθμό των CTCs σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση χωρίς νόσο (DFS), επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) και συνολική επιβίωση (OS), ενώ αυξημένα επίπεδα δείχνουν την πρόοδο της νόσου. Τέλος, η παρουσία εξαιρετικά χαμηλού ποσοστού καρκινικών κυττάρων (ελάχιστη υπολειμματική νόσος - MRD) επιτυγχάνεται μέσω της ανίχνευσης των CTCs και του ctDNA. (Yao et al., 2023)

5. Μελλοντικές τάσεις και προκλήσεις

Η ανάπτυξη καινούριων τεχνολογιών υψηλής απόδοσης και η βελτίωση των ήδη υπαρχών αναλυτικών τεχνικών επιτρέπουν τη διεξοδική ανάλυση γονιδίων, πρωτεϊνών και άλλων σημαντικών βιολογικών μορίων προσφέροντας την ευκαιρία για την αναγνώριση μοριακών δεικτών για διάφορες ασθένειες και τη βαθύτερη κατανόηση τους για σωστή αντιμετώπιση. Σε αυτό συνεισφέρει σημαντικά η ανακάλυψη και η αξιολόγηση νέων βιοδεικτών για πιο εξελιγμένη προσέγγιση και αντιμετώπιση συμβάλλοντας στην εξατομικευμένη θεραπεία και η ανάπτυξη καινούριων τεχνικών ανάλυσης αλλά και θεραπευτικών προσεγγίσεων.

5.1 Ανακάλυψη νέων βιοδεικτών

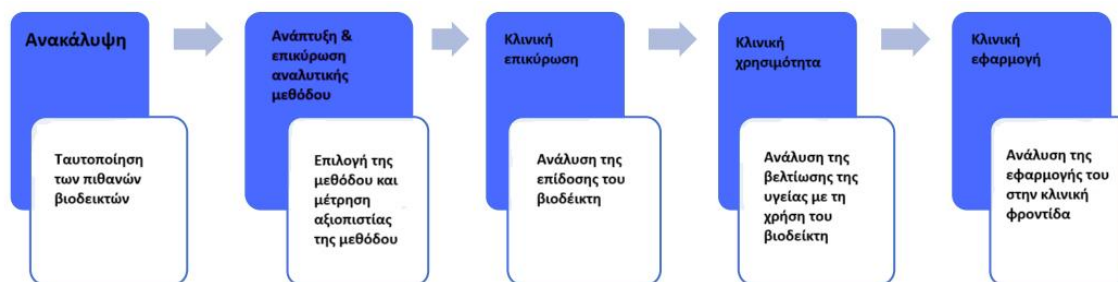
Υπάρχουν δύο βασικοί συλλογιστικοί μηχανισμοί για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών: η μέθοδος με βάση την υπόθεση και η μεθοδολογία ανακάλυψης. Καθώς κατανοούμε καλύτερα τις διάφορες παθολογικές ασθένειες, την καρκινογένεση και την εξάπλωση του καρκίνου, είναι πιο εύκολο να υποθέσουμε και να εξετάσουμε συγκεκριμένα γονίδια, μακρομόρια, ένζυμα, υποδοχείς κ.τ.λ. Για παράδειγμα, ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί αύξηση στα επίπεδα της γλυκόζης, με αποτέλεσμα την καθιέρωση της εξέτασης της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης ως βιοδείκτη για την διάγνυσή του. Επίσης, η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού οδήγησε στη χρησιμοποίηση των υποδοχέων ER και τη ενίσχυση του HER-2 ως προγνωστικούς βιοδείκτες για τον καρκίνο του μαστού.

Αντίθετα, η μεθοδολογία ανακάλυψης στοχεύει την αναγνώριση αλλαγών ή και στην παρουσία μορίων που σχετίζονται με την ασθένεια. Μπορεί και εδώ να έχουμε υποθετικό συλλογισμό καθώς μπορεί η ανακάλυψη βιοδεικτών να στηρίζεται στην παρατήρηση της διαφοροποιημένης έκφρασης κάποιο γονιδίου. Παραδείγματος χάριν, το γονίδιο BRCA1, οδήγησε στην κατανόηση του ρόλου που παίζει το

συγκεκριμένο γονίδιο στην επιδιόρθωση του DNA όταν παρατηρήθηκαν διαγραφωμένες περιοχές στο χρωμόσωμα 17 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και η εξέλιξη τεχνολογιών που υποστηρίζουν την εφαρμογή τους αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης ιατρικής έρευνας. Η συστηματική κατανόηση των μηχανισμών των ασθενειών, σε συνδυασμό με τη χρήση προηγμένων τεχνολογιών, υπόσχεται πιο έγκαιρη διάγνωση, στοχευμένες θεραπείες και βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα. Το μέλλον της εξατομικευμένης ιατρικής βασίζεται στη συνεχή πρόοδο σε αυτό το πεδίο, ανοίγοντας τον δρόμο για καλύτερη πρόληψη και βελτιστοποίηση της φροντίδας των ασθενών. (McDermott et al., 2013)

Τα συνήθη βήματα για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη τεχνικών ανίχνευσης αποτελεσματικών βιοδεικτών είναι τα εξής: ανακάλυψη, ανάπτυξη και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού του βιοδείκτη, κλινική επικύρωση, κλινική χρησιμότητα και τέλος κλινική εφαρμογή.



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών. (McDermott et al., 2013)

Το πρώτο βήμα είναι ο εντοπισμός ατομικών ή ομαδικών βιοδεικτών μέσα από τα αποτελέσματα προ κλινικών μελετών. Για να γίνει καλύτερη διαχείριση και οργάνωση θα πρέπει να είναι γνωστό ο σκοπός του βιοδείκτη και η κλινική εφαρμογή για την οποία προορίζεται. Χρειάζεται κατάλληλη επιλογή πληθυσμιακού δείγματος, επαρκή στατιστικά στοιχεία, εξέταση όλων των πιθανών παραγόντων και χρήση τυφλού

δείγματος ώστε να προστατευτεί η προκατάληψη (bias) της μεθόδου. Όπλο στην φαρέτρα των ερευνητών αποτελούν οι νέες εφαρμοσμένες τεχνικές ανάλυσης όπως η NGS, οι συστοιχίες γονιδιακής έκφρασης, η MS για προσδιορισμό πρωτεϊνών και άλλες τεχνολογίες υψηλής απόδοσης.

Μετά από την ανακάλυψη του επιθυμητού βιοδείκτη πρέπει να αναπτυχθεί και να επικυρωθεί η μέθοδος ανίχνευσής του ή/και ποσοτικοποίησης του από τα δείγματα ελέγχου του ασθενούς. Αναπτύσσεται συγκεκριμένο πρωτόκολλο για τη συλλογή του δείγματος, τον τρόπο επεξεργασίας και της αποθήκευσης του. Σημαντικό στάδιο αυτού του βήματος είναι η αναλυτική επικύρωση της μεθόδου. Δηλαδή, η μέθοδος ανάλυσης που έχει σχεδιαστεί να μπορεί να ανιχνεύσει ή/και να ποσοτικοποιήσει τον επιλεγμένο βιοδείκτη, διασφαλίζοντας την απόδοση της μεθόδου και τα κλινικά αποτελέσματα. Τα χαρακτηριστικά που προσδιορίζονται αφορούν την αναλυτική ευαισθησία (sensitivity), την αναλυτική ειδικότητα (specificity), την αναλυτική ακρίβεια (accuracy) και την αξιοπιστία (reliability) που προσδιορίζεται με την αναλυτική επαναληψιμότητα (repeatability) και την αναλυτική αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). (Sarhadi and Armengol, 2022)

Όρος	Ορισμός
Αναλυτική Ευαισθησία	Η μικρότερη συγκέντρωση μιας ουσίας σε ένα βιολογικό δείγμα που μπορεί να μετρηθεί με αξιοπιστία με μια αναλυτική διαδικασία
Αναλυτική Ειδικότητα	Η ικανότητα μιας ανάλυσης να μετρήσει τη συγκεκριμένη ουσία/στόχο(αντί άλλων) σε βιολογικό δείγμα
Αναλυτική Ακρίβεια	Η εγγύτητα συμφωνίας μεταξύ της τιμής που βρέθηκε σε σχέση με την αξία μιας συμβατικής ή πραγματικής τιμής ή αποδεκτή τιμής αναφοράς.
Αναλυτική Επαναληψιμότητα	Το μέτρο του βαθμού στον οποίο ένα τεστ δίνει το ίδιο αποτέλεσμα, όταν διεξάγεται πολλές φορές με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό, με τον ίδιο χειριστή, σε σύντομο χρονικό διάστημα
Αναλυτική Αναπαραγωγιμότητα	Το μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή δίνει το ίδιο αποτέλεσμα όταν διεξάγεται πολλές φορές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικό εξοπλισμό και με διαφορετικούς χειριστές

Πίνακας 4: Ορισμοί όρων που αξιολογούνται στην αναλυτική επικύρωση. (Sarhadi and Armengol, 2022)

Το τρίτο βήμα αφορά την κλινική επικύρωση, δηλαδή τη διαδικασία με την οποία επιβεβαιώνεται ότι ο βιοδείκτης μπορεί μέσω της αναλυτικής μεθόδου που έχει αναπτυχθεί να αναγνωρίσει, να μετρήσει ή να προβλέψει μια κλινική κατάσταση, χωρίς να σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος βιοδείκτης βελτιώνει την κλινική κατάσταση. Η αξιολόγηση της απόδοσης ενός βιοδείκτη βασίζεται σε διάφορες διαγνωστικές παραμέτρους.

Η διαγνωστική ευαισθησία (diagnostic sensitivity) υπολογίζει πόσο συχνά η μέτρηση ενός δυαδικού βιοδείκτη (ύπαρξη ή όχι) αναγνωρίζει σωστά την παρουσία ενός χαρακτηριστικού σε άτομα που πραγματικά το έχουν. Αντίθετα, η διαγνωστική ειδικότητα (diagnostic specificity) υπολογίζει πόσο συχνά η μέτρηση ενός δυαδικού βιοδείκτη αναγνωρίζει σωστά την απουσία ενός χαρακτηριστικού σε άτομα που πραγματικά δεν το έχουν.

Η θετική προγνωστική αξία (positive predictive value, PPV) περιγράφει τη συχνότητα με την οποία ένα θετικό τεστ βιοδείκτη αντιστοιχεί πραγματικά στην παρουσία ενός χαρακτηριστικού, ενώ η αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value, NPV) περιγράφει τη συχνότητα με την οποία ένα αρνητικό τεστ βιοδείκτη αντιστοιχεί πραγματικά στην απουσία του.

Η καμπύλη χαρακτηριστικών λειτουργίας του δέκτη (receiver operating characteristics, ROC) δείχνει τη σχέση μεταξύ της ευαισθησίας (αληθώς θετικά) και της ειδικότητας (αληθώς αρνητικά). Η καμπύλη αυτή παρέχει γραφική αναπαράσταση των λόγων πιθανοτήτων στις διάφορες τιμές του βιοδείκτη. Τέλος, η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (area under the ROC curve, AUC ROC) αντικατοπτρίζει την ικανότητα του βιοδείκτη να διακρίνει μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων ατόμων. Ένας βιοδείκτης πρέπει να έχει τουλάχιστον 90% διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα και η AUC να είναι πάνω από 75%.

Τα τελευταία βήματα ανακάλυψης νέων βιοδεικτών αφορούν την κλινική χρησιμότητα και την κλινική εφαρμογή. Αν αποδειχτεί κλινικά ότι ο βιοδείκτης έχει συμβάλλει στην καλυτέρευση της υγείας του ασθενούς, σε μείωση των παρενεργειών της θεραπείας ή ακόμα και σε μείωση του κόστους θεραπείας, τότε ο συγκεκριμένος βιοδείκτης είναι χρήσιμος στην κλινική εφαρμογή. Ένας βιοδείκτης πέρα από κλινικά αποτελέσματα πρέπει να έχει και οικονομικά οφέλη.

Τέλος, η εφαρμογή των κλινικών πρωτοκόλλων χρησιμοποίησης νέων βιοδεικτών εγκρίνεται από τις αρμόδιες αρχές (π.χ. FDA ή Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων) αλλά η ενσωμάτωση της χρήσης του μπορεί να επηρεάζεται και από τα εθνικά συστήματα υγείας. Για να εφαρμοστεί ένας βιοδείκτης στην κλινική πράξη θα πρέπει να είναι αποδεκτός και από τους γιατρούς και από τους ασθενείς, καθώς και οι ίδιοι οι γιατροί να είναι ενημερωμένοι και κατάλληλα εκπαιδευμένοι για την εφαρμογή του και την σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

5.2 Νέες τεχνολογίες ανάλυσης

Η ανάγκη για ταχύτερη και πιο ακριβή διάγνωση, πρόγνωση και εξατομικευμένη θεραπεία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων βιοδεικτών. Η υγρή βιοψία χρησιμοποιείται ήδη ευρέως για την ανίχνευση βιοδεικτών σε σωματικά υγρά, σε πολλές κλινικές περιπτώσεις. Τα τελευταία χρόνια, αναπτύσσονται τεχνικές που αξιοποιούν την τεχνητή νοημοσύνη και την επεξεργασία δεδομένων, την πρωτεωμική και τη μεταγραφωμική, τη νανοτεχνολογία και το μικροβίωμα

5.2.1 Νανοτεχνολογία

Η ραγδαία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας έχει ανοίξει νέους δρόμους για την ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών, εισάγοντας καινοτόμα εργαλεία όπως οι νανοαισθητήρες (nanosensors). Οι μοναδικές ιδιότητες των νανοϋλικών, όπως η

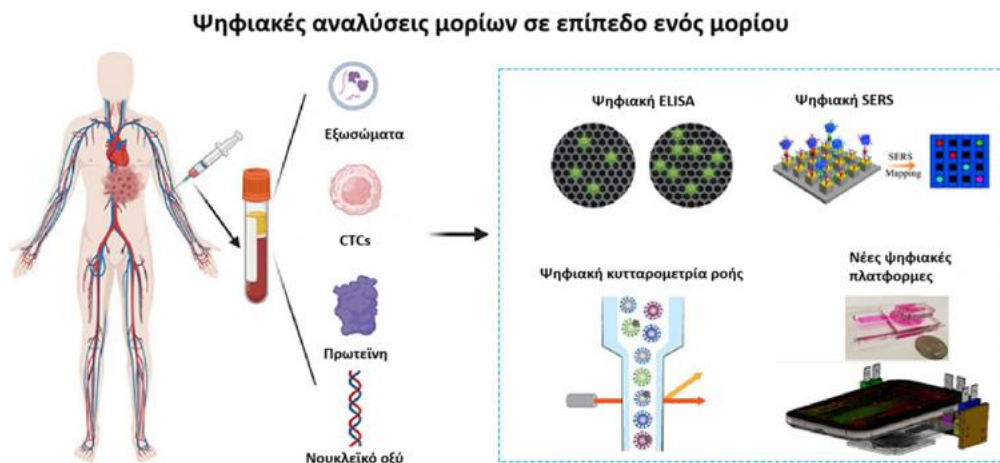
υψηλή ευαισθησία και η δυνατότητα αλληλεπίδρασης με βιολογικά μόρια, καθιστούν ιδανικούς τους νανοαισθητήρες στην έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου. Είναι ειδικά σχεδιασμένοι για την ανίχνευση με μεγάλη ακρίβεια διαφόρων μορίων όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες και άλλους βιοδείκτες. (Wu et al., 2024)

Μέσω τεχνικών όπως ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance - SPR) και η επιφανειακή ενίσχυση σκέδασης Raman (SERS), οι νανοαισθητήρες μπορούν να εντοπίσουν μοριακές αλλαγές ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και μπορούν να συμβάλουν στην πρόωπη διάγνωση του καρκίνου.

Στην κλινική πρακτική η εφαρμογή τους κατά την ανάλυση δειγμάτων υγρής βιοψίας, όπως το αίμα ή το πλάσμα, βοηθάει στην ανίχνευση cfDNA, εξωσωμάτων ή CTCs. Αυτή η μη επεμβατική προσέγγιση μειώνει την ανάγκη για παραδοσιακές βιοψίες και συμβάλλει στη συχνότερη παρακολούθηση της πορείας του ασθενούς κατά τη διάρκεια της θεραπείας. (Wu et al., 2024)

Λόγω της πολυπλοκότητάς της μήτρας του δείγματος, της χαμηλής συγκέντρωσης του βιοδείκτη, ειδικά σε αρχικά στάδια της νόσου, υπάρχει η ανάγκη για την εξέλιξη ιδιαίτερα ευαίσθητων και ειδικών τεχνικών ανίχνευσης.

Αναδυόμενες τεχνολογίες όπως οι ψηφιακές αναλύσεις μορίων σε επίπεδο ενός μορίου (single-molecule digital assays) έχουν σημαντικές εφαρμογές στη βιοϊατρική, τη διάγνωση καρκίνου και τη μοριακή ανάλυση. Η σύνδεσή τους με ψηφιακή ELISA, ψηφιακή κυτταρομετρία ροής, ψηφιακή SERS και άλλες τεχνικές βοηθάει στην ποσοτική ανίχνευση της νόσου με ψηφιακή καταμέτρηση μεμονωμένων μορίων αυξάνοντας την ευαισθησία της ανάλυσης και ξεδιαλύνοντάς καλύτερα την ετερογένεια του καρκίνου με αποτέλεσμα τον σχεδιασμό εξατομικευμένης θεραπείας. (Li et al., 2024)



Εικόνα 13: Ψηφιακές αναλύσεις μορίων σε επίπεδο ενός μορίου (Li et al., 2024)

Ψηφιακή ELISA (Digital ELISA): Η κλασική ELISA μετατρέπεται σε ψηφιακή μέσω της διάσπασης του δείγματος σε χιλιάδες ανεξάρτητες μικροαντιδράσεις (π.χ. μικροσταγονίδια ή μικροπηγάδια). Σε κάθε μικροαντίδραση καθώς τα νανοσφαιρίδια χρυσού (AuNPs) προσκολλώνται στο μόριο-στόχο, ανιχνεύεται οπτικό σήμα ως δυαδικό αποτέλεσμα (παρουσία ή απουσία στόχου), επιτρέποντας εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης, μειώνοντας αισθητά τα σφάλματα που σχετίζονται με την ένταση του σήματος στις αναλογικές μετρήσεις και αυξάνει την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης. Λόγω όμως της χαμηλής αποδοτικότητας στη δειγματοληψία (σε κάποιες πλατφόρμες μόνο το 5-10% αναλύονται) και του μεγάλου χρόνου ανάλυσης υπάρχει και η ανάπτυξη της digital dropcast ELISA. Σε αυτή την παραλλαγή, το δείγμα εισέρχεται σε μικροσταγονίδια και πραγματοποιείται η ταυτόχρονη διεξαγωγή πολλαπλών δειγμάτων. Βελτιώνει την αποδοτικότητα, ενώ η χρήση ενζύμων ή φωσφορισμού για ταχείας ενίσχυσης σήματος μειώνει τον χρόνο ανάλυσης. Η digital ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση απειροελάχιστης ποσότητας PSA σε δείγμα αίματος έπειτα από ριζική προστατεκτομή για την παρακολούθηση υποτροπής. (Li et al., 2024; Tsurusawa et al., 2021)

Ψηφιακή Κυτταρομετρία Ροής: Βασίζεται στη δυνατότητα ανίχνευσης σωματιδίων ή μορίων σε επίπεδο ενός μορίου αντί για μετρήσεις πληθυσμών κυττάρων. Χρησιμοποιούνται μικροσφαιριδίων για τη σύζευξη με βιοδείκτες μαζί με τεχνικές ενίσχυσης τμημάτων του DNA ή του RNA ή υβριδισμού DNA για την ενίσχυση του σήματος. Η καταμέτρηση γίνεται σε δυαδικό σύστημα (ύπαρξη ή όχι) προσφέροντας αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια. Χρησιμοποιείται στην ποσοτικοποίηση του miRNA. Βασικό πλεονέκτημα είναι η μείωση του θορύβου σχέση με την κλασσική κυτταρομετρία ροής βελτιώνοντας την απόδοση. Περαιτέρω μελλοντική βελτίωση είναι η χρήση μικροσταγονιδίων αλλά και η εφαρμογή εξειδικευμένων αλγορίθμων ανάλυσης δεδομένων.

Ψηφιακή επιφανειακή ενίσχυση σκέδασης Raman (Digital SERS): Βελτιώνει την παραδοσιακή SERS μέσω της εισαγωγής μεμονωμένων νανοδομών (π.χ. νανοκυλίνδρους) που επιτρέπουν την ανάλυση μορίων επίσης με δυαδικό τρόπο. Έτσι, μειώνονται οι διακυμάνσεις στα σήματα Raman που επηρεάζουν την αναπαραγωγικότητα, αυξάνοντας την ακρίβεια για την ανίχνευσης σπάνιων βιοδεικτών. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση καλοήθων ή κακοήθων όγκων του πνεύμονα δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα από τις κλασσικές απεικονιστικές τεχνικές (PET/CT). (Li et al., 2024)

5.2.2 Multi-Omics και εξατομικευμένη Ιατρική

Η αναγνώριση των γενετικών πληροφοριών, των μεταβολικών οδών και η μελέτη των πρωτεϊνών έχουν ανοίξει ένα νέο πεδίο στην κλινική πράξη. Ιδιαίτερα στον τομέα της ογκολογίας, οι καρκινικοί βιοδείκτες επιτρέπουν την αναγνώριση γενετικών ή μεταγραφικών παραμέτρων, τη μείωση ή ανεπάρκεια της λειτουργίας πρωτεϊνών, βοηθώντας στη διάγνωση, την πρόγνωση και την εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση.

Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο με υψηλό βαθμό ετερογένειας, γεγονός που καθιστά τις κλασσικές μεθόδους ανάλυσης ανεπαρκείς καθώς εστιάζουν

σε μεμονωμένους βιοδείκτες. Η ανάπτυξη των πολυ-ομικών (multi-omics) προσεγγίσεων έχει προσφέρει μια συνολική εικόνα στη βιολογία των όγκων, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την κατανόηση της νόσου. Με τον όρο multi-omics, αναφερόμαστε σε διαφορετικές κατηγορίες μελέτης βιολογικών πληροφοριών, με στόχο την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων και εφαρμογή στην εξατομικευμένη θεραπεία. Χρησιμοποιώντας τις διαθέσιμες αναλυτικές τεχνικές (NGS, PCR, MS κ.α) σε συνδυασμό με βιοπληροφορική ανάλυση, μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για συγκεκριμένες μοριακές ομάδες ή διεργασίες. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν τη γενωμική (genomics), που μελετά το σύνολο της γενετικής πληροφορίας και τις μεταλλάξεις στο DNA, την πρωτεομική (proteomics), που εξετάζει τις πρωτεΐνες που παράγονται σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό και τη μεταβολομική που διερευνά τις μεταβολικές οδούς και τα μεταβολικά προϊόντα. (Hristova and Chan, 2019)

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής αυτών των τεχνολογιών είναι ο καρκίνος του μαστού. Χρησιμοποιώντας υγρή βιοψία για την ανίχνευση CTCs, ctDNA και διάφορους πρωτεϊνικούς δείκτες. Η ανάλυση των omics βοηθά στον εντοπισμό δεικτών που σχετίζονται με την επιβίωση και την αντίσταση στη θεραπεία. Για παράδειγμα, ασθενείς με >5 CTCs ανά 7,5 mL αίματος έχουν μικρότερη επιβίωση και υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής. Μετά από τη θεραπεία, η μέτρηση επίπεδων ctDNA συνδέεται με την πρόγνωση της επιβίωσης, ενώ η αναγνώριση μεταλλάξεων στο ESR1 σχετίζονται με αντίσταση στη ορμονοθεραπεία.

Οι ομικές τεχνολογίες επιτρέπουν την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών βάσει του μοριακού προφίλ κάθε ασθενούς. Η φαρμακογονιδιωματικής συνεισφέρει καθοριστικά στην κατανόηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας. Παραδείγματος χάριν, σε καρκίνο με HER-2 θετικό η αναγνώριση μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA οδηγεί σε θεραπεία με αναστολείς PI3K. Ασθενείς με πολυμορφισμούς στη γλυκοπρωτεΐνη 1 (Pgp) θα εμφανίσουν τοξικότητα στην πακλιταξέλη (paclitaxel), ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο ESR1

προβλέπουν αντίσταση στην ταμοξιφαίνη κατά την ορμονοθεραπείας για καρκίνο του μαστού. (Orsini et al., 2023)

Με τη συνεχή εξέλιξη της τεχνολογίας, η ραγδαία μείωση του κόστους αλληλούχησης γονιδιώματος, σε συνδυασμό με τη βελτίωση των υπολογιστικών τεχνικών, θα επιτρέψει τη γενικευμένη κλινική εφαρμογή της εξατομικευμένης ιατρικής. Οι υψηλής απόδοσης τεχνολογίες αλληλούχησης και οι προηγμένες αναλυτικές πλατφόρμες συμβάλλουν στη γρήγορη και ακριβή επεξεργασία γενετικών και πρωτεϊνικών δεδομένων. Σε αυτό θα συμβάλει σημαντικά η τεχνητή νοημοσύνη (AI) και η μηχανική μάθηση με ανάπτυξη αλγορίθμων και βιοπληροφορικών εργαλείων.

Τέλος, και η φαρμακογονιδιωματική συμβάλλει καθοριστικά στη βελτίωση της εξατομικευμένης θεραπείας, επιτρέποντας την ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν συγκεκριμένα γενετικά προφίλ. Με τις πληροφορίες που προκύπτουν από multi-omics αναλύσεις είναι δυνατή η πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών στις θεραπείες, μειώνοντας την πιθανότητα παρενεργειών και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. (Reel et al., 2021)

5.2.3 Τεχνητή νοημοσύνη (AI) και Μεγάλα δεδομένα (Big Data)

Η ετερογένεια των όγκων, καθώς και η διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών στις αντικαρκινικές θεραπείες καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για εξατομικευμένες προσεγγίσεις τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία. Η ανάπτυξη της τεχνητής νοημοσύνης (Artificial Intelligence - AI) και της μηχανικής μάθησης (Machine Learning - ML) έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο, επιτρέποντας την ανάλυση μεγάλων δεδομένων (Big Data), την πρόβλεψη της έκβασης της νόσου και την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Από την απεικόνιση και την ανάλυση βιοδεικτών μέχρι τη φαρμακογονιδιωματική και την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών, η AI συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση της πρόγνωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Η εφαρμογή της AI στην απεικονιστική ιατρική, όπως σε ακτινογραφίες, αξονικές τομογραφίες (CT) και μαγνητικές τομογραφίες (MRI), συμβάλλει στην έγκαιρη διάγνωση. Οι αλγόριθμοι βαθιάς μάθησης, όπως τα συνελκτικά νευρωνικά δίκτυα (Convolutional Neural Networks - CNNs), χρησιμοποιούνται στις απεικονιστικές εξετάσεις για την ανίχνευση όγκων, όπως σε ακτινογραφίες θώρακα για ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα και σε μαγνητικές τομογραφίες για όγκους στον εγκέφαλο. Επιπλέον, βοηθούν στην ταξινόμησή τους σε καλοήθεις ή κακοήθεις, παρέχοντας ακριβή και ταχύτατα αποτελέσματα.

Επιπλέον, τα υπολογιστικά διαγνωστικά μοντέλα (Computer-Aided Diagnosis - CAD) έχουν επιδείξει εξαιρετική ακρίβεια στην ανίχνευση του καρκίνου. Για παράδειγμα, ένα τέτοιο σύστημα πέτυχε ακρίβεια άνω του 95% στην έγκαιρη διάγνωση ασυμπτωματικού καρκίνου του μαστού. Παράλληλα, η τεχνική της μεταφοράς μάθησης (Transfer Learning), όπου προ-εκπαιδευμένα μοντέλα προσαρμόζονται σε νέες τεχνικές, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην ιατρική απεικόνιση ενισχύοντας τη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Με την ικανότητα της AI να αναλύει τεράστιο όγκο δεδομένων και να εντοπίζει πρότυπα που δεν είναι άμεσα ορατά, ανοίγονται νέοι δρόμοι για πιο ακριβείς και γρήγορες διαγνώσεις. (Alsharif, 2024)

Η AI βοηθά στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών μέσω της ανάλυσης γενετικών, πρωτεϊνικών και μεταβολικών δεδομένων. Η AI με τη βοήθεια της ML αναλύει μεγάλα σύνολα δεδομένων (Big Data) από γενετικά, πρωτεϊνικά και μεταβολικά δεδομένα εντοπίζοντας μοτίβα και σχέσεις που θα ήταν δύσκολο να αναγνωριστούν με συμβατικές μεθόδους. Ένα παράδειγμα αποτελεί η χρήση πολυ-ομικών δεδομένων (multi-omics) για την ανάλυση γονιδιακών μεταλλάξεων και πρωτεϊνικών εκφράσεων οδηγώντας στην ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων. (Liao et al., 2023)

Επίσης, η AI χρησιμοποιείται για τη δημιουργία προγνωστικών μοντέλων που εκτιμούν την πιθανότητα επιβίωσης, την εξέλιξη του όγκου και την ανταπόκριση στις θεραπείες. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα των ηλεκτρονικών ιατρικών φακέλων

(EHRs) και πραγματικά δεδομένα (real-world data), η AI μπορεί να βελτιώσει την πρόβλεψη της έκβασης, ενώ ταυτόχρονα ενσωματώνει την εξατομικευμένη θεραπεία για τη βελτίωση της ανταπόκρισης στις θεραπείες. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, AI μοντέλα έχουν επιτύχει ακρίβεια άνω του 95% στην πρόβλεψη της επιβίωσης ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο. Παρά την εντυπωσιακή ακρίβεια που έχουν πετύχει τα AI μοντέλα, απαιτείται προσοχή στην ποιότητα των δεδομένων και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η βέλτιστη απόκριση του ασθενή στην θεραπευτική προσέγγιση είναι ο κύριος στόχος των θεραπειών. Η AI μπορεί να συνδυάζει κλινικά και μοριακά δεδομένα, αναλύοντας το γενετικό προφίλ του ασθενή και να προτείνει τις βέλτιστες θεραπείες, μειώνοντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επίσης, μπορεί να αναγνωρίσει κρίσιμους μοριακούς βιοδείκτες για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία. Για παράδειγμα, έπειτα από ανάλυση δεδομένων από πρωτεϊνικοί βιοδείκτες με αλγορίθμους βαθιά μάθησης (deep learning – DL) ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες που υποδηλώνουν αντοχή στη χημειοθεραπεία. Επίσης, χρησιμοποιώντας την NGS και την AI μπορούν να εντοπιστούν εξατομικευμένες μεταλλάξεις που καθορίζουν τη χορήγηση στοχευμένων θεραπειών. (Liao et al., 2023; Alsharif, 2024)]

Η AI έχει επιφέρει ριζικές αλλαγές στην ανακάλυψη, ανάπτυξη και επανατοποθέτηση φαρμάκων, προσφέροντας νέες δυνατότητες για την ογκολογία. Χρησιμοποιεί την ML και την DL για να αναλύσει τεράστια σύνολα δεδομένων, προβλέποντας τη βιολογική δραστικότητα και την αποτελεσματικότητα φαρμάκων σε συγκεκριμένους στόχους καρκίνου.

Έχει τη δυνατότητα να αναλύει γονιδιωματικά και πρωτεϊνωματικά δεδομένα για την ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων, να προβλέπει τις χημικές ιδιότητες και τοξικότητα νέων μορίων πριν δοκιμαστούν σε εργαστήρια, καθώς και να επιταχύνει τη διαδικασία εικονικού προσυμπληρωματικού ελέγχου (virtual screening) για την επιλογή υποψήφιων φαρμάκων. Σε πρόσφατη έρευνα καταγράφηκε ότι η AI ανέλυσε περισσότερα από 2.766 εγκεκριμένα φάρμακα από τον FDA, εντοπίζοντας 27.371

πιθανές νέες αλληλεπιδράσεις. Επίσης, η επανατοποθέτηση φαρμάκων (drug repurposing) μέσω ΑΙ επιτρέπει την ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών χρήσεων για υπάρχοντα φάρμακα. Σε μία πρόσφατη μελέτη, η ΑΙ ανέλυσε περισσότερα από 2.700 εγκεκριμένα φάρμακα ανακαλύπτοντας νέες πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες για 63% αυτών.

Συνολικά, η συνδυαστική χρήση αλγορίθμων βαθιάς μάθησης, δεδομένων και προηγμένων τεχνολογιών ΑΙ συμβάλλει στην ακριβέστερη διάγνωση και στην εξατομικευμένη θεραπεία, αναδεικνύοντας τη σημαντικότητα της τεχνολογίας για την πρόβλεψη και την αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου. (Alsharif, 2024)

5.3 Νέες Θεραπείες

5.3.1 mRNA εμβόλια

Η ανάπτυξη των εμβολίων mRNA θεωρείται ιδιαίτερα ελπιδοφόρα, καθώς προσφέρουν χαμηλή τοξικότητα, ταχεία παραγωγή και δυνατότητα στόχευσης ποικίλων αντιγόνων. Αν και αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για την πρόληψη λοιμωδών νοσημάτων, η χρήση αυτής της τεχνολογίας δεν περιορίζεται μόνο εκεί, αλλά έχει ανοίξει νέες προοπτικές στην ανοσοθεραπεία κατά του καρκίνου.

Η πρόοδος στα εμβόλια κατά του καρκίνου ξεκίνησε το 1988, όταν οι επιστήμονες κατάφεραν να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση ενάντια στο μελάνωμα. Η ανακάλυψη των αντιγόνων των όγκων επέτρεψε την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών. Τα εμβόλια αυτά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- **Προληπτικά εμβόλια**, που προστατεύουν από ιούς ώστε να αποτρέψουν την εμφάνιση καρκίνου,
- **Θεραπευτικά εμβόλια**, που ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων.

Περίπου το 12% των ανθρώπινων καρκίνων αποδίδεται σε ογκογόνους ιούς. Τα τελευταία 30-40 χρόνια, έχει αποδειχθεί ότι οι χρόνιες λοιμώξεις από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αντίστοιχα. Το πρώτο εμβόλιο κατά του HBV, το οποίο θεωρείται και το πρώτο «αντικαρκινικό» εμβόλιο, κυκλοφόρησε το 1982, συμβάλλοντας σημαντικά στη μείωση της χρόνιας HBV λοίμωξης στα παιδιά.

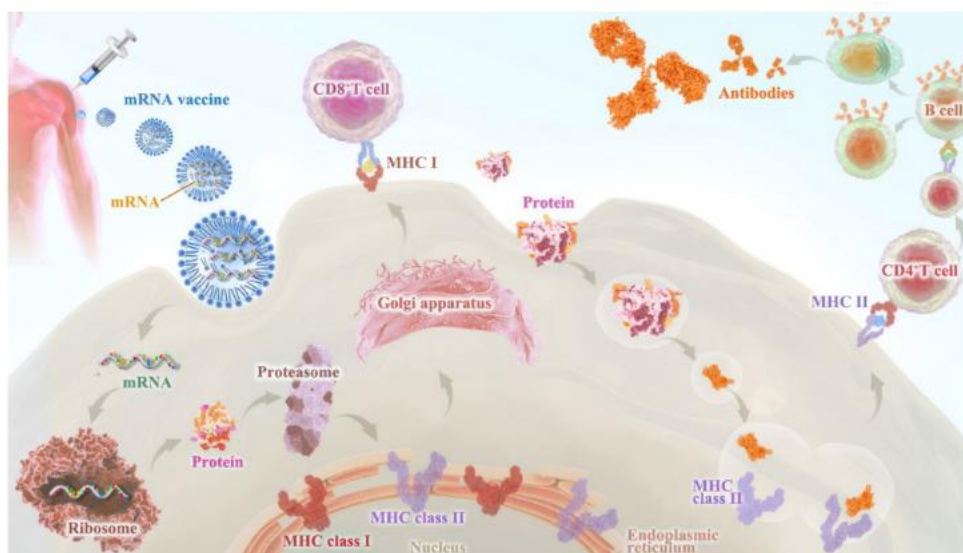
Ο HPV αποτελεί σοβαρό ζήτημα δημόσιας υγείας λόγω της σύνδεσής του με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Τη δεκαετία του 1980, ο Harald Zur Hausen απομόνωσε για πρώτη φορά στελέχη του HPV σε καρκινικούς όγκους του τραχήλου, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη των εμβολίων Gardasil (2006), Cervarix (2007) και Gardasil 9 (2014). Έως τον Ιούνιο του 2020, περισσότερες από 100 χώρες είχαν εντάξει το εμβόλιο HPV στα εθνικά τους προγράμματα εμβολιασμού (Li et al., 2023).

Σε αντίθεση με τα προληπτικά εμβόλια, τα θεραπευτικά εμβόλια έχουν στόχο να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Αυτά βασίζονται σε:

- **Αντιγόνα που σχετίζονται με όγκους (TAA)**, τα οποία όμως μπορεί να αναγνωριστούν ως φυσιολογικά από τον οργανισμό,
- **Ειδικά αντιγόνα όγκων (TSA)**, τα οποία προσφέρουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά απαιτούν περαιτέρω έρευνα για τη μείωση του κόστους και της πολυπλοκότητας των σχετικών εμβολίων.

Παρά τις συνεχιζόμενες προκλήσεις, πολλές στρατηγικές θεραπευτικού εμβολιασμού βρίσκονται σε προκλινικό στάδιο ή κλινικές δοκιμές. Τα εμβόλια mRNA διακρίνονται ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, καθώς αρκετά εξ αυτών έχουν ήδη αξιολογηθεί κλινικά, ενισχύοντας τις προοπτικές ευρείας εφαρμογής τους.

Η πανδημία COVID-19 επιτάχυνε την έρευνα για τα mRNA εμβόλια, αποδεικνύοντας την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους. Το mRNA είναι ένα ασταθές μόριο που μεταφέρει γενετικές πληροφορίες από το DNA στα ριβοσώματα, όπου συντίθενται πρωτεΐνες. Αυτή η ιδιότητά του επιτρέπει την παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών, όπως ένζυμα, αντισώματα και αντιγόνα, καθιστώντας τα εμβόλια mRNA ευέλικτα, εύκολα στην παραγωγή και πιο ασφαλή σε σύγκριση με άλλες γενετικές τεχνικές.



Εικόνα 14: Ανοσοαπόκριση που βασίζεται σε εμβόλια mRNA

Κλινικές μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη και μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα δείχνουν ότι τα εμβόλια mRNA διαθέτουν ευνοϊκό προφίλ ασφαλείας και μπορούν να προκαλέσουν ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις κατά των αντιγόνων των όγκων. Για παράδειγμα:

1. **CV9103 & CV9104:** Εμβόλια για τον καρκίνο του προστάτη που στοχεύουν πολλαπλά αντιγόνα (PSA, PSMA κ.τ.λ.). Οι δοκιμές έδειξαν ανοσολογικές αποκρίσεις και βελτιωμένη πρόγνωση για ασθενείς με πολλαπλές ανοσολογικές αντιδράσεις.

2. **CV9201 & CV9202:** Εμβόλια για μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που περιλαμβάνουν αντιγόνα όπως NY-ESO-1 και survivin. Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις.

Τα εμβόλια mRNA έχουν δοκιμαστεί σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες κατά του καρκίνου. Συγκεκριμένα:

- Σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (docetaxel, cisplatin) παρατηρήθηκε επιβράδυνση της ανάπτυξης των όγκων,
- Ο συνδυασμός με ακτινοθεραπεία οδήγησε σε πλήρη εξάλειψη όγκων σε προκλινικά μοντέλα,
- Η χρήση τους με αναστολείς σημείων ελέγχου (anti-CTLA-4, anti-PD1) ενίσχυσε την ανοσολογική απόκριση.

Μια νέα προσέγγιση βασίζεται στη χρήση νεοαντιγόνων που προκύπτουν από μοναδικές μεταλλάξεις κάθε ασθενούς. Με την τεχνολογία αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), είναι δυνατή η δημιουργία εξατομικευμένων εμβολίων, μια στρατηγική που έχει δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές για μελάνωμα και τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (Fiedler et al., 2016).

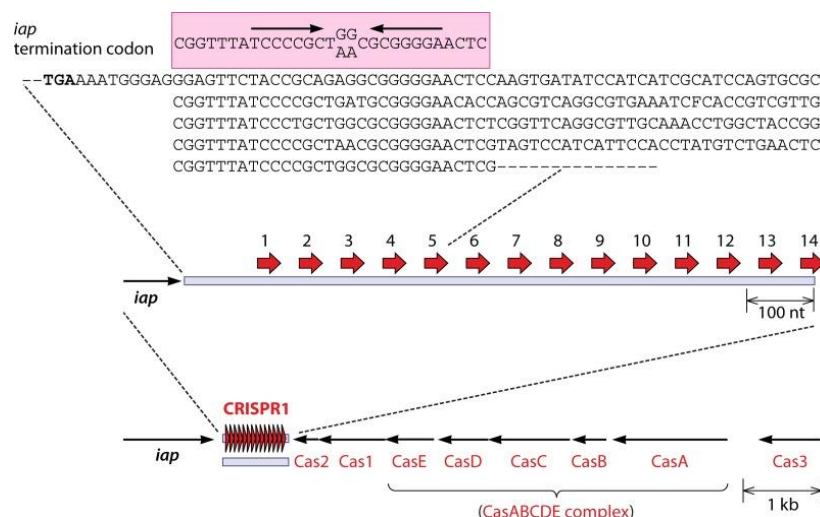
Τα mRNA εμβόλια αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία του καρκίνου στο μέλλον, ενισχύοντας τις προοπτικές για εξατομικευμένη ιατρική και στοχευμένες ανοσοθεραπείες.

5.3.2 CRISPR και γονιδιακή θεραπεία

Η ανακάλυψη ομαδοποιημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA άνοιξε το δρόμο για την ευρύτερη κατανόηση της λειτουργίας των οργανισμών, στην κατανόηση των εσωτερικών μηχανισμών και στην ανακάλυψη αποτελεσματικότερων θεραπειών.

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην βιολογία έχει το σύστημα CRISPR (ομαδοποιημένες κανονικά διασπαρμένες βραχείες παλινδρομικές επαναλήψεις, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR). Πρώτη φορά εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν το 1987 από τον Ιάπωνα επιστήμονα Yoshizumi Ishino, κατά τη διάρκεια ανάλυσης ενός γονιδίου υπεύθυνου για την μετατροπή της αλκαλικής φωσφατάσης στο βακτήριο *E.coli*. Παρόλο που έγιναν αρκετές μελέτες, μόλις στα μέσα του 2000 έγινε γνωστή η λειτουργία αυτού του συστήματος. Το σύστημα αποτελούσε μέρος ενός βακτηριακού αμυντικού μηχανισμού ενάντια σε βακτηριοφάγους κατατάσσοντας το CRISPR ως ανοσοποιητικό σύστημα.

Παρατηρήθηκε ότι υπήρχε ομοιότητα σε αλληλουχίες των περιοχών του CRISPR και σε αλληλουχίες βακτηριοφάγων και μετέπειτα γονιδιωματικές αναλύσεις έδειξαν ότι το CRISPR και οι πρωτεΐνες Cas (προϊόντα του γονιδίου Cas), λειτουργούν μαζί ως ένα σύστημα προσαρμοστικής ανοσίας προστατεύοντας τους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνη Cas9 είναι προγραμματισμένη να κόβει συγκεκριμένες αλληλουχίες κάνοντας το σύστημα ένα ισχυρό εργαλείο γονιδιακής επεξεργασίας. (Ishino et al., 2018)



Εικόνα 14: Το πρώτο CRISPR βρέθηκε στο *E. coli*. Ως αποτέλεσμα της ανάλυσης γονιδίου *iap* στο *E.coli*, βρέθηκε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία καθοδικά του

γονιδίου *iap*. Το σύμπλεγμα γονιδίων *Cas* αναγνωρίστηκε επίσης στην περιοχή αυτή. Το CRISPR/Cas9 είναι ένα προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια για την προστασία τους από ιούς. (Ishino et al., 2018)

Ο μηχανισμός του CRISPR λειτουργεί σε τρία στάδια:

- **Προσαρμογή (Adaptation):** Όταν ένας ιός μολύνει ένα βακτήριο, το γενετικό του υλικό ενσωματώνεται στην αλληλουχία του CRISPR του βακτηρίου. Τα τμήματα από το ξένο γενετικό υλικό ονομάζονται διαχωριστικά (spacers) και λειτουργούν ως "μνήμη" για μελλοντικές μολύνσεις.
- **Έκφραση (Expression):** Συστοιχίες του συστήματος CRISPR μεταγράφεται μαζί με τα διαχωριστικά και σχηματίζουν σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Cas9, δημιουργείται crRNA το οποίο σε μελλοντική μόλυνση θα αναγνωρίσει τα ξένα γενετικά στοιχεία.
- **Παρέμβαση (Interference):** Όταν ένας ιός επανεμφανιστεί, το σύμπλοκο crRNA-Cas9 αναγνωρίζει την αλληλουχία-στόχο και η Cas9 κόβει και απεικοδομεί το ιικό DNA, αδρανοποιώντας τον ιό. (Lino et al., 2018)

Για να μπορέσουν να στοχοποιήσουν και να ανοικοδομήσουν το ξένο νουκλεϊκό οξύ, τα crRNAs και οι πρωτεΐνες Cas συμπλοκοποιούνται και το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται καταρράκτης (cascade). Τα συστήματα CRISPR έχουν ταξινομηθεί σε έξι τύπους, οι οποίοι ομαδοποιούνται σε δύο βασικές κατηγορίες. Οι πιο μελετημένοι τύποι είναι οι I–III ενώ νεότεροι τύποι (IV–VI) έχουν εντοπιστεί και μελετώνται για τις ιδιαίτερες λειτουργίες τους.

Τύπος I: Χρησιμοποιεί πρωτεϊνικό καταρράκτη και την πρωτεΐνη Cas3 για την αναγνώριση και διάσπαση του DNA.

Τύπος II: Περιλαμβάνει μόνο μία πρωτεΐνη, την Cas9, η οποία σαρώνει, δεσμεύει και κόβει το DNA-στόχο.

Τύπος III: Χρησιμοποιεί την Cas10 σε ένα σύμπλεγμα παρόμοιο με τον πρωτεϊνικό καταρράκτη για την αναγνώριση και διάσπαση DNA ή RNA. [56]

Η ανακάλυψη και η εκτενής μελέτη του συστήματος CRISPR έχει ανοίξει πλέον νέα μονοπάτια στην βιοϊατρική. Πλέον, δίνεται η δυνατότητα στους επιστήμονες να επεμβαίνουν στο γονιδίωμα και να διορθώνουν λάθη, να ενεργοποιούν ή να απενεργοποιούν γονίδια με μεγάλη ευκολία.

Μια επαναστατική χρήση του συστήματος CRISPR είναι η χρήση του σε γονιδιακή θεραπεία για τη β-θαλασσαιμία (TDT) και η δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD.) Είναι δύο πολύ σοβαρές γενετικές παθήσεις του αίματος, όπου ο ασθενής πρέπει να κάνει συνεχής μεταγγίσεις. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 τροποποιήθηκε γενετικά ο BCL11A, ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για τη μειωμένη παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα. Με την παρέμβαση αυτή παρατηρήθηκε αύξηση της αιμοσφαιρίνης σε σημείο που οι ασθενείς ανεξαρτητοποιήθηκαν από τις μεταγγίσεις. (Frangoul et al., 2021)

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για την επεξεργασία γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, οι ερευνητές έχουν δημιουργήσει εξαιρετικά εξειδικευμένους μοριακούς ανιχνευτές για την ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών σε σωματικά υγρά, όπως αίμα, ούρα και σάλιο. Το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται εκτενώς για την ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων ιικών νουκλεϊκών οξέων, διάφορων κυκλοφορούντων καρκινικών DNA (ctDNA, π.χ. μετάλλαξη EGFR), των miRNA (π.χ. miR-17, miR-31), των πρωτεϊνών (π.χ. TGF-β1, CEA, PSA, AFP) και των εξωσωμάτων.

Άλλες αναλυτικές τεχνικές με τις οποίες συνδυάζεται το σύστημα CRISPR για την ανακάλυψη καρκινικών βιοδεικτών είναι η qPCR, η FISH και η νανοτεχνολογία. Επιπλέον, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 έχει επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως του παγκρεατικού, του προστάτη, του μαστού, των ωοθηκών, του ήπατος και του παχέος εντέρου. (Zhou et al., 2024)

Πραγματοποιούνται διάφορες κλινικές δοκιμές όπου το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται ως θεραπεία. Για παράδειγμα, τροποποίηση T-κυττάρων σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, με την αφαίρεση του γονιδίου PD-1, το οποίο δρα ως αναστολέας της ανοσολογικής απόκρισης, οδήγησε σε καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Παρομοίως κατά την θεραπεία του καρκίνου του αίματος, αφαιρέθηκαν γονίδια που σχετίζονται με την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης και αυτό βελτίωσε την απόκριση των T-κυττάρων απέναντι των καρκινικών κύτταρων. Το CRISPR/Cas9 χρησιμοποιήθηκε για τη στόχευση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και Pten, που οδηγούν σε ανάπτυξη ηπατικών όγκων ώστε να απενεργοποιηθούν αυτά τα γονίδια.

Με το CRISPR υπάρχει δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου και του θεραπευτικού αποτελέσματος. Με χρήση βιοαισθητήρων βασισμένους στο CRISPR/Cas13, υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης εξωσωμικών μορίων PD-1 επιτρέποντας την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας

Μεγάλο ενδιαφέρον υπάρχει και στη χρήση του CRISPR στην εξατομικευμένη θεραπεία. Τα οργανοειδή, τα οποία είναι τρισδιάστατες κυτταρικές δομές που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με CRISPR/Cas9 για την προσαρμογή θεραπειών σε κάθε ασθενή, δοκιμάζοντας την ανταπόκριση σε διαφορετικά φάρμακα πριν από την κλινική τους εφαρμογή. (Rabaan et al., 2023)

Το σύστημα CRISPR/Cas9 παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα όπως υψηλή απόδοση, χαμηλή πολυπλοκότητα εφαρμογής, ευκολία στη χρήση και εξοικονόμηση χρόνου. Ένα ακόμα βασικό χαρακτηριστικό του CRISPR/Cas9 είναι η εξαιρετική ειδικότητά του, η οποία του επιτρέπει να διακρίνει ακόμη και μια μονή νουκλεοτιδική διαφορά στο νουκλεϊκό οξύ-στόχο. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα ορισμένες προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν για τη βελτίωση του CRISPR. Στον τομέα της διάγνωσης, η χρήση φθορισμομετρικών και ηλεκτροχημικών αναλύσεων καθιστά την ανίχνευση

λιγότερο πρακτική. Επίσης, καθώς με CRISPR μπορούμε να επέμβουμε και να τροποποιήσουμε χρωμοσώματα, εγείρονται και θέματα ηθικής.

Η εξέλιξη του καρκίνου επηρεάζεται από πολλαπλούς βιοδείκτες, όπως διάφορα miRNA, ctDNA και πρωτεΐνες, γεγονός που καθιστά τη σχεδίαση υψηλής απόδοσης στρατηγικών ανίχνευσης βιοδεικτών με βάση το CRISPR ως μια πολλά υποσχόμενη και σημαντική προσέγγιση. Η τεχνολογία CRISPR αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο γονιδιακής επεξεργασίας, που προσφέρει μεγάλες προοπτικές και ευκαιρίες για την ανάπτυξη εξατομικευμένης διαχείρισης του καρκίνου. (Zhou et al., 2024)

5.4 Ηθικοί προβληματισμοί

Η πολυπλοκότητα και η αβεβαιότητα που χαρακτηρίζουν την έρευνα των βιοδεικτών και τη σωστή ερμηνεία και χρήση των αποτελεσμάτων, επηρεάζουν τους επιστημονικούς κανόνες ποιότητας, δημιουργώντας προκλήσεις για το ήθος της ερευνητικής κοινότητας. Υπάρχει ανάγκη για αυστηρά πρότυπα στην ανάπτυξη και επικύρωση των βιοδεικτών καθώς η έλλειψη αξιοπιστίας μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβείς διαγνώσεις ή θεραπείες.

Η ανάπτυξη και η εφαρμογή των βιοδεικτών στην κλινική πράξη πέρα από τις νέες δυνατότητες στη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών εγείρει και κάποιες σημαντικές ηθικές, νομικές και κοινωνικές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν.

Αρχικά, ένα από τα κύρια ζητήματα είναι η προσβασιμότητα όλων των ασθενών σε νέες γενετικές τεχνολογίες και βελτιωμένες θεραπείες. Η πρόοδος στην εξατομικευμένη ιατρική δεν πρέπει να είναι προνόμιο των λίγων, αλλά πρέπει να διασφαλίζεται η ισότιμη πρόσβαση με βάση την ιατρική ανάγκη και όχι τις οικονομικές δυνατότητες των ασθενών. Επίσης, η έρευνα και ανάπτυξη γενετικών θεραπειών θα πρέπει να ενθαρρύνεται, αλλά να διατηρείται η προσιτότητα στο κοινό.

Η ύπαρξη σαφούς κανονιστικού πλαισίου είναι εξαιρετικά σημαντική προϋπόθεση για την ασφαλή και ηθική χρήση γενετικών εξετάσεων και θεραπειών. Η θέσπιση συγκεκριμένων οδηγιών μπορεί να συμβάλει στην προστασία των δικαιωμάτων των ασθενών και στην αποφυγή κατάχρησης γενετικών δεδομένων.

Είναι επιτακτική ανάγκη ανάπτυξη πολιτικών αποζημίωσης και ασφαλιστικής κάλυψης ώστε να διασφαλιστεί ότι όλοι οι ασθενείς θα έχουν πρόσβαση στις παρεχόμενες υπηρεσίες, με τη λιγότερο οικονομική επιβάρυνση. Η ενσωμάτωση των γενετικών εξετάσεων στο σύστημα υγείας απαιτεί επενδύσεις σε υποδομές που θα επιτρέπουν την ομαλή ένταξή τους στην καθημερινή ιατρική πρακτική ως προβλεπτικούς παράγοντες αλλά και βελτιώνοντάς την έγκαιρη διάγνωση.

Ταυτόχρονα, πρέπει να δίνεται βάρος στην εκπαίδευση τόσο των ιατρών όσο και των ασθενών σχετικά με τις δυνατότητες, τους κινδύνους και τις επιπτώσεις της θεραπείας. Η εκπαίδευση βοηθάει στην αποφυγή λανθασμένη ερμηνεία μπορεί να οδηγήσει σε παρανοήσεις, στιγματισμό και αχρείαστο άγχος.

Ιδιαίτερη μέριμνα απαιτείται επίσης για τη διαχείριση περιπτώσεων όπου οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Η λήψη αποφάσεων σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει να καθορίζεται από σαφή ηθικά κριτήρια. Παράλληλα, είναι απαραίτητο να εξετάζονται οι συνέπειες της μη διενέργειας διαθέσιμων γενετικών εξετάσεων, καθώς η αποφυγή τους μπορεί να στερήσει από τους ασθενείς πολύτιμες πληροφορίες για την υγεία τους.

Ένα από τα πιο κρίσιμα ζητήματα που εγείρονται είναι η προστασία της ιδιωτικότητας και η διασφάλιση της εμπιστευτικότητας των γενετικών δεδομένων. Η ύπαρξη αυστηρών πολιτικών ασφαλείας δεδομένων (GTPR) είναι απαραίτητη για την αποτροπή μη εξουσιοδοτημένης πρόσβασης σε ευαίσθητες πληροφορίες. Ταυτόχρονα, η δίκαιη χρήση της γενετικής πληροφορίας από ασφαλιστικές εταιρείες, εργοδότες, δικαστήρια, σχολεία, και άλλες αρχές πρέπει να ρυθμίζεται νομοθετικά,

ώστε να αποτρέπεται κάθε μορφή διάκρισης που βασίζεται σε γενετικά χαρακτηριστικά.

Συνολικά, η εξέλιξη της γενετικής ιατρικής και η αξιοποίηση των βιοδεικτών πρέπει να συνοδεύεται από ένα ισχυρό ηθικό, νομικό και κοινωνικό πλαίσιο. Η διαμόρφωση πολιτικών που θα διασφαλίζουν τη δικαιοσύνη, την προστασία της ιδιωτικότητας και την ορθή χρήση της γενετικής πληροφορίας είναι ζωτικής σημασίας για την αξιοποίηση αυτών των τεχνολογιών προς όφελος της κοινωνίας. (S and R, 2024)

6. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Ο καρκίνος σε όλες του τις μορφές παραμένει μια από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες παγκοσμίως. Η μεγάλη του ετερογένεια έχει φέρει στο προσκήνιο την ανάγκη της εξατομικευμένης ιατρικής για να αντιμετωπιστεί με τις καλύτερες προϋποθέσεις επιβίωσης.

Η μελέτη των μοριακών βιοδεικτών έχει καταδείξει τη σημασία τους στην κλινική ογκολογία, προσφέροντας πολύτιμα δεδομένα για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της απόκρισης στις θεραπείες. Οι σύγχρονες τεχνολογίες έχουν επιτρέψει την ταυτοποίηση και την εφαρμογή των βιοδεικτών σε εξατομικευμένες προσεγγίσεις θεραπείας, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα των αντικαρκινικών θεραπειών.

Η μεγαλύτερή μελλοντική πρόκληση αφορά την ανίχνευση νέων βελτιωμένων βιοδεικτών, που λόγω όμως την εξαιρετικά χαμηλή τους συγκέντρωση είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν νέες εξαιρετικά ευαίσθητες τεχνολογίες ανίχνευσης. Επίσης, είναι αναγκαία και η χρήση ρυθμιστικού πλαισίου για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ηθικής χρήσης των γενετικών δεδομένων. Η σωστή ερμηνεία των βιοδεικτών, καθώς και η διασφάλιση ισότιμης πρόσβασης στις εξελιγμένες γενετικές τεχνολογίες, αποτελούν σημαντικά ζητήματα για το μέλλον της ιατρικής έρευνας και κλινικής εφαρμογής.

Συνολικά, η έρευνα στους μοριακούς βιοδείκτες συνεχίζει να εξελίσσεται, με στόχο τη βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών, ενώ παράλληλα αναδεικνύονται νέες προοπτικές για περαιτέρω μελέτες και ανακαλύψεις που θα ενισχύσουν την ακρίβεια και την αξιοπιστία των θεραπειών.

7. Βιβλιογραφικές αναφορές

Alsharif, F. (2024). Artificial intelligence in oncology: Applications, challenges and future frontiers. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 14(3), 647–656. <https://doi.org/10.5530/ijpi.14.3.76>

Al-Tashi, Q., Saad, M. B., Muneer, A., Qureshi, R., Mirjalili, S., Sheshadri, A., Le, X., Vokes, N. I., Zhang, J., & Wu, J. (2023). Machine learning models for the identification of prognostic and predictive cancer biomarkers: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7781. <https://doi.org/10.3390/ijms24097781>

Amatori, S., Persico, G., & Fanelli, M. (2017). Real-time quantitative PCR array to study drug-induced changes of gene expression in tumor cell lines. *Journal of Cancer Metastasis & Treatment*, 3, 90–99. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.22>

Andergassen, U., Kölbl, A. C., Mahner, S., & Jeschke, U. (2016). Real-time RT-PCR systems for CTC detection from blood samples of breast cancer and gynaecological tumour patients: A review. *Oncology Reports*, 35(4), 1905–1915. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4608>

Aronson, J. K., & Ferner, R. E. (2017). Biomarkers—A general review. *Current Protocols in Pharmacology*, 76, 9.23.1–9.23.17. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>

Arya, S. K., & Estrela, P. (2018). Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection. *Sensors*, 18(7), 2010. <https://doi.org/10.3390/s18072010>

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>

Bodaghi, A., Fattahi, N., & Ramazani, A. (2023). Biomarkers: Promising and valuable tools towards diagnosis, prognosis, and treatment of COVID-19 and other diseases. *Heliyon*, 9, e13323. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13323>

Boguszewska, K., Szewczuk, M., Urbaniak, S., et al. (2019). Review: Immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 4689–4704. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>

Caixeta, E. T., Ferrão, L. F. V., Maciel-Zambolim, E., & Zambolim, L. (2014). Molecular markers. In *Biotechnology and Plant Breeding* (pp. 19–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418672-9.00002-7>

Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 243(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>

Charpidou, A., Hardavella, G., Boutsikou, E., Panagiotou, E., Simsek, G. Ö., Verbeke, K., Xhemalaj, D., & Domagała-Kulawik, J. (2024). Unravelling the diagnostic pathology and molecular biomarkers in lung cancer. *Breathe* (Sheffield), 20(2), 230192. <https://doi.org/10.1183/20734735.0192-2023>

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>

Das, S., Dey, M. K., Devireddy, R., & Gartia, M. R. (2024). Biomarkers in cancer detection, diagnosis, and prognosis. *Sensors*, 24(1), 37. <https://doi.org/10.3390/s24010037>

Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4, 307–309.

Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M. (2018). Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>

Fiedler, K., Lazzaro, S., Lutz, J., Rauch, S., & Heidenreich, R. (2016). *mRNA cancer vaccines*. In W. Walther (Ed.), *Current strategies in cancer gene therapy* (Vol. 209, pp. 61-85). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42934-2_5

Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y. S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., Sharma, A., Sheth, S., Soni, S., Steinberg, M. H., Wall, D., Yen, A., Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 252–260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Guan, Y., Li, G., Wang, R., Yi, Y., Yang, L., Jiang, D., Zhang, X., & Peng, Y. (2012). Application of NGS in oncology and personalized treatment. *Chinese Journal of Cancer*, 31(10), 463–470. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10216>

Guo, H., Zhang, J., Qin, C., Yan, H., Liu, T., Hu, H., Tang, S., Tang, S., & Zhou, H. (2022). Biomarker-targeted therapies in non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Cells*, 11(20), 3200. <https://doi.org/10.3390/cells11203200>

Hristova, V. A., & Chan, D. W. (2019). Cancer biomarker discovery and translation: Proteomics and beyond. *Expert Review of Proteomics*, 16(2), 93–103. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1559062>

Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, 200(7), e00580-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>

Kamińska, K., Nalejska, E., Kubiak, M., et al. (2018). Prognostic and predictive epigenetic biomarkers in oncology. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 23, 83–95. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0371-7>

Kim, R. Y., Xu, H., Myllykangas, S., & Ji, H. (2011). Genetic-based biomarkers and next-generation sequencing: The future of personalized care in colorectal cancer. *Personalized Medicine*, 8(3), 331–345. <https://doi.org/10.2217/pme.11.16>

Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>

Li, J., Zhang, Z., Trau, M., & Wuethrich, A. (2024). Digital platforms enabling single-molecule analysis for cancer detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 171, 117502. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117502>

Li, Y., Wang, M., Peng, X., Yang, Y., Chen, Q., Liu, J., She, Q., Tan, J., Lou, C., Liao, Z., & Li, X. (2023). mRNA vaccine in cancer therapy: Current advance and future outlook. *Clinical and Translational Medicine*,

Liao, J., Li, X., Gan, Y., Han, S., Rong, P., Wang, W., Li, W., & Zhou, L. (2023). Artificial intelligence assists precision medicine in cancer treatment. *Frontiers in Oncology*, 12, 998222. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.998222>

Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>

McDermott, J. E., Wang, J., Mitchell, H., Webb-Robertson, B. J., Hafen, R., Ramey, J., & Rodland, K. D. (2013). Challenges in biomarker discovery: Combining expert insights with statistical analysis of complex omics data. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 7(1), 37–51. <https://doi.org/10.1517/17530059.2012.718329>

Orsini, A., Diquigiovanni, C., & Bonora, E. (2023). Omics technologies improving breast cancer research and diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12690. <https://doi.org/10.3390/ijms241612690>

Osborne, C., & Brooks, S. A. (2006). SDS-PAGE and Western blotting to detect proteins and glycoproteins of interest in breast cancer research. *Methods in Molecular Medicine*, 120, 217. <https://doi.org/10.1385/1-59259-969-9:217>

Passaro, A., Al Bakir, M., Hamilton, E. G., Diehn, M., André, F., Roy-Chowdhuri, S., Mountzios, G., Wistuba, II, Swanton, C., & Peters, S. (2024). Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. *Cell*, 187(7), 1617–1635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.041>

Purkayastha, K., Dhar, R., Pethusamy, K., Srivastava, T., Shankar, A., Rath, G. K., et al. (2023). The issues and challenges with cancer biomarkers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 19(Suppl 1), S20–S35.

Rabaan, A. A., AlSaihati, H., Bukhamsin, R., Bakhrebah, M. A., Nassar, M. S., Alsaleh, A. A., Alhashem, Y. N., Bukhamseen, A. Y., Al-Ruhimy, K., Alotaibi, M., Alsubki, R. A., Alahmed, H. E., Al-Abdulhadi, S., Alhashem, F. A., Alqatari, A. A., Alsayyah, A., Farahat, R. A., Abdulal, R. H., Al-Ahmed, A. H., Imran, M., & Mohapatra, R. K. (2023). Application of CRISPR/Cas9 technology in cancer treatment: A future direction. *Current Oncology*, 30(2), 1954–1976. <https://doi.org/10.3390/currncol30020152>

Reel, P. S., Reel, S., Pearson, E., Trucco, E., & Jefferson, E. (2021). Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review. *Biotechnology Advances*, 49, 107739. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107739>

S, D., & R, K. (2024). A review of the regulatory challenges of personalized medicine. *Cureus*, 16(8), e67891. <https://doi.org/10.7759/cureus.67891>

Sarhadi, V. K., & Armengol, G. (2022). Molecular biomarkers in cancer. *Biomolecules*, 12(8), 1021. <https://doi.org/10.3390/biom12081021>

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Wagadoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-generation sequencing technology: Current trends and advancements. *Biology*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>

Scoog, A., Holler, F., & Nieman, T. A. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (M. I. Karagiannis, K. H. Efstathiou, & N. Chaniotakis, Trans.). Kotsarakis Publishing.

Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): History, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, 75(3), 99–114. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>

Tsurusawa, N., Chang, J., Namba, M., Makioka, D., Yamura, S., Iha, K., Kyosei, Y., Watabe, S., Yoshimura, T., & Ito, E. (2021). Modified ELISA for ultrasensitive diagnosis. *Journal of Clinical Medicine*, 10, 5197. <https://doi.org/10.3390/jcm10215197>

Wait, R. (1993). Introduction to mass spectrometry. In *Methods in Molecular Biology*, 17, 191–213. <https://doi.org/10.1385/0-89603-215-9:191>

Wenk, D., Zuo, C., Kislinger, T., et al. (2024). Recent developments in mass-spectrometry-based targeted proteomics of clinical cancer biomarkers. *Clinical Proteomics*, 21, 6. <https://doi.org/10.1186/s12014-024-09452-1>

Wu, S., Singh, R., Zhang, Y., He, L., Fu, Y., Yi, Z., et al. (2024). Emerging role of nanosensors in early cancer detection. *AIMS Biophysics*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.3934/biophy.2024028>

Yao, S., Han, Y., Yang, M., Jin, K., & Lan, H. (2023). Integration of liquid biopsy and immunotherapy: Opening a new era in colorectal cancer treatment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1292861. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1292861>

Yun, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia. *Biomarker Research*, 8, 40. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00222-3>

Zaikin, V. G., & Borisov, R. S. (2021). Options of the main derivatization approaches for analytical ESI and MALDI mass spectrometry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1873100>

Zalis, M., Viana Veloso, G. G., Aguiar, P. N. Jr., Gimenes, N., Reis, M. X., Matsas, S., & Ferreira, C. G. (2024). Next-generation sequencing impact on cancer care: Applications, challenges, and future directions. *Frontiers in Genetics*, 15, 1420190. <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1420190>

Zhou, Y., Tao, L., Qiu, J., Xu, J., Yang, X., Zhang, Y., Tian, X., Guan, X., Cen, X., & Zhao, Y. (2024). Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01823-2>

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.