



«ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ»

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ
η εφαρμογή της στη διάγνωση και πρόγνωση ασθενειών

«ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΙΑΜΑΤΑΡΗΣ»

Επιβλέπων καθηγητής: **«ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ»**

Πάτρα, «Ιανουάριος» «2025»

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («Ιωάννη Διαματάρη») 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.



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

η εφαρμογή της στη διάγνωση και πρόγνωση ασθενειών

«ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΙΑΜΑΤΑΡΗΣ»

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

«ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ»

«ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΚΟΡΙΛΑΣ»

«Καθηγητής Βιοχημείας

«Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας

Πανεπιστήμιο Πατρών»

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών»

Πάτρα, «Ιανουάριος» «2025»

«Αφιερώνω αυτή τη διατριβή στην οικογένειά μου, στους φίλους μου, και σε όλους εκείνους που με στήριξαν σε όλη αυτή την πορεία. Η υπομονή τους ήταν παροιμιώδης. Αφιερώνω επίσης αυτό το έργο σε όλους τους ερευνητές και επαγγελματίες υγείας, των οποίων οι αδιάκοπες προσπάθειες εμπνέουν και προάγουν τις εξελίξεις στον τομέα της ιατρικής επιστήμης».

«Επιπλέον επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλο το διδακτικό προσωπικό τις αδιάκοπες προσπάθειές τους και τις θυσίες που καταβάλλουν ώστε να έχουμε εμείς την δυνατότητα να ωφεληθούμε από αυτό το πρόγραμμα σπουδών.»

Περίληψη

Η υγρή βιοψία είναι μια καινοτόμος, μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδος που έχει τραβήξει την προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω της δυνατότητάς της να ανιχνεύει και να παρακολουθεί διάφορες ασθένειες, ιδιαίτερα τον καρκίνο. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές βιοψίες ιστών, οι οποίες απαιτούν χειρουργικές διαδικασίες, η υγρή βιοψία χρησιμοποιεί αίμα, ούρα ή άλλα βιολογικά υγρά για την ανάλυση βιοδεικτών όπως το ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA), το RNA, τα εξωκυττάρια κυστίδια και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs). Αυτή η μέθοδος προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η ευκολία συλλογής δειγμάτων, η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο και η ικανότητα ανίχνευσης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, καθιστώντας την ιδανικό εργαλείο για πρόωπη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της θεραπείας.

Ο κύριος στόχος αυτής της διατριβής είναι να εξετάσει τις μεθόδους και τις εφαρμογές της υγρής βιοψίας στην ανίχνευση και διαχείριση ασθενειών. Παρέχει μια επισκόπηση των διαφόρων τύπων βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στη υγρή βιοψία. Η διατριβή εξετάζει επίσης τις τρέχουσες προκλήσεις και περιορισμούς που σχετίζονται με τη υγρή βιοψία, όπως η κλινική ευαισθησία και ειδικότητα και της τυποποίησης των τεχνικών ανίχνευσης. Εκτός από τον καρκίνο, η παρούσα εργασία εξετάζει επίσης τις εφαρμογές της υγρής βιοψίας και σε άλλες ασθένειες, όπως οι νευρολογικές και καρδιαγγειακές παθήσεις, όπου η μέθοδος αυτή προσφέρει δυνατότητες για πρόωπη διάγνωση και συνεχή παρακολούθηση.

Συνολικά, η διατριβή αυτή αποσκοπεί στην ανάδειξη της αυξανόμενης σημασίας της υγρής βιοψίας ως εργαλείου στην ιατρική ακριβείας και στη δυνατότητά της να αλλάξει τις διαγνωστικές και θεραπευτικές στρατηγικές σε διάφορα κλινικά πεδία.

Λέξεις – Κλειδιά

Υγρή Βιοψία, Βιοδείκτες, Fragmentomics, Ελεύθερα κυκλοφορούν DNA, Κκυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα.

Abstract

Liquid biopsy is an innovative, non-invasive diagnostic approach that has gained significant attention in recent years for its potential to detect and monitor various diseases, particularly cancer. Unlike traditional tissue biopsies, which require surgical procedures, liquid biopsy uses blood, urine, or other bodily fluids to analyze biomarkers such as cell free DNA (cfDNA), circulating tumor DNA (ctDNA), RNA, exosomes, and circulating tumor cells (CTCs). This method offers several advantages, including ease of sample collection, real-time monitoring, and the ability to detect minimal residual disease, making it an ideal tool for early diagnosis, prognosis, and treatment monitoring.

The primary focus of this thesis is to explore the methods and applications of liquid biopsy in disease detection and management. It provides a comprehensive overview of the different types of biomarkers used in liquid biopsy, with a particular emphasis on cfDNA and CTCs. The thesis also examines the current challenges and limitations associated with liquid biopsy, including issues related to sensitivity, specificity, and standardization of techniques. In addition to cancer, this work also explores the emerging applications of liquid biopsy in other diseases, such as neurological disorders and cardiovascular diseases, where it holds promise for early detection and continuous monitoring.

Overall, this thesis aims to highlight the growing importance of liquid biopsy as a tool for precision medicine and its potential to revolutionize diagnostic and therapeutic strategies in various clinical settings.

Keywords

Liquid Biopsy, Biomarkers, Fragmentomics, cell free DNA, cfDNA, Circulating Tumor Cells, CTC.

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	9
Κατάλογος Πινάκων	10
1 Εισαγωγικές Έννοιες της Υγρής Βιοψίας και Συγκριτική Ανάλυση με την Βιοψία ιστού.	11
1.1 Βιομόρια και Σωματίδια που Αναλύονται στην Υγρή Βιοψία.....	16
1.1.1 Ελεύθερα κυκλοφορούν DNA / καρκινικό DNA (cfDNA / ctDNA)	16
1.1.2 Ελεύθερα κυκλοφορούν εμβρυϊκό DNA - cffDNA cell free fetus DNA	25
1.1.3 Ελεύθερα κυκλοφορούν RNA - Cell free RNAs (cfRNA) / extracellular RNAs (exRNAs).....	27
1.1.4 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating tumor cells - CTC)..	30
1.1.5 Καρκινικά βλαστοκύτταρα (Cancer stem like cells - CSC)	36
1.1.6 Αιμοπετάλια τροποποιημένα από όγκο (Tumor educated platelets TEDs)	37
1.1.7 Εξωκυττάρια Κυστίδια (Extra cellular Vescicles - EVs).....	41
2 Fragmentomics.....	43
2.1 Ο ρόλος της κατανομής του μήκους των θραυσμάτων του cfDNA	44
2.2 Το σημείο θραύσης και ο τρόπος θραύσης του cfDNA μπορεί να αποκρυπτογραφηθεί.....	47
2.2.1 Τα σημεία θραύσης (preferred ends) εμφανίζουν μοτίβα τετραμερών βάσεων	47
2.2.2 Οι συντεταγμένες θραύσης του DNA διαφέρουν ανάλογα με τον ιστό προέλευσης.	47
2.2.3 Τρόπος θραύσης (τυφλά ή προεξέχοντα άκρα)	48
2.2.4 Επιγενετική και Fragmentomics	49
3 Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις για την Ανακάλυψη Βιοδεικτών στην Υγρή Βιοψία	51

3.1	Αναζητώντας κατάλληλους Βιοδείκτες και τρόποι ταυτοποίησης τους.	53
3.2	Η Επικύρωση των Βιοδεικτών είναι απαραίτητη για την χρήση τους στην κλινική πράξη.....	57
3.3	Η συνεισφορά της τεχνολογίας και οι νέες τεχνικές που εφαρμόζονται από την ανακάλυψη ως την εφαρμογή των Βιοδεικτών.	64
3.3.1	Πρωτεομική	64
3.3.2	Προσεγγίσεις εμπλουτισμού δειγμάτων για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων - CTC	73
3.3.3	Τεχνικές ανάλυσης και εμπλουτισμού cfDNA / ctDNA / cffDNA.	82
4	Η Υγρή Βιοψία στην κλινική πράξη.....	96
4.1	Προγεννητικός Έλεγχος.....	96
4.1.1	ανίχνευση ανευπλοειδιών	96
4.1.2	Μη επεμβατική γονοτύπιση του εμβρυικού Ρέζους D	97
4.2	Καρκίνος	99
4.2.1	Καρκίνος του πνεύμονα.....	99
4.2.2	Καρκίνος του Μαστού	103
5	Συστήματα ανίχνευσης	106
5.1	CellSearch system(Coumans & Terstappen, 2015).....	106
5.2	Guardant360 system(Guardant360 CDx Technical Information, 2024).....	108
5.3	fecal occult blood rapid test (FOBT)(Kaur et al., 2024).....	109
6	Επίλογος.....	111
	Βιβλιογραφία	112

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1-1 Σημεία λήψης υγρής βιοψίας και είδος υγρού που συλλέγεται	12
Εικόνα 1-2 Προέλευση του cfDNA.	16
Εικόνα 1-3 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της απόπτωσης.	17
Εικόνα 1-4 Σχηματική απεικόνιση τη πυρόπτωσης.....	18
Εικόνα 1-5 Σχηματική απεικόνιση της νεκρόπτωσης.....	19
Εικόνα 1-6 απεικόνιση της πορείας της νέκρωσης και της απόπτωσης.	21
Εικόνα 1-7 Κυτταρικά γεγονότα που καθοδηγούν τη διαδικασία της NETosis.....	22
Εικόνα 1-8 Η Προέλευση του cfRNA	27
Εικόνα 1-9 Η διαδικασία της μετάστασης του καρκίνου	32
Εικόνα 1-10 Τα στάδια με τα ουδετερόφιλα κατά τη μετάσταση του καρκίνου.....	33
Εικόνα 1-11 Μηχανισμοί που διέπουν τη δημιουργία των TEPs	38
Εικόνα 1-12 Ορόσημα ανακαλύψεων καρκίνου-αιμοπεταλίων	39
Εικόνα 1-13 εξωκυττάρια κυστίδια στο ανθρώπινο πλάσμα.....	42
Εικόνα 2-1 Δομικά χαρακτηριστικά των cfDNA	43
Εικόνα 2-2 μήκος cfDNA και δραστηριότητα Νουκλεασών	44
Εικόνα 2-3 Χαρακτηριστικό Μήκος θραυσμάτων cfDNA.....	48
Εικόνα 3-1 Κατηγορίες Βιοδεικτών.....	51
Εικόνα 3-2 Πορεία ανάπτυξης Βιοδεικτών.....	54
Εικόνα 3-3 Διαγράμματα ροής μελετών ανακάλυψης και επικύρωσης Βιοδεικτών...59	
Εικόνα 3-4 Επισκόπηση πρωτεωμικών τεχνολογιών	64
Εικόνα 3-5 Διαδοχική ή τριγωνική στρατηγική.....	66
Εικόνα 3-6 Ορθογώνια στρατηγική	67
Εικόνα 3-7 Μέθοδοι εμπλουτισμού CTCs.....	75
Εικόνα 3-8 Αρχή λειτουργίας του συστήματος Intplex™:.....	85
Εικόνα 3-9 Σύγκριση μεταξύ κλασσικής PCR και ddPCR.....	87
Εικόνα 4-1 Εφαρμογές Υγρής Βιοψίας	100
Εικόνα 5-1 Η σχέση μεταξύ CTC και επιβίωσης σε διάφορους καρκίνους	107

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1-1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας.	14
Πίνακας 1-2 Σύγκριση μεταξύ υγρής βιοψίας και κλασικής βιοψίας ιστού.	15
Πίνακας 1-3 Διαφορές μεταξύ cfDNA και ct DNA.....	25
Πίνακας 2-1 https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103455	46
Πίνακας 3-1 Σύνοψη των μεθόδων χαρακτηρισμού των CTC.....	82
Πίνακας 3-2 σύνοψη μεθόδων για τον χαρακτηρισμό cfDNA/ctDNA/cffDNA.....	92
Πίνακας 3-3 μέθοδοι απομόνωσης και συλλογής εξωκυτταρικών κυστιδίων.....	93
Πίνακας 3-4 μέθοδοι χαρακτηρισμού εξωκυτταρικών κυστιδίων.....	95
Πίνακας 5-1 Guardant360® CDx	108

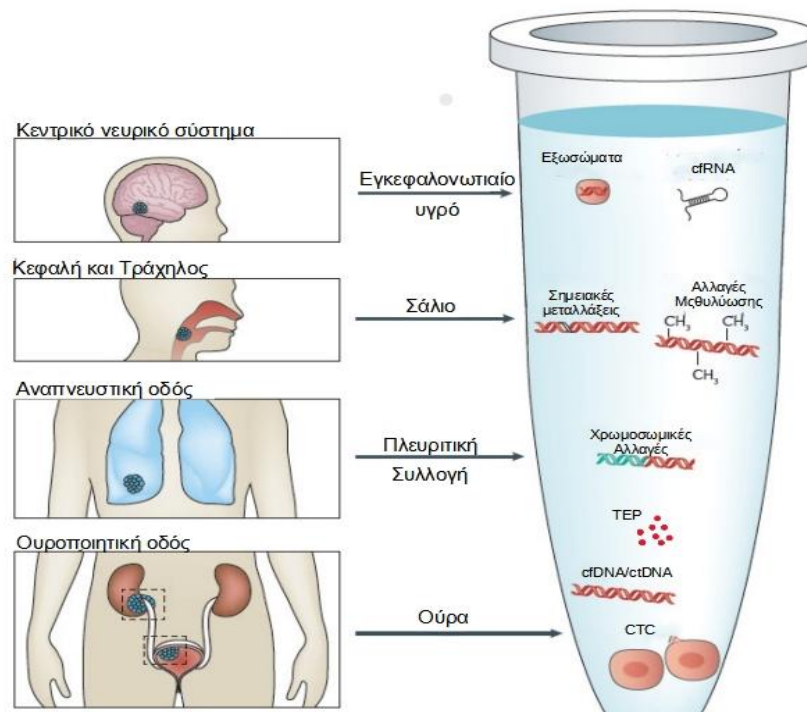
1 Εισαγωγικές Έννοιες της Υγρής Βιοψίας και Συγκριτική Ανάλυση με την Βιοψία ιστού.

Η διάγνωση πολλών ασθενειών, όπως οι νεοπλασματικές παθήσεις, μόλυνση από κάποιο παθογόνο αλλά και άλλες, απαιτεί συχνά την διενέργεια βιοψίας. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους ανάλογα με το είδος του ιστού και τη θέση του οργάνου που έχει προσβληθεί. Κύριες μέθοδοι βιοψίας περιλαμβάνουν (*Biopsy - NHS, n.d.; Britto & Shetty J, 2020*):

- **Την χειρουργική βιοψία**, περιλαμβάνει πλήρη αναισθησία και αφαίρεση τμήματος ή ολόκληρης της βλάβης
- **Την βιοψία με λεπτή βελόνα**, πραγματοποιείται με χρήση πολύ λεπτής βελόνας για λήψη υγρού ή μικρής ποσότητας κυττάρων
- **Την βιοψία με κόπτουσα βελόνα**, καθοδηγείται στην τοποθεσία λήψης της βιοψίας με απεικονιστικές μεθόδους όπως υπέρηχο ή ακτινογραφία, και με βελόνα μεγαλύτερης διαμέτρου λαμβάνεται τμήμα ιστού.
- **Την στερεοτακτική βιοψία**, σε πάσχουσες περιοχές όπου ο υπέρηχος δεν έχει μπορεί να τις απεικονίσει, τότε με βελόνα κενού και καθοδήγηση ακριβείας με μαστογράφο ή και αξονικό τομογράφο λαμβάνεται τμήμα ιστού.

Εκτός από τις παραπάνω τεχνικές υπάρχουν διάφορες άλλες τεχνικές που εφαρμόζονται αναλόγως την πάσχουσα περιοχή. Πολλές φορές η βιοψία απαιτεί την πρόσβαση στον υπό διερεύνηση ιστό ενδοσκοπικά όπως π.χ. στο στομάχι ή στο έντερο ή σε άλλες περιπτώσεις που δεν υπάρχει εναλλακτικός τρόπος, την χειρουργική επέμβαση. Σε σοβαρές και χρόνιες παθήσεις όταν πραγματοποιείται μια βιοψία χειρουργικά, είναι δύσκολο και πολλές φορές αδύνατο να γίνει και δεύτερη βιοψία οπότε η πληροφορίες που αποκτήθηκαν για την ασθένεια είναι αυτές που αποκτήθηκαν κατά τον χρόνο λήψης της βιοψίας. Όμως κυρίως στον καρκίνο, ήδη κατά την βιοψία τις περισσότερες φορές ο όγκος ήδη έχει μια ετερογένεια δηλαδή πολλαπλές μεταλλάξεις να έχουν αναπτυχθεί σε διαφορετικά σημεία του όγκου με αποτέλεσμα να λαμβάνεται πληροφορία μόνο από τα σημεία που λήφθηκαν δείγματα (Ignatiadis et al., 2021). Περαιτέρω η βιολογία των καρκινικών κυττάρων συνέχεια μεταλλάσσεται με αποτέλεσμα οι αρχικές πληροφορίες να μην είναι

επαρκείς για την επιλογή ή την προσαρμογή της θεραπείας σε νέα δεδομένα (Batool et al., 2023). Παρόλα αυτά η βιοψία σήμερα είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ταυτοποίηση της ασθένειας και την θεραπευτική επιλογή των ασθενών στους οποίους διενεργείται. Από την άλλη η υγρή βιοψία σκοπό έχει να εισάγει μια εναλλακτική στην κλασσική βιοψία. Να μπορούν να διενεργούνται μοριακές διαγνωστικές



Εικόνα 1-1 Σημεία λήψης υγρής βιοψίας και είδος υγρού που συλλέγεται

Σημεία λήψης υγρής βιοψίας και είδος υγρού που συλλέγεται εκτός από το αίμα που είναι και φορέας των περισσότερων βιομορίων και σωματιδίων που στοχεύονται στην υγρή βιοψία. Επίσης απεικονίζονται και κάποιοι από τους πιθανούς στόχους της.

<https://doi.org/10.3390/cancers13184619>

εξετάσεις μέσω λήψης σωματικών υγρών, όπως αίμα, ούρα, πτύελα, αμνιακό υγρό, ωτιαίο υγρό, κ.α. Με την αλματώδη πρόοδο της τεχνολογίας αναπτύχθηκαν πολλές νέες τεχνολογίες προς την κατεύθυνση αυτή και η εφαρμογή της υγρής βιοψίας σε διάφορους τομείς φέρνει απτά αποτελέσματα (Ignatiadis et al., 2021; Nikanjam et al., 2022; Poulet et al., 2019).

Είναι ήδη γνωστό εδώ και πολλές δεκαετίες ότι κυρίως στο αίμα κυκλοφορούν διάφορα κύτταρα, τα οποία αυτά προέρχονται ως μέρος της φυσιολογικής ανανέωσης των κυττάρων σε υγιή ιστό. Επίσης όμως μπορεί να προέρχονται και από μη υγιή κύτταρα που είτε νεκρώνονται είτε καταστρέφονται με τους μηχανισμούς της

απόπτωσης(Pantel & Alix-Panabières, 2010). Το αυξανόμενο ενδιαφέρον στα κύτταρα αυτά εστιάστηκε αρχικά σε αυτά που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα και ο ρόλος τους στην μετάσταση του όγκου, τα οποία είναι γνωστά ως CTC (Cancer Tumor Cells) όπου και κατά την μελέτη τους ο όρος υγρή βιοψία επινοήθηκε από τους Catherine Alix-Panabières and Klaus Pantel. Ο όρος αυτός αρχικά περιέγραφε την ανάλυση των CTC αλλά στη συνέχεια άρχισαν να περιλαμβάνουν και θραύσματα από καρκινικό DNA που κυκλοφορεί στο αίμα γνωστό ως ctDNA (circulating tumor DNA). Με την πάροδο του χρόνου εντάθηκαν και άλλοι πιθανοί στόχοι ως βιοδείκτες, όπως cell-free RNA, extracellular vesicles (EVs), πρωτεΐνες, tumor-educated platelets (TEPs), κ.α(Alix-Panabières & Pantel, 2013; *Biopsy - NHS*, n.d.; Pantel & Alix-Panabières, 2010).

Αναπτύχθηκαν αρκετές τεχνολογίες για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των παραπάνω βιοδεικτών που βρίσκονται στο στάδιο των δοκιμών και της αξιολόγησης τους ως πιθανοί στόχοι. Αν και οι βιοδείκτες αυτοί βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, όπου σε ένα δείγμα μια δεκάδα περίπου από τον κάθε ένα βιοδείκτη θα βρίσκεται ανάμεσα σε 106 λευκά αιμοσφαίρια και 109 ερυθρά αιμοσφαίρια. Με τις κατάλληλες όμως τεχνικές εμπλουτισμού του δείγματος, οι προοπτικές ανάπτυξης της υγρής βιοψίας είναι πολλά υποσχόμενη(Morgan, 2019). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η υγρή βιοψία με την βελτίωση που παρατηρείται στις εφαρμοζόμενες τεχνικές, αναδεικνύεται ως εργαλείο διάγνωσης και παρακολούθησης ασθενειών, υπογραμμίζοντας όμως την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα και βελτίωση. Στον Πίνακα 1-1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας. αποτυπώνονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας.

Παρότι το αίμα είναι κυρίαρχο μέσο για την ανίχνευση βιοδεικτών, πολλά άλλα σωματικά υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μερικά με λιγότερο επεμβατικές μεθόδους, όπως το σάλιο για καρκίνους της στοματοφαρυγγικής κοιλότητας, του λαιμού κλπ. τα ούρα για βλάβες του ουροποιητικού όπως πχ της ουροδόχου κύστης, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού για ανίχνευση όγκων του εγκεφάλου ή ασθένειες όπως τις διάφορες άνοιες, κλπ, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 1-1. Οι τεχνολογίες που έχουν επιστρατευθεί για την ανάλυση και ταυτοποίηση των δειγμάτων είναι αρκετές,

με κυρίαρχες την ddPCR (digital droplet PCR), qPCR (qualitative PCR), NGS (Next generation sequencing), τεχνολογίες CHIP, συσκευές μικρορευστομηχανικής, flow cytometry, και αρκετές ακόμη (Alix-Panabières & Pantel, 2021; Batool et al., 2023; Nikanjam et al., 2022). Επίσης αναπτύσσονται και κάποια kit, όπως το CellSearch (Andree et al., 2016) που είναι από τα λίγα μέχρι στιγμής που εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Υγείας FDA, ή το CancerSeek (Bittla et al., 2023) και άλλα που είναι στο στάδιο των μελετών.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Υγρής Βιοψίας

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Είναι μη επεμβατική μέθοδος Η υγρή βιοψία διενεργείται με δείγμα αίματος ή άλλων σωματικών υγρών, μειώνοντας την ανάγκη για επώδυνες και επικίνδυνες επεμβάσεις.	Έχει περιορισμένη ευαισθησία Τα επίπεδα κυκλοφορούντος DNA cfDNA, ctDNA ή CTCs, EVs κ.α. μπορεί να είναι πολύ χαμηλά, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευσή τους σε πρώιμα στάδια.
Παρέχει δυνατότητα συχνής παρακολούθησης Μέσω επαναλαμβανόμενων δειγματοληψιών παρέχεται η δυνατότητα συνεχούς παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου ή της απόκρισης στη θεραπεία.	Υπάρχει έλλειψη τυποποίησης Δεν υπάρχουν εναρμονισμένες μέθοδοι ανάλυσης, κάτι που οδηγεί σε διακυμάνσεις στην ακρίβεια και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.
Πρώιμη ανίχνευση αλλαγών Εντοπίζονται γενετικές μεταλλάξεις και αλλαγές που σχετίζονται με μια ασθένεια πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων.	Ασάφεια ερμηνείας Η ανίχνευση γενετικών αλλαγών δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ο ασθενής έχει ή θα αναπτύξει μια ασθένεια, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει ανησυχία.
Εξατομικευμένη ιατρική Παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον γενετικό προφίλ μιας ασθένειας, επιτρέποντας την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών.	Κόστος και διαθεσιμότητα Ορισμένες τεχνολογίες υγρής βιοψίας παραμένουν δαπανηρές και όχι ευρέως διαθέσιμες.
Εντοπισμός ετερογένειας όγκου Καταγράφεται πληρέστερα η γενετική ποικιλομορφία ενός όγκου, σε αντίθεση με την παραδοσιακή βιοψία που αναλύεται ένα συγκεκριμένο τμήμα του.	Έλλειψη ιστολογικών πληροφοριών Δεν παρέχει δεδομένα για τη μορφολογία και το μικροπεριβάλλον του όγκου, κάτι που μπορεί να είναι κρίσιμο για τη διάγνωση.
Ευκολία και ταχύτητα Είναι πιο άμεση διαδικασία από την παραδοσιακή βιοψία, με γρήγορη λήψη και επεξεργασία δειγμάτων.	

Πίνακας 1-1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας.

Τέλος, παρότι και οι δύο μέθοδοι προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες, διαφέρουν σημαντικά ως προς τη διαδικασία, τις δυνατότητες και τους περιορισμούς τους όπως συγκρίνονται παρακάτω στον Πίνακα 1-2:

Σύγκριση μεταξύ Υγρής Βιοψίας και Βιοψίας Ιστού

Υγρή Βιοψία	Βιοψία Ιστού
Διενεργείται με δείγμα αίματος ή άλλου σωματικού υγρού, όπως ούρα ή πτύελα. Η διαδικασία είναι από ελάχιστα ως μη επεμβατική, ανώδυνη και γρήγορη.	Συλλέγεται τμήμα ιστού από την πάσχουσα περιοχή μέσω χειρουργικής επέμβασης ή βιοψίας βελόνας. Είναι επεμβατική και συχνά συνοδεύεται από πόνο, ανάρρωση και κινδύνους επιπλοκών.
Εστιάζει σε γενετικά και μοριακά στοιχεία. Παρέχει πληροφορίες για τη μεταβολή της ασθένειας σε πραγματικό χρόνο.	Επιτρέπει μικροσκοπική και μακροσκοπική ανάλυση του ιστού, προσφέροντας δεδομένα για τη μορφολογία, το στάδιο, και το μικροπεριβάλλον του όγκου.
Μπορεί να πραγματοποιείται επαναλαμβανόμενα για τη συνεχή παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου ή της απόκρισης στη θεραπεία.	Συνήθως γίνεται μία ή λίγες φορές, λόγω της επεμβατικότητας και της δυσκολίας πρόσβασης στην πάσχουσα περιοχή.
Ανιχνεύει τη γενετική ετερογένεια ενός όγκου, συμπεριλαμβανομένων μεταστάσεων ή ανθεκτικών κλώνων που μπορεί να μην εντοπίζονται σε έναν μόνο ιστό.	Εστιάζει μόνο στην περιοχή που λαμβάνεται το δείγμα, κάτι που ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζει τη συνολική ετερογένεια του όγκου και τυχόν μεταστάσεις.
Έχει χαμηλότερη ευαισθησία σε περιπτώσεις με χαμηλά επίπεδα αναλύτων, ενώ δεν παρέχει ιστολογικές πληροφορίες.	Είναι πιο ακριβής σε ιστολογικές αναλύσεις αλλά δεν επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης μιας ασθένειας με την πάροδο του χρόνου.

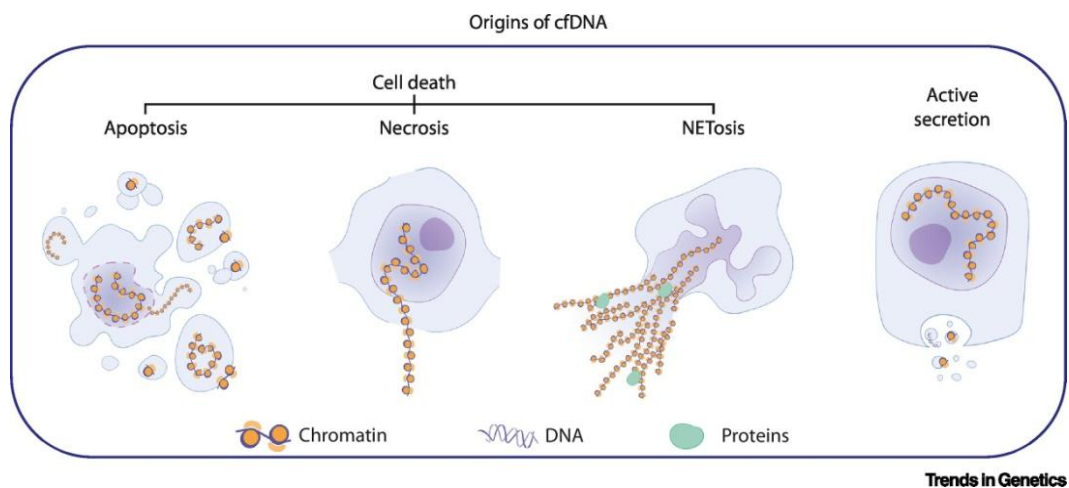
Πίνακας 1-2 Σύγκριση μεταξύ υγρής βιοψίας και κλασικής βιοψίας ιστού.

1.1 Βιομόρια και Σωματίδια που Αναλύονται στην Υγρή Βιοψία

1.1.1 Ελεύθερα κυκλοφορούν DNA / καρκινικό DNA (cfDNA / ctDNA)

Το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cell free DNA - cfDNA) ανιχνεύεται στο πλάσμα και στον ορό του αίματος και αποτελείται από θραύσματα DNA επεξεργασμένο από νουκλεάσες με μέγεθος περίπου 160 νουκλεοτιδίων. Σε υγιή άτομα η προέλευση του προέρχεται κυρίως από τα αιμοποιητικά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό από άλλες πηγές και σε συγκεντρώσεις 1-50 ng/ml αλλά μπορεί να αυξηθεί σε πάνω από 1000 ng/ml σε ασθενείς με καρκίνο (Han & Lo, 2021a; Kustanovich et al., 2019). Πέρα από το κατακερματισμένο DNA ενός υγιούς ατόμου μπορούν να ταυτοποιηθούν και θραύσματα DNA από καρκινικά κύτταρα, εμβρυικά κύτταρα σε έγκυες, DNA δότη σε μεταμοσχευμένα άτομα αλλά ακόμα και βακτηριακό ή ιικό DNA. Ο χρόνος ημιζωής του cfDNA στην κυκλοφορία κυμαίνεται από 5-150 λεπτά αφού υπάρχουν μηχανισμοί που το απομακρύνουν από την κυκλοφορία του αίματος.

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που μέσω αυτών θα μπορούσε να καταλήγει το DNA στο αίμα οι οποίοι υπάγονται σε δύο γενικές κατηγορίες, σε κυτταρικό θάνατο και σε ενεργή κυτταρική έκκριση (Εικόνα 1-2)

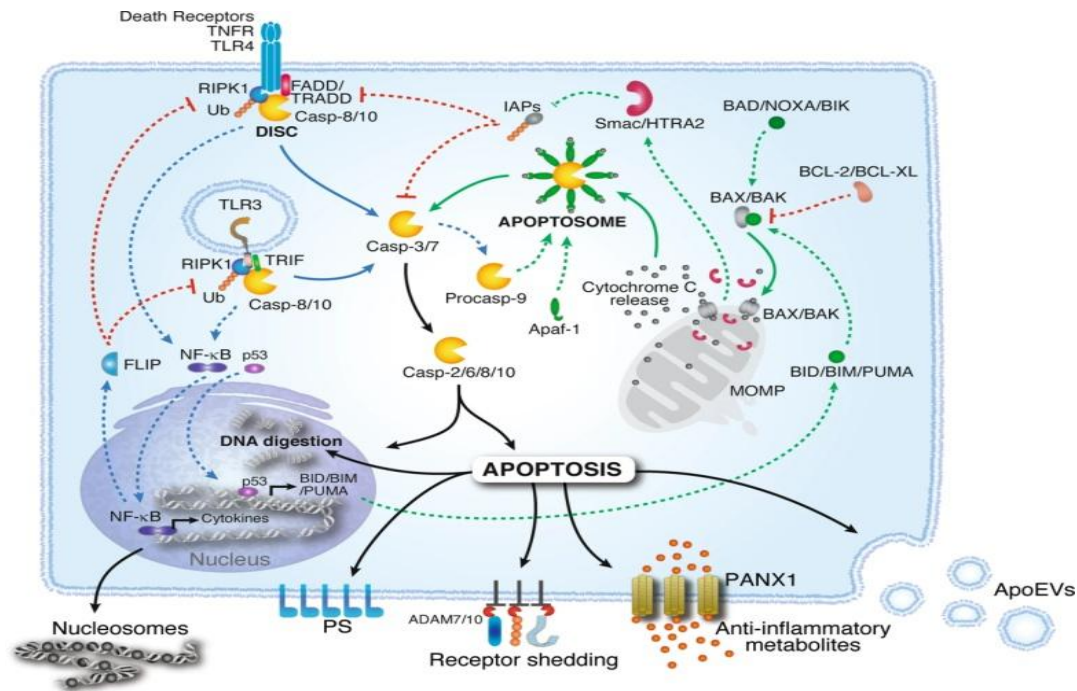


Εικόνα 1-2 Προέλευση του cfDNA.

Το ελεύθερα κυκλοφορούν DNA (cfDNA) απελευθερώνεται από τα κύτταρα μέσω πολλαπλών μηχανισμών, που ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τον κυτταρικό θάνατο και την ενεργή έκκριση. Οι διαδικασίες κυτταρικού θανάτου περιλαμβάνουν την απόπτωση, τη νέκρωση και τη NETosis.

Έκκριση DNA λόγω Κυτταρικού θανάτου.**Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος - Απόπτωση**

Ένας από τους τρόπους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 1-3), η απόπτωση που είναι και ο πιο συχνά παρατηρούμενος μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου αλλά και ο πιο μελετημένος μηχανισμός, είναι μια πολύ σημαντική κυτταρική λειτουργία που σκοπό έχει να απομακρύνει μη υγιή κύτταρα, ή κύτταρα που δεν χρειάζονται πλέον όπως αυξομειώνεται το στήθος και η μήτρα κατά την εγκυμοσύνη ή την έμμηνο ρύση. Κατά την απόπτωση το κύτταρο ενεργοποιεί συγκεκριμένους μηχανισμούς – διαφορετικούς κατά περίπτωση - όπου αυτό συρρικνώνεται και συμπυκνώνονται τα οργανίδια του.

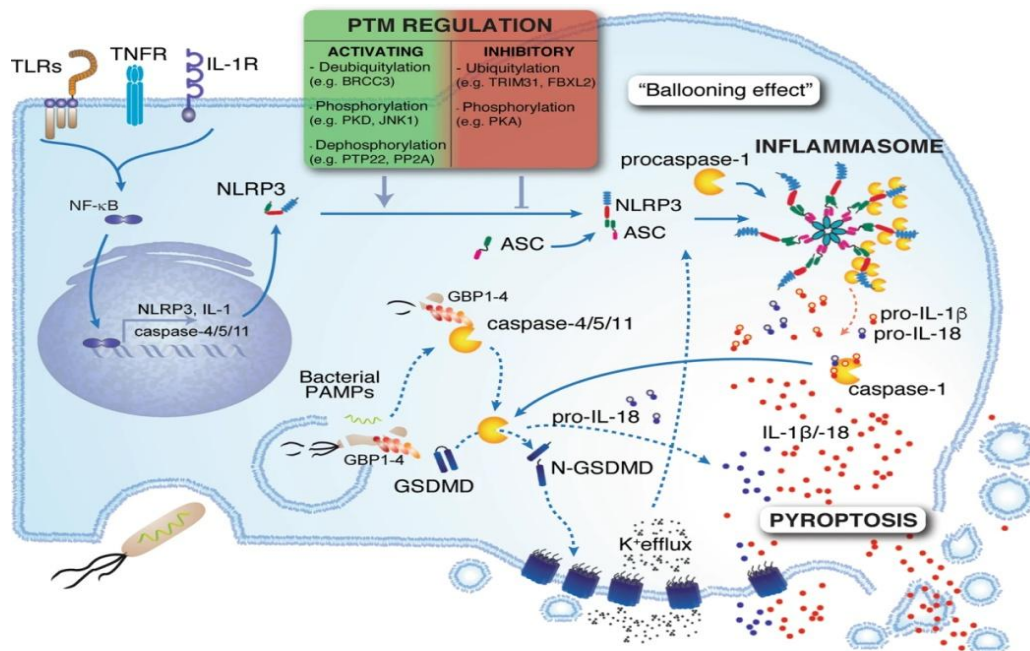


Εικόνα 1-3 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της απόπτωσης.

Η απόπτωση ενεργοποιείται μέσω δύο κύριων οδών, που αναφέρονται ως η ενδογενής (πράσινη γραμμή) και η εξωγενής οδός (κόκκινη γραμμή). Η ενδογενής οδός ενεργοποιείται μέσω της ολιγομερούς σύνθεσης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2, BAK και BAX. Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται μέσω σύνδεσης μεμβρανικών υποδοχέων, όπως ο υποδοχέας παράγοντας νέκρωσης όγκου 1 (TNFR1) ή οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs). Οι ενεργοποιημένες κασπάσες, όπως οι κασπάσες -2, -6, -8 και -10, προκαλούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν μηνύματα με τη μορφή νουκλεοσωμικών δομών, αποσπώμενων υποδοχέων, αντιφλεγμονωδών μεταβολιτών ή μορίων συσκευασμένων σε εξωκυττάρια κυστίδια απόπτωσης (Bayes).

Cellular & Molecular Immunology (2021) 18:1106–1121; <https://doi.org/10.1038/s41423-020->

Στη συνέχεια αρχίζει να τεμαχίζει το DNA και παράλληλα να δημιουργεί δομές (membrane blebbing-κύστωση) παρόμοιες με φουσκάλες ή ψευδοπόδια. Έπειτα το πυρηνικό υλικό και το κυτταροπλασματικό υλικό κατακερματισμένο απελευθερώνεται στο περιβάλλον μέσω των αποπτωτικών σωματίων (apoptotic bodies ApoBD) και μικροσωματιδίων (ApoEV)(Xu et al., 2019) τα οποία μεταξύ άλλων περιέχουν θραύσματα χρωματίνης, ελεύθερο DNA και μιτοχονδριακό DNA, τέλος μπορεί να παρουσιάζονται και στην μεμβράνη τους(Xu et al., 2019). Αυτά στη συνέχεια μπορεί να επάγουν φλεγμονώδη αντίδραση μέσω της δράσης των

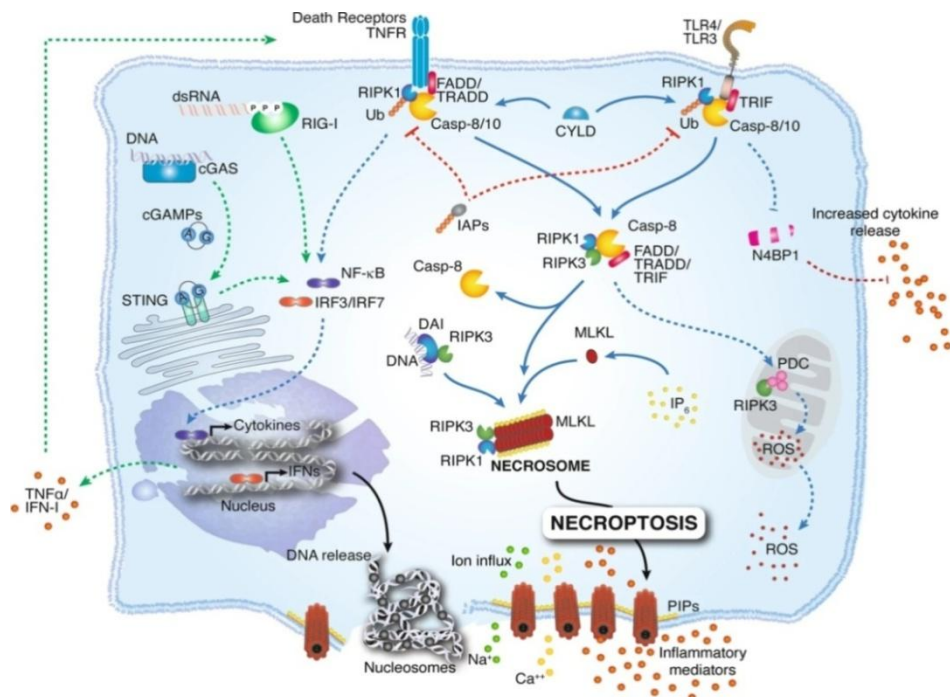


Εικόνα 1-4 Σχηματική απεικόνιση τη πυρόπτωσης

Η πυρόπτωση είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που επάγεται από φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από ενδοκυτταρικούς αισθητήρες, όπως ο NLRP3, οι οποίοι ανιχνεύουν DAMPs, PAMPs, διαταραχές στη μεμβράνη, ωσμωτικές ανισορροπίες και εκροή ιόντων, μεταξύ πολλών ερεθισμάτων. Με την ενεργοποίησή τους, αυτοί οι αισθητήρες προσλαμβάνουν τον προσαρμογέα ASC, σχηματίζοντας μια μικροσκοπική δομή που ονομάζεται φλεγμονόσωμα.

Cellular & Molecular Immunology (2021) 18:1106–1121; <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>

υποδοχέωνⁱ TLR2, TLR3 και TLR9(Han & Lo, 2021a) η να φαγοκυτωθούν. Χαρακτηριστικό του είναι η μη διατάραξη περιβάλλοντος ιστού και διατήρηση της υγείας του. Η αποτυχία ενεργοποίησης της απόπτωσης πολλές φορές οδηγεί σε ανάπτυξη όγκων αφού αποτυγχάνει να καταστρέψει το παθολογικό κύτταρο οδηγώντας το στην ανεξέλεγκτη διαίρεση. Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου όπως η πυρόπτωση (Εικόνα 1-4) αυτός ο μηχανισμός κυρίως ενεργοποιείται από μολύνσεις και επάγει φλεγμονώδη αντίδραση.



Εικόνα 1-5 Σχηματική απεικόνιση της νεκρόπτωσης.

Η νεκρόπτωση ενεργοποιείται μέσω των υποδοχέων TNFR και Fas καθώς και μέσω των υποδοχέων τύπου Toll (TLR4 ή TLR3). Με την ενεργοποίησή τους, αυτοί οι υποδοχείς προσλαμβάνουν τις πρωτεΐνες προσαρμογής FADD, TRADD και TRIF, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις RIPK1 και τις κασπάσες-8 ή -10 (μπλε γραμμή).

Cellular & Molecular Immunology (2021) 18:1106–1121; <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>

ⁱ Οι υποδοχείς TLRs είναι πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αποτελούν μέρος του ενδογενούς ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στις λοιμώξεις. Οι TLRs είναι μεμβρανικοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, που σημαίνει ότι ανιχνεύουν συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα που συνδέονται με παθογόνα (όπως βακτήρια, ιοί, μύκητες και παράσιτα) ή κατεστραμμένα κύτταρα του ξενιστή(Duan et al., 2022).

Αρχικά το κύτταρο διογκώνεται σαν μπαλόνι, ο πυρήνας συρρικνώνεται αλλά το DNA δεν τεμαχίζεται. Στην συνέχεια υπάρχει λύση του κυττάρου και απελευθερώνονται στο περιβάλλον διάφορα μόρια που επάγουν φλεγμονή (Bertheloot et al., 2021). Θεωρείται σημαντικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου και παρατηρείται κυρίως στον ιστό του καρδιαγγειακού συστήματος και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (D'Arcy, 2019). Άλλος ένας μηχανισμός που έχει περιγραφεί ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι η νεκρόπτωση (Εικόνα 1-5 Σχηματική απεικόνιση της νεκρόπτωσης.), η οποία εμπλέκει διαφορετικούς μηχανισμούς όσο και κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια με τους άλλους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Χαρακτηριστικό της είναι η δημιουργία πόρων στην εξωτερική μεμβράνη, το πρήξιμο του κυττάρου και απελευθέρωση κυτοκινών και DNA στο περιβάλλον.

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη δομή των προϊόντων του κάθε μηχανισμού αφού αυτά πολλές φορές διαφέρουν μεταξύ τους, όπως π.χ. το μήκος των θραυσμάτων του κατακερματισμένου DNA αλλά και τα σημεία που έχει κοπεί από τα αντίστοιχα ένζυμα. Αυτό σε συνδυασμό με την γνώση του ερεθίσματος που ενεργοποιεί κάθε μηχανισμό μπορεί να βοηθήσει να καταταχτούν και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες τα διαφορετικά μεταξύ τους cfDNA.

Κυτταρικός θάνατος - Νέκρωση

Η πορεία της ζωής του κυττάρου ορίζεται από διάφορα ορόσημα, αυτά χαρακτηρίζονται ως σημεία ασταθούς ισορροπίας, άπαξ και υπερβεί το σημείο ισορροπίας τότε το κύτταρο ξεκινάει μια διαδικασία χωρίς επιστροφή, όπως ή κυτταρική διαίρεση ή εν προκειμένω ο κυτταρικός θάνατος (Majno & Joris, 1995). Μια μερίδα επιστημόνων χρησιμοποιεί τον όρο νέκρωση ως το τελευταίο στάδιο της απόπτωσης αφού ο κυτταρικός θάνατος έχει περιέλθει σε προηγούμενα στάδια, δηλαδή ως θάνατος ορίζεται το σημείο εκείνο που δεν αναστρέφεται η καταστροφή του κυττάρου, η νέκρωση και η απόπτωση όμως διαφέρουν όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1-6.

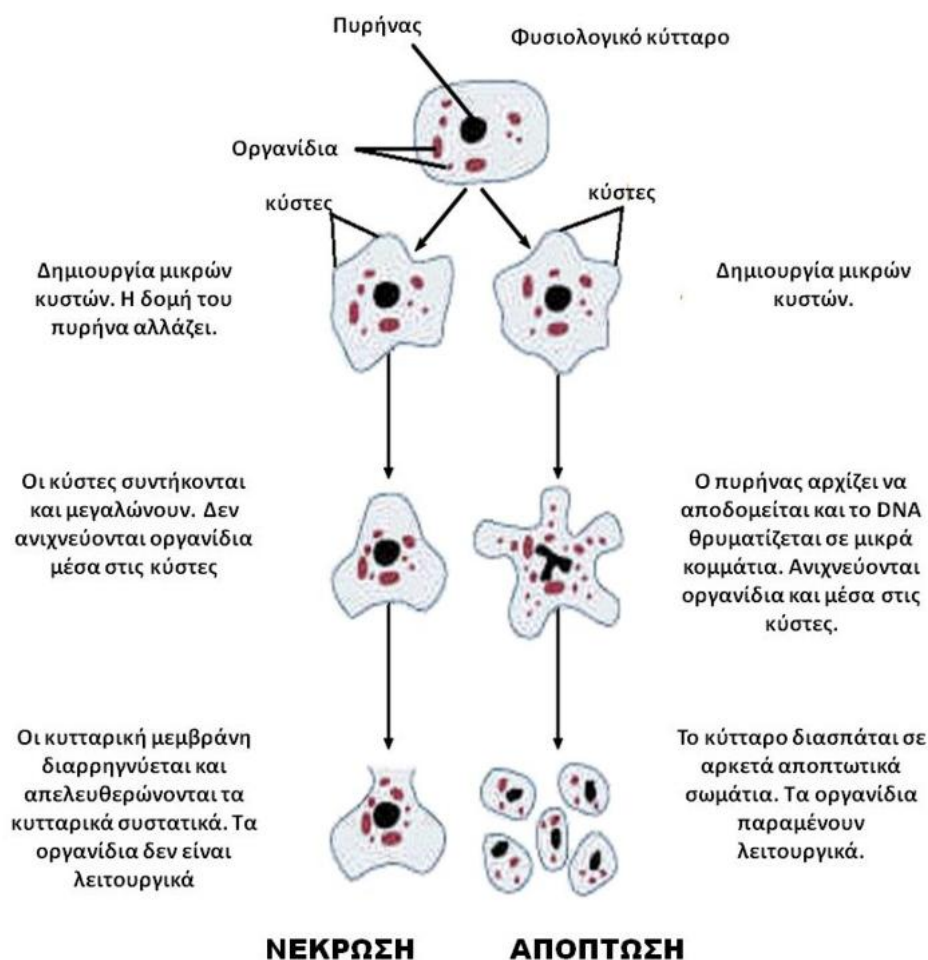
Ο όρος νέκρωση όμως χρησιμοποιείται από την πλειονότητα να περιγράψουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό θάνατο όπου η συνήθης αιτία είναι η υποξία, η φλεγμονή ή από κάποιο εξωτερικό ερέθισμα όπως ακτινοβολία, θερμότητα, χημικά κλπ. Η

νέκρωση, δηλαδή η λύση του κυττάρου και η διασπορά του κυτταρικού υλικού στο περιβάλλον είναι μια διαδικασία ενεργειακά ανεξάρτητη και προκαλείται από την αποτυχία διατήρησης της ομοιόστασης του (D'Arcy, 2019). Η διαδικασία πριν την λύση του κυττάρου περιγράφεται ως όγκωση και περιλαμβάνει τρία στάδια.

1^ο στάδιο: Το κύτταρο περνάει σε φάση όγκωσης λόγω κάποιου ερεθίσματος με εισροή ιόντων και νερού, με αποτέλεσμα την πρήξιμο του κυττάρου χωρίς όμως αλλαγή στην διαπερατότητα της μεμβράνης

2^ο στάδιο: Σε αυτό το στάδιο η διαδικασία είναι μη αντιστρεπτή και η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνει χάνοντας παράλληλα την επιλεκτικότητα της.

3^ο στάδιο: Η κυτταρική μεμβράνη διαρρηγνύεται και το περιεχόμενο του κυττάρου διασκορπίζεται στο περιβάλλον. (Weerasinghe & Buja, 2012)

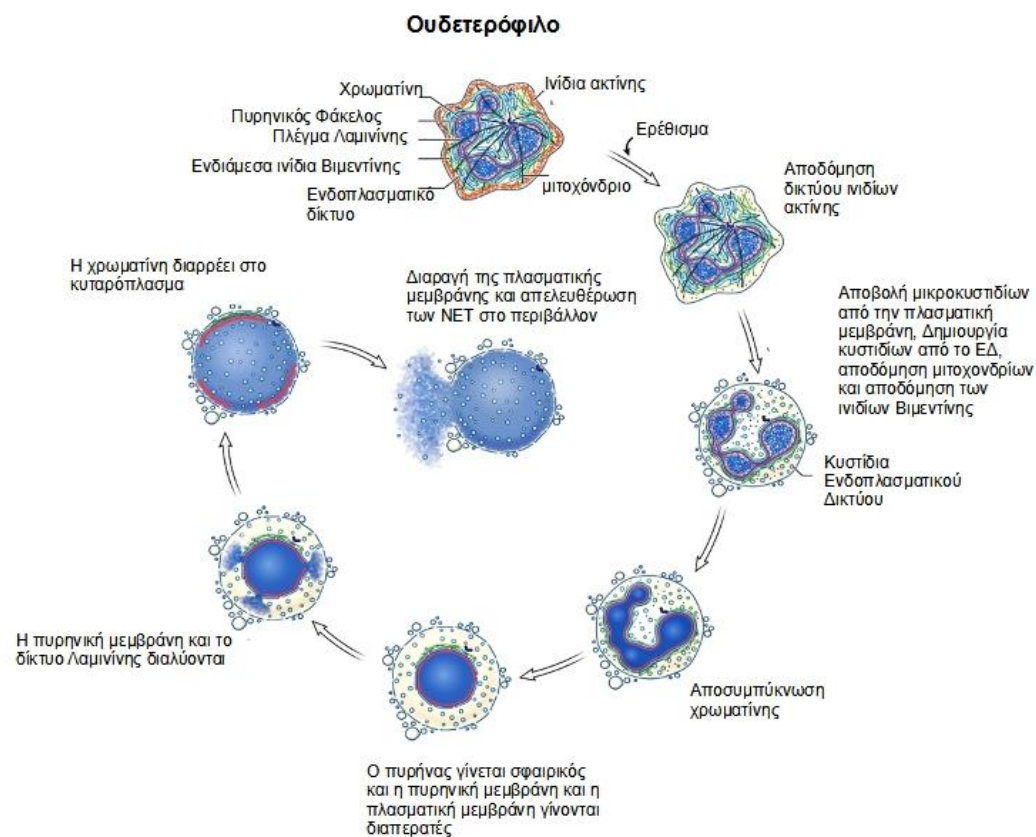


Εικόνα 1-6 απεικόνιση της πορείας της νέκρωσης και της απόπτωσης.

Συγκριτική απεικόνιση της πορείας της νέκρωσης και της απόπτωσης όπου είναι εμφανής η διαφορετική εμφάνιση του κυττάρου σε κάθε διεργασία.

Θάνατος με απελευθέρωση Εξωκυττάρων δικτύων χρωματίνης - NETωση

Τα ουδετερόφιλα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την διαφοροποίηση τους στον μυελό των οστών και στρατολογούνται σε σημεία που απαιτείται ανοσολογική απόκριση. Αυτή η δράση τους περιλαμβάνει την απελευθέρωση κοκκίων, την φαγοκυττάρωση των παθογόνων και την απελευθέρωση των NET (neutrophil extracellular traps - εξωκυττάρια παγίδες ουδετερόφιλων). Η διαδικασία παραγωγής των NET είναι γνωστή ως NETosis (Εικόνα 1-7) και όπως πολλές κυτταρικές διεργασίες μπορεί να εκφραστεί με εναλλακτικούς τρόπους και από



Εικόνα 1-7 Κυτταρικά γεγονότα που καθοδηγούν τη διαδικασία της NETosis

Μοντέλο των κυτταρικών γεγονότων που καθοδηγούν τη διαδικασία της NETosis και των μοριακών ρυθμιστών της

<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>, Το σχήμα είναι προσαρμοσμένο από Thiam et al. (2020).

διαφορετικά ερεθίσματα (Huang et al., 2022), θεωρείται και αυτή η διεργασία ως ένας από τους τρόπους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα NET έχουν δομή

πλέγματος και αποτελούνται από ιστόνες και πρωτεΐνες όμοιες με αυτές συγκροτούν τα κοκκία(Thiam et al., 2020). Οι ιστόνες είναι τροποποιημένες και η χρωματίνη έχει αποσυμπυκνωθεί, επίσης έχουν διαφορετική δομή από αυτή μέσα στον πυρήνα με αποτέλεσμα το αρνητικό φορτίο του DNA να αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με τα άλλα συστατικά των ET για να σχηματίσουν αυτό το πλέγμα(Mitsios et al., 2017).

Το DNA κόβεται από διάφορες νουκλεάσες και αποδομούνται τα NET με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται στην κυκλοφορία ελεύθερο DNA. Παράλληλα απελευθερώνεται και DNA κατά την λύση του κυττάρου(Thiam et al., 2020). Πέρα από πηγή cfDNA τα NET θεωρούνται ότι επάγουν αρκετές ασθένειες, όπως του συστηματικού Ερυθρωματώδη Λύκου, Θρομβώσεις, Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, Ψωρίαση, Καρκίνος, κ.α(Mitsios et al., 2017; Vorobjeva, 2020). λόγω της υπερπαραγωγής τους ή και της μειωμένης ικανότητας μεταλλαγμένων νουκλεασών να κόβουν το DNA. Αυτή η ιδιότητα τους πέρα από το DNA που ελευθερώνεται καθιστά τις δομές αυτές (NETs) και πιθανούς βιοδείκτες λόγω της σύνθεσής τους αλλά και λόγω των αντισωμάτων εναντίων τους(Vorobjeva, 2020).

Ενεργή κυτταρική έκκριση DNA

Παρόλο που η παρουσία των εξωσωμάτων είναι γνωστή για πάρα πολλά χρόνια, το ότι, όμως, κάποια μπορεί να περιέχουν, εκτός από πρωτεΐνες και λιπίδια, αλλά και νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) είναι γνωστό μόνο την τελευταία δεκαετία. Μέχρι στιγμής ενεργή κυτταρική έκκριση cfDNA έχει παρατηρηθεί μέσω δύο μηχανισμών, η πρώτη μέσω του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης και η δεύτερη μέσω του μονοπατιού δημιουργίας αμφισωμάτων(Hu et al., 2021).

Στον πρώτο μηχανισμό, αυτόν μέσω της ενδοκυττάρωσης αν και έχει αναφερθεί ότι βρέθηκε DNA από τον πυρήνα από όλα τα χρωμοσώματα, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να ποσοτικοποιηθούν τα ευρήματα(Kalluri & LeBleu, 2020), παρόλα αυτά DNA βακτηρίων και ιών βρίσκεται μέσα στα εξωσώματα. Ο δεύτερος μηχανισμός, αυτός του μονοπατιού των αμφισωμάτων, δηλαδή όταν τα πολυκυστικά σωματίδια (Multivesicular Bodies – MVB) συγχωνεύονται αρχικά με φαγοφόρα και στη συνέχεια με λυσοσώματα, τα περιεχόμενα τους δεν οδηγούνται πάντα στην

απέκκριση αλλά και στην ενεργή έκκριση όπου ανάμεσα σε αυτά βρίσκονται και νουκλεοσώματα και δίκλωνο DNA.

Η δομή και το περιεχόμενο των εξωσωμάτων είναι χαρακτηριστική των κυττάρων από τα οποία εκκρίνονται, καθιστώντας τα εξαιρετικούς στόχους ανάλυσης για υγρή βιοψία, αυτό δεν όμως σημαίνει ότι τα εξωσώματα που προέρχονται από όμοια κύτταρα έχουν και το ίδιο πάντα περιεχόμενο. Οι λειτουργίες που επιτελούν είναι:

- η διακυτταρική επικοινωνία αφού έχει βρεθεί ότι μεταφέρουν κάθε τύπο πρωτεΐνης, ιού, RNA, προϊόντων αποικοδόμησης από σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά και miRNA. και τα κύτταρα στόχοι ενδοκυττάρων τα εξωσώματα.
- η ομοιοστάση του κυττάρου με την απομάκρυνση μη απαραίτητων ή πλεοναζόντων μορίων.

Για την δομή και το περιεχόμενο τους μπορεί να αναζητηθεί στην τρέχουσα έκδοση της βάσης δεδομένων για το περιεχόμενο των εξωσωμάτων «Exocarta». (www.exocarta.org).

Τέλος, ανιχνεύονται και θραύσματα DNA που δεν εμπεριέχονται σε κάποιο σωματίδιο ή κυστίδιο, αλλά είναι είτε ελεύθερο θραύσμα ή ενωμένο με κάποιο μεγαλομόριο, όπως ιστόνες ή άλλες πρωτεΐνες. Ενώ το ελεύθερο DNA υπόκειται στην δράση των νουκλεασών και αποδομείται γρήγορα, αυτό που περιβάλλεται από ιστόνες προστατεύεται από την δράση τους. Το μέγεθος του θραύσματος και η θέση του στο χρωμόσωμα σε αρκετές περιπτώσεις εξαρτάται από το είδος του ιστού από τον οποίο προέρχεται, καθώς η θραύση γίνεται κοντά στην θέση εκκίνησης μεταγραφής γονιδίων, αφού αυτές περιβάλλονται από μεταγραφικούς παράγοντες που προστατεύουν το DNA από τις νουκλεάσες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κάποιο αποτύπωμα για τον ιστό προέλευσης (Szilágyi et al., 2020). Επίσης φορείς DNA είναι και δομές γνωστές ως Virtosomes που είναι συμπλέγματα αποτελούμενα από λιποπρωτεΐνες DNA και RNA, ρόλος τους θεωρείται ότι είναι η διακυτταρική επικοινωνία. Η απελευθέρωση τέτοιων συμπλεγμάτων είναι αυξημένη από καρκινικά κύτταρα καθιστώντας τα ελκυστικούς στόχους για βιοδείκτες (Gahan & Stroun, 2010; Szilágyi et al., 2020). Επίσης μπορεί να βρεθεί και μικροβιακό και ιικό γενετικό υλικό να κυκλοφορεί ελεύθερο στο αίμα.

ctDNA – Ελεύθερα κυκλοφορούν καρκινικό DNA

Το cfDNA και το ctDNA είναι παρόμοιες αλλά διακριτές μορφές DNA που ανιχνεύονται στο αίμα. Το cfDNA αποτελείται από μικρά θραύσματα DNA που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος από διάφορα κύτταρα μέσω της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) ή της νέκρωσης (ανεξέλεγκτος κυτταρικός θάνατος) και προέρχεται τόσο από φυσιολογικά όσο και από παθολογικά κύτταρα. Από την άλλη το ctDNA είναι ένα υποσύνολο του cfDNA που προέρχεται ειδικά από καρκινικά κύτταρα. Τα επίπεδα ανίχνευσης του είναι συνήθως χαμηλότερα από τα επίπεδα του cfDNA, αλλά είναι εξαιρετικά ειδικά για τον καρκίνο. Περιλαμβάνει θραύσματα DNA που απορρίπτονται από τους όγκους λόγω νέκρωσης, απόπτωσης ή ενεργής έκκρισης. Τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι ότι φέρει γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις που είναι χαρακτηριστικές των όγκων, όπως μεταλλάξεις, μοτίβα μεθυλίωσης και αριθμητικές μεταβολές γονιδίων. Παρατίθεται στον πίνακα 1.1 μια σύνοψη με τις κύριες διαφορές τους:

	cfDNA	ctDNA
Πηγή	Όλα τα κύτταρα του οργανισμού	Καρκινικά κύτταρα
Συγκέντρωση	Υψηλότερη και μεταβαλλόμενη	Πολύ Χαμηλότερη
Ειδικότητα	Γενική (όχι ειδική για παθήσεις)	Υψηλή ειδικότητα για καρκίνους
Κλινική Χρήση	Προγεννητικός έλεγχος, γενική υγεία	Ανίχνευση καρκίνου, πρόγνωση, παρακολούθηση

Πίνακας 1-3 Διαφορές μεταξύ cfDNA και ct DNA

1.1.2 Ελεύθερα κυκλοφορούν εμβρυϊκό DNA - cffDNA cell free fetus DNA

Μια κατηγορία του ελεύθερα κυκλοφορούν DNA που αξίζει να περιγραφεί ξεχωριστά είναι αυτό του εμβρυϊκού ελεύθερα κυκλοφορούν DNA (Cell free fetal DNA – cffDNA). Όπως υποδηλώνεται και από το όνομα του είναι DNA που ανιχνεύεται στο αίμα, στα ούρα κλπ. μιας εγκύου και προέρχεται από το έμβρυο και τον πλακούντα. Χρησιμοποιείται στον προγεννητικό έλεγχο ως προγνωστικός δείκτης και όχι ως διαγνωστικός (NIPT test) κατά κύριο λόγο για την τρισωμία 21 με πολύ υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας, τις τρισωμίες 18 και 13 και

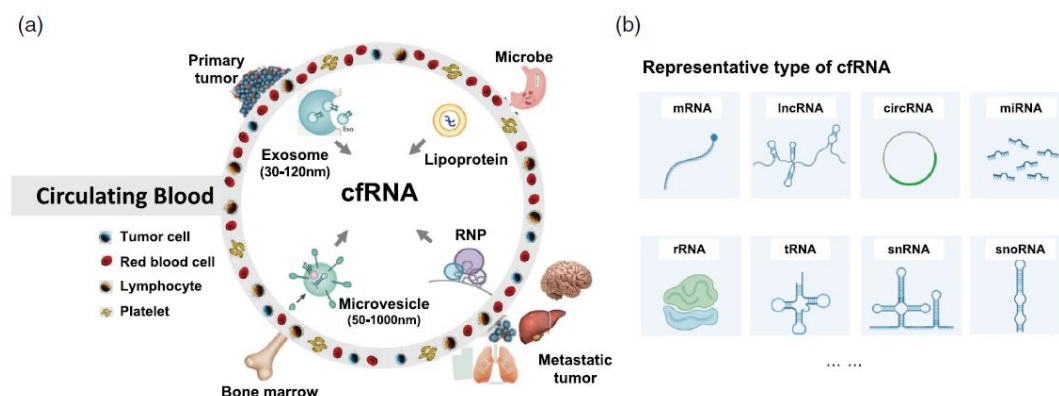
χρωμοσωμικές βλάβες που αφορούν το χρωμόσωμα X. Επίσης χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του φύλου από πολύ νωρίς αλλά και για τεστ πατρότητας, επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη πρόληψη της αιμολυτικής ασθένειας των νεογνών και εμβρύων. Ακόμα, μια σημαντική συνεισφορά στον προγεννητικό έλεγχο είναι στην διάγνωση της προεκλαμψίας, και τέλος μπορούν να ανιχνευτούν μονογονιδιακές ασθένειες, όπως η κυστική ίνωση, β θαλασσαιμία κ.α (Goldwaser & Klugman, 2018; Gullo et al., 2023). Παρατηρήθηκε αρχικά το 1997 με την ανίχνευση χρωμοσώματος Y σε έγκυες και εν συνεχεία βρέθηκε ότι η ποσότητα του cffDNA αυξάνεται σταδιακά κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, με απότομη αύξηση μετά την 20^η εβδομάδα κύησης. Παράλληλα παρατηρήθηκε ότι το μήκος των τμημάτων του είναι μικρότερο σε σύγκριση με το ελεύθερα κυκλοφορούν DNA προερχόμενο από την έγκυο. Επίσης βρέθηκε ότι ο χρόνος ημιζωής του cffDNA κυμαίνεται περίπου στα 16 λεπτά κάτι που υποδεικνύει ότι η παραγωγή και αφαίρεση του από το μητρικό αίμα είναι μια δυναμική διεργασία (Phillippe, 2015). Κύρια πηγή του cffDNA έχει βρεθεί ότι προέρχεται από συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα, δηλαδή από κύτταρα της εξωτερικής στοιβάδας του πλακούντα που έρχεται σε επαφή με το μητρικό αίμα, και σε μικρότερο ποσοστό εμβρυικά κύτταρα (κυρίως ερυθροβλάστες) (Goldwaser & Klugman, 2018) κάτι που επηρεάζει σημαντικά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, όπως θα αναλύσουμε παρακάτω.

Κατά την διαφοροποίηση του ζυγωτού ο ιστός του πλακούντα και ο ιστός του εμβρύου αναπτύσσονται ανεξάρτητα. Έτσι πολλές φορές ένα ποσοστό των κυττάρων του πλακούντα έχει ανευπλοϊδίες που όμως δεν προκαλούν αποβολή καθώς υπάρχει ανεκτικότητα σε αυτές σε αντίθεση με εντοπισμένες ανευπλοϊδίες στο έμβρυο που προκαλούν αυτόματη αποβολή. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται confined placental mosaicism (CPM) και η έκβαση της εγκυμοσύνης μπορεί να είναι από φυσιολογική, καθυστερημένη ανάπτυξη ή αποβολή και εξαρτάται από το ποσοστό των κυττάρων με ανευπλοϊδίες, το είδος την θέση τους κλπ. Το παραπάνω φαινόμενο επηρεάζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς τα αποτελέσματα μπορεί να ανταποκρίνονται σε DNA του πλακούντα και όχι του εμβρύου. Δηλαδή η ένδειξη μιας χρωμοσωμικής ανωμαλίας να προέρχεται από κύτταρα του πλακούντα που μπορεί να μην επηρεάζουν τη εγκυμοσύνη και όχι του εμβρύου. Έτσι το διαγνωστικό τεστ παραμένει η αμνιοπαρακέντηση ή/και η βιοψία χοριακών λαχνών για την

επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (Chiu & Lo, 2021; Goldwaser & Klugman, 2018). Ο τρόπος ανίχνευσης του δεν διαφέρει ιδιαίτερα από αυτούς που χρησιμοποιούνται και για την ανίχνευση του ελεύθερα κυκλοφορούν DNA, αν και έχουν αναπτυχθεί στοχευμένα τεστ πατρότητας ή άλλα για χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μονογονιδιακές ασθένειες, που άλλα χρησιμοποιούνται ως προγνωστικά εργαλεία και άλλα είναι ακόμα στο στάδιο της ανάπτυξης (Chiu & Lo, 2021; Goldwaser & Klugman, 2018).

1.1.3 Ελεύθερα κυκλοφορούν RNA - Cell free RNAs (cfRNA) / extracellular RNAs (exRNAs).

Έχει βρεθεί να κυκλοφορεί RNA ελεύθερα στο πλάσμα όταν πρωτοαναφέρθηκε από τους Mandel και Metais από το 1948 και στην συνέχεια επιβεβαιώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε το 1978-1979 (De Sota et al., 2024). Η υπόθεση ότι στο αίμα δεν θα ανιχνεύονταν RNA υποστηρίζονταν από την παρουσία RNA νουκλεασών, δηλαδή ενζύμων που αποδομούν το RNA, όμως στην πορεία η ανίχνευση RNA στο



Εικόνα 1-8 Η Προέλευση του cfRNA

(a) Το ελεύθερα κυκλοφορούν RNA (cfRNA) δεν αποδομείται αφού συχνά περικλείεται σε εξωκυττάρια κυστίδια (π.χ. μικροκυστίδια ή εξωσώματα) ή μέσω της πρόσδεσης του σε πρωτεΐνες όπως τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα (RNP). Στο αίμα ασθενών με καρκίνο, αυτά τα εξωκυττάρια κυστίδια και τα RNPs προέρχονται και απελευθερώνονται από όλους τους τύπους αιμοσφαιρίων, πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους, μυελό των οστών, μικροοργανισμούς του ανθρώπινου σώματος, και άλλα. (b) Αντιπροσωπευτικοί τύποι cfRNA

<https://doi.org/10.1002/wrna.1791>

πλάσμα και στον ορό του αίματος δείχθηκε το 1978 από τον Stroun και τους συνεργάτες ότι είναι δυνατή μέσω εγκλεισμού του σε εξωκυττάρια κυστίδια (EV) με

τα οποία προστατεύεται από τη δράση των RNA νουκλεασών. Αυτός είναι και ένας από τους βασικούς μηχανισμούς με τους οποίους το cfRNA προστατεύεται από την αποδόμηση από τις RNA νουκλεάσες αφού η πλειονότητα του mRNAs που βρίσκεται στο αίμα αποδομείται με χρόνο ημιζωής μόλις 15 δευτερόλεπτα (De Sota et al., 2024). Επίσης πλέον ανιχνεύεται στο αίμα, στα ούρα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κ.α. (Εικόνα 1-8 Η Προέλευση του cfRNA). Η προέλευση του μπορεί να είναι το αποτέλεσμα απόπτωσης ή νέκρωσης (π.χ. μέσω κύστωσης) ή από βιοχημικά μονοπάτια με πρωτεΐνες σύνδεσης RNA (π.χ., με τις πρωτεΐνες HDL, AGO2, NPM1) (Szilágyi et al., 2020). Παρότι έχουν παρατηρηθεί κωδικά και μη κωδικά μόρια RNA η έρευνα επικεντρώνεται στην μελέτη μη κωδικών RNA (cf-ncRNA) λόγω της σταθερότητας τους που οφείλεται στην σύνδεση τους με πρωτεΐνες ή στην ενσωμάτωσή τους σε κυστίδια. Γενικά το mRNA αντιπροσωπεύει μόνο το 2% του εξωκυττάριου RNA ενώ το miRNA και το piRNA αντιπροσωπεύουν το 40% (De Sota et al., 2024).

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει διάκριση στα επίπεδα συγκέντρωσης τους ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς, κάτι που τα καθιστά υποψήφια μόρια για Βιοδείκτες. Αν και η λειτουργία των cf-ncRNA δεν είναι ακόμα σαφής, υπάρχει η ένδειξη ότι μπορεί να υποστηρίζουν επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και να λειτουργούν όπως οι ορμόνες (Szilágyi et al., 2020). Παρακάτω θα γίνει μια περιγραφή μερικών cf-ncRNA.

- Micro RNAs (miRNA)

Τα miRNA μέχρι στιγμής είναι τα πιο μελετημένα από το σύνολο των ncRNA, είναι μικρές μονόκλωνες αλληλουχίες RNA (18-23nt) που ο ρόλος τους είναι η μετά-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση μέσω της ενσωμάτωσής τους στο σύμπλεγμα RISC, που στοχεύουν τις 3' UTR περιοχές των mRNA ώστε να παρεμποδίσουν την μετάφρασή τους σε πρωτεΐνη ή να οδηγήσουν το mRNA σε αποσύνθεση. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 2500 διαφορετικά miRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα που ρυθμίζουν διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες, την απόπτωση, κ.α. φτιάχνοντας πολύπλοκα δίκτυα με τα mRNA αφού ένα mRNA μπορεί να είναι περιέχει στόχους για πολλά miRNA ενώ ταυτόχρονα ένα miRNA μπορεί να υβριδοποιείται με πολλαπλά mRNA (Szilágyi et al., 2020).

Έχει διαπιστωθεί ότι σε πολλές ασθένειες υπάρχει διαφοροποιημένη έκφραση miRNA και η αλλαγή αυτή παρατηρείται και στα cf-miRNA. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι cf-ncRNA μέσα σε κυστίδια προερχόμενα από όγκους, προσλαμβάνονται από γειτονικά κύτταρα που στη συνέχεια επηρεάζεται η έκφραση των γονιδίων τους. Η δράση τους όμως έχει παρατηρηθεί και στη επικοινωνία μεταξύ πλακούντα και μήτρας όπου miRNA που εκκρίνονται από βλαστοκύτταρα του εμβρύου προσλαμβάνονται από το ενδομήτριο επάγοντας την εμφύτευση του. Πέρα από τα παραπάνω έχει βρεθεί η δράση τους και σε πολλά άλλα πεδία καθιστώντας τα πιθανούς βιοδείκτες(De Sota et al., 2024; Szilágyi et al., 2020).

- Long Non-Coding RNAs (lncRNA)

Αυτά είναι αλληλουχίες RNA με μήκος πάνω από 200 νουκλεοτίδια και προέρχονται κυρίως από μεταγραφή εσονίων ή την αντινοσηματική αλληλουχία γονιδίων. Ο ρόλος τους περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα, από την επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, τον ρόλο τους ως ικρίωμα για την σύνθεση πρωτεϊνών, ως στόχοι για την δέσμευση μορίων σε περίσσεια, κ.α. Επίσης λειτουργούν ως πρόδρομα μόρια, άλλων μικρότερων λειτουργικών RNA όπως sncRNA (small non coding RNA). Ενδοκυτταρικά έχει βρεθεί συσχέτιση της έκφρασης τους σε διάφορες ασθένειες και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι κάποια από αυτά κυκλοφορούν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στο πλάσμα, θεωρούνται ως υποψήφιοι βιοδείκτες(Szilágyi et al., 2020).

- PIWI-Interacting RNAs

Έχουν μήκος 24-32 νουκλεοτίδια και η πιο γνωστή λειτουργία τους είναι η αποσιώπηση τρανσποζονίων στο γονιδίωμα των γαμετών, επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι λειτουργούν και ως ογκογονίδια η ογκοκατασταλτικά γονίδια όμως από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα υπάρχει περιορισμένη αναφορά για ανίχνευση τους στο αίμα ή το πλάσμα, γεγονός που δυσκολεύει την χρήση τους ως βιοδείκτες(Szilágyi et al., 2020).

Υπάρχει ένας αριθμός από άλλα μη κωδικά RNA όπως τα YRNA, τα κυκλικά RNA circRNA, τα Vault RNA και άλλα που όμως για να μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες θα πρέπει να είναι ανιχνεύσιμα σε σωματικά υγρά σε ποσότητες ικανές για

να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις. Επίσης θα πρέπει να γίνουν μελέτες για να συσχετιστούν με την εμφάνιση ή πρόοδο ασθενειών(Szilágyi et al., 2020).

- Messenger RNA (mRNAs)

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει περίπου 24.000 γονιδιακούς τόπους ενώ από την άλλη κωδικοποιεί μόνο περίπου 2600 ώριμα miRNAs και επιπλέον ο τρόπος που λειτουργούν τα miRNAs είναι πολύπλοκος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω καθώς το καθένα από αυτά μπορεί να συνδέεται με τις 3'-μη μεταφραζόμενες (3'UTR) περιοχές πολλαπλών γονιδίων-στόχων, ρυθμίζοντας πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες μέσω της μετά-μεταφραστικής τροποποίησης του mRNA. Άλλα είδη RNA, όπως τα lncRNA και piRNAs, έχουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία από τα mRNAs, περίπου 60.000 και 30.000 αντίστοιχα, αλλά δεν έχουν αναγνωριστεί οι γενετικοί τόποι προέλευσης τους σαφώς και οι λειτουργικοί τους ρόλοι παραμένουν ασαφείς.

Αντιθέτως, ο ρόλος πολλών γονιδίων είναι θεμελιωμένος, και υπάρχουν αρκετές πλήρως χαρακτηρισμένες αλληλουχίες εκφραζόμενου mRNA διαφόρων ιστών και κυττάρων. Η δημιουργία προφίλ έκφρασης γονιδίων και σύγκρισης μεταξύ οργάνων αποκάλυψε την διαφορά στην έκφραση του mRNA μεταξύ τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την αναγνώριση της προέλευσης τους. Τα παραπάνω δείχνουν ότι το mRNA πλεονεκτεί, προς το παρόν, έναντι άλλων τύπων cfRNA για χρήση ως βιοδείκτης στην υγρή βιοψία.

1.1.4 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating tumor cells - CTC)

Τα CTC μπορούν να οριστούν ως τα καρκινικά κύτταρα που αποχωρίζονται από έναν συμπαγή όγκο και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος(Castro-Giner & Aceto, 2020). Είναι ένας από τους μηχανισμούς που προάγει την μετάσταση των συμπαγών όγκων και η μελέτη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες στην εύρεση νέων θεραπειών αλλά και της αντίστασης που αναπτύσσουν κατά των υπαρχόντων θεραπειών. Επιπλέον μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την ικανότητα που αναπτύσσουν να αποφεύγουν τον αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού αλλά επίσης και τους τρόπους με τους οποίους

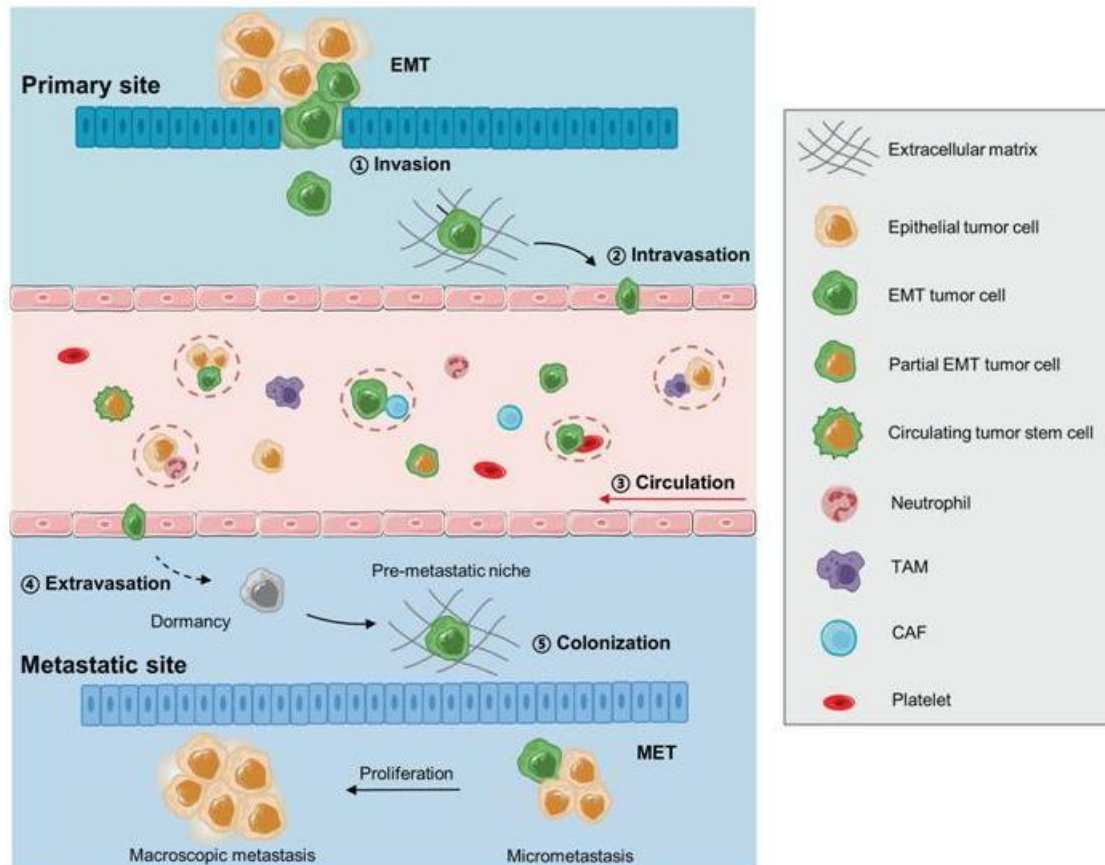
μπορούν να αναπτύσσονται σε διαφορετικό ιστό από τον οποίο προέρχονται. Η λήψη τους με την διαδικασία της υγρής βιοψίας δίνει νέες και ενημερωμένες πληροφορίες για την σύσταση του όγκου, καθώς συνήθως η αρχική βιοψία έχει γίνει πριν από αρκετό καιρό και πριν από την λήψη θεραπειών και οι πληροφορίες από αυτήν να μην αντιστοιχούν στην σύσταση του όγκου μετά από την θεραπεία ή την διάγνωση μιας μετάστασης (Diamantopoulou et al., 2020).

Ο μηχανισμός της μετάστασης δεν είναι ίδιος σε όλους τους τύπους του καρκίνου, αλλά για να αποσπαστούν καρκινικά κύτταρα από έναν συμπαγή όγκο και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να αποικίσουν έναν μακρινό ιστό απαιτούνται διάφορα βήματα στοχαστικού χαρακτήρα (Lin et al., 2021; Todenhöfer et al., 2020):

- Ενεργή κυτταρική μετανάστευση και εισβολή στον περιβάλλον ιστό.
- Ενδοαγγειακή διήθηση στο λεμφικό ή κυκλοφορικό σύστημα
- Επιβίωση στην κυκλοφορία
- Εξαγγείωση
- Προσκόλληση και αποίκιση της μεταστατικής εστίας.

Η επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) - Εικόνα 1-9) θεωρείται από τους κύριους μηχανισμούς της ενεργής μετανάστευσης και ενδοαγγειακής διήθησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά όχι ο μοναδικός. Φυσιολογικά αυτή η μετάπτωση παρατηρείται στην ανάπτυξη του εμβρύου αλλά και στην επούλωση τραυμάτων. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν πληθώρα συνδετικών μορίων στην επιφάνεια τους, όπως λιονταρίνες και κολεκτίβες που συνδέουν γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα στενά μεταξύ τους. Αντιθέτως τα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν πολύ λιγότερα συνδετικά μόρια και πιο «εύκαμπτο κυττοσκελετό» κάνοντας τα πιο εύκαμπτα και ευκίνητα. Η μετάπτωση αυτή προκαλείται στα καρκινικά κύτταρα κυρίως υπό συνθήκες υποξίας ή ακτινοβολίας. Έχει βρεθεί, ότι σε συνθήκες υποξίας τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF1α (Hypoxia -inducible factor 1 alpha) που και αυτός με την σειρά του ρυθμίζει θετικά την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάπτωση (Lin et al., 2021; Todenhöfer et al., 2020)

Αυτή η αλλαγή στην βιολογία των κυττάρων τα επιτρέπει να αποκολληθούν από τον



Εικόνα 1-9 Η διαδικασία της μετάστασης του καρκίνου

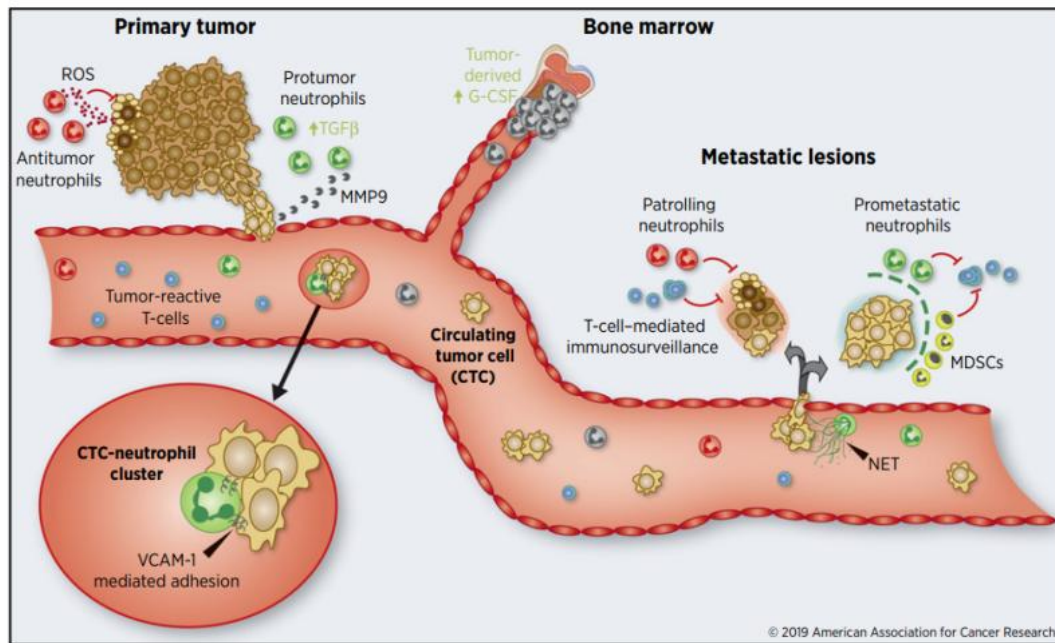
Η διαδικασία της μετάστασης του καρκίνου περιλαμβάνει μια σειρά πολύπλοκων γεγονότων: την εισβολή των καρκινικών κυττάρων περιβάλλον ιστό, την εξαγγείωση τους στην κυκλοφορία, την επιβίωσή τους στην κυκλοφορία ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και την αλληλεπίδρασή τους με αιμοσφαίρια, την εξαγγείωση τους από την κυκλοφορία, καθώς και την προσκόλλησή τους και αποίκιση στον απομακρυσμένο ιστό. Συνοτομογραφίες: EMT (epithelial to mesenchymal transition - μετάβαση από επιθηλιακή σε μεσεγχυματική κατάσταση), CAF (cancer-associated fibroblast-ινοβλάστες που συνδέονται με τον καρκίνο), TAM (tumor-associated macrophage - μακροφάγα που συνδέονται με τον όγκο).

<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>

όγκο, να μεταναστεύσουν και να διηθηθούν στο κυκλοφορικό ή λεμφικό σύστημα.

Με την είσοδο των CTC στην κυκλοφορία του αίματος, τα περισσότερα από αυτά είτε υπόκεινται σε καταστροφική για αυτά διατμητική τάση ή πεθαίνουν μέσω ανοίκησης (anoikis) – μια μορφή κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει όταν τα κύτταρα χάνουν την σύνδεση με τον περιβάλλον ιστό και το εξωκυττάριο υγρό, καθώς αυτά παρέχουν σήματα για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους. Ένα μικρό

κλάσμα των CTC που εισέρχεται στην κυκλοφορία, αλληλεπιδρά με συστατικά του αίματος και καταφέρνει να επιβιώσει (Εικόνα 1-10). Τα κύρια συστατικά αυτά είναι: Ουδετερόφιλα, Αιμοπετάλια, Μακροφάγα, Myeloid-Derived Suppressor Cells



Εικόνα 1-10 Τα στάδια με τα ουδετερόφιλα κατά τη μετάσταση του καρκίνου

Αναπαράσταση της εμπλοκής των ουδετερόφιλων κατά τα διάφορα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας. Στον πρωτογενή όγκο, τα ουδετερόφιλα μπορεί να έχουν είτε αντικαρκινικές είτε προ-καρκινικές λειτουργίες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των CTC και των ουδετερόφιλων μέσω του VCAM-1 επιτρέπει την ενδοαγγείωση συμπλεγμάτων CTC-ουδετερόφιλων Η εξαγγείωση μπορεί επίσης να προαχθεί από τα ουδετερόφιλα μέσω του σχηματισμού NETs. Τέλος, στην μεταστατική εστία, τα ουδετερόφιλα έχουν διπλό ρόλο ως κυτταροτοξικά και προ-καρκινικά.

Cancer Res 2019;79:6067–73 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1972

(MDSCs), Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs)(Lin et al., 2021).

Τέλος να σημειωθεί ότι στην κυκλοφορία ανιχνεύονται μεμονωμένα CTC αλλά και σπανιότερα σε συμπλέγματα, είτε μεταξύ τους είτε με άλλα έμμορφα συστατικά του αίματος. Τα αποτελέσματα των μελετών δείχνουν ότι αυξημένος αριθμός συμπλεγμάτων που ανιχνεύονται στο αίμα αποτελεί χειρότερη πρόγνωση για την έκβαση της ασθένειας ενώ λιγότερες μελέτες κατέληξαν ότι ο συνολικός αριθμός των CTC ασχέτως αν είναι σε συμπλέγματα ή μεμονωμένα αποτελούν χειρότερη πρόγνωση για την έκβαση της ασθένειας(Pereira-Veiga et al., 2022).

Αλληλεπίδραση των CTC με ουδετερόφιλα(Pereira-Veiga et al., 2022; Saini et al., 2019).

Τα ουδετερόφιλα είναι ο πολυπληθέστερος τύπος λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα και τους ιστούς. Παρόλο που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγγενή ανοσοαπόκριση κατά των λοιμώξεων από βακτήρια και μύκητες, στον καρκίνο έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να λειτουργήσουν υποστηρικτικά ή ανασταλτικά στην ανάπτυξη ενός όγκου, ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά του αίματος ή την πόλωσηⁱ τους ως N1 / N2(Saini et al., 2019). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ουδετερόφιλων και των CTC είναι αμφίδρομη και επηρεάζει τον μεταβολισμό και των δύο ώστε από την μία να οδηγούνται τα ουδετερόφιλα σε πολωτική κατάσταση N2 και από την άλλη η αυξημένη μεταστατική τους ικανότητα σε σύγκριση με αυτή των μεμονωμένων CTCs. Επιπλέον, παρότι τα ουδετερόφιλα είναι πολυάριθμα σε όλο το κυκλοφορικό σύστημα, τα συμπλέγματα είναι πολύ περισσότερα σε αγγεία που αιματώνουν την εστία του όγκου και δεν ανιχνεύονται με καρκινικά κύτταρα που εγχέονται στην κυκλοφορία. Η δημιουργία των συμπλεγμάτων των ουδετερόφιλων και των CTCs επιτυγχάνεται με διακυτταρική προσκόλληση μέσω VCAM-1 που ρυθμίζει την μετανάστευση διαμέσου του ενδοθηλίου των λευκών αιμοσφαιρίων και επιπλέον υποβοηθά την αγκίστρωση στο ενδοθήλιο των αγγείων και την μετανάστευση μέσω του φραγμού αίματος-ιστού κατά την ενδοαγγειακή διήθηση, μηχανισμοί που τελικά ρυθμίζουν την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων και την εξαγγείωση(Pereira-Veiga et al., 2022; Saini et al., 2019).

Ένας ακόμα μηχανισμός άμυνας των ουδετερόφιλων πέρα από την φαγοκύτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η NETωση όπως περιγράφηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, με την οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον πλέγματα χρωματίνης και πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία προσκολλώνται και στα

ⁱ Τα ουδετερόφιλα έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους όγκους και να επιτελούν αντιδιαμετρικές λειτουργίες, υποκείμενα σε πόλωση προς φαινότυπους είτε N1 (αντικαρκινικούς) είτε N2 (καρκινικούς), ανάλογα με τα καθορισμένα σήματα που λαμβάνουν. Οι εγγενείς μοριακές διαφορές μεταξύ διαφορετικών καρκίνων ενδέχεται να συνδέονται με την τάση των ουδετερόφιλων να πολώνονται προς τον φαινότυπο N1 ή N2.

CTCs. Αυτά τα συμπλέγματα παρουσιάζουν μεταστατική ικανότητα, καθώς έχει παρατηρηθεί αυξημένη διαπερατότητα στα τοιχώματα των αγγείων.

Αλληλεπίδραση των CTC με αιμοπετάλια (Lin et al., 2021; Pereira-Veiga et al., 2022).

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά (από 1 έως 3 μm), απύρρηνα θραύσματα κυττάρων με χαρακτηριστικό δισκοειδές σχήμα. Οι κύριοι ρόλοι των αιμοπεταλίων είναι η διατήρηση της αιμόστασης του αγγειακού συστήματος και να προάγουν την επούλωση των πληγών μέσω της πήξης του αίματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των CTCs και των αιμοπεταλίων μελετάται εκτεταμένα, και έχει παρατηρηθεί η προστατευτική δράση τους επί των CTCs.

Τα ελεύθερα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και σχηματίζουν συσσωματώματα με αυτά παράλληλα τα CTCs υποβοηθούν τον σχηματισμό αυτών των συσσωματωμάτων εκφράζοντας προθρομβωτικούς και προπηκτικούς παράγοντες. Άλλοι παράγοντες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια, όπως ο TGF- β , επιταχύνουν τη μετάβαση σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT) στα CTCs και προάγουν την διήθηση και τη μετάσταση. Επίσης, τα αιμοπετάλια προστατεύουν τα CTCs από τις διατμητικές τάσεις που υφίστανται στην κυκλοφορία και στον θάνατο μέσω ανοίκωσης με τον σχηματισμό των συσσωματωμάτων και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών. Τέλος τα αιμοπετάλια μπορούν να βοηθήσουν τα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν από την αναγνώριση του ανοσοποιητικού συστήματος επικαλύπτοντας τα ταχύτατα και να αποκτήσουν έναν «ψευδοφυσιολογικό» φαινότυπο, μεταφέροντας στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων κυστίδια που περιέχουν υποδοχείς MHC κατηγορίας I. Με αυτόν τον τρόπο τα CTCs μιμούνται τα φυσιολογικά κύτταρα και τα προστατεύει από τα κύτταρα NK (Natural killer cells) του ανοσοποιητικού.

Αλληλεπίδραση των CTC με Μακροφάγα (Lin et al., 2021; Pereira-Veiga et al., 2022).

Τα Μακροφάγα είναι κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος και προέρχονται από τα μονοκύτταρα, εδράζονται σε όλους τους ιστούς και φαγοκυττώνουν κατεστραμμένα κύτταρα και ξένα σώματα ενώ παράλληλα προωθούν την επιδιόρθωση και την επιβίωση των κυττάρων του οργανισμού. Η αλληλεπίδραση

των μακροφάγων με τους όγκους είναι γνωστή και συχνά ανιχνεύονται στην καρκινική εστία. Ο ρόλος τους είναι η υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος στην καταπολέμηση του όγκου, όμως πολλές φορές επιστρατεύονται από τα καρκινικά κύτταρα προς όφελος τους. Έχει παρατηρηθεί ότι η αλληλοεπίδραση των μακροφάγων με τα κύτταρα του όγκου επάγει την μεσεγχυματική μετάβαση τους και την απελευθέρωση των CTCs στην κυκλοφορία. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι μακροφάγα και CTC μπορεί να συμπτυχθούν σε ασθενείς με καρκίνο ή τα μακροφάγα να αποκτήσουν επιθηλιακούς ή βλαστικούς υποδοχείς στην εξωτερική μεμβράνη μετά από την φαγοκύτωση αποπτωτικών καρκινικών κυττάρων προωθώντας την έννοια των «tumacrophages». Αυτά που περιγράφηκαν τελευταία δεν έχουν παρατηρηθεί σε υγιή άτομα καθιστώντας τα πιθανούς στόχους για βιοδείκτες.

Πέρα από τα παραπάνω υπάρχουν ενδείξεις για αλληλεπίδραση των CTCs με δενδριτικά κύτταρα, ινοβλάστες, Κατασταλτικά Κύτταρα της Μυελικής Σειράς και ερυθρά αιμοσφαίρια.

1.1.5 Καρκινικά βλαστοκύτταρα (Cancer stem like cells - CSC)

Τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSCs) είναι ένας τύπος κυττάρων που έχουν την ικανότητα ανανέωσης και δημιουργίας νέων καρκινικών κυττάρων. Ο ρόλος του είναι κρίσιμος στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων, καθώς και στην ανθεκτικότητα στη θεραπεία, την υποτροπή και τη μετάσταση. Εντοπίζονται σε πολλούς τύπους καρκίνων, και η ταυτοποίησή τους βασίζεται στην έκφραση συγκεκριμένων επιφανειακών δεικτών, διαφορετικοί για κάθε τύπο καρκίνου (M. Najafi et al., 2019).

Η προέλευση των καρκινικών βλαστοκυττάρων (CSCs) θεωρείται ότι πηγάζει κυρίως από (Celià-Terrassa & Jolly, 2020; M. Najafi et al., 2019):

- επιγενετικές ή γενετικές αλλαγές, σε φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα ή πρόδρομα κύτταρα όπως μεθυλίωση, απομεθυλίωση, και μεταλλάξεις
- επαναπρογραμματισμός σωματικών κυττάρων
- ενεργοποίηση από το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME-tumor microenvironment) μέσω εξωκυτταρικών σημάτων.

- επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)).

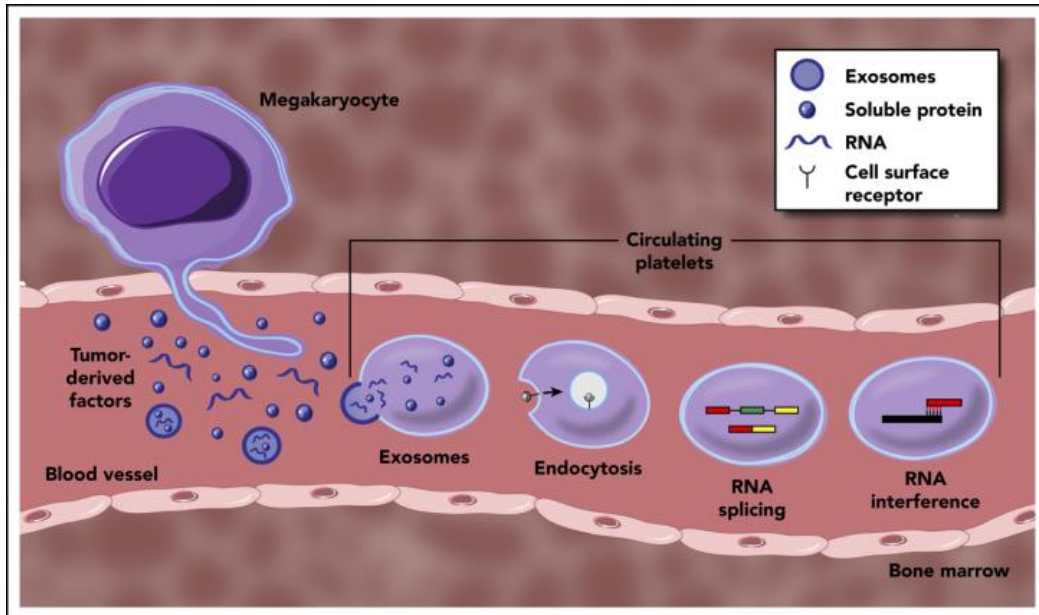
Τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSC) εισέρχονται και αυτά στην κυκλοφορία του αίματος αλλά απαντώνται πιο σπάνια από τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC). Τα καρκινικά βλαστοκύτταρα λόγω ότι μπορούν και αποφεύγουν τον θάνατο από ανοίκωση και να παραμένουν σε κατάσταση αδράνειας ή αυτοφαγίας και επίσης έχουν την δυνατότητα να αναπαράγουν ανεξάρτητα ολόκληρη τη δομή του όγκου, φαίνεται ότι είναι αρκετά ανθεκτικά σε ακατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, οπότε και επιζούν περισσότερο από τα CTCs. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι η ικανότητα αυτή των καρκινικών βλαστοκυττάρων συνδέεται με το μεσεγχυματικό φαινότυπο, αλλά πλέον, τα στοιχεία για την εξαιρετικά υψηλή πλαστικότητα των καρκινικών βλαστοκυττάρων θεωρείται ότι προέρχεται από τον συνδυασμό βλαστικών ιδιοτήτων με επιθηλιακά αλλά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά (Gening et al., 2021).

Για την ανίχνευση των CTCs κυρίως χρησιμοποιούνται επιθηλιακοί δείκτες που όμως παράγουν μεγάλο σφάλμα κυρίως λόγω της μεσεγχυματικής μετάπτωσης που υφίστανται (Mirza et al., 2017), οπότε η έρευνα κατευθύνεται στον συνδυασμό ανίχνευσης δεικτών τόσο από CTCs αλλά και κυκλοφορούντα CSCs ή μόνο από κυκλοφορούντα CSC, όπου γίνεται καταγραφή των ιδιοτήτων τους σε διάφορες μορφές καρκίνων (Gening et al., 2021; Mirza et al., 2017).

1.1.6 Αιμοπετάλια τροποποιημένα από όγκο (Tumor educated platelets TEDs)

Τα αιμοπετάλια έχουν μέγεθος 1-3 μm και είναι θραύσματα από Μεγακαρυοκύτταρα που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος κατά τον κατακερματισμό τους, μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας. Όπως και τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι πολυπληθή, χωρίς πυρήνα και έχουν μέση διάρκεια ζωής 7-10 μέρες όταν δεν έχουν ενεργοποιηθεί. Ενεργοποιούνται όταν απαιτείται να συμβάλλουν στην πήξη του αίματος σε περιπτώσεις ρήξης των αγγείων απελευθερώνοντας μια πληθώρα παραγόντων πήξης και δημιουργώντας ομοτυπικές συστάδες μεταξύ τους. Παρόλο αυτή την σημαντική λειτουργία τους, πολλές φορές ενεργοποιούνται υπό μη φυσιολογικές συνθήκες και επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις ή θρομβώσεις και συμβάλλουν στην ανάπτυξη ασθενειών (Εικόνα 1-11) όπως ο σακχαρώδης διαβήτης

και ο καρκίνος (Best et al., 2018; In 't Veld & Wurdinger, 2019; S. Najafi et al., 2024).



Εικόνα 1-11 Μηχανισμοί που διέπουν τη δημιουργία των TEPs

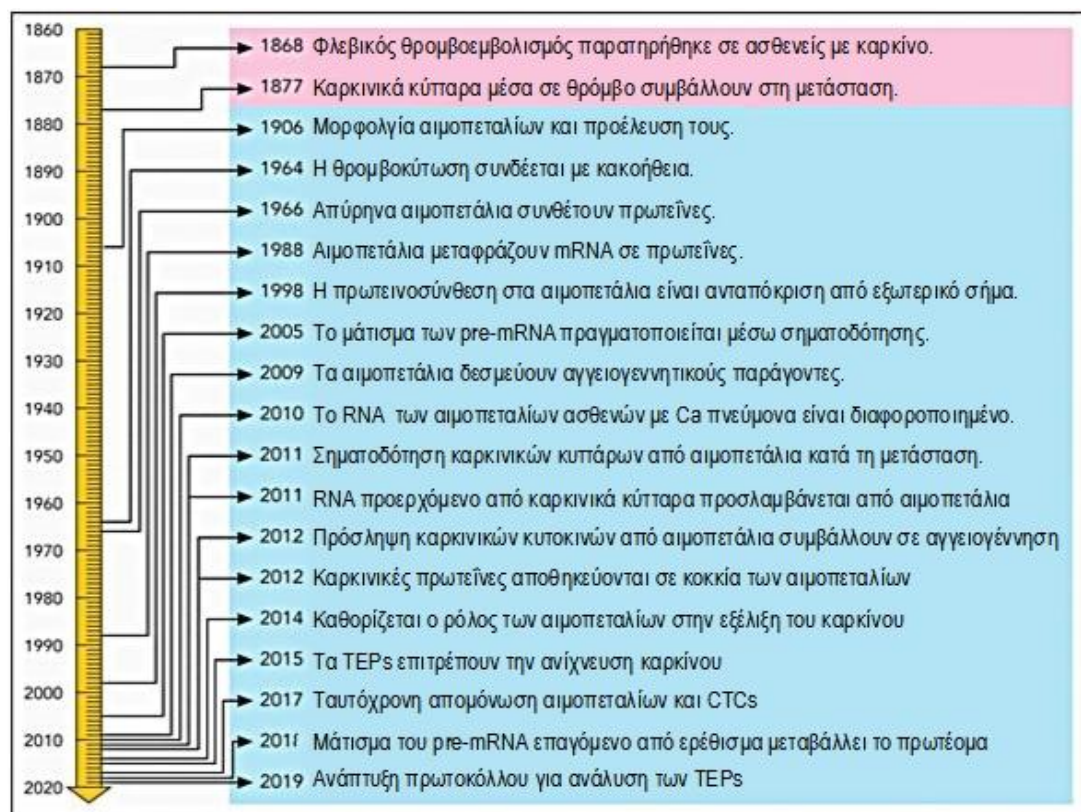
Παράγοντες που εκφράζονται από όγκους και εισέρχονται στην κυκλοφορία μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των ώριμων αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία του αίματος μέσω διαφόρων μηχανισμών.

DOI 10.1182/blood.2019003976.

Η παρατήρηση ότι τα αιμοπετάλια συσχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων ανατρέχει στα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Η πρώτη, το 1868, από τον Trousseau που παρατήρησε ότι η αυθόρμητη πήξη απαντάται συχνά σε καρκινοπαθείς, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αιμοπετάλια επηρεάζονται από τον καρκίνο. Η δεύτερη, το 1877, από τον Billroth που παρατήρησε ότι σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο υπήρχαν θρόμβοι γεμάτοι με συστατικά από όγκους. Από τότε μέχρι σήμερα (Εικόνα 1-12) έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί πολλοί τρόποι με τους οποίους τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας στην έννοια των TEPs (In 't Veld & Wurdinger, 2019). Όπως αναλύθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, η μετάσταση στον καρκίνο περιλαμβάνει την ενδοαγγειακή διήθηση, την αποφυγή των αμυντικών μηχανισμών και του κυτταρικού θάνατο μέσω ανοίκουσας την εξαγγείωση και τον αποικισμό της νέας θέσης. Τα αιμοπετάλια όταν ενεργοποιούνται υπό μη φυσιολογικές συνθήκες συμβάλουν στην εξέλιξη του καρκίνου μέσω την απελευθέρωση κοκκίων που περιέχουν πολλαπλούς αυξητικούς παράγοντες όπως PDGF, VEGF, κυτοκίνες (PF4,

ντερλευκίνη-4) κ.α. αυξάνοντας την αγγειογένεση σε κάποιους καρκίνους και συμβάλλοντας στην αποφυγή του ανοσοποιητικού (S. Najafi et al., 2024; Roweth & Battinelli, 2021).

Περαιτέρω έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη κυκλικών καρκινικών RNA μέσα στα αιμοπετάλια που προέρχεται από συγκεκριμένους ιστούς, όπως EGFRvIII και PCA3 σε ασθενείς με γλοίωμα ή καρκίνο του προστάτη. Επίσης βρέθηκαν τμήματα mRNA του EML4-ALK σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων εντός των αιμοπεταλίων. Θεωρείται ότι το RNA προέρχεται από σύντηξη με καρκινικά



Εικόνα 1-12 Ορόσημα ανακαλύψεων καρκίνου-αιμοπεταλίων

Χρονοδιάγραμμα ορόσημων μελέτης των αιμοπεταλίων σε σχέση με τον καρκίνο.

εξωσώματα ή κυστίδια, αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτή η μεταφορά παραμένει άγνωστος. Επιπλέον, ενώ τμήματα DNA των αντίστοιχων mRNA έχουν ανιχνευτεί στην κυκλοφορία του αίματος, δεν έχουν εντοπιστεί εντός των αιμοπεταλίων, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού επιλεκτικής πρόσληψης RNA, αλλά όχι DNA (Roweth & Battinelli, 2021). Τα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να μεταφράζουν το mRNA σε πρωτεΐνη όπως της

ιντερλευκίνης-1β, B-cell lymphoma-3 και TF (tissue factor). Όταν η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με καρκινικά κύτταρα καταλήγει στην παραγωγή μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που οδηγεί στην προαγωγή της μετάστασης και της εξέλιξης του καρκίνου, τότε αυτά τα τροποποιημένα αιμοπετάλια θεωρούνται ως «εκπαιδευμένα» από καρκινικά κύτταρα, τα TEPs (tumor educated platelets)(S. Najafi et al., 2024; Roweth & Battinelli, 2021). Η «εκπαίδευση» των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιείται κυρίως μέσω άμεσων (face to face) και έμμεσων αλληλεπιδράσεων (virtual education). Από τα σημαντικότερα γεγονότα κατά την αλληλεπίδραση αυτή είναι η αρχική ενεργοποίηση που έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, γνωστή ως tumor-cell induced platelet aggregation (TCIPA). Ωστόσο, οι διαφορετικοί τύποι καρκίνου έχουν τροποποιημένους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της(S. Najafi et al., 2024).

Άμεση Αλληλεπίδραση (face to face)

Σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις, διάφορα μόρια προσκόλλησης (CM / SAM), συμπεριλαμβανομένων των γλυκοπρωτεϊνών, των σελεκτινών και των ιντεγκρινών, εμπλέκονται στην εκπαίδευση των αιμοπεταλίων. Ο φυσιολογικός ρόλος των γλυκοπρωτεϊνών είναι η σωστή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που όμως ανιχνεύονται στην επιφάνεια τόσο των αιμοπεταλίων όσο και των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων οπότε και αλληλεπιδρούν οδηγώντας σε μη φυσιολογική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η καλύτερα μελετημένη είναι η Γλυκοπρωτεΐνη 1b alpha (GP1ba). Από τις Σελεκτίνες η P type εκφράζεται συνεχώς στην εξωτερική μεμβράνη των αιμοπεταλίων και προσδένεται σε υποδοχείς που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά επίσης αλληλεπιδρά άμεσα και με καρκινικά κύτταρα(S. Najafi et al., 2024).

Έμμεση Αλληλεπίδραση (virtual education)

Ο τρόπος αυτός περιλαμβάνει διαδικασίες με τις οποίες τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια χωρίς άμεση, φυσική επαφή όπως την έκκριση μεταβολιτών και ενζύμων στο αίμα ή μέσω διαμεσολαβητών, όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, που με το κατάλληλο ερέθισμα έχουν την δυνατότητα να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Όπως παραδείγματος παρατηρείται έντονα στον παγκρεατικό καρκίνο, όπου τα καρκινικά

κύτταρα εκκρίνουν Θρομβίνη και Θρομβοξάνη A2 που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια. Επίσης η έκκριση ADP, Μυκίνης, Μεταλλοπρωτεϊνάσες κ.ά. που ενεργοποιούν το καθένα από διαφορετικό μονοπάτι τα αιμοπετάλια (S. Najafi et al., 2024).

Φυσικά και δεν τελειώνει η απαρίθμηση των μορίων και σωματιδίων που έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως υποψήφιοι δείκτες για την υγρή βιοψία. Ήδη η χρήση πρωτεϊνών όπως το προστατικό αντιγόνο (PSA), την β-Χοριακή Γοναδοτροπίνη (hCG), το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο CEA, την άλφα εμβρυϊκή σφαιρίνη α-FP κ.α. προτρέπει στην ανίχνευση και άλλων πρωτεϊνών με εφαρμογή νέων πρωτεομικών μεθόδων, αφού η υπάρχουσες αν και χρήσιμες είναι στο προσκήνιο πολλά χρόνια. Το μεγάλο αγκάθι είναι ο θόρυβος από την πληθώρα των διαφορετικών πρωτεϊνών που κυκλοφορούν ταυτόχρονα στα σωματικά υγρά. Έτσι προτείνεται ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων για να υπάρξει εξειδίκευση στην ανίχνευση τους με υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας (Z. Ding et al., 2022).

1.1.7 Εξωκυττάρια Κυστίδια (Extra cellular Vescicles - EVs)

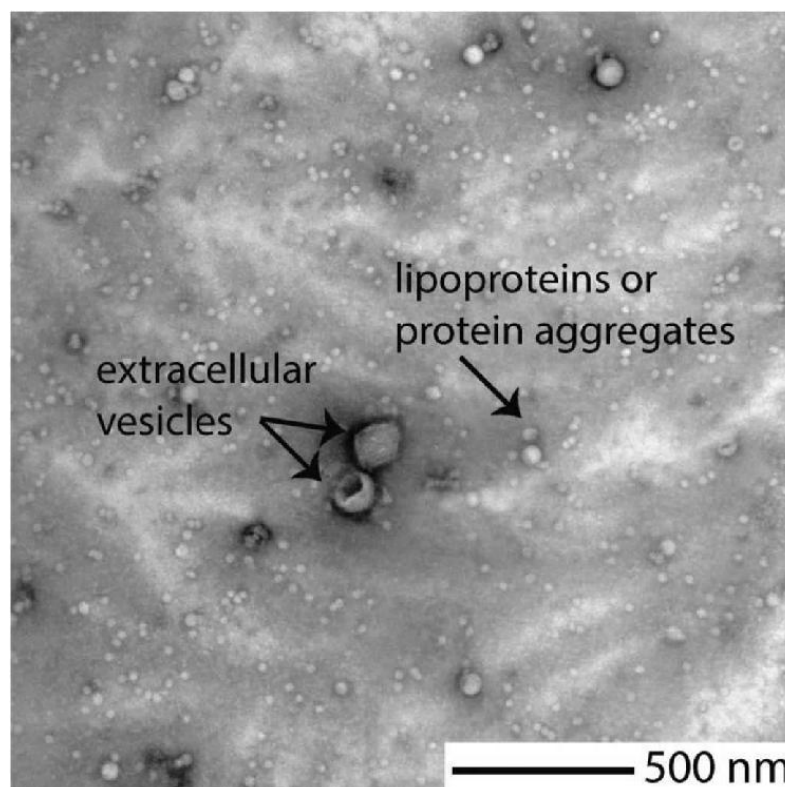
Τα Εξωκυττάρια Κυστίδια (Extracellular Vesicles - EVs) είναι μικροσκοπικά σωματίδια που εκκρίνονται από σχεδόν όλα τα κύτταρα στον εξωκυτταρικό χώρο. Περιβάλλονται από μια διπλή λιπιδική μεμβράνη και το μέγεθός τους κυμαίνεται από περίπου 30 έως 2.000 νανόμετρα (nm) (Εικόνα 1-13). Διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία, καθώς μεταφέρουν βιοδραστικά μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA, RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNA, mRNA και lncRNA) και μεταβολίτες μεταξύ κυττάρων.

Τύποι Εξωκυττάρων Κυστιδίων:

Η Διεθνής Εταιρεία για τα Εξωκυττάρια Κυστίδια (International Society for Extracellular Vesicles - ISEV) διακρίνει τα εξωκυττάρια κυστίδια σε τρεις βασικούς τύπους, με βάση το μέγεθος και τη βιογένεσή τους:

- **Εξωσώματα:** Μικρά σωματίδια (~30–150 nm) που σχηματίζονται μέσω της ενδοσωμικής οδού και εκκρίνονται όταν τα πολυσωματιδιακά σώματα συγχωνεύονται με την κυτταρική μεμβράνη.
- **Μικροσωμάτια:** Μεγαλύτερα σωματίδια (~100–1.000 nm) που εκκρίνονται απευθείας από την κυτταρική μεμβράνη.
- **Αποπτωτικά Σωματίδια:** Τα μεγαλύτερα εξωκυττάρια κυστίδια (~1.000–2.000 nm) που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (αποπτωτικού θανάτου).

Τα Εξωκυττάρια Κυστίδια (EVs) μεταφέρουν χαρακτηριστικά μόρια από τα γονικά κύτταρα, όπως πρωτεΐνες, miRNAs, mRNAs, lncRNAs, DNA και λιπίδια, υποδεικνύοντας την κατάσταση της νόσου τη στιγμή εκείνη. Επίσης έχουν στην μεμβράνη σημαντικά σηματοδοτικά μόρια που περιλαμβάνουν κυρίως τα CD63, CD81, CD9, TSG101 και HSP27. Μπορούν να απομονωθούν από διάφορα σωματικά υγρά, όπως το αίμα, τα ούρα, το σάλιο, το μητρικό γάλα, το σπέρμα, κ.α. (Wang et al., 2024).

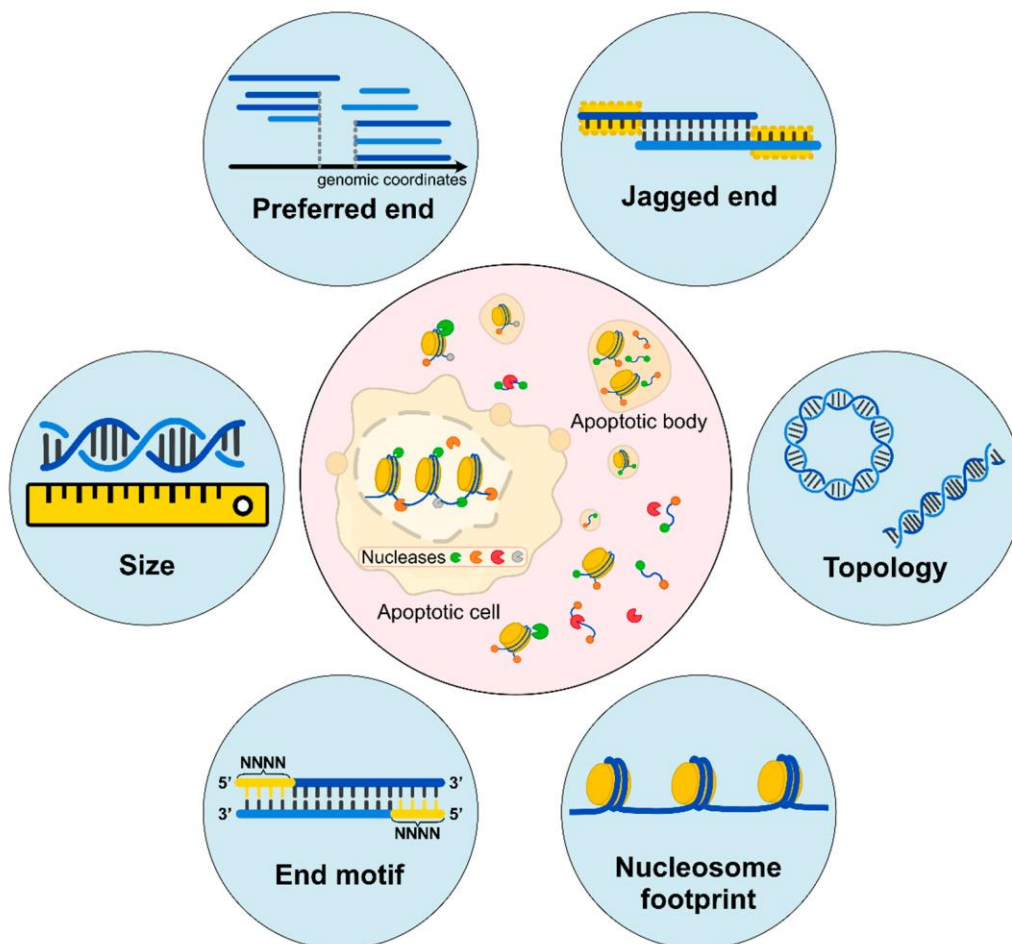


Εικόνα 1-13 εξωκυττάρια κυστίδια στο ανθρώπινο πλάσμα
φωτογραφία εξωκυτταρικών κυστιδίων στο ανθρώπινο πλάσμα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.

<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1557616>

2 Fragmentomics

Το πεδίο αυτό αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα, μετά από τη δημοσίευση της μελέτης του Ivanov et. al.(Ivanov et al., 2015; Qi et al., 2023), όπου παρατηρήθηκαν επαναλαμβανόμενα μοτίβα στο μήκος των θραυσμάτων του DNA που αντανακλούν επιγενετικές ρυθμίσεις στο γονιδίωμα. Στη συνέχειαδείχθηκε ότι το μήκος των θραυσμάτων συνιστά ένα νουκλεοσωμικό αποτύπωμα και μπορούν να συσχετιστούν με τον ιστό από τον οποίο προέκυψαν. Επίσης βρέθηκαν διαφορετικά προφίλ κατακερματισμού του DNA μεταξύ ασθενών με καρκίνο και υγιών ατόμων. Ακόμα,



Εικόνα 2-1 Δομικά χαρακτηριστικά των cfDNA

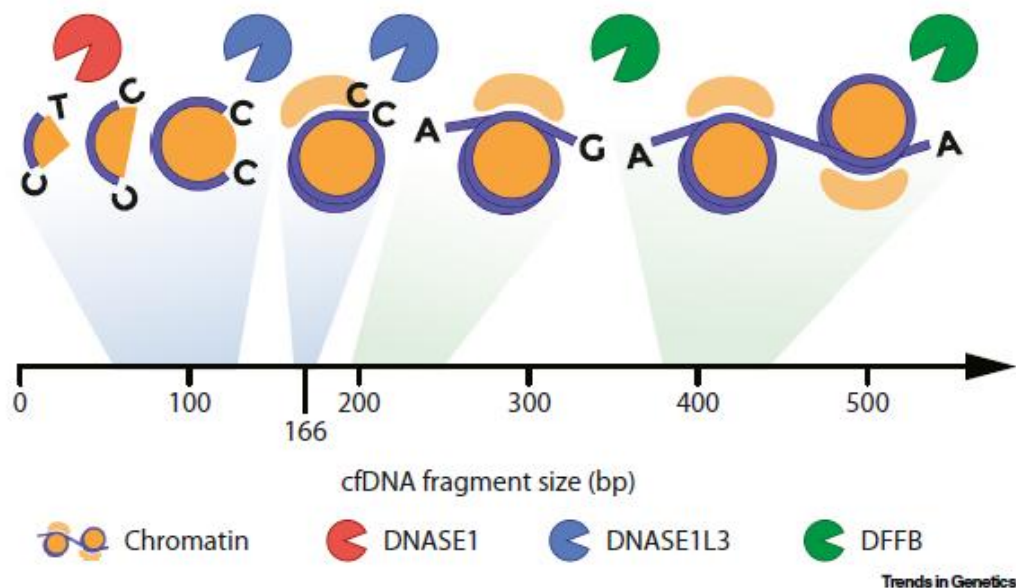
doi.org/10.3390/diagnostics12040978.

εκτός από το μήκος, μελετήθηκαν και άλλα χαρακτηριστικά των θραυσμάτων αυτών όπως, την κατανομή του μήκους των τμημάτων, το μοτίβο των βάσεων στα σημεία θραύσης, τον τρόπο θραύσης (τυφλά ή προεξέχοντα άκρα), αλλά και τα σημεία θραύσης (συντεταγμένες) όπως σχηματικά αποτυπώνονται στην Εικόνα 2-1.

2.1 Ο ρόλος της κατανομής του μήκους των θραυσμάτων του cfDNA

Κατά κύριο λόγο σε υγιή άτομα το cfDNA προέρχονται από τα αιμοποιητικά κύτταρα αλλά ένα μη αμελητέο ποσοστό προέρχεται και από άλλους ιστούς. Το ποσοστό αυτό αλλάζει σε διαφορετικές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Han & Lo, 2021b). Το DNA απομακρύνεται σχετικά γρήγορα από το αίμα με χρόνο ημιζωής εκτιμώμενο από 16 λεπτά ως δύο ώρες. Κύρια οδός απομάκρυνσης του DNA είναι το συκώτι όπου περίπου το 90% πραγματοποιείται εκεί, επίσης απομακρύνεται και μέσω των νεφρών αλλά και αποδομείται από νουκλεάσες (Han & Lo, 2021b).

Η πιο καλά μελετημένη αποπτωτική νουκλεάση είναι η *DNA fragmentation factor B* (DFFB or DFF40), η οποία κατά την απόπτωση απομακρύνεται ο αναστολέας της από κασπάσες και θρυμματίζει αρχικά το DNA σε μακρομοριακά τμήματα και στη συνέχεια σε ολιγονουκλεοσώματα. Η ποσότητα όμως του cfDNA δεν έδειξε να



Εικόνα 2-2 μήκος cfDNA και δραστηριότητα Νουκλεασών

Διαφορετικές νουκλεάσες κόβουν το DNA σε διαφορετικά μεγέθη όπως επίσης και προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.

<https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.005>

Διπλωματική Εργασία

διαφέρει ανάμεσα σε αγρίου τύπου και DFFB – ελλειμματικά ποντίκια, που υποδεικνύει και την δράση και άλλων νουκλεασών. Δύο άλλες νουκλεάσες που είναι γνωστό ότι δρουν στο αίμα είναι οι DNASE1 και DNASE1L3 και είναι υπεύθυνες για τον κύριο όγκο της δραστηριότητας αυτής στο πλάσμα (Han & Lo, 2021b) όπως φαίνεται στην Εικόνα 2-2.

Η DNASE1L3 από μόνη δεν μπορεί να λειτουργήσει καθώς πειράματα έδειξαν ότι η συνέργεια με την DFFB είναι απαραίτητα για να προκύψει η χαρακτηριστική κατανομή του μήκους με κορυφή στα 160 bp αλλά και το προτιμώμενο «κόψιμο» σε άκρα CC. Η παρουσία της DFFB για να κόψει σε τμήματα των 1000 bp είναι απαραίτητη για να λειτουργήσει σε δεύτερο χρόνο η DNASE1L3. Από την άλλη η επίπτωση από την δράση της DNASE1 δεν είναι ξεκάθαρη και τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δρα πάνω σε γυμνό DNA ενώ η παρουσία προσδεδεμένων πρωτεϊνών αναστέλλει την δράση της (Han & Lo, 2021b).

Η διαφορετική κατανομή του μεγέθους του cfDNA ανάμεσα σε υγιή άτομα και σε άτομα διαγνωσμένα με καρκίνο του παγκρέατος αναφέρθηκε από τους Giacona et al. το 1998, βρέθηκε ότι ο αριθμητικός μέσος της κατανομής του cfDNA των υγιών ατόμων ήταν 273 nm ενώ των ασθενών ήταν 185 nm χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αργότερα βρέθηκε ότι το ctDNA (circulating tumor DNA) είναι θρυμματισμένο σε μικρότερα κομμάτια από το cfDNA που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία από μη καρκινικά κύτταρα. Τέλος υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της κατανομής του μεγέθους και της συγκέντρωσης του cfDNA σε σχέση με το μέγεθος του όγκου. Στον Πίνακα 2-1 <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103455> συγκρίνονται οι κατανομές του μεγέθους του cfDNA ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς από διάφορες μελέτες (Udomruk et al., 2021).

Πέρα από το μήκος των θραυσμάτων του γραμμικού cfDNA, ερευνάται και το eccDNA (Extrachromosomal Circular DNA), το οποίο είναι κυκλικό εξωχρωμοσωμικό DNA με ανιχνευμένα μεγέθη κυρίως 202 bp και 338 bp με καθαρά ενδιάμεσα βήματα των 10bp.

Σύγκριση Μεγέθους cfDNA με τον τύπο του καρκίνου ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς

Τύπος Καρκίνου	κατανομή μεγέθους cfDNA			
	Ασθενείς	Υγιείς	Τεχνολογία	Αναφορά
Καρκίνος παχέος εντέρου	<145 bp	~180 bp	AFM και qPCR	Mouliere, 2014
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	<150 bp	150–180 bp	Massive Parallel Seq	Jiang et al., 2015
Μελάνωμα	~145 bp	~165 bp	Xenotransplantation	Underhill et al., 2016
Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων	141–181 bp	164–181 bp	Capillary Electrophoresis (microchip-based)	Yamamoto et al., 2018
Καρκίνος των ωοθηκών	<150 bp	~167 bp	Massive Parallel Seq	Mouliere F., 2018
Χολαγγειοκαρκίνωμα	<150 bp	~167 bp	Massive Parallel Seq	Mouliere F., 2018
Καρκίνος παγκρέατος (τοπικός)	167–173 bp	168–185 bp	Capillary Electrophoresis (microchip-based)	Lapin et al., 2018
Καρκίνος παγκρέατος (προχωρημένο στάδιο)	148–180 bp			
Καρκίνος μαστού (προχωρημένο στάδιο)	>160 bp	160–200 bp	Capillary Electrophoresis (microchip-based)	Panagopoulou, 2019
Καρκίνος μαστού (τοπικός)	22 - 160 bp			
Καρκίνος πνεύμονα (τοπικά προχωρημένος)	~170 bp	120–265 bp	Capillary Electrophoresis (microchip-based)	Abe et al., 2020
Καρκίνος πνεύμονα (εξωθωρακική μετάσταση)	~170 bp και 5 kb			

Συντομογραφίες: cfDNA: ελεύθερο κυκλοφορούν DNA. bp: ζεύγη βάσεων. AFM: Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης. qPCR: Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

Πίνακας 2-1 <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103455>

Πίνακας 2-1

2.2 Το σημείο θραύσης και ο τρόπος θραύσης του cfDNA μπορεί να αποκρυπτογραφηθεί.

2.2.1 Τα σημεία θραύσης (preferred ends) εμφανίζουν μοτίβα τετραμερών βάσεων

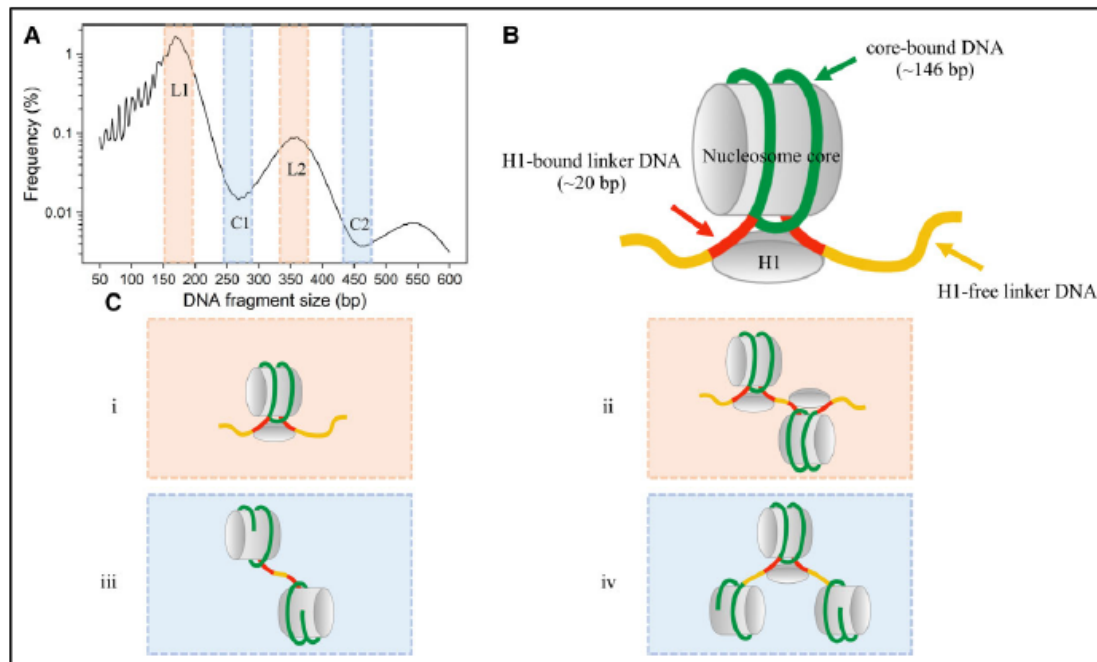
Τα σημεία θραύσης του DNA καθορίζεται από την δράση της νουκλεάσης που το «κόβει». Από τις έρευνες που έγιναν όπως σε μια μελέτη όπου από τα 256 (4⁴) προκύπτοντα μοτίβα ενός τετραμερούς DNA που βρίσκεται 5' άκρο των cfDNA το κορυφαίο μοτίβο που βρέθηκε ήταν αυτό με αλληλουχία CCCT ακολουθούμενο από άλλα πέντε με αλληλουχίες CCTG, CCAG, CCAA, CCAT, και CCTC. Όπως παρατηρείται όλα ξεκινάνε με CC, στη συνέχεια με knockout της DNASE1L3 νουκλεάσης πειράματα σε ποντίκια η συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων αυτών μειώθηκε δραστικά.

Ως βιοδείκτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθένειες όπως τον συστηματικό ερυθρωματώδη λύκο ή το ηπατοκυτταρικό καρκίνο αλλά και στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Η μειωμένη έκφραση mRNA της DNASE1L3 έχει παρατηρηθεί στο ηπατοκυτταρικό καρκίνο και αυτός είναι ο λόγος που παρατηρήθηκε η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων που ξεκινάνε με CC σε αυτούς τους ασθενείς. Παρομοίως όμως έχει παρατηρηθεί αντίστοιχη μείωση της έκφρασης και σε ασθενείς με άλλους καρκίνους (S. C. Ding & Lo, 2022; Zhou et al., 2023).

2.2.2 Οι συντεταγμένες θραύσης του DNA διαφέρουν ανάλογα με τον ιστό προέλευσης.

Οι θέσεις των νουκλεοσωμάτων στο γονιδίωμα δεν είναι ίδιες σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αλλά υπάρχει μια διακύμανση στην αλληλουχία στην οποία είναι προσδεδεμένα. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι κάθε κυτταρικός τύπος έχει διαφορετικό ποσοστό του γονιδιώματος ανοικτό ως ευχρωματίνη για να μπορεί να υπάρχει πρόσβαση σε αυτό από τους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Επίσης στους ίδιους ιστούς και σε διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις, όπως στρες ή διαίρεσης το ποσοστό αυτό μεταβάλλεται. Περαιτέρω έχει διαπιστωθεί ότι το μήκος των 166 bp που αντιστοιχεί στο μέσο τμήμα cfDNA υγιούς ατόμου αντικατοπτρίζει

το DNA που περιβάλλει ένα νουκλεόσωμα μαζί με το linker DNA, ενώ το μήκος των 143 bp είναι αυτό χωρίς το linker DNA (Εικόνα 2-3).



Εικόνα 2-3 Χαρακτηριστικό Μήκος θραυσμάτων cfDNA

(A) Η κατανομή μεγέθους σε αγρίου τύπου ποντίκια, η συχνότητες σε λογαριθμική κλίμακα στον άξονα y. L1 και L2 τα θραύσματα cfDNA με μήκος από 150 έως 200 bp και από 330 έως 380 bp ορίζονται ως cfDNA με συνδετικό DNA (linker DNA). C1 και C2 τα θραύσματα με μήκος από 240 έως 290 bp και από 420 έως 470 bp ορίζονται ως cfDNA που στερείται συνδετικών ακολουθιών DNA.

(B) Η δομή ενός νουκλεοσώματος: Αποτελείται από τον πυρήνα του νουκλεοσώματος, που περιλαμβάνει ένα οκταμερές ιστονών, μια ιστόνη H1, μόρια DNA δεσμευμένα στον πυρήνα, μόρια DNA δεσμευμένα στην H1 και μη δεσμευμένο συνδετικό DNA (linker DNA).

(C) i και ii: Θραύσματα με συνδετικό DNA. iii και iv: Θραύσματα που στερούνται συνδετικών ακολουθιών DNA.

<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac050>

Από τα παραπάνω εικάζεται ότι τα τμήματα που βρίσκονται στο αίμα και παράλληλα αντιστοιχούν σε τμήματα ευχρωματίνης και νουκλεοσωμικών θέσεων μπορούν ίσως να αντιστοιχηθούν με συγκεκριμένους ιστούς και φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις (S. C. Ding & Lo, 2022).

2.2.3 τρόπος θραύσης (τυφλά ή προεξέχοντα άκρα)

Τα τυφλά άκρα των μορίων cfDNA προκύπτουν από την δράση της διαδικασίας επιδιόρθωσης του DNA στο πλάσμα κατά την αλληλούχιση, στην οποία οι προεξοχές στο 5' άκρο συμπληρώνονται και οι προεξοχές στο 3' κόβονται. Για τον

λόγο αυτό τα προεξέχοντα άκρα των θραυσμάτων DNA διέφευγε της παρατήρησης για πολλά χρόνια (Liu, 2022). Η αναγνώριση τους προτείνεται να γίνεται με διάφορες μεθόδους αλλά κυρίως με χρήση μεθυλιωμένων κυτοσινών κατά το βήμα της επιδιόρθωσης, με αυτόν τον τρόπο θα αναγνωρίζονται μεθυλιωμένες κυτοσίνες σε θέσεις εκτός νησίδων CpG που φυσιολογικά σε μεγάλο ποσοστό είναι μη μεθυλιωμένες (S. C. Ding & Lo, 2022). Η αναγνώριση τους ως πιθανούς βιοδείκτες στην ογκολογία και την μαιευτική είναι σχετικά πρόσφατη αν και ακόμα διερευνάται ο μηχανισμός με τον οποίο προκύπτουν αυτά τα προεξέχοντα άκρα (S. C. Ding et al., 2022).

2.2.4 Επιγενετική και Fragmentomics

Όλα τα κύτταρα του οργανισμού δεν είναι όμοια, έχουν υποστεί διαφοροποίηση και επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες αλλά έχουν και διαφορετική εμφάνιση. Όμως το γενετικό τους υλικό είναι ίδιο με εξαίρεση των ωαρίων και σπερματοζωαρίων, και κάποιων κυττάρων του ανοσοποιητικού, αλλά και λόγω μεταλλάξεων κάποιων καρκινικών κυττάρων. Έτσι υπάρχει μια δυσκολία στην αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών που προέρχονται από μη υγιή κύτταρα έναντι του υποβάθρου του DNA από υγιή κύτταρα.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, υπάρχουν περίπου 28 εκατομμύρια γενετικοί τόποι CpG που μπορούν να είναι επιγενετικά μεθυλιωμένοι και με αυτόν τον τρόπο να ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδιώματος αναλόγως του είδους του κυττάρου και την φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση στην οποία βρίσκεται. Συνδυασμός των χαρακτηριστικών των θραυσμάτων του cfDNA και των επιγενετικών τροποποιήσεων μπορεί να δίνει ακριβέστερες πληροφορίες για την προέλευση του cfDNA. Κύρια τεχνική για την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων είναι η δισουλφιδική αλληλούχιση (Bisulfite sequencing), με την οποία μπορεί να ανιχνευτεί η μεθυλίωση σε επίπεδο βάσης, μια τεχνική όμως που καταστρέφει το δείγμα. Έχουν προχωρήσει κάποιες μελέτες που δείχνουν την χρησιμότητα της μεθόδου αυτής:

- στον προγεννητικό έλεγχο με την μητρική εντύπωση του γονιδίου IGF2-H19, των υποκινητών των γονιδίων SERPINB8 και RASSF1A,
- στον καρκίνο που είναι γνωστές πολλές διαφορές στην μεθυλίωση του γονιδιώματος μεταξύ υγιών και καρκινικών κυττάρων.

- Στην μεταμόσχευση οργάνων όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορές στην μεθυλίωση του γονιδιώματος μεταξύ δότη και λήπτη(Lo et al., 2021).

3 Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις για την Ανακάλυψη Βιοδεικτών στην Υγρή Βιοψία

Ένα καθορισμένο χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί και να αξιολογηθεί αντικειμενικά ως ένας δείκτης φυσιολογικής βιολογικής διεργασίας, νοσογόνους διεργασίας ή απόκρισης σε θεραπευτική παρέμβαση ή μετά από έκθεση σε κάποιον παράγοντα.

«A defined characteristic that is measured as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or responses to an exposure or intervention»(Califf, 2018; Strimbu & Tavel, 2010).

The National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group

Η έννοια του βιοδείκτη και ο ορισμός του δεν θα πρέπει να συγχέονται με την απευθείας μέτρηση για το πώς αισθάνεται, λειτουργεί ή επιβιώνει ένα άτομο. Το τελευταίο είναι γνωστό ως COA – clinical outcome assessment δηλαδή η αξιολόγηση της κλινικής έκβασης και χρησιμοποιείται για την άμεση αξιολόγηση του ασθενούς και της θεραπευτικής προσέγγισης. Οι βιοδείκτες υποστηρίζουν ένα ευρύ φάσμα σκοπών και ένας από αυτούς είναι η σύνδεση μιας μέτρησης με μια πρόβλεψη της αξιολόγησης της κλινικής έκβασης(Califf, 2018).

Οι βιοδείκτες μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω σε κατηγορίες, όπως προγνωστικοί, διαγνωστικοί, παρακολούθησης, θεραπευτικοί, κλπ. Στην Εικόνα 3-1 αποτυπώνεται η χρήση κάθε κατηγορίας βιοδείκτη κατά την πορεία μιας ασθένειας. Το BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource τους οργανώνει σε επτά κατηγορίες: ευαισθησίας / κίνδυνου, διαγνωστικοί, παρακολούθησης, προγνωστικοί, προδιάθεσης, φαρμακοδυναμικής / ανταπόκρισης και ασφάλειας(Califf, 2018).



Εικόνα 3-1 Κατηγορίες Βιοδεικτών

Η χρήση βιοδεικτών κατά την πορεία μιας ασθένειας <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.01.1616>

- **Διαγνωστικοί βιοδείκτες:** Οι βιοδείκτες αυτοί μπορούν να διαγνώσουν ή να επιβεβαιώσουν μια ασθένεια ή κατάσταση, ή να ταυτοποιήσουν μια παραλλαγή της ασθένειας.
- **Βιοδείκτες παρακολούθησης:** Αυτοί οι βιοδείκτες θα πρέπει να μπορούν να μετρώνται επαναλαμβανόμενα για να μπορεί να αξιολογηθεί: η πορεία μιας ασθένειας ή μιας κατάστασης, η ανίχνευση της έκθεσης από ένα ιατρικό προϊόν ή περιβαλλοντικό παράγοντα, ή η ανίχνευση της επίδρασης από ένα ιατρικό προϊόν ή βιολογικό παράγοντα.
- **Προγνωστικοί βιοδείκτες:** Ένας προγνωστικός βιοδείκτης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό σε άτομα με μια ασθένεια ή ιατρική κατάσταση, της πιθανότητας: ενός κλινικού συμβάντος, επανεμφάνισης της ασθένειας ή της εξέλιξης της.
- **Βιοδείκτες προδιάθεσης:** όταν ανιχνεύεται ή παρατηρείται αλλαγή στην τιμή του τότε χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη ότι ένα άτομο ή μια ομάδα ατόμων είναι πιο πιθανό να έχουν ευνοϊκότερη ή δυσμενέστερη επίδραση από την έκθεση σε ένα ιατρικό προϊόν ή περιβαλλοντικό παράγοντα.
- **Βιοδείκτες ευαισθησίας/κίνδυνου:** Υποδεικνύουν την πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας ή ιατρικής κατάστασης σε άτομα που δεν έχουν κλινικά εμφανή ασθένεια ή κάποια ιατρική κατάσταση.

Παρόλο που αυτή η διάκριση δεν είναι ομοιόμορφα αποδεκτή, οι ομάδες εργασίας του BEST κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι προγνωστικοί βιοδείκτες θα πρέπει να διαχωρίζονται από τους βιοδείκτες ευαισθησίας/κινδύνου, οι οποίοι σχετίζονται με τη μετάβαση από υγιή κατάσταση σε ασθένεια.
- **Βιοδείκτες φαρμακοδυναμικής / ανταπόκρισης:** Χρησιμοποιούνται όταν παρακολουθείται η αντίδραση ενός οργανισμού στην έκθεση σε ένα ιατρικό/φαρμακευτικό προϊόν ή περιβαλλοντικό παράγοντα.
- **Βιοδείκτες ασφάλειας:** λαμβάνεται η τιμή τους πριν ή και μετά από την έκθεση σε ένα ιατρικό/φαρμακευτικό προϊόν ή σε έναν περιβαλλοντικό παράγοντα για να μετρηθεί η πιθανότητα, η παρουσία ή η έκταση της τοξικότητας του ως παρενέργεια(Califf, 2018).

3.1 Αναζητώντας κατάλληλους Βιοδείκτες και τρόποι ταυτοποίησης τους.

Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών είναι μια επίπονη διαδικασία, καθώς θα πρέπει ένας βιοδείκτης να έχει συγκεκριμένες ιδιότητες, Θα πρέπει να είναι είτε δυαδικός (θετικό / αρνητικό), είτε να ποσοτικοποιείται χωρίς υποκειμενικά κριτήρια και να μπορεί να εφαρμοστεί στην καθημερινή ιατρική πρακτική με εύλογο χρόνο διεκπεραίωσης. Ο βιοδείκτης θα πρέπει να έχει κλινική ευαισθησία και ειδικότητα και να είναι σχετικά εύκολα ανιχνεύσιμος (Ou et al., 2021)

Η διαδρομή από την ανακάλυψη έως την κλινική χρήση ενός βιοδείκτη είναι ανάλογη αυτή ενός φάρμακου, αργή και επίπονη, που όμως μπορεί να διαιρεθεί σε επιμέρους βήματα ή φάσεις. Η κύρια χρήση ενός βιοδείκτη, δηλαδή αν θα είναι προγνωστικός ή διαγνωστικός κλπ., είναι επιτακτικό να καθοριστεί νωρίς στην εξέλιξη του όπως τα δείγματα και οι ασθενείς που θα επιλεγούν πρέπει να αντικατοπτρίζουν την χρήση του βιοδείκτη και τον πληθυσμό στον οποίο στοχεύει, δηλαδή όπως ορίζεται στην στατιστική το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό (Ou et al., 2021).

Κύρια σημεία που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την μελέτη βιοδεικτών ιδίως κατά την χρήση αρχειοθετημένων δειγμάτων είναι:

*το πόσο αντιπροσωπευτικό έναντι του πληθυσμού είναι το δείγμα,
ο αριθμός των δειγμάτων έναντι του αριθμού των γεγονότων,
ο επιπολασμός της νόσου
η αναλυτική αξιοπιστία του τεστ
και η επαναληψιμότητα.*

Βασικότερο σημείο που πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή είναι η μεροληψία, που είναι και η βασικότερη αιτία αποτυχίας επικύρωσης ενός βιοδείκτη. Η μεροληψία είναι η συστηματική απομάκρυνση από την αληθινή τιμή μιας μέτρησης και μπορεί να παρεισφρήσει κατά το στάδιο της επιλογής ασθενών, κατά την συλλογή των δειγμάτων, κατά την ανάλυση και κατά την αξιολόγηση. Δύο από τους βασικότερους τρόπους μείωσης της μεροληψίας είναι η τυχαιοποίηση και η τυφλοποίηση της μελέτης που θα πρέπει να ενσωματώνονται σε όλα τα στάδια όπου είναι δυνατόν (Ou et al., 2021) Εικόνα 3-2.

Στον ιστότοπο EQUATOR network υπάρχει μια εκτεταμένη συλλογή από οδηγίες για τον σχεδιασμό και την ανάρτηση διαγνωστικών και προγνωστικών μελετών (<https://www.equator-network.org>).



Εικόνα 3-2 Πορεία ανάπτυξης Βιοδεικτών

Απλοποιημένο διάγραμμα εξέλιξης και ανάπτυξης βιοδεικτών σε όλα τα στάδια

<https://doi.org/10.1016/i.itho.2021.01.1616>

Η ταυτοποίηση και αναγνώριση προγνωστικών βιοδεικτών μπορεί γίνει μέσω καλά σχεδιασμένων αναδρομικών μελετών (αυτές που βασίζονται σε πραγματοποιημένα γεγονότα), οι οποίες δεν βασίζονται αποκλειστικά σε δείγματα ευκολίας (δηλαδή δείγματα εύκολα και άμεσα προσβάσιμα), αλλά διενεργούνται και με δείγματα που έχουν συλλεχθεί από μια ομάδα αντιπροσωπευτική του πληθυσμού-στόχο, καθώς και με μελέτες ασθενών-μαρτύρων, κ.α. Στη συνέχεια ο εντοπισμός του βιοδείκτη θα μπορούσε να επιτυγχάνεται μέσω στατιστικής ανάλυσης για την αξιολόγηση της συσχέτισης της τιμής του βιοδείκτη και του κλινικού αποτελέσματος.

Οι προβλεπτικοί βιοδείκτες χρειάζεται να αναγνωριστούν μέσω δευτερογενών αναλύσεων με δεδομένα από ολοκληρωμένες τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές, με τη χρήση ενός στατιστικού μοντέλου για την ανίχνευση ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ της θεραπείας και του υπό μελέτη βιοδείκτη. Ακολούθως θα πρέπει με αναλυτικές μεθόδους και τις κατάλληλα επιλεγμένες στατιστικές αναλύσεις να επιβεβαιωθούν οι φυσιολογικές / παθολογικές τιμές, τα αποδεκτά όρια σφάλματος, την διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα και άλλα όπως αναλύονται παρακάτω:

Μια μελέτη που αξιολογεί ένα διαγνωστικό τεστ για την ανίχνευση μιας ασθένειας εξετάζει άτομα που πάσχουν και άτομα που δεν πάσχουν από την ασθένεια. Το αποτέλεσμα του τεστ μπορεί να είναι θετικό (δηλώνοντας την παρουσία της ασθένειας) ή αρνητικό (δηλώνοντας την απουσία της ασθένειας). Ωστόσο, τα αποτελέσματα του τεστ ενδέχεται να μην αντιστοιχούν πάντα στην πραγματική κλινική κατάσταση κάθε ατόμου. Έτσι τα αποτελέσματα μπορούν να καταταχθούν ως:

Αληθώς Θετικά (ΑΘ) : τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε νοσούντα άτομα που το τεστ δείχνει θετικό.

Ψευδώς Θετικά (ΨΘ) : τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε υγιή άτομα που το τεστ δείχνει θετικό.

Αληθώς Αρνητικά (ΑΑ) : τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε υγιή άτομα που το τεστ δείχνει αρνητικό.

Ψευδώς Αρνητικά (ΨΑ) : τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε νοσούντα άτομα που το τεστ δείχνει αρνητικό.

Λαμβάνοντας τις τιμές των παραπάνω ποσοτήτων μπορεί κανείς στη συνέχεια να υπολογίσει τις παρακάτω ποσότητες:

Διαγνωστική Ευαισθησία (Sensitivity)

Η εκατοστιαία αναλογία των αληθώς θετικών προς το σύνολο των νοσούντων:

$$\frac{\text{Αληθώς Θετικά}}{\text{Αληθώς Θετικά} + \text{Ψευδώς Αρνητικά}} \times 100$$

δηλαδή η πιθανότητα να είναι θετικό το τεστ δεδομένου ότι το άτομο νοσεί, οπότε σε ένα τεστ με υψηλή ευαισθησία, ένα αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποκλειστεί η νόσηση.

Διαγνωστική Ειδικότητα (Specificity)

Η εκατοστιαία αναλογία των αληθώς αρνητικών προς το σύνολο των υγιών:

$$\frac{\text{Αληθώς Αρνητικά}}{\text{Αληθώς Αρνητικά} + \text{Ψευδώς Θετικά}} \times 100$$

δηλαδή η πιθανότητα να είναι αρνητικό το τεστ δεδομένου ότι το άτομο είναι υγιές, οπότε σε ένα τεστ με υψηλή ειδικότητα, ένα θετικό αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιωθεί η νόσηση.

Διαγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος (Positive predictive Value):

Η εκατοστιαία αναλογία των αληθώς θετικών προς το σύνολο των θετικών

$$\frac{\text{Αληθώς Θετικά}}{\text{Αληθώς Θετικά} + \text{Ψευδώς Θετικά}} \times 100$$

Και εκφράζει την πιθανότητα ένα θετικό αποτέλεσμα ορθώς να ανιχνεύει την παρουσία της νόσου.

Διαγνωστική αξία αρνητικού αποτελέσματος (Negative predictive Value):

Η εκατοστιαία αναλογία των αληθώς αρνητικών προς το σύνολο των αρνητικών

$$\frac{\text{Αληθώς Αρνητικά}}{\text{Αληθώς Αρνητικά} + \text{Ψευδώς Αρνητικά}} \times 100$$

Και εκφράζει την πιθανότητα ένα αρνητικό αποτέλεσμα ορθώς να μην ανιχνεύει την παρουσία της νόσου.

Καμπύλη ROC (receiver operating characteristics)

Είναι μια μεθοδολογία που σκοπό έχει να βρεθεί η βέλτιστη τιμή μεταξύ διαγνωστικής ευαισθησίας και διαγνωστικής ειδικότητας. Αποτυπώνεται ως η γραφική παράσταση της Ευαισθησίας (αληθώς θετικών) έναντι της 1- ειδικότητας (ψευδώς θετικών) και το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη μας δίνει την διαγνωστική αξία, όσο μεγαλύτερο τόσο μεγαλύτερη η διαγνωστική αξία. Επίσης μπορούν να συγκριθούν δύο ή και περισσότερα διαγνωστικά τεστ μεταξύ τους.

Πέρα των παραπάνω υπάρχουν και άλλες ποσότητες όπως η αποτελεσματικότητα (efficiency), ο λόγος πιθανοφάνειας θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος κ.λ.π(Ou et al., 2021; Σκορίλας Ανδρέας, 2020).

3.2 Η Επικύρωση των Βιοδεικτών είναι απαραίτητη για την χρήση τους στην κλινική πράξη.

Η διαδικασία επικύρωσης των βιοδεικτών γίνεται για να διαπιστωθεί ότι η απόδοση ενός τεστ, οργάνου, ή διαδικασίας λειτουργεί εντός αποδεκτών ορίων για τον σκοπό που θα χρησιμοποιηθεί. Η διαδικασία της επικύρωσης περιλαμβάνει την εσωτερική και εξωτερική επικύρωση (αξιολόγηση).

Με την εσωτερική επικύρωση ενός βιοδείκτη διαπιστώνεται η απόδοση του βιοδείκτη μέσα από τα δεδομένα με τα οποία αναπτύχθηκε. Η αξιολόγηση θα πρέπει να επιτυγχάνεται με μεθόδους επαναδειγματοληψίας, όπως bootstrapping ή cross-validation. Με την εξωτερική αξιολόγηση διαπιστώνεται η απόδοση του βιοδείκτη με χρήση δεδομένων ανεξάρτητων από αυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη και ανάπτυξη του. Να σημειωθεί ότι για την εξωτερική αξιολόγηση θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικές τοποθεσίες ή χώρες όπως και από διαφορετικούς χρόνους. Μια άλλη κατηγοριοποίηση επικύρωσης είναι ή αναλυτική και ή κλινική επικύρωση.

Με την αναλυτική επικύρωση, η χρήση στατιστικών μεθόδων παρόμοιων με αυτών που περιγράφηκαν παραπάνω στην ταυτοποίηση βιοδεικτών, όπως η διαγνωστική ευαισθησία, διαγνωστική ειδικότητα, κ.λπ. αλλά επιπλέον και η αναλυτική ευαισθησία, αναλυτική ειδικότητα, η διακρισιμότητα, η ανιχνευσιμότητα κ.α. Σκοπός της αναλυτικής επικύρωσης είναι η διασφάλιση της απόδοσης του βιοδείκτη σε

τεχνικό επίπεδο ώστε να αποδίδει συνεπείς μετρήσεις ανεξαρτήτως εργαστηρίου, τοποθεσίας, προσωπικού κ.λπ. και όχι η χρησιμότητα του. Η κλινική επικύρωση από την άλλη, επιδιώκει την καθιέρωση μεταξύ του βιοδείκτη και του καταληκτικού σημείου ενδιαφέροντος και επιπλέον να αποδείξει την χρησιμότητα του ως βιοδείκτη. Επιτυγχάνεται με εξωτερική επικύρωση, η οποία περιλαμβάνει την αναδρομική χρήση δεδομένων από μελέτες που η αξιολόγηση του βιοδείκτη δεν περιλαμβανόταν στους αρχικούς στόχους της μελέτης, ή και με νέες προοπτικές μελέτες. Γενικά όμως η εδραίωση της ωφελιμότητας ενός βιοδείκτη ή φαρμάκου απαιτεί την διεξαγωγή προοπτικών μελετών ώστε να φανεί ότι η χρήση του βιοδείκτη μεταφράζεται σε κλινικό όφελος.

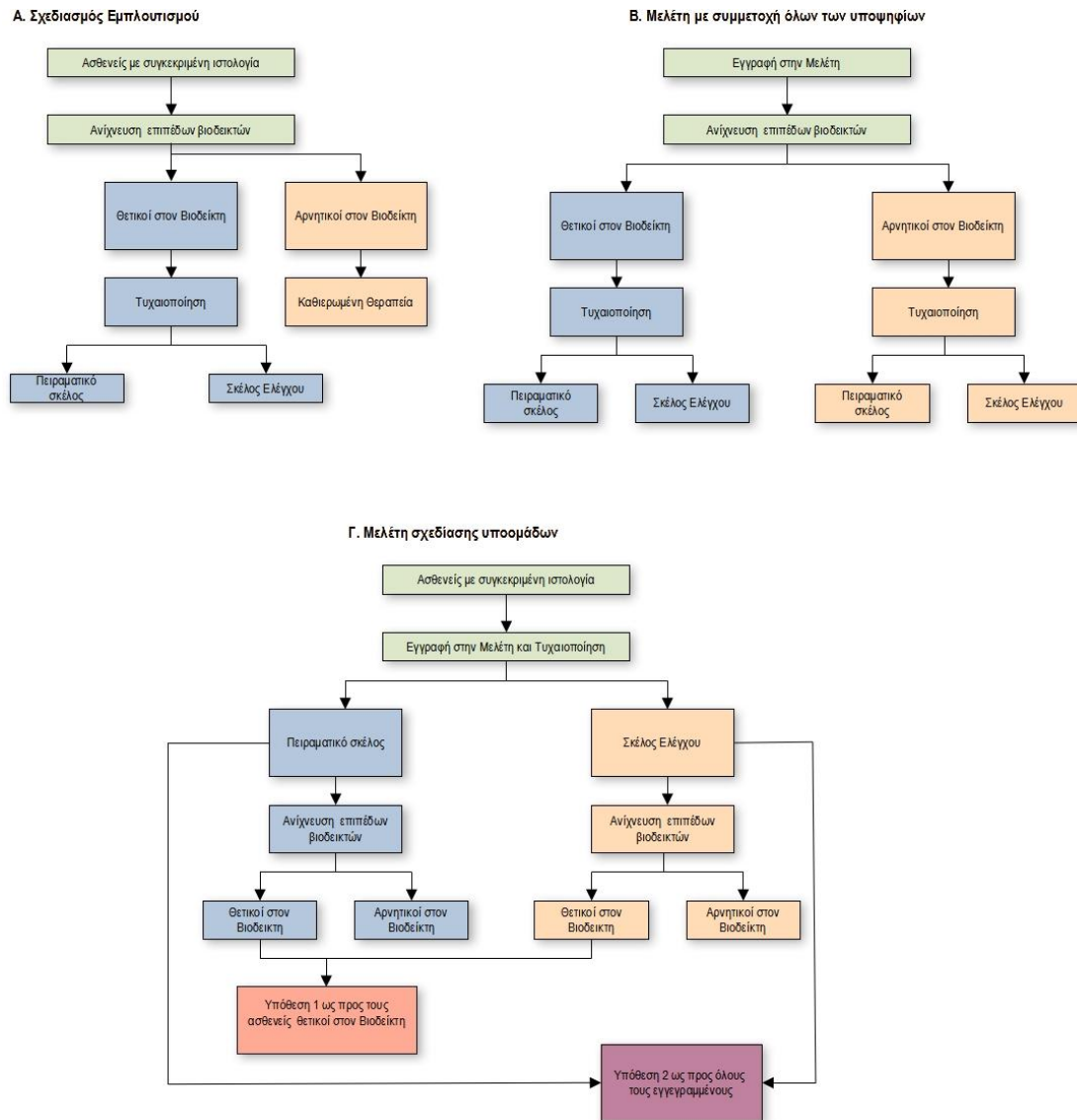
Περιγραφή διεξαγωγής μελετών

Μια μελέτη που διεξήχθη στα πλαίσια επικύρωσης ενός βιοδείκτη είναι η μελέτη **MILD**(Sozzi et al., 2014). Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα τυχαιοποιημένο προοπτικό μοντέλο όπου εγγράφηκαν 4099 άτομα, πρώην και νυν καπνιστές χωρίς ιστορικό καρκίνου. Λήφθηκαν δείγματα αίματος κατά την εγγραφή αλλά και κατά την διάρκεια της μελέτης για την αξιολόγηση ενός ανιχνευτή microRNA. Ο ανιχνευτής εντόπιζε συγκεκριμένα σημεία του microRNA όπου και ανάλογα με την έκβαση του ατόμου λάμβανε μια τιμή, η όλη διαδικασία ήταν τυφλοποιημένη. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση όπου χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το αξιολόγηση, βιοδεικτών είναι:

Σχεδιασμός εμπλουτισμού(Rosell et al., 2012).

Σε αυτές τις μελέτες γίνεται δειγματοληψία και ανίχνευση σε όλους τους διαθέσιμους ασθενείς αλλά εγγράφονται στην μελέτη μόνο όσοι έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Εικόνα 3-3Α). Η μέθοδος αυτή επιλέγεται όταν ο επιπολασμός του βιοδείκτη είναι χαμηλός. Παράδειγμα τέτοιας μελέτης είναι η μελέτη EURTAC, που συνέβαλε στην έγκριση από τον FDA της χρήσης του erlotinib ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με μεταλλάξεις στο γονίδιο EGFR. Από 1227 ασθενείς που ελέγχθηκαν επιλέχθηκαν οι 174 με

μεταλλάξεις στο γονίδιο EGFR ώστε να λάβουν θεραπεία είτε με erlotinib είτε με την καθιερωμένη θεραπεία.



Εικόνα 3-3 Διαγράμματα ροής μελετών ανακάλυψης και επικύρωσης Βιοδεικτών

Διαγράμματα ροής τριών τύπων μελετών: Α. Σχεδιασμός εμπλουτισμού, Β. Μελέτη με συμμετοχή όλων των υποψηφίων, Γ. Μελέτη σχεδίασης υποομάδων

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.01.1616>

Μελέτη με συμμετοχή όλων των υποψηφίων(Allinson, 2018).

Αυτού του τύπου οι μελέτες επιλέγονται όταν το όφελος της θεραπείας πρέπει να μελετηθεί τόσο σε αυτούς που έχουν το επιθυμητό χαρακτηριστικό αλλά και σε αυτούς που απουσιάζει (Εικόνα 3-3B). Αρχικά γίνεται ανίχνευση σε όλους τους ασθενείς, και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε ομάδες ανάλογα με το αν κατέχουν το χαρακτηριστικό ή όχι και στη συνέχεια γίνεται η προκαθορισμένη ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Μια τέτοια μελέτη είναι και η MARVEL TRIAL (N0723, NCT00738881), όπου εγγράφηκαν 1197 ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μετά από την θεραπεία πρώτης γραμμής. Από αυτούς λήφθηκαν δείγματα και κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα την έκφραση του EGFR όπως αποτυπώνεται μετά από επεξεργασία (FISH) fluorescence in situ hybridization των χρωμοσωμάτων. Στη συνέχεια οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν και κάποιοι λάβανε erlotinib και άλλοι pemetrexed. Στη συνέχεια οι δύο ομάδες, η ομάδα θετική στο FISH και η άλλη ομάδα αρνητική στο FISH συγκρίθηκαν και εξάχθηκαν αποτελέσματα αν υπάρχει διαφορά στην θεραπεία μεταξύ των δύο φαρμάκων όταν υπάρχει θετικότητα στην εξέταση FISH.

Μελέτη σχεδίασης υποομάδων(Hoering et al., 2008)

Αυτός ο σχεδιασμός προσφέρει πλεονεκτήματα όταν υπάρχουν ενδείξεις ότι η πειραματική θεραπεία θα είναι πιο αποτελεσματική όταν εφαρμόζεται σε ασθενείς με τον βιοδείκτη ενδιαφέροντος, αλλά θα μπορούσε επίσης να έχει επίδραση και στο σύνολο των ασθενών (Εικόνα 3-3Γ). Οι μελέτες αυτές για να επιτύχουν τον σκοπό τους, χρησιμοποιούν στον σχεδιασμό τους πολλαπλές υποθέσεις. Όλοι οι ασθενείς με μια συγκεκριμένη ασθένεια τυχαιοποιούνται να λάβουν είτε πειραματική θεραπεία είτε την καθιερωμένη θεραπεία, αλλά ορίζονται επιπλέον ξεχωριστοί στόχοι για τη αποτελεσματικότητα της πειραματικής θεραπείας αναμένεται στην υπό-ομάδα των ασθενών που επιλέχθηκαν με τον βιοδείκτη, και για όλους τους εγγεγραμμένους ασθενείς.

Μια τέτοια μελέτη που διεξήχθη είναι η Southwest Oncology Group S0819 που σκοπό είχε να δείξει ότι η ενίσχυση του σήματος του EGFR μπορεί να ταυτοποιήσει

ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που θα έχουν όφελος στην θεραπεία με αντισώματα EGFR σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Τυχαιοποιήθηκαν 1313 ασθενείς σε θεραπεία με Cetuximab με χημειοθεραπεία έναντι σε αυτούς μόνο με χημειοθεραπεία. Το αποτέλεσμα έδειξε στασιμότητα στην εξέλιξη της νόσου στους ασθενείς με μετάλλαξη στον EGFR και αυξημένη επιβίωση στον συνολικό πληθυσμό.

Πέρα των παραπάνω υπάρχουν και άλλου τύπου κλινικών μελετών ή και συνδυασμοί τους ώστε να διερευνηθούν ή να επικυρωθούν βιοδείκτες. Αν και υπάρχουν στην βιβλιογραφία αρκετές προτεινόμενες μέθοδοι και τεχνικές, όμως δεν υπάρχει μια κοινή οδηγία για την επικύρωση ενός βιοδείκτη που να είναι εφαρμόσιμη σε όλες τις πλατφόρμες (Hickford et al., 2023). Πιθανοί λόγοι που συνέβαλλαν στην αποτυχία εφαρμογής κοινής πολιτικής είναι ότι παρότι έχουν εκδοθεί κάποιες αναθεωρήσεις και review papers, αυτά προέρχονται κυρίως από τον τομέα των παθολόγων και δεν εγκολπώνεται η ανομοιογένεια στην χρήση των μεθόδων της ιστοπαθολογίας στην ανακάλυψη βιοδεικτών. Τα σημαντικότερα ζητήματα που απέτυχαν να συζητηθούν είναι τα παρακάτω:

- Οι δημοσιευμένες συστάσεις και τα white papers (λευκές βίβλοι) περισσότερο επικεντρώνονται σε μεμονωμένες τεχνολογικές πλατφόρμες, στις οποίες δεν ενσωματώνονται οι ανάγκες ενός σύγχρονου εργαστηρίου βιοδεικτών.
- Ανάμεσα στις διαφορετικές πλατφόρμες, δεν έχει επιτευχθεί κάποια ευθυγράμμιση στις συστάσεις επικύρωσης δοκιμασιών βιοδεικτών
- Υπάρχει εμφανής έλλειψη σαφήνειας ανάμεσα στα βιοαναλυτικά εργαστήρια σχετικά με τον τρόπο εφαρμογής κοινών πρακτικών επικύρωσης δοκιμασιών βιοδεικτών με βάση το Πλαίσιο Χρήσης (context of use – COU, δηλαδή ο σκοπός για τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί ο βιοδείκτης), με αποτέλεσμα ασυνέπειες εντός των οργανισμών αλλά και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χορηγών και των διαφόρων οργανισμών σύμβασης για έρευνες (CRO), με αποτέλεσμα την αβεβαιότητα σχετικά οδηγίες των ρυθμιστικών αρχών.

Σύμφωνα με το εξαιρετικό άρθρο των Hickford et.al. (Hickford et al., 2023), όπου περιγράφεται μια προσέγγιση για την εναρμόνιση των μεθοδολογιών, παρακάτω θα

γίνει μια περιγραφή του τοπίου στο αναπτύσσονται οι βιοδείκτες και τα κύρια σημεία της προσέγγισης αυτής.

Στο υπάρχον πλαίσιο, διάφοροι βιοδείκτες αξιολογούνται με χρήση διαφόρων αναλυτικών πλατφόρμων και μεθόδων για την ανάπτυξη νέων θεραπειών. Ο τρόπος μέτρησης και αξιολόγησης των βιοδεικτών μπορεί να καταστεί ιδιαίτερα πολύπλοκος λόγω παραγόντων όπως η μοριακή ετερογένεια, ο μεγάλος αριθμός υποψήφιων μορίων, ο ιστός προέλευσης και η θέση στο σώμα, το εύρος της αλλαγής της τιμής του βιοδείκτη μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων κ.λπ. Αυτό περιορίζει την επίδραση των κανονιστικών οδηγιών επί των φαρμακοκινητικών μελετών λόγω ότι θα πρέπει να επικυρώνονται βάσει της επιστημονικής προσέγγισης FFP (Fit For Purpose) βασισμένη στο Πλαίσιο Χρήσης (context of use – COU). Αν και έχουν δημοσιευθεί αρκετά άρθρα σε αυτό το αντικείμενο, υπάρχουν αρκετά σημεία που θα πρέπει συζητηθούν στον τρόπο που θα πρέπει να εφαρμοστεί στην ανάπτυξη φαρμάκων. Επιπλέον τα περισσότερα άρθρα επικεντρώνονται σε μια συγκεκριμένη τεχνική (π.χ. LC-MS, κυτταρομετρία ροής, δοκιμασίες πρόσδεσης, κ.α.)(Hickford et al., 2023).

Το Πλαίσιο Χρήσης (context of use – COU)

Ο καθορισμός του πλαισίου χρήσης ενός βιοδείκτη πρέπει να προηγείται της έναρξης διαδικασιών επικύρωσης ενός βιοδείκτη. Δηλαδή να καθορίζεται για κάθε βιοδείκτη ο τρόπος χρήσης των δεδομένων που θα προκύψουν και ο σκοπός ανάπτυξης του. Όπως αποτυπώνεται και στο γλωσσάρι του BEST:

“A statement that fully and clearly describes the way the medical product development tool is to be used and the medical product development-related purpose of the use.”

Στη συνέχεια απαιτείται η δημιουργία ενός εγγράφου προδιαγραφών που να καταγράφονται οι απαιτήσεις του πλαισίου χρήσης μαζί με πληροφορίες για τον βιοδείκτη όπως την βιολογία του, τους αναλυτικούς και προ αναλυτικούς παράγοντες και τον σχεδιασμό της μελέτης. Ακολούθως θα πρέπει να μεταφραστούν τα παραπάνω στις απαιτούμενες διαδικασίες της μελέτης από το τμήμα της βιοανάλυσης σε συνεργασία με το τμήμα ανάπτυξης του βιοδείκτη. Επιπλέον το τμήμα βιοανάλυσης σε συνεργασία με ειδικούς στις τεχνολογικές πλατφόρμες σχεδιάζουν την μέθοδο επικύρωσης, υπολογίζεται το εύρος της απόδοσης, και το επίπεδο αυστηρότητας της επικύρωσης(Hickford et al., 2023).

Επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων

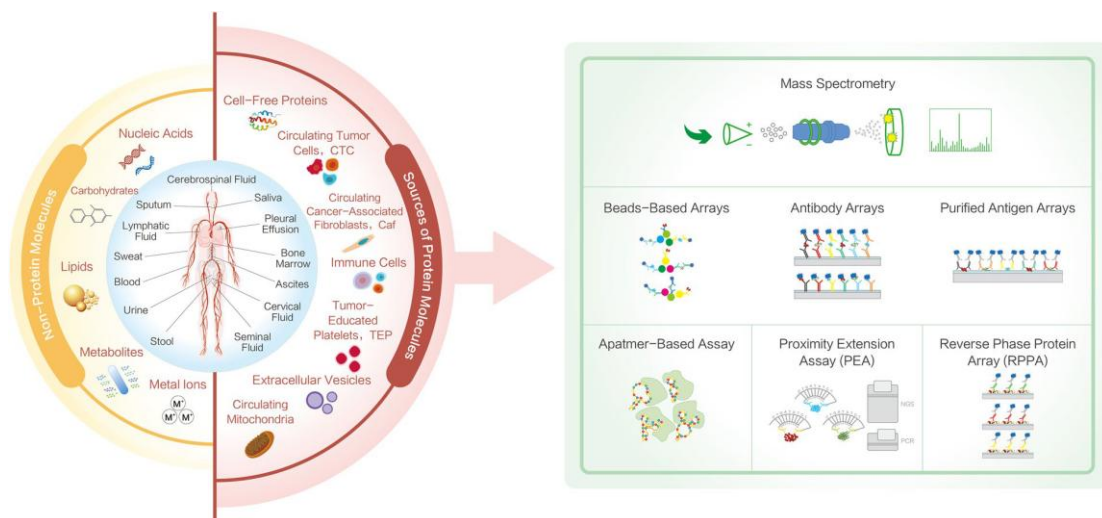
Η βάση της προσέγγισης αυτής είναι ότι το πλαίσιο χρήσης (COU) καθορίζει την αυστηρότητα με την οποία εφαρμόζεται η διαδικασία επικύρωσης όπως, αριθμός επαναλήψεων, χειριστές, χρήση προκαθορισμένων κριτηρίων απόδοσης, ενώ η βιοαναλυτική πλατφόρμα ορίζει της τεχνικές παραμέτρους επικύρωσης. Όλες οι παράμετροι που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη αναλυτική πλατφόρμα λαμβάνονται υπόψη, ανεξάρτητα από το πλαίσιο χρήσης (COU). Μεταξύ διαφορετικών αναλυτικών πλατφορμών οι τεχνικές δυνατότητες διαφέρουν οπότε θα χρειάζεται διαφορετική προσέγγιση για την επικύρωση όσο αφορά τις παραμέτρους των βιοδεικτών. Για να υπερκεραστεί αυτό το πρόβλημα θα πρέπει να υπάρχουν οδηγοί διαχείρισης για κάθε πλατφόρμα για τον τρόπο αξιολόγησης των παραμέτρων αυτών(Hickford et al., 2023).

3.3 Η συνεισφορά της τεχνολογίας και οι νέες τεχνικές που εφαρμόζονται από την ανακάλυψη ως την εφαρμογή των Βιοδεικτών.

Ανάλογα με το είδος του βιοδείκτη όπως, πρωτεΐνη, DNA, RNA, χρωμόσωμα, μεταβολίτης κυτταρικό σωματίο κλπ. είναι απαραίτητη η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου συλλογής, απομόνωσης, εμπλουτισμού, ανάλυσης του. Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει μια μικρή ανασκόπηση των τεχνολογιών που προσφέρονται για την ανάλυση δειγμάτων στην υγρή βιοψία.

3.3.1 Πρωτεομική

Αν και δεν αναφέρθηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια, οι πρωτεΐνες ήδη διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο ως βιοδείκτες και παρά την επικέντρωση των ερευνών στην υγρή βιοψία στα νουκλεϊκά οξέα, η πρωτεϊνική ανάλυση εξακολουθεί να έχει κρίσιμη σημασία, καθώς οι πρωτεΐνες επιτελούν τον κύριο ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες και αποτελούν τους άμεσους στόχους σε πολλές θεραπείες. Η προοπτική που προσφέρει η εκτενής ανάλυση των πρωτεϊνών και του πρωτεόματος



Εικόνα 3-4 Επισκόπηση πρωτεωμικών τεχνολογιών

Επισκόπηση των τεχνολογιών πρωτεωμικής ανάλυσης στις υγρές βιοψίες για τον καρκίνο:
(αριστερά) Στον εσωτερικό μπλε δακτύλιο παρουσιάζονται οι πηγές όλων των τύπων βιολογικών υγρών, όπως αίμα, ούρα, κόπρανα, κλπ. Ο εξωτερικός δακτύλιος είναι δίχρωμος, υποδεικνύοντας μη πρωτεϊνικές (κίτρινο) και πρωτεϊνικές (κόκκινο) πηγές μορίων που θεωρούνται πιθανοί βιοδείκτες.
(Δεξιά) Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται κυρίως : περιλαμβάνουν τη φασματομετρία μάζας, τις πρωτεϊνικές διατάξεις αντίστροφης φάσης (reverse phase protein array), τις διατάξεις αντισωμάτων/αντιγόνων/σφαιριδίων (antibody arrays/antigen arrays/beads arrays), τις αναλύσεις εγγύτητας (proximity extension assay) και τις αναλύσεις απταμερών (aptamer assay).

Δ<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>

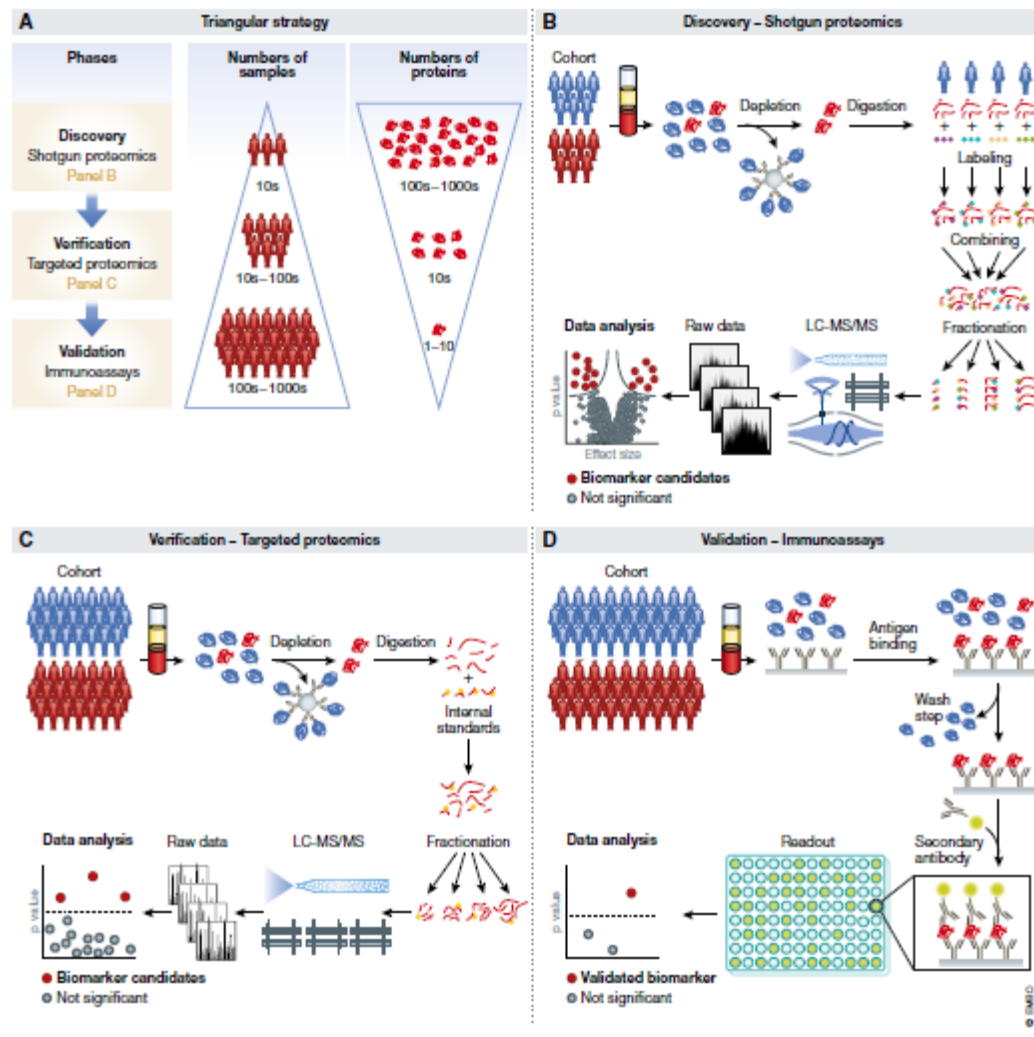
είναι πολυδιάστατη (Εικόνα 3-4), παρέχοντας σημαντικές δυνατότητες για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών με ενισχυμένη ικανότητα προσδιορισμού του ιστού ή του οργάνου προέλευσης συγκριτικά με τα νουκλεϊκά οξέα ή ένας συνδυασμός αυτών (Z. Ding et al., 2022).

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, οι ερευνητές εργάζονται στην αύξηση της διαστατικότητας των προφίλ πρωτεϊνικών βιοδεικτών, είτε μέσω ανάλυσης του πλήρους πρωτεώματος είτε με εστίαση στις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ενώ στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζονται περίπου 22.000 έως 25.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, το πρωτέωμα υπολογίζεται να περιλαμβάνει πάνω από ένα εκατομμύριο διαφορετικές πρωτεϊνικές μορφές μέσω διαφόρων επιγενετικών ρυθμίσεων, ματίσματος του RNA και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, καθιστώντας την ανάλυσή του πολύ πιο απαιτητική σε σύγκριση με το γονιδίωμα. Επιπλέον, λόγω της υψηλής μεταβλητότητας του πρωτεώματος, το οποίο ανταποκρίνεται δυναμικά σε διάφορα ερεθίσματα, η ανάλυση του ίδιου δείγματος δύο φορές είναι πρακτικά αδύνατη, σε αντίθεση με το γονιδίωμα που παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα και αργές μεταβολές (Z. Ding et al., 2022).

Η ζήτηση για νέους πρωτεϊνικούς βιοδείκτες στην υγρή βιοψία και οι αδιαμφισβήτητες δυνατότητες της πρωτεωμικής έχουν ωθήσει σε σημαντική πρόοδο τα τελευταία χρόνια, με τεχνολογικές βελτιώσεις και την ανάπτυξη καινοτόμων μεθοδολογιών που διευκολύνουν την εις βάθος μελέτη του πρωτεώματος και τη μεγιστοποίηση της αποδοτικότητάς του.

Η προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών με μεθόδους πρωτεωμικής συνοψίζεται μέσω δύο στρατηγικών, της διαδοχικής ή τριγωνικής και της ορθογώνιας (Geyer et al., 2017):

Η διαδοχική ή τριγωνική στρατηγική (Εικόνα 3-5), περιλαμβάνει διάφορες φάσεις όπου σε αυτές, ο αριθμός των ατόμων αυξάνεται προοδευτικά από λίγους σε πολλούς,



Εικόνα 3-5 Διαδοχική ή τριγωνική στρατηγική

(Α) Πρώτο στάδιο: Ένας σχετικά μικρός αριθμός περιπτώσεων και μαρτύρων αναλύεται με μεθόδους hypothesis-free discovery proteomics, παρέχοντας ιδανικά ποσοτικοποίηση χιλιάδων πρωτεϊνών. Δεύτερο στάδιο: Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται διαφορετικά εξετάζονται σε ομάδες μέτριου μεγέθους με στοχευμένες πρωτεωμικές μεθόδους. Τρίτο στάδιο: Για μία ή λίγες από τις εναπομένουσες πρωτεΐνες, αναπτύσσονται ανοσοανλύσεις, οι οποίες επικυρώνονται σε μεγάλες ομάδες και εφαρμόζονται στην κλινική πράξη.

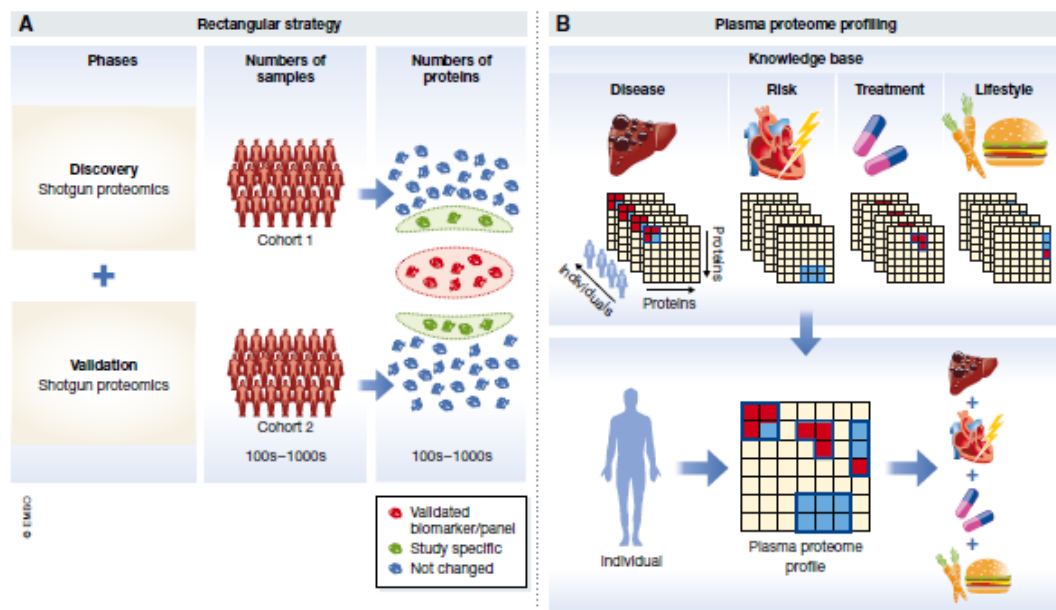
(Β) Ροή εργασιών για ανακάλυψη πρωτεωμικής χωρίς υποθέσεις: Εξερεύνηση του πρωτεϊνικού προφίλ με σκοπό την ανεύρεση υποψηφίων πρωτεϊνών βιοδεικτών.

(C) Στοχευμένη πρωτεωμική: Ποσοτική ανάλυση επιλεγμένων πρωτεϊνών για την αξιολόγηση της καταλληλότητάς τους.

(D) Ανάπτυξη ανοσοανλύσεων για κλινική επικύρωση και εφαρμογή: Δημιουργία και επικύρωση διαγνωστικών εργαλείων που βασίζονται σε πρωτεΐνες για χρήση στην κλινική πράξη.

DOI 10.15252/msb.20156297

ενώ ο αριθμός των πρωτεϊνών μειώνεται από εκατοντάδες ή χιλιάδες σε λίγες. Με αυτό το σύστημα επιτρέπεται η σταδιακή επεξεργασία δεδομένων και η συνεχή εστίαση στους καλύτερα υποσχόμενους βιοδείκτες, επιταχύνοντας έτσι τη διαδικασία αναγνώρισης και επικύρωσης των πιο κατάλληλων πρωτεϊνών για περαιτέρω κλινική διερεύνηση (Geyer et al., 2017). Η ορθογώνια στρατηγική (Εικόνα 3-6) στοχεύει στην υιοθέτηση μιας ταχείας και αυτοματοποιημένης διαδικασίας για εις βάθος ποσοτική ανάλυση του πρωτεώματος, η οποία αποτυπώνει τον μέγιστο δυνατό αριθμό πρωτεϊνών σε όσο το δυνατόν περισσότερους συμμετέχοντες και υπό ποικίλες συνθήκες. Σε αντίθεση με την τριγωνική προσέγγιση, η ορθογώνια στρατηγική



Εικόνα 3-6 Ορθογώνια στρατηγική

(A) Στη φάση ανακάλυψης, μια μεγάλη ομάδα εξετάζεται με στόχο την όσο το δυνατόν πληρέστερη κάλυψη του πρωτεώματος. Στη φάση επικύρωσης, αναλύεται μια άλλη ομάδα για να επιβεβαιωθούν οι υποψήφιοι βιοδείκτες, χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνολογία και παρόμοιο μέγεθος ομάδας. Τελικά μόνο οι πρωτεΐνες που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και στις δύο μελέτες (πορτοκαλί αντί για πράσινο κύκλος στο δεξί μέρος του πίνακα A) θεωρούνται επικυρωμένοι βιοδείκτες.

(B) Προφίλ πρωτεώματος πλάσματος από διαφορετικές καταστάσεις όπως τρόπος ζωής, ασθένεια, θεραπεία κλπ, θα δημιουργήσει μια βάση δεδομένων που συνδέει τις αλλαγές των πρωτεϊνών με συγκεκριμένες καταστάσεις (άνωτερο πάνελ). Το προφίλ του πρωτεώματος ενός ατόμου μπορεί έπειτα να αποδομηθεί χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες και τους αλγόριθμους που συνδέονται με τη βάση δεδομένων (κατώτερο πάνελ).

DOI 10.15252/msb.20156297

περιλαμβάνει αρχικά έναν μεγάλο αριθμό συμμετεχόντων — εκατοντάδες ή και χιλιάδες — αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες ανίχνευσης διαφορετικών προτύπων με ικανότητα διάκρισης μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων ή καταστάσεων. Ο αυξημένος αριθμός πρωτεϊνικών προφίλ επιτρέπει την αναγνώριση μικρών, αλλά στατιστικά σημαντικών διαφορών σε ομάδες πρωτεϊνών.

Στην προτεινόμενη ορθογώνια στρατηγική, τόσο η ομάδα ανακάλυψης όσο και η ομάδα επικύρωσης υποβάλλονται σε λεπτομερή ανάλυση μέσω shotgun πρωτεωμικής, εξαλείφοντας την εξάρτηση της διαδικασίας επικύρωσης από τη φάση ανακάλυψης και επιτρέποντας τη συνδυασμένη ανάλυση των δύο ομάδων. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μελέτης και διευκολύνει την αναγνώριση τόσο μεμονωμένων βιοδεικτών όσο και σύνθετων πρωτεϊνικών μοτίβων, τα οποία σχετίζονται με συγκεκριμένες καταστάσεις υγείας ή νόσου, κάτι που δεν επιτυγχάνεται μέσω της τριγωνικής στρατηγικής.

Φασματομετρία μάζας (MS-mass spectrometry)

Μια από τις κυρίαρχες τεχνικές για ανάλυση πρωτεϊνών είναι η χρήση φασματογράφου μάζας. Τα όργανα αυτά διαχωρίζουν ιοντισμένα σωματίδια βάση του λόγου μάζας – φορτίου τους. Υπάρχουν διάφοροι φασματογράφοι μάζας που βασίζονται σε διαφορετικές αρχές λειτουργίας, όμως τα βασικά μέρη παραμένουν κοινά:

Η πηγή ιόντων: το τμήμα αυτό παράγει θραύσματα και τα ιοντίζει ώστε να εισέλθουν στον αναλυτή. Υπάρχουν πολλοί τρόποι ιοντισμού που κατηγοριοποιούνται σε σκληρούς και μαλακούς ιοντισμούς. Ο σκληρός ιοντισμός παράγει περισσότερα και μικρότερα θραύσματα ενώ ο μαλακός ιοντισμός παράγει λιγότερα και μεγαλύτερα θραύσματα

Ο αναλυτής: είναι αυτός που διαχωρίζει τα θραύσματα βάση του λόγου μάζας–φορτίου τους και όπως αναμένεται υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι, όπως ο αναλυτής χρόνου πτήσης (time of flight -TOF), το τετραπολικό φίλτρο (quadrupole), Παγίδες ιόντων (ion traps), το Orbitrap κλπ.

και ο ανιχνευτής: που καταγράφει την παρουσία των ιόντων και συνήθως είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής που μετατρέπει το σήμα των ιόντων σε φωτόνια που στη συνέχεια ενισχύονται και καταγράφονται.

Στην φασματομετρία μάζας πολύ συχνά για μεγαλύτερη ανάλυση και μικρότερη καταστροφή του δείγματος τίθενται διαδοχικά περισσότεροι του ενός φασματογράφοι μάζας (tandem MS), ίδιου ή και διαφορετικού τρόπου λειτουργίας και επίσης μπορεί αντί ενός ανιχνευτή να τοποθετηθεί χρωματογράφος, πιο συχνά υγρής χρωματογραφίας. Μία υποθετική τέτοια διεργασία περιλαμβάνει τη διάσπαση του δείγματος ακολουθούμενη από τιτλοδότηση των πεπτιδίων στη συνέχεια τα αραιωμένα θραύσματα πεπτιδίων ιονίζονται και χαρακτηρίζονται σε έναν αναλυτή μάζας. Λόγω όμως των πολύπλοκων χαρακτηριστικών των σωματικών υγρών, ειδικά του αίματος, έχουν καταβληθεί προσπάθειες να αυξηθεί ο αριθμός των πρωτεϊνών που μπορούν να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια (Z. Ding et al., 2022).

Περαιτέρω, η πρωτεϊνική φασματομετρία μάζας (Protein MS) μπορεί γενικά να ταξινομηθεί σε μη στοχευμένη πρωτεωμική ανάλυση (untargeted) και στοχευμένη πρωτεωμική ανάλυση (targeted). Στόχος της μη στοχευμένης πρωτεωμικής ανάλυσης είναι η σχεδόν πλήρης κάλυψη του πρωτεώματος, δηλαδή η ταυτοποίηση και/ή ποσοτικοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων πρωτεϊνών. Η αυξανόμενη εφαρμογή μέτρων ποιοτικού ελέγχου στις ροές εργασίας της μη στοχευμένης πρωτεωμικής ανάλυσης έχει συμβάλει στην αποδοχή αυτής της προσέγγισης ως αξιόπιστης τεχνολογίας για την ανακάλυψη βιοδεικτών από την επιστημονική κοινότητα.

Η στοχευμένη πρωτεωμική ανάλυση έχει επίσης σημειώσει σταθερή πρόοδο όσον αφορά τη χρήση της στην ανακάλυψη και ανάλυση βιοδεικτών. Στην πραγματικότητα, η στοχευμένη πρωτεωμική ανάλυση ονομάστηκε ως "Μέθοδος της Χρονιάς" από το περιοδικό Nature Methods το 2012, ακριβώς λόγω της καταλληλότητάς της για επαλήθευση υποψηφίων βιοδεικτών και κλινικές εφαρμογές (Sobsey et al., 2020). Η τεχνική φασματομετρίας πολλαπλής/επιλεγμένης αντίδρασης (Multiple/selected reaction monitoring MS - MRM/SRM-MS) προσφέρει μικρότερους χρόνους ανάλυσης σε σύγκριση με παρόμοιες τεχνολογίες, εκτεταμένες δυνατότητες πολλαπλής ανάλυσης (multiplexing), καθώς και ταχύτητα, ευαισθησία και ποσοτική ακρίβεια κατά την ανάλυση βιομορίων και επιπλέον υψηλή

αναπαραγωγιμότητα που απαιτείται στην κλινική έρευνα. Προσφάτως η τεχνική φασματομετρίας μαζών παράλληλης παρακολούθησης αντιδράσεων (parallel reaction monitoring-PRM-MS), παρουσιάζει παρόμοια ή βελτιωμένα χαρακτηριστικά με το επιπλέον πλεονέκτημα ότι τα φάσματα ιόντων υψηλής ανάλυσης μπορούν να φιλτραριστούν μετά την καταγραφή, για την εξαγωγή συγκεκριμένων ιχών ιόντων σχεδόν απουσία θορύβου(Z. Ding et al., 2022; Sobsey et al., 2020).

Ένα βασικό πλεονέκτημα της φασματομετρίας μαζών (MS) για την υγρή βιοψία είναι ότι επιτρέπει την ανάλυση χωρίς αρχικές υποθέσεις (πρωτέωμα και με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις), καθιστώντας την ως προτιμώμενη προσέγγιση στα πρώτα στάδια ανακάλυψης βιοδεικτών. Σήμερα, στην κλινική πρωτεωμική ανάλυση, υπάρχει η δυνατότητα να χαρακτηριστούν μερικές εκατοντάδες έως και πάνω από χίλιες πρωτεΐνες σε μία μη στοχευμένη ανάλυση MS σε ορό ή πλάσμα, ενώ στην ανάλυση MS ούρων, μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα αρκετές χιλιάδες στόχοι λόγω της σημαντικά λιγότερο πολύπλοκης πρωτεϊνικής σύνθεσης. Στην πρωτεωμική ανάλυση με βάση το αίμα, το δύσκολο έργο είναι η απόσβεση του θορύβου λόγω της τεράστιας περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες του αίματος(Z. Ding et al., 2022).

Μικροσυστοιχίες αντισώματος/αντιγόνου (antibody/antigen arrays)

Οι διατάξεις με μικροσφαιρίδια (bead-based arrays) και οι διατάξεις σε επίπεδη επιφάνεια τύπου sandwich ELISA παρότι χρησιμοποιούνται ευρέως και στην κλινική πρακτική, το αναλυτικό τους πεδίο περιορίζεται κυρίως σε μεσαίο ή χαμηλό και επομένως δεν θα αναφερθούν περαιτέρω. Από την άλλη οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων, ως ένα από τα πρώιμα αναπτυγμένα εργαλεία στοχευμένης πρωτεωμικής ανάλυσης, έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα πλαίσια σε πρωτεωμικές μελέτες. Αυτές οι μικροσυστοιχίες προσφέρουν τη δυνατότητα στοχευμένης ανάλυσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, καθιστώντας τις χρήσιμες για τη διερεύνηση διαφόρων βιοδεικτών, αν και η δυνατότητα πολλαπλών αναλύσεων είναι συχνά περιορισμένη συγκριτικά με άλλες τεχνικές υψηλότερης ανάλυσης.

Μια τυπική διάταξη μικροσυστοιχιών περιλαμβάνει την ακινητοποίηση συγκεκριμένων αντισωμάτων μέσω ομοιοπολικού δεσμού, δεσμού συγγένειας ή φυσικής μονιμοποίησης πάνω σε ειδικά επεξεργασμένα επίπεδα υποστρώματα. Στην

ανάλυση υψηλής πολλαπλότητας (high-plex) δηλαδή την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών βιοδεικτών, που συνήθως περιλαμβάνει αρκετές εκατοντάδες στόχους, τα δείγματα συνήθως επισημαίνονται με φθορίζουσες, χημειοφωταυγείς ή ετικέτες ολιγομερών για να ενισχύονται και να ανιχνεύονται διαφορετικά σήματα. Με αυτή την μέθοδο μπορούν να χαρακτηριστούν πάνω από χίλιες πρωτεΐνες με ελάχιστη διασταυρούμενη ανοσολογική αντίδραση. Επίσης οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων έχουν εξαιρετική ειδικευση, ξεπερνώντας τα ζητήματα ευαισθησίας που συναντώνται στις μη στοχευμένες πρωτεωμικές τεχνικές (Z. Ding et al., 2022).

Οι μικροσυστοιχίες αντιγόνων, γνωστές επίσης και ως λειτουργικές μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών (functional protein arrays), αποτελούν ακόμα μία τεχνική υψηλής απόδοσης στην πρωτεωμική ανάλυση, και η εφαρμογή τους στην έρευνα χρησιμοποιείται ευρέως. Οι λειτουργικές μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών ξεκινούν με την μονιμοποίηση πρωτεϊνών/πεπτιδίων, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα του πρωτεώματος υπό διερεύνηση, όπου στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμεύουν ως δόλωμα για την δέσμευση αναλυτών καθώς αυτοί πλημυρίζουν την μικροσυστοιχία. Θεωρητικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών (τροποποιήσεις πρωτεϊνών - PTMs), λιπίδια, κύτταρα, νουκλεϊκά οξέα και αντισώματα, κ.α. Η πιο εκτενής μικροσυστοιχία του ανθρώπινου πρωτεώματος καλύπτει ένα μεγάλο εύρος του (21.000 μορφές πρωτεϊνών), καθιστώντας την ένα ισχυρό εργαλείο για την απόκτηση ενός πανοραμικού στιγμιότυπου της πρωτεωμικής ανάλυσης του αίματος. Αν και οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων/αντιγόνων είναι εξαιρετικό εργαλείο εξερεύνησης του σερολογικού προφίλ των αυτοαντισωμάτων (AAb), η επεκτασιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα, η απόκλιση των αποτελεσμάτων και το κόστος παραμένουν τα μεγάλα μειονεκτήματα (Z. Ding et al., 2022).

Ανάλυση με χρήση απταμερών (Aptamer-based assays)

Τα απταμερή (aptamer) είναι μικρά μονόκλωνα τμήματα DNA ή RNA, ή πεπτίδια που λόγω της δομής τους αναδιπλώνονται σε διάφορες δομές. Όταν αναδιπλωθούν σε συγκεκριμένη τριτοταγή δομή, δεσμεύονται σε αντίστοιχους πρωτεϊνικούς στόχους με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα. Η συγγένεια που προκύπτει δεν είναι μόνο χημική αλλά προκύπτει και από την δομή τους όπου ο στόχος πρέπει να έχει και αυτός το κατάλληλο σχήμα για να εισχωρήσει στην θέση δέσμευσης. Δημιουργούνται

μέσω μιας διεργασίας ονομαζόμενη SELEX (Sequential Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) όπου σε έναν προτεινόμενο στόχο παρουσιάζονται διάφορα τυχαία δείγματα ολιγομερών και αυτά που δεσμεύονται επιλέγονται ενώ τα υπόλοιπα απορρίπτονται, περαιτέρω με την διαδικασία αυτή μπορούν να επιλεγούν και απταμερή με διαφορετικό βαθμό συγγένειας.

Μια μέθοδος για την αναγνώριση νέων βιοδεικτών είναι με την χρήση τροποποιημένων απταμερών ονομαζόμενη SOMA (slow off-rate modified aptamers), όπου σε αυτή την μέθοδο τα απταμερή μονιμοποιούνται με φωτοδιασπώμενα μόρια και συνδέονται με σημασμένους φθορίζοντες ανιχνευτές. Στη συνέχεια με αυτές τις δομές αλιεύονται οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος και ακολούθως γίνεται φωτοδιάσπαση και καθαρισμός. Στις πρωτεΐνες που έχουν απομείνει δεσμευμένες στα απταμερή γίνεται ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμός μέσω συμβατικών τεχνικών. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα απταμερή σε σχέση με τα αντισώματα, είναι υψηλότερη συγγένεια και ειδικότητα, και μπορούν να παρασκευαστούν και να επιλεγούν με ευκολία με μικρές παραλλαγές στην αλληλουχία τους από παρτίδα σε παρτίδα, παρέχοντας μια οικονομικά αποδοτική λύση. Στην πορεία και για την αύξηση της αναλυτικής ποικιλίας των απταμερών εισήχθησαν χημικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια, που μιμούνται πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων που με αυτόν τον τρόπο βελτιώνουν τις δεσμευτικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, η ειδικότητα των απταμερών βελτιώθηκε επίσης σημαντικά με την χρήση ειδικών ανταγωνιστών που να δεσμεύουν μη ειδικούς προσδέτες, διατηρώντας παράλληλα υψηλούς ρυθμούς δέσμευσης για τους πραγματικούς στόχους. Παρόλο που ο αριθμός των απταμερών για εμπορικούς σκοπούς έχουν ξεπεράσει τις 7000, η δυσκολία παρασκευής τους για πρωτότυπους στόχους τους αποτελεί ένα μειονέκτημα έναντι της χρήσης αντισωμάτων (Z. Ding et al., 2022).

Ανάλυση με την μέθοδο PEA (Proximity Extension Assay)

Η μέθοδος Proximity Extension Assay (PEA) αποτελεί μια καινοτόμο τεχνολογία ανίχνευσης πρωτεϊνών, η οποία συνδυάζει τη κλασική τεχνική sandwich ELISA με μεθόδους αλληλούχισης DNA, όπως η qPCR και η NGS. Αυτή η προσέγγιση διευρύνει τις δυνατότητες ανακάλυψης νέων βιοδεικτών που προορίζονται για αναλύσεις υγρών βιοψιών. Διαθέτει εκτεταμένο δυναμικό εύρος ανάλυσης και

απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος, καθιστώντας την κατάλληλη για σερολογική ανάλυση υψηλής ακρίβειας.

Κατά τη διαδικασία, πολλαπλά αντισώματα για τις στοχευμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται, όπου κάθε αντίσωμα φέρει συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA που επιτρέπει ακριβή υβριδοποίηση και πραγματοποιείται μόνο όταν το ζεύγος αντισωμάτων υβριδοποιηθεί με την πρωτεΐνη-στόχο. Οι προκύπτουσες δίκλωνες αλληλουχίες DNA ενισχύονται με τη χρήση qPCR ή NGS, οι οποίες παρέχουν μια ποσοτική μέτρηση της σχετικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Η πιο εξελιγμένη εκδοχή της μεθόδου PEA, αναπτυγμένη από την Olink, καλύπτει 3.072 στόχους και θεωρητικά το εύρος της ανάλυσης μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω, προσφέροντας μεγάλες δυνατότητες για ανακαλύψεις και αναλύσεις σε πρωτεϊνικά προφίλ (Z. Ding et al., 2022).

3.3.2 Προσεγγίσεις εμπλουτισμού δειγμάτων για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων - CTC .

Η ανίχνευση των CTC από δείγματα ασθενών αποτελεί πρόκληση, καθώς αυτά συνυπάρχουν σε χαμηλή συγκέντρωση σε σύγκριση με την ετερογένεια των κυττάρων του ασθενούς στην κυκλοφορία. Οπότε οι τεχνολογίες ανίχνευσης CTCs πρέπει να έχουν την ικανότητα να ξεχωρίζουν τα CTC από το υπόβαθρο και να τα εμπλουτίζουν έτσι ώστε να είναι συμβατή η περαιτέρω ανάλυση τους, καθώς οι διαθέσιμοι βιοδείκτες δεν είναι ειδικοί, η αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων καθίσταται δύσκολη, αφού δεν μπορούν να αποκλειστούν και κύτταρα του αίματος. Επιπλέον, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο ένας βιοδείκτης για τον εντοπισμό όλων των καρκινικών κυττάρων, αφού η ετερογένεια τους είναι ευρεία ακόμα και στον ίδιο ασθενή. Εφαρμόζονται μέθοδοι και τεχνικές αναλόγως την ιδιότητα των CTC που εκμεταλλεύονται όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 3-7. Έτσι μπορούμε να τις κατατάξουμε στις μεθόδους που χρησιμοποιούν Βιοφυσικές, Βιοχημικές και Λειτουργικές ιδιότητες των CTC (Cowling & Loshak, 2016; Ju et al., 2022).

Βιοφυσικές μέθοδοι εμπλουτισμού δειγμάτων CTC

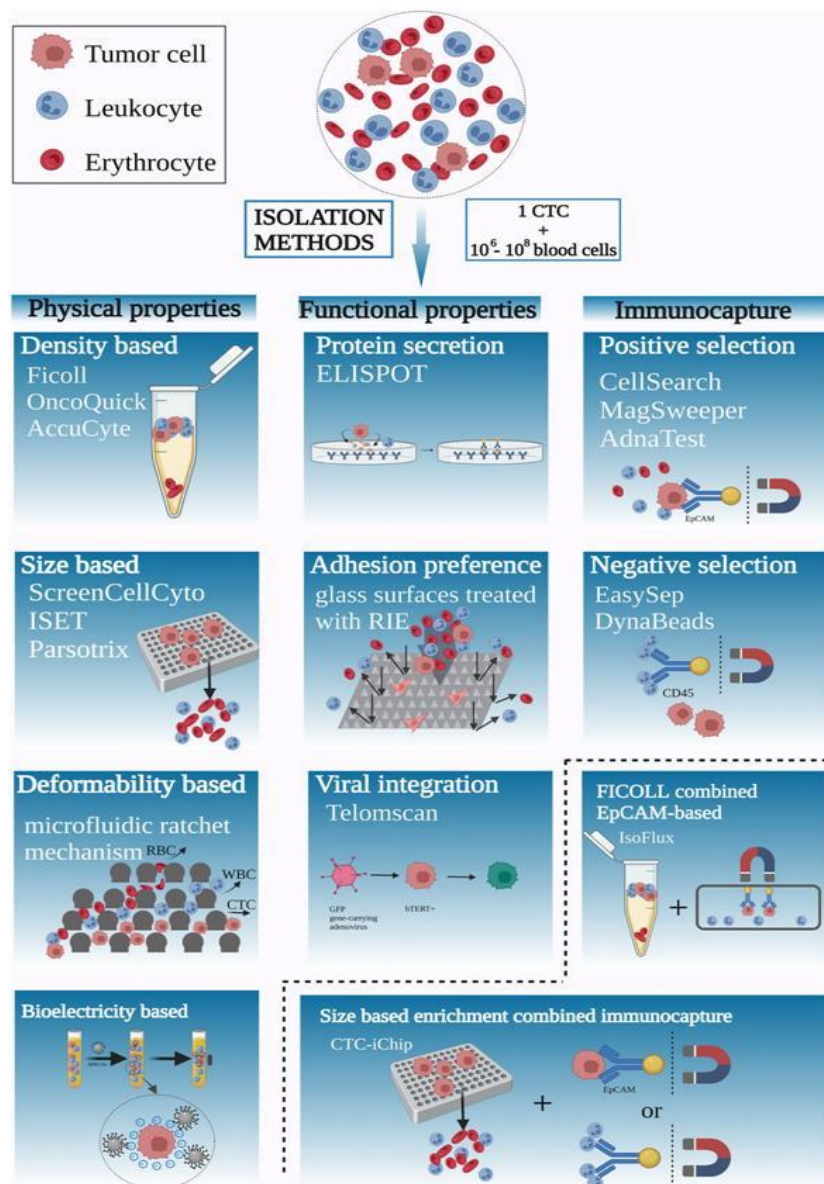
Είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούν μικροδιήθηση, υδροδυναμικές δυνάμεις, ακουστική ανύψωση, διηλεκτροφόρηση, κ.α.

Μικροδιήθηση

Οι τεχνικές μικροδιήθησης αποτελούν συχνή επιλογή για τον εμπλουτισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) λόγω της απλότητας τους, της ευκολίας στην χρήση τους και της δυνατότητάς τους να επεξεργάζονται μεγάλες ποσότητες δείγματος. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, συχνά εμφανίζουν περιορισμένη εξειδίκευση εξαιτίας της αλληλοεπικάλυψης μεγέθους των CTCs και των λευκοκυττάρων αλλά παράλληλα υπάρχει επίσης ο κίνδυνος απώλειας CTCs που έχουν μικρότερο μέγεθος από τον μέσο όρο, ενώ οι πόροι των φίλτρων μπορεί να προκαλέσουν παραμόρφωση και βλάβη στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs). Επιπλέον, τα φίλτρα είναι ευάλωτα σε φραγμούς, ιδίως όταν γίνεται επεξεργασία μεγάλων όγκων ολικού αίματος.

Με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί εξελιγμένα συστήματα μικροδιήθησης. Ένα από αυτά, το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα **ISET® (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells)** χρησιμοποιεί πολυκαρβονικές μεμβράνες που μέσω χάραξης έχουν διαμορφωθεί πόροι για τον διαχωρισμό καρκινικών κυττάρων βάσει μεγέθους. Υπάρχουν 12 πηγάδια με κυλινδρικούς πόρους διαμέτρου 8 μm, επιτρέποντας την άμεση διήθηση 10 mL δείγματος αραιωμένου σε αναλογία 1:10. Παρότι το ISET® εμπλουτίζει τα καρκινικά κύτταρα χωρίς να καταστρέφει τη μορφολογία τους, η χαμηλή εξειδίκευση περιορίζει τις εφαρμογές του. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε τρία στάδια όπου το πρώτο και δεύτερο στάδιο είναι η συλλογή και η διήθηση και το κρισιμότερο είναι το τρίτο στάδιο όπου επιλέγεται η χρώση. Μία από τις ιδιότητες του συστήματος αυτού είναι η δυνατότητα χρήσης λείζερ μικροτόμου, η οποία επιτρέπει την ανάκτηση νουκλεϊκών οξέων από μεμονωμένα CTCs για περαιτέρω μοριακή ανάλυση και χαρακτηρισμό (Ju et al., 2022; Ma et al., 2013). Παρόμοιο σε λειτουργία είναι και το σύστημα **ScreenCell®** και σε σύγκριση με το **ISET®**, διαθέτει το πλεονέκτημα του εμπλουτισμού μη μονιμοποιημένων ζωντανών κυττάρων και η τεχνολογία έχει δείξει ότι αποτελεί μια πιθανή διαγνωστική εξέταση αίματος για τον καρκίνο του πνεύμονα (Cowling & Loshak, 2016).

Επιπλέον, εκτός από τα φίλτρα μεμβράνης, έχουν επίσης αναπτυχθεί συσκευές μικρορευστοδυναμικής που έχουν ενσωματωμένα φίλτρα για τον εμπλουτισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs). Ένα από αυτά είναι το σύστημα **Parsortix®** που χρησιμοποιεί μια πατενταρισμένη τεχνολογία μικρορευστομηχανικής, η οποία επιτρέπει την καταγραφή των CTCs χωρίς χρήση σηματοδοτικών μορίων (ανεξάρτητα από επίτοπους) αλλά με βάση το μέγεθος και



Εικόνα 3-7 Μέθοδοι εμπλουτισμού CTCs

Οι περισσότερες μέθοδοι εμπλουτισμού CTC αξιοποιούν επιφανειακή έκφραση αντιγόνων των CTC ή τις φυσικές ή λειτουργικές τους ιδιότητες για να διαχωρίσουν τα CTC από τα ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και άλλων κυττάρων του αίματος.

<https://doi.org/10.1186/s40364-022-00403-2>

την παραμόρφωση των κυττάρων. Στη συνέχεια, το σύστημα Parsortix® διευκολύνει την καταγραφή των CTCs, καθώς και τη συλλογή τους για περαιτέρω ανάλυση (Wishart et al., 2024).

Υδροδυναμικές μέθοδοι

Οι τεχνικές εμπλουτισμού που βασίζονται στην υδροδυναμική έχουν το πλεονέκτημα της απομόνωσης βιώσιμων κυττάρων χωρίς σήμανση ή χρώση των κυττάρων, με σχετικά υψηλή απόδοση και χωρίς προβλήματα φραγμών. Ωστόσο, η ακριβής ρύθμιση της ταχύτητας ροής του δείγματος και της γεωμετρίας της συσκευής είναι απαραίτητη για αξιόπιστα αποτελέσματα.

Λόγω των μικρών διαστάσεων των καναλιών μιας συσκευής μικρορευστομηχανικής, η ροή και τα ρευστά συμπεριφέρονται διαφορετικά σε σχέση με τη τυρβώδη ροή σε μακροσκοπική κλίμακα. Μια δημοφιλής τεχνική που εκμεταλλεύεται τη γραμμική ροή για τον διαχωρισμό κυττάρων βάσει μεγέθους είναι η deterministic lateral displacement (DLD) τεχνική. Στην τεχνική DLD, τα κύτταρα προσκρούουν σε περιοδικά μετατοπισμένες σειρές μικροστηλών και είτε εκτρέπονται από τις στήλες προς μια κατεύθυνση είτε ρέουν διαμέσου αυτών, ανάλογα με το μέγεθος του κυττάρου. Δεδομένου ότι η DLD είναι μια διαδικασία συνεχούς ροής, είναι λιγότερο επιρρεπής σε φραγμούς σε σύγκριση με τα συστήματα μικροδιήθησης (Cowling & Loshak, 2016).

Η τεχνική της ενεργειακής εστίασης (inertial focusing) είναι μια άλλη μέθοδος που εκμεταλλεύεται τις διαφορές στις βιοφυσικές ιδιότητες των κυττάρων για τον εμπλουτισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs). Το φαινόμενο της ενεργειακής εστίασης αποδείχθηκε για πρώτη φορά από τους Segre και Silberberg τη δεκαετία του 1960, όταν παρατηρήθηκε ότι τα σωματίδια διαμέτρου 1 μm που αιωρούνται τείνουν να κινούνται προς τους πλευρικούς τοίχους ενός σωλήνα διαμέτρου 1 cm και να σχηματίζουν έναν δακτύλιο. Παρότι αρκετά περίπλοκη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό σωματιδίων με βάση μια σειρά μηχανικών ιδιοτήτων, όπως το μέγεθος, το σχήμα και η παραμορφωσιμότητα τους. Διάφοροι τρόποι διαχωρισμού σωματιδίων βασίζονται σε έναν από τους δύο απλούς αρχικούς κανόνες: (α) εστίαση σε ένα σωματίδιο και απομάκρυνση των υπόλοιπων,

όπως συμβαίνει στην τεχνική Dean flowⁱ fractionation (διαχωρισμός μέσω ροής Dean), ή (β) εστίαση όλων των σωματιδίων ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας μια ενδογενή υδροδυναμική διαφορά (Martel & Toner, 2014).

Διαχωρισμός μέσω φυγοκέντρισης

Η φυγοκέντριση βασίζεται στη διαφορετική πυκνότητα των συστατικών του αίματος και είναι από τις πρώτες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs). Στις μεθόδους φυγοκέντρισης βάσει πυκνότητας, τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα διαχωρίζονται στο ίζημα, ενώ τα καρκινικά κύτταρα μαζί με άλλα, διαχωρίζονται στη ονομαζόμενη ενδιάμεση φάση.

Η σύγκριση δύο συστημάτων φυγοκέντρισης πυκνότητας του OncoQuick® και του Ficoll - μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους φυγοκέντρισης πυκνότητας για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό ανθρώπινων μονοπύρηνων κυττάρων, έδειξε ότι το OncoQuick® βελτιώνει τον εμπλουτισμό των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με το Ficoll, μέσω αυξημένης απομάκρυνσης μονοπύρηνων κυττάρων, με συγκρίσιμη ανάκτηση καρκινικών κυττάρων, όμως προς το παρόν το OncoQuick® διατίθεται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς (Gertler et al., 2003). Στην κυκλοφορία υπάρχουν και άλλα κιτ με διαφοροποιημένες μεθόδους με την χρήση φυγοκέντρισης πυκνότητας αλλά και σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους όπως το AccuCyte® διαχωρίζοντας τη λευκοκυτταρική στιβάδα από τα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα μέσω ενός μοναδικού σωλήνα διαχωρισμού και συσκευής συλλογής. Επίσης κυκλοφορεί και το RosetteSep® σχεδιασμένο για τον διαχωρισμό και τον εμπλουτισμό κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων από φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα. Το κιτ περιέχει ένα μίγμα αντισωμάτων που απομακρύνει τα ανεπιθύμητα κύτταρα αλλάζοντας την πυκνότητά τους.

ⁱ Η ροή Dean αναφέρεται στο δευτερεύον ρεύμα που αναπτύσσεται σε καμπύλες ή σπειροειδείς διαδρομές, όπως σε σωλήνες ή μικρορευστοδυναμικά συστήματα, λόγω των συνδυασμένων επιδράσεων της αδράνειας και της καμπυλότητας. Εμφανίζεται όταν το ρευστό ρέει μέσω μιας καμπύλης διαδρομής, δημιουργώντας στροβιλισμούς που είναι κάθετοι προς την κύρια κατεύθυνση ροής.

Διαχωρισμός μέσω διηλεκτροφόρησης

Εκτός των παραπάνω ιδιοτήτων, οι ηλεκτρικές ιδιότητες των CTCs μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τον διαχωρισμό τους από υπόλοιπα συστατικά του αίματος. Στις τεχνικές που βασίζονται στη διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis, DEP), χρησιμοποιείται ένα ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο όπου τα κύτταρα αποκτούν πόλωση και ανάλογα με τη διηλεκτρική σταθερά τους έλκονται ή απωθούνται. Ρυθμίζοντας τη συχνότητα του ηλεκτρικού πεδίου, καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων, κατευθύνοντάς τους σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Επίσης και αυτή η μέθοδος δεν χρησιμοποιεί σημασμένα κύτταρα για τον διαχωρισμό και μπορεί να ενσωματωθεί σε μικρορευστοδυναμικές πλατφόρμες (Cowling & Loshak, 2016).

Ακουστική ανύψωση (acoustophoresis)

Με την ακουστική ανύψωση (Lenshof & Laurell, 2014) κύτταρα μέσα σε ένα υγρό περνάνε μέσα από ένα ηχητικό πεδίο στάσιμων κυμάτων και εκτίθενται σε δυνάμεις που προκύπτουν από την πίεση των ακουστικών κυμάτων, και με αυτόν τον τρόπο τα διαφορετικά κύτταρα συγκεντρώνονται σε διαφορετικά σημεία του πεδίου (Cowling & Loshak, 2016). Είναι μια αναπτυσσόμενη τεχνολογία που μπορεί και διαχωρίζει μόρια και σωματίδια που δεν έχουν πολικότητα ή ηλεκτρικό φορτίο.

Βιοχημικές μέθοδοι εμπλουτισμού δειγμάτων CTC

Ο εμπλουτισμός CTCs βάσει βιοφυσικών ιδιοτήτων επιτυγχάνει υψηλή απόδοση και εμπλουτισμό, ωστόσο, χρειάζεται βελτίωση της ειδικότητας, γεγονός που επηρεάζει την καθαρότητα των εμπλουτισμένων CTCs. Αντίθετα, ο βιοχημικός εμπλουτισμός των CTCs βασίζεται στην υψηλής ειδικότητας αλληλεπίδραση μεταξύ αντισωμάτων και προσδετών και των αντιγόνων που εκφράζονται από τα κύτταρα και βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των CTCs. Αυτή η προσέγγιση αξιοποιεί τις μοριακές διαφορές μεταξύ των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων για τον πιο ακριβή εντοπισμό και απομόνωση των CTCs. Στις περισσότερες προσεγγίσεις, αντισώματα ή απταμερή μονιμοποιούνται είτε σε μικροσυσκευές είτε σε μαγνητικά σφαιρίδια. Στις περισσότερες μεθόδους ως βιοδείκτης χρησιμοποιείται το μόριο προσκόλλησης

επιθηλιακών κυττάρων (EpCAM-Epithelial Cell Adhesion Molecule), το οποίο υπερεκφράζεται συχνά στα CTCs επιθηλιακής προέλευσης. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστοειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως ο HER2 για τον καρκίνο του μαστού ή η PSMA για το καρκίνωμα του προστάτη.

Διαχωρισμός με αντισώματα

Στις ανοσολογικές μεθόδους γίνεται εφαρμογή της θετικής επιλογής, που στοχεύονται αντιγόνα που εκφράζονται από τα κύτταρα στόχους του ή της αρνητικής επιλογής που απομακρύνονται κύτταρα του αίματος με βιοδείκτες που εκφράζονται από αυτά τα κύτταρα ή συνδυασμός των δύο (Ju et al., 2022).

Στο σύστημα **CellSearch®**, τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το **EpCAM** διαχωρίζονται από τα άλλα κύτταρα του αίματος μέσω αντισωμάτων ειδικών για το EpCAM, τα οποία είναι προσκολλημένα σε μαγνητικά σωματίδια. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιούνται και σημαίνονται διαδοχικά με φθορίζοντα αντισώματα κατά της κυτοκερατίνης και με DAPI, ενώ τα αιμοποιητικά κύτταρα σημαίνονται με αντισώματα κατά του CD45. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που είναι θετικά για κυτοκερατίνη (CK) και DAPI, αλλά αρνητικά για CD45, καταμετρούνται ως CTCs. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι περιορίζεται στην αναγνώριση CTC που εκφράζουν κυτοκερατίνη (CK) και EpCAM (Coumans & Terstappen, 2015). Παρόμοιες τεχνικές είναι και το σύστημα Magnetic activated cell sorting (MACS) και Dynabeads magnetic separation technology με τα ανάλογα πλεονεκτήματα και περιορισμούς (Cowling & Loshak, 2016).

Μια διαφορετική τεχνική που είναι ευαίσθητη και γρήγορη αναπτύχθηκε πρόσφατα ονομαζόμενη 3DPIC (3D printed immunomagnetic concentrator) για την απομόνωση και ταυτόχρονη ανίχνευση CTCs στο αίμα. Συνδυάζει έναν τρισδιάστατο εκτυπωμένο ανοσομαγνητικό συγκεντρωτή (3DPIC) και τη μέθοδο ανίχνευσης με βιοφωταύγεια ATP. Μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) προσκολλώνται σε μαγνητικά νανοσωματίδια με μέσο διάμετρο 50 nm που στοχεύουν το μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων (EpCAM), στη συνέχεια τα καρκινικά κύτταρα καταμετρώνται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο βιοφωταύγειας ATP. Για την ανάκτηση των κυττάρων χρησιμοποιούνται ανοσοσφαίρες υδρογέλης (hydrogel) με χημική

σταθερότητα και δυνατότητα άμεσης αποδόμησης (CSID, chemically stable and instantly degradable) οι οποίες είναι τροποποιημένες με αντισώματα κατά του EpCAM(Ju et al., 2022; Park et al., 2021).

Λειτουργικές μέθοδοι εμπλουτισμού δειγμάτων CTC

Οι λειτουργικές δοκιμασίες χρησιμοποιούν ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες των CTCs για να ξεπεραστούν κάποιοι περιορισμοί σχετιζόμενοι με την ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, ένας σημαντικός περιορισμός στη μέθοδο εμπλουτισμού των CTCs με βάση τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων είναι η μειωμένη καθαρότητα του τελικού προϊόντος, γεγονός που εξακολουθεί να αποτελεί κυρίαρχο πρόβλημα. Μια μέθοδος η enzyme-linked immunospot technology, Epithelial Immunospot (ELISPOT), που έχει δοκιμαστεί σε διάφορες ασθένειες και ανοσολογικές αντιδράσεις. Μια διαφορετική προσέγγιση είναι η μέθοδος TelomeScan, αυτή ανιχνεύει CTCs μέσω ενός αδενοϊού που διαθέτει μηχανισμό επιλεκτικής αντιγραφής της τελομεράσης. Μολύνοντας το δείγμα με τον ιό αυξάνει ο λόγος του σήματος προς τον θόρυβο, λειτουργώντας ως ανιχνευτής και παράλληλα εκπέμποντας φθορισμό(Ju et al., 2022).

Μέθοδοι Ανίχνευσης και Χαρακτηρισμού των CTCs

Παρακάτω στον Πίνακα 3-1 Σύνοψη των μεθόδων χαρακτηρισμού των CTC. είναι μια σύνοψη των μεθόδων χαρακτηρισμού των CTC που περιλαμβάνει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της κάθε μεθόδου(Wang et al., 2024).

Σύνοψη μεθόδων χαρακτηρισμού των CTC			
Μέθοδος	Λεπτομέρειες	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Κυτταρομετρία ροής	Ποσοτική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων	Ταχύτητα ανίχνευσης. Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών καναλιών. Υψηλή ευαισθησία, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει μικρές μεταβολές σε μεμονωμένα κύτταρα. Υψηλή εξειδίκευση, με ικανότητα αναγνώρισης και διάκρισης συγκεκριμένων τύπων κυττάρων μέσω επισημάνσης με ειδικά αντισώματα ή φθορίζουσες	Χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης. Απαιτεί μεγάλη αραιώση Μπορεί να καταστρέψει συστάδες κυττάρων

		ουσίες.	
Ανοσοφθορισμός	Χαρακτηρισμός κυττάρων μέσω σήμανσης.	<p>Η χρώση και σήμανση των κυττάρων εκμεταλλεύοντας την ειδική σύνδεση των αντισωμάτων με τα αντιγόνα προσφέρει υψηλή εξειδίκευση.</p> <p>Η ανίχνευση πολλαπλών βιοδεικτών των CTCs μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφορετικών συνδυασμών αντισωμάτων και μεθόδων χρώσης με υψηλή ευαισθησία, επιτρέποντας μια πιο ολοκληρωμένη αναγνώριση και ανάλυση τους.</p>	Η μορφολογία των κυττάρων είναι ανομοιογενής, η έκφραση των αντιγόνων είναι ετερογενής, και υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.
FISH*	Η αναγνώριση επιτυγχάνεται μέσω υβριδοποίησης DNA	<p>Η μοριακή ανίχνευση είναι γρήγορη, ακριβής και δοκιμασμένη για κλινική εφαρμογή.</p> <p>Χρησιμοποιεί ειδικούς ανιχνευτές που υβριδοποιούνται το DNA μέσα στο κύτταρο, προσφέροντας υψηλή εξειδίκευση και ικανότητα ακριβούς ανίχνευσης της αλληλουχίας DNA των CTCs.</p> <p>Επιπλέον, μπορεί να ανιχνεύσει δείκτες και καρυότυπους μέσα στα CTCs, βελτιώνοντας έτσι την ευαισθησία της ανίχνευσης.</p>	Χρονοβόρα διαδικασία Επιρρεπής σε παρεμβολές
RT-PCR**	Ποσοτική ανάλυση χαρακτηρισμού CTCs	<p>Μέσω της αντίστροφης μεταγραφής και της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, η τεχνολογία μπορεί να ανιχνεύσει πολύ χαμηλή αφθονία CTCs με υψηλή ευαισθησία.</p> <p>Επιπλέον, χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές (primers) και ανιχνευτές (probes) για την ενίσχυση και ανίχνευση του στοχευμένου mRNA με υψηλή εξειδίκευση.</p>	<p>Το RNA αποδομείται εύκολα.</p> <p>Το δείγμα μολύνεται εύκολα</p> <p>Η ποσοτικοποίησή του είναι έμμεση.</p>
Αλληλούχιση γονιδιώματος	Έλεγχος και ταυτοποίηση γονιδίων	Μπορούν να ανιχνευθούν μοριακά χαρακτηριστικά όπως μεταλλάξεις γονιδίων, και μεθυλίωση στα CTCs.	<p>Υψηλό κόστος.</p> <p>Δεν μπορεί να αποκαλυφθεί η μορφολογία των</p>

		Έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει ίχνη CTCs σε σύνθετα δείγματα, προσφέροντας έτσι υψηλή ευαισθησία και υψηλή ανάλυση. Μπορούν να επιλεγούν κατάλληλες περιοχές αλληλούχισης και να σχεδιαστούν εκκινήτες με υψηλή εξειδίκευση.	κυττάρων
Πρωτεωμικές μέθοδοι	ακριβής ανίχνευση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών και τροποποιήσεων τους	Παράλληλη ανίχνευση πολλαπλών πρωτεϊνών. Μέσω της ανάλυσης φασματομετρίας μαζών και άλλων τεχνικών, μπορούν να ανιχνευθούν μικρές διαφορές στην έκφραση των CTCs με υψηλή ευαισθησία. Με την επιλογή κατάλληλων πρωτεϊνικών δεικτών και μεθόδων ανάλυσης φασματομετρίας μαζών, μπορεί να εξασφαλιστεί υψηλή εξειδίκευση αποκλείοντας άλλα κύτταρα.	Τα CTCs είναι ανομοιογενή και σε χαμηλή συγκέντρωση, γεγονός που καθιστά την ανάλυση ιδιαίτερα δύσκολη και σύνθετη.

Πίνακας 3-1 Σύνοψη των μεθόδων χαρακτηρισμού των CTC.

*Fluorescence in situ hybridization

** Reverse Transcriptase PCR

3.3.3 Τεχνικές ανάλυσης και εμπλουτισμού cfDNA / ctDNA / cffDNA.

Η ανίχνευση του ctDNA (circulating tumor DNA) αποτελεί μικρό κλάσμα του συνολικού κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (cfDNA) και είναι ιδιαίτερος απαιτητικό. Το ctDNA μπορεί να διαφοροποιηθεί από το cfDNA μέσω χαρακτηριστικών όπως οι σωματικές μεταλλάξεις (σημειακές μεταλλάξεις, indels, αναδιατάξεις), οι μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων, η ανευπλοειδία, και τα μοτίβα μεθυλίωσης.

1. Σωματικές μεταλλάξεις: Παρέχουν ποιοτικούς δείκτες που διαχωρίζουν με σαφήνεια το ctDNA από το cfDNA. Ωστόσο, επειδή εμφανίζονται σε ένα αντίγραφο ανά κύτταρο, η παρουσία τους μπορεί να είναι περιορισμένη,

ειδικά σε πρώιμο στάδιο νόσου. Τεχνικά σφάλματα, όπως αυτά που δημιουργούνται κατά τη χρήση PCR, μπορεί να αυξήσουν το θόρυβο και να μειώσουν την ακρίβεια.

2. Αναδιατάξεις και indels: Παρουσιάζουν υψηλότερο λόγο σήματος προς θόρυβο σε σχέση με τις σημειακές μεταλλάξεις, καθώς τα τεχνικά σφάλματα από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους δεν παράγουν αναδιατάξεις. Ωστόσο, είναι σπάνια σε συμπαγείς όγκους, ενώ πολλές φορές είναι μοναδικά για κάθε ασθενή και συνήθως απαιτούν εξειδικευμένες εξετάσεις.
3. Μοτίβα μεθυλίωσης: Χρησιμοποιούνται τόσο για την ανίχνευση καρκίνων όσο και για τον εντοπισμό του ιστού προέλευσης της ασθένειας.
4. Ανευπλοειδία: Αποτελεί ελκυστικό βιοδείκτη, καθώς εμφανίζεται στη μεγάλη πλειοψηφία των συμπαγών όγκων.
5. Το μέγεθος: έχει αποδειχθεί ότι το ctDNA έχει μια κατανομή μεγέθους διαφορετικό με την μέση τιμή να είναι μικρότερη από το cfDNA.

Συλλογή και εμπλουτισμός cfDNA/ctDNA/cffDNA

Οι συγκεντρώσεις του cfDNA είναι 2-24 φορές υψηλότερες στον ορό σε σύγκριση με την συγκέντρωση στο πλάσμα. Όμως τα αυξημένα επίπεδα cfDNA στον ορό συνδέονται κυρίως με τη λύση των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πήξης, οδηγώντας σε απελευθέρωση μη καρκινικού DNA, γεγονός που μειώνει τη σχετική ποσότητα του ctDNA. Έτσι για ctDNA η συλλογή από το πλάσμα θεωρείται πιο κατάλληλη μέτρα για την ανάλυση του. Στη συνέχεια για την ιδανική ανάλυση του συλλεχθέντος DNA απαιτείται η πλήρης απομάκρυνση των κυτταρικών συστατικών εντός των πρώτων 6 ωρών από τη λήψη του αίματος από το κλάσμα του πλάσματος, προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος μόλυνσης με γονιδιωματικό DNA (Cowling & Loshak, 2016).

Για την απομόνωση και την περαιτέρω ανάλυση του κυκλοφορούντος DNA, υπάρχουν διάφορες επιλογές, όπως:

- Μέθοδοι βασισμένες σε στήλες φυγοκέντρισης (spin column-based),
- Μέθοδοι βασισμένες σε μαγνητικές χάντρες (magnetic bead-based),
- Μέθοδοι απομόνωσης φάσεων (phase isolation methods)

Κάθε μέθοδος παρουσιάζει διαφορές όσον αφορά την καθαρότητα και την αποτελεσματικότητα ανάκτησης μικρών θραυσμάτων DNA, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή της μεθόδου. Να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι απομόνωσης φάσεων (όπως η διαδικασία φαινόλης-χλωροφορμίου) αν και πιο χρονοβόρες και πολύπλοκες, επιτυγχάνουν σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις DNA και ανακτούν ευρύτερο φάσμα μεγεθών θραυσμάτων DNA, συμπεριλαμβανομένων των μικρών θραυσμάτων του ctDNA. Πέρα των παραπάνω κυκλοφορούν και έτοιμα κιτ διαφόρων εταιρειών για την απομόνωση DNA όπως: QIAamp DNA Blood™ Mini Kit, The QIAamp Circulating Nucleic Acid™ Kit, the Maxwell Rapid Sample Concentrator™, MagNa Pure™ και πολλά άλλα (Cowling & Loshak, 2016).

Χαρακτηρισμός και Ανίχνευση του cfDNA / ctDNA / cffDNA.

Οι προσέγγιση για τον χαρακτηρισμό του συλλεχθέντος DNA μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στις μεθόδους βασισμένες στην PCR, και στις μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς. Επίσης μπορούν ανεξάρτητα των παραπάνω να κατηγοριοποιηθούν και σε μεθόδους με στοχευμένη προσέγγιση, δηλαδή ενισχύει γνωστές αλληλουχίες/μεταλλάξεις και σε μεθόδους με μη στοχευμένη προσέγγιση.

Μέθοδοι βασισμένες στην Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

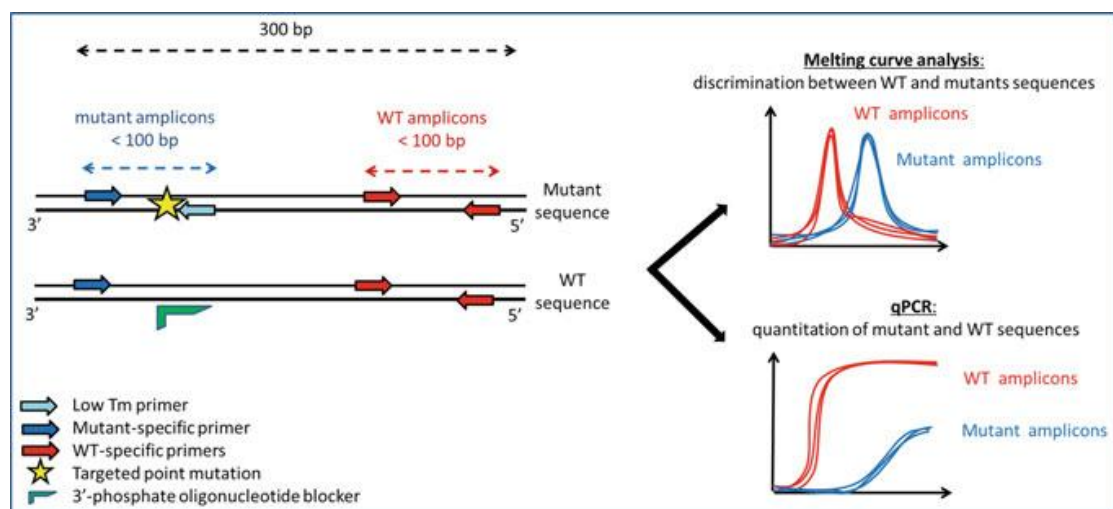
Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που βασίζονται στην κλασική PCR όπου αναπτύχθηκαν διαφορές μέθοδοι για να αποφευχθούν περιορισμοί που σχετίζονται με αυτήν. Τέτοιες μέθοδοι είναι:

ARMS-qPCR - Amplification Refractory Mutation System—qPCR

Είναι μια στοχευμένη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων, που βασίζεται στη real time-PCR. Έχει υψηλή εξειδίκευση με την χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών που δεσμεύονται μόνο σε γονιδιακές αλληλουχίες με συγκεκριμένες μεταλλάξεις και διακριτική ικανότητα μέχρι και μία βάση. Έχει υψηλή ευαισθησία και είναι ικανή να ανιχνεύσει μεταλλάξεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις DNA, ακόμη και σε δείγματα με υψηλό υπόβαθρο φυσιολογικού DNA, επίσης έχει υψηλή διακριτική ικανότητα στον

εντοπισμό ετεροζυγωτών. Σε αυτή την μέθοδο βασίζονται, εμπορικά διαθέσιμα κιτ όπως:

The SuperARMS EGFR Mutation Detection™ kit (Amoy Diagnostics Co., Xiamen, China), *The Cobas EGFR mutation™ test v2 commercial kit* (Roche Diagnostics, Meylan, France), *Idylla™ platform* (Biocartis, Mechelen, Belgium), *Intplex™* (DiaDx, Les Matelles, France) και άλλα (Cowling & Loshak, 2016; Lin et al., 2021), όπου αποτυπώνεται σχεδιαστικά στην Εικόνα 3-8.



Εικόνα 3-8 Αρχή λειτουργίας του συστήματος Intplex™:

Δύο ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν την μεταλλαγμένη αλληλουχία (με μπλε χρώμα) και την αλληλουχία αγρίου τύπου (με κόκκινο χρώμα) αντίστοιχα, σχεδιάζονται ώστε να παράγουν amplicons παρόμοιου μεγέθους. Για την ενίσχυση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας ένα σύστημα εκκινητών χαμηλής θερμοκρασίας τήξης σχεδιάζεται, ενώ ένα ανασταλτικό ολιγονουκλεοτίδιο (με πράσινο χρώμα) που υβριδοποιείται στην αλληλουχία αγρίου τύπου αποτρέπει την μη-ειδική επιμήκυνση των αλληλουχιών αυτών.

Ψυχρή PCR - Cold-PCR - Co-amplification at Lower Denaturation temperature PCR

Η Cold-PCR είναι μια μη στοχευμένη μέθοδος ενίσχυσης DNA που επικεντρώνεται στην ανίχνευση και τον εμπλουτισμό μεταλλάξεων σε χαμηλή συγκέντρωση. Στην μέθοδο αυτή η θερμοκρασία αποδιάταξης T_m ρυθμίζεται σε χαμηλότερο σημείο σε σύγκριση με την παραδοσιακή PCR, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την επιλεκτική αποδιάταξη και ενίσχυση μεταλλαγμένων αλληλουχιών DNA. Έτσι εμπλουτίζονται οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις και λόγω της μη στοχευμένης ενίσχυσης μπορούν να εντοπιστούν και σπάνιες ή άγνωστες

μεταλλάξεις. Πολλές παραλλαγές της COLD-PCR έχουν αναπτυχθεί με μεταβλητή απόδοση και ειδικότητα εμπλουτισμού, όπως:

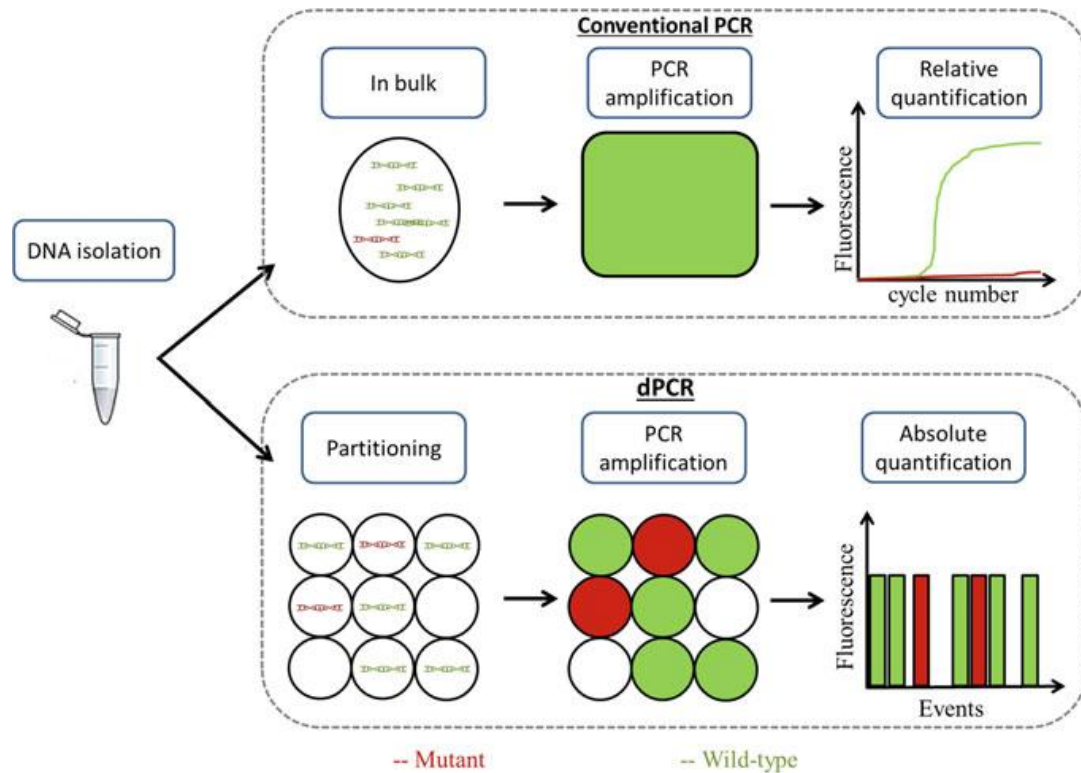
full-, fast-, ice- (improved and complete enrichment-), enhanced-ice, and temperature-tolerant COLD-PCR (Cowling & Loshak, 2016).

Ειδική για Μεθυλίωση-PCR (Methylation-Specific qPCR (qMSP))

Είναι μια στοχευμένη τεχνική ποσοτικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του επιπέδου της μεθυλίωσης DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Αρχικά το DNA υποβάλλεται σε επεξεργασία με διθειώδες νάτριο (sodium bisulfite), το οποίο μετατρέπει τις μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες σε Ουρακίλη, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν αμετάβλητες. Στη συνέχεια εκτελείται ποσοτική PCR (qPCR) για την ακριβή μέτρηση του επιπέδου μεθυλίωσης σε πραγματικό χρόνο. Οι εκκινήτες και οι ανιχνευτές είναι ειδικά σχεδιασμένοι για την τροποποιημένη αλληλουχία DNA.

Ψηφιακή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR))

Η ψηφιακή PCR (Digital PCR ή dPCR) είναι μια εξελιγμένη μέθοδος στοχευμένης ποσοτικής ανάλυσης DNA ή RNA που βασίζεται στην κατανομή του δείγματος σε χιλιάδες μικροαντιδράσεις. Αρχικά το DNA ή RNA αραιώνεται και διαιρείται τυχαία σε πολλές μικροαντιδράσεις (droplets, μικροπηγάδια ή νανοαντιδράσεις), όπου κάθε αντιδραστήριο μπορεί να περιέχει μηδέν, μία ή περισσότερες αλληλουχίες-στόχους. Στη συνέχεια σε κάθε αντιδραστήριο πραγματοποιείται ξεχωριστή PCR για την ενίσχυση της στοχευμένης αλληλουχίας αν υπάρχει. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία κάθε μικροαντίδραση κατατάσσεται ως θετική αν περιέχει την αλληλουχία-στόχο ή αρνητική αν δεν την περιέχει. Ο απόλυτος αριθμός των μορίων του DNA υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την στατιστική κατανομή Poisson. Παρακάτω στην Εικόνα 3-9 Σύγκριση μεταξύ κλασσικής PCR και ddPCR, γίνεται μια σύγκριση μεταξύ κλασσικής PCR και ddPCR.



Εικόνα 3-9 Σύγκριση μεταξύ κλασσικής PCR και ddPCR

https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_10

Κυκλοφορούν οι παρακάτω συσκευές που η λειτουργία τους βασίζεται στην **ddPCR (Droplet Digital PCR)** και διάφορα κιτ που τις συνοδεύουν για την ανίχνευση μεταλλάξεων:

The QX100/QX200™ ddPCR system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France)

BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics)

The RainDrop Plus™ system (RainDance Technologies, Lexington, United States)

The microfluidic-chamber-based Biomark dPCR™ (Fluidigm Corporation, Les Ulis, France)(Cowling & Loshak, 2016)

Μέθοδοι αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation)

Αν και οι μέθοδοι βασιζόμενοι στην PCR έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία για την ανάλυση DNA, παρουσιάζουν περιορισμούς λόγω της χαμηλής δυνατότητας σύνθετης ανάλυσης και της έλλειψης σχεδιασμού για την ανίχνευση νέων μεταλλάξεων. Αυτοί οι περιορισμοί έχουν την δυνατότητα να ξεπεραστούν με τις

τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς - NGS (Next-Generation Sequencing), με τις οποίες διενεργούνται εξαιρετικά ευαίσθητες μοριακές αναλύσεις σε πολλαπλές γονιδιακές περιοχές με μία μόνο εκτέλεση. Η μεθοδολογία NGS υποστηρίζει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως το προφίλ μεταλλάξεων DNA, ο προσδιορισμός του φορτίου μεταλλάξεων ενός όγκου, και η ταυτοποίηση χρωμοσωμικών ανωμαλιών και αναδιατάξεων.

Η στοχευμένη αλληλούχιση δεν καλύπτει όλο το φάσμα του γονιδιώματος, αλλά χρησιμοποιεί εστιασμένα γονιδιακά πάνελ με τους κλινικά σημαντικούς στόχους ή τους στόχους υπό μελέτη, επιτρέποντας την πολλαπλή αλληλούχιση κάθε στόχου χιλιάδες φορές (ultra-deep sequencing). Αντιθέτως η μη στοχευμένη αλληλούχιση με μεθόδους όπως η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS – Whole genome sequencing) και αλληλούχιση ολόκληρου του εξωσώματος του γονιδιώματος (WES - Whole exome sequencing) εφαρμόζεται σε όλο το γονιδίωμα.

Στοχευμένη αλληλούχιση ανίχνευσης cfDNA/ctDNA

Η στοχευμένη αλληλούχιση έχει πλεονεκτήματα, όπως η βελτίωση του βάθους κάλυψης και της ευαισθησίας στις επιλεγμένες περιοχές προς αλληλούχιση, με μειωμένο κόστος και ευκολότερη ανάλυση δεδομένων. Η στοχευμένη αλληλούχιση βασίζεται σε δύο κύριες προσεγγίσεις που διαφοροποιούνται ως προς τη μέθοδο εμπλουτισμού των στόχων πριν από την αλληλούχιση: τις μεθόδους amplicon-based και τις μεθόδους capture-based.

Μέθοδοι βασισμένοι σε προϊόντα ενίσχυσης DNA (Amplicon-based)

Οι μέθοδοι αυτοί στοχεύουν στην ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδιωματικών περιοχών μέσω PCR, χρησιμοποιώντας ειδικά ζεύγη εκκινητών.

AmpliSeq

Η μέθοδος βασίζεται σε εμπλουτισμό DNA ή RNA μέσω αμπλικονίων (τμήματα DNA ή RNA που είναι προϊόντα πολλαπλασιασμού - amplicons) με σκοπό να δημιουργήσει έως και χιλιάδες στόχους για ενίσχυση για την ανάλυση γονιδιακών περιοχών. Τα **AmpliSeq panels** παρέχουν ένα σύνολο εκκινητών (oligonucleotide

primers) για την προετοιμασία βιβλιοθηκών multiplex PCR. Διατίθενται στο εμπόριο πληθώρα έτοιμα ή εξατομικευμένα panels όπως: Ion AmpliSeq™ BRCA1/2 Panel for Ion Torrent (Life Technologies), AmpliSeq™ BRCA1/2 Panel for Illumina), AmpliSeq™ Cancer HotSpot Panel v2 (Illumina) και πολλά άλλα.

Safe-Sequencing System (Safe-SeqS)

Η μέθοδος **Safe-SeqS** αποδίδει σε κάθε τμήμα DNA προς ανάλυση ένα μοναδικό μοριακό αναγνωριστικό (UMI, επίσης γνωστό ως barcode ή index). Η ενίσχυση των σημασμένων αλληλουχιών DNA με αυτό το αναγνωριστικό δημιουργεί ομάδες UMI που όλα τα μόρια τους έχουν ταυτόσημη αλληλουχία με το αρχικό πρότυπο, εφόσον δεν προκύψουν σφάλματα από την ενίσχυση PCR ή τη διαδικασία αλληλούχισης. Εάν στην ίδια ομάδα τουλάχιστον το 95% των αναγνώσεων φέρουν την ίδια μετάλλαξη, τότε οι παραλλαγές θεωρούνται πραγματικές. Με αυτή τη στρατηγική αυξάνεται ο αριθμός των ανιχνευόμενων μεταλλάξεων και μειώνει το ποσοστό σφάλματος λόγω μεροληψίας κατά την αντιγραφή ή την αλληλούχιση, (μια μετάλλαξη μπορεί να ανιχνευθεί σε υπόβαθρο 5000 έως 10^9 νουκλεοτιδίων αγρίου τύπου). Η τεχνολογία αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί για την ανίχνευση αλλοιώσεων που σχετίζονται με όγκους σε **ctDNA** από καρκίνο παχέος εντέρου, καθώς και σε τεστ Παπανικολάου ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και ενδομητρίου.

Tagged-amplicon deep sequencing (TAm-Seq)

Η προσέγγιση **TAm-Seq** συνδυάζει ενίσχυση δύο σταδίων και αλληλούχιση μεγάλων γονιδιωματικών περιοχών από μικρές ποσότητες ή κατακερματισμένο DNA, όπως αυτό που συλλέγεται από δείγματα πλάσματος. Οι εκκινητές σχεδιάζονται για να καλύπτουν μεγάλες αλληλουχίες με μικρά επικαλυπτόμενα αμπλικόνια. Προηγείται ένα προενισχυτικό στάδιο με τη χρήση πολλαπλών εκκινητών ειδικών για τον στόχο. Ακολουθεί η πραγματοποίηση παράλληλων πολλαπλών αντιδράσεων PCR για την επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών. Τέλος, μοριακά barcodes προστίθενται στα άκρα των παραγόμενων αμπλικονίων πριν από τη συνένωση και την αλληλούχιση. Ωστόσο, ένα τεχνικό περιοριστικό σημείο της TAm-Seq είναι το

όριο ανίχνευσης μεταλλαγμένων αλληλόμορφων το οποίο είναι >2%, αρκετά υψηλότερο σε σύγκριση με τις περισσότερες μεθόδους που βασίζονται σε dPCR.

Μέθοδοι βασισμένοι με δέσμευση του στόχου (Capture-Based μέθοδοι)

Οι μέθοδοι **capture-based** εμπλουτίζουν τα δείγματα μέσω υβριδισμού με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες προς τις γονιδιωματικές περιοχές ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, οι υβριδοποιημένες περιοχές δεσμεύονται με σφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την επιλεκτική απομόνωση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια για την ανίχνευση γενετικών μεταβολών σε προκαθορισμένες περιοχές του γονιδιώματος.

Προσωποποιημένη τυποποίηση καρκίνου με βαθιά αλληλούχιση (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq))

Το **CAPP-Seq** (Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing) είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνολογία που συνδυάζει τον υβριδικό εμπλουτισμό πολλών περιοχών ενδιαφέροντος με βαθιά αλληλούχιση (deep sequencing). Μπορεί να γενικευτεί σε οποιονδήποτε τύπο καρκίνου με γνωστές επαναλαμβανόμενες γενετικές μεταβολές σε πρώιμα ή προχωρημένα στάδια της νόσου.

Πέρα από τις παραπάνω μεθόδους υπάρχουν αρκετές ακόμη όπως οι:

Targeted error correction sequencing (TEC-Seq), FoundationOne™ liquid, Guardant 360™ digital sequencing test και άλλα.

Μη στοχευμένη αλληλούχιση ανίχνευσης cfDNA/ctDNA

Το **WGS (Whole Genome Sequencing)** που εξετάζει το πλήρες γονιδιωματικό περιεχόμενο ενός όγκου ή ιστού. Αυτή η μέθοδος μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων όταν εφαρμόζεται ως διαγνωστική προσέγγιση, αλλά μπορεί να αποκαλύψει νέες θεραπευτικές στρατηγικές, σπάνιες ή ασυνήθιστες μεταλλάξεις, καθώς και μη ανιχνεύσιμα ογκογονίδια όταν εφαρμόζεται στην κλινική έρευνα. Παρ' όλα αυτά, το WGS συνοδεύεται από περιορισμούς που περιλαμβάνουν

δυσκολίες ποιοτικού ελέγχου των αποτελεσμάτων, ηθικά ζητήματα, υψηλό κόστος και μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης από τις στοχευμένες μεθόδους. Το **WES**, από την άλλη, στοχεύει στην ανάλυση όλων των εξονίων, δηλαδή των περιοχών του γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αν και προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης συχνών ή σπάνιων ανωμαλιών που σχετίζονται με ασθένειες, παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Ακολουθεί ο Πίνακας 3-2 με μια σύνοψη για κάποιες από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν για τον χαρακτηρισμό του cfDNA/ctDNA/cffDNA

Μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό cfDNA/ctDNA/cffDNA				
Μέθοδος	Λεπτομέρειες	Στόχος Μετάλλαξης	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
ddPCR	Απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός του αρχικού δείγματος	Γνωστές	Υψηλή αναλυτική ειδικότητα. Ανιχνεύει ελάχιστες ποσότητες DNA (50 pg/ml πλάσματος)	Μόνο για περιορισμένες γενετικές θέσεις.
BEAMing	Μαγνητικά σφαιρίδια, εναιώρημα, ενίσχυση	Γνωστές	Εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία, ανίχνευση 1/10.000 ctDNA /υγρή DNA. Μαγνητικά σφαιρίδια απορροφούν ελεύθερο DNA για ανάλυση μεταλλάξεων μέσω κυτταρομετρίας ροής.	Μόνο γνωστές μεταλλάξεις, σχετικά φθηνή.
TAm-Seq	Ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων σε cfDNA	Γνωστές και νέες	Υψηλή ευαισθησία για χαμηλές συγκεντρώσεις ctDNA. Ακριβής ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω ειδικού σχεδιασμού εκκινητών για αύξηση ειδικότητας.	Γενική τεχνική.
CAPP-Seq	Στοχευμένη υβριδοποίηση	Γνωστές και νέες	Πολύ ευαίσθητη ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων ctDNA μέσω σχεδίασης	Γενική τεχνική.

			εκκινητών και ανιχνευτών για αποφυγή παρεμβολών. Ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων, ενθέσεων, διαγραφών κ.λπ.	
WGS	Βαθιά αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος	Άγνωστες	Εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία για ανίχνευση μεταλλάξεων με συχνότητα <1%. Παρέχει πλήρη πληροφορία για όλα τα γονίδια, περιλαμβάνοντας μεταλλάξεις, ενθέσεις και διαγραφές.	Χαμηλή ευαισθησία, υψηλό κόστος.
WES	Βαθιά αλληλούχιση εξονίων	Άγνωστες	Υψηλή ευαισθησία για κοινές και σπάνιες μεταλλάξεις. Στοχεύει σε εξόνια, διευκολύνοντας την ανίχνευση γονιδίων που προκαλούν ασθένειες.	Χαμηλή ευαισθησία, υψηλό κόστος.

Πίνακας 3-2 σύνοψη μεθόδων για τον χαρακτηρισμό cfDNA/ctDNA/cffDNA

Χαρακτηρισμός των εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs)

Τα Εξωκυττάρια Κυστιδία (EVs) αποτελούν έναν σημαντικό ερευνητικό τομέα στην υγρών βιοψία, και η αξία των πιθανών εφαρμογών τους συνεχώς αξιολογείται.. Ωστόσο, οι κύριες δυσκολίες στον τομέα αυτό είναι η απομόνωση και ο καθαρισμός των Εξωκυττάρων Κυστιδίων (EVs), που έχουν μεγάλη ετερογένεια στην λειτουργία, το μέγεθος, το περιεχόμενο και την προέλευση τους.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και την συλλογή των εξωκυτταρικών σωματιδίων εξαρτώνται για τον σκοπό και τον στόχο της απομόνωσης τους αλλά επίσης και με βάση το μέγεθος και την προέλευση τους.

Χρησιμοποιείται μια πληθώρα διαφορετικών μεθόδων αλλά συνηθέστερα, η καθίζηση πολυμερών, η απομόνωση με βάση το μέγεθος, η ανοσοπροσκόλληση και η υπερφυγοκέντρωση χρησιμοποιούνται συνήθως. Κάθε επιλογή έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία παρατίθενται παρακάτω στον Πίνακα 3-33.

μέθοδοι απομόνωσης και συλλογής εξωκυτταρικών κυστιδίων			
Μέθοδος	Λεπτομέρειες	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Υπερφυγοκέντρωση	Βασίζεται στις διαφορές μεγέθους και πυκνότητας	Δεν απαιτεί ετικέτες για τα EVs, αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης	χρονοβόρα, υψηλό κόστος, δομική ζημιά, συσσωμάτωση σωματιδίων, διαχωρισμός λιποπρωτεϊνών
Φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας	Καθαρισμός των EVs	Βελτιώνει την καθαρότητα των EVs	Μειώνει τον ρυθμό καθίζησης των EVs, αυξάνοντας τον χρόνο
Καθίζηση Πολυμερών	Χρησιμοποιεί πολυαιθυλένιο γλυκόλης (PEG), μειώνοντας τη διαλυτότητα των εξωσωμάτων	Ευκολία στη λειτουργία, σύντομος χρόνος ανάλυσης, επεξεργασία μεγάλων δόσεων δειγμάτων	Μειωμένη καθαρότητα και χαμηλό ποσοστό ανάκτησης
Απομόνωση με βάση το Μέγεθος (Υπερδιήθηση και Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους)	Υπερδιήθηση που χρησιμοποιεί μεμβράνες υπερδιήθησης με διαφορετικά όρια μοριακού βάρους (MWCO) για επιλεκτική απομόνωση δειγμάτων	Χαμηλό κόστος και υψηλή αποδοτικότητα εμπλουτισμού	Μειωμένο ποσοστό ανάκτησης
Χρωματογραφία Ανοσοπροσκόλλησης (IAC)	Η ειδική σύνδεση αντισωμάτων και συνδετικών μορίων	ισχυρή εξειδίκευση, υψηλή ευαισθησία, υψηλή καθαρότητα και υψηλή απόδοση	Δεν είναι κατάλληλη για τη μαζική απομόνωση EVs, παράγει παρεμβαλλόμενες πρωτεΐνες
Μικρορευστομηχανικές Τεχνικές	Οι φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες συγκεκριμένων υποτύπων EVs	Χαμηλή κατανάλωση αντιδραστηρίων, πολύ υψηλή καθαρότητα των απομονωμένων προϊόντων και σύντομος χρόνος επεξεργασίας	Γρήγορη και αποδοτική παραγωγή επαρκών ποσοτήτων EVs

Πίνακας 3-3 μέθοδοι απομόνωσης και συλλογής εξωκυτταρικών κυστιδίων

Ο χαρακτηρισμός των Εξωκυττάρων κυστιδίων μετά την απομόνωση τους χρησιμοποιεί μεθόδους PCR, γονιδιωματικής και πρωτεωμικής. Στον Πίνακα 3-44 που ακολουθεί γίνεται μια σύνοψη των μεθόδων που εφαρμόζονται για τον χαρακτηρισμό τους.

μέθοδοι χαρακτηρισμού εξωκυτταρικών κυστιδίων				
Περιεχόμενο	Μέθοδος	Λεπτομέρειες	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
miRNA	Microarray Τεχνολογία	Παρέχει προφίλ έκφρασης miRNAs σε όλο το γονιδίωμα	Υψηλή εξειδίκευση, κατάλληλη για την ανίχνευση μεγάλων αριθμών μη φυσιολογικών miRNAs	Χαμηλή ευαισθησία, ακατάλληλη για ποσοτικοποίηση χαμηλών επιπέδων miRNAs
	RT-qPCR	Ικανότητα ποσοτικοποίησης miRNAs χαμηλού επιπέδου	Υψηλή ευαισθησία, απαιτεί μικρό όγκο δείγματος	Ανάγκη εύρεσης κατάλληλων ελέγχων miRNA αναφοράς, που δεν είναι πάντα εύκολη επιλογή
	Next Generation Sequencing	Ακριβής ποσοτικοποίηση miRNAs σε όλο το γονιδίωμα	Δεν απαιτούνται εκκινητές ή ανιχνευτές, δυνατότητα ανίχνευσης νέων miRNAs	Απαιτεί εξειδικευμένη γνώση, χρονοβόρα ανάλυση δεδομένων και προετοιμασία δειγμάτων
mRNA	iMER Τεχνολογία	Συνδυάζει μαγνητική επιλογή με σφαιρίδια, συλλογή RNA και PCR φθορισμού σε πραγματικό χρόνο	Απλή διαδικασία, σύντομος χρόνος ανάλυσης, απαιτεί μικρό δείγμα, υψηλή ευαισθησία	Σύνθετη προετοιμασία δείγματος, πιθανότητα ψευδών θετικών ή αρνητικών, τεχνικά απαιτητική
	Whole Genome Sequencing	Απαιτεί κατασκευή βιβλιοθήκης, αλληλούχιση και ανάλυση βιοϋπογραφών	Υψηλή ανάλυση, πλήρης, ευέλικτη	Τεχνικά δύσκολη, σύνθετη και δαπανηρή επεξεργασία δεδομένων
	Digital PCR	Απόλυτη ποσοτική ανάλυση, ανίχνευση συκέντρωσης και αριθμού αντιγράφων mRNA	Υψηλή ευαισθησία, απλό πείραμα, εφαρμογή σε ευρύ φάσμα δειγμάτων	Σύνθετη ανάλυση δεδομένων, απαιτήσεις για εξειδικευμένο προσωπικό, υψηλό κόστος
Πρωτεΐνες	ExoTEST ELISA	Ανιχνεύει και	Αποφυγή	Οι ανιχνευόμενες

		ποσοτικοποιεί EVs από ανθρώπινο πλάσμα	περίπλοκων διαδικασιών καθαρισμού εξωσωμάτων	πρωτεΐνες δεν είναι αποκλειστικές για εξωσώματα, αλλά μοιράζονται με οργανίδια
	EV Array Τεχνολογία	Ανιχνεύει EVs με υψηλή απόδοση	Χωρίς καθαρισμό, γρήγορη, αυτοματοποιημένη, οικονομική, ιδιαίτερα ευαίσθητη	Σύνθετη ανάλυση
	Flow Cytometry	Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών δειγμάτων και χαμηλών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών	Υψηλή ευαισθησία, πολυπαραμετρική ανάλυση, αυτοματοποίηση	Σύνθετη ανάλυση
	Western Blot	Ανιχνεύει πρωτεΐνες μέσω αντισωμάτων	Μεγάλο εύρος δειγμάτων, υψηλή εξειδίκευση, αναπαραγωγιμότητα	Χρονοβόρα και περίπλοκη διαδικασία, εξαρτάται από την ποιότητα των αντισωμάτων
	Φασματομετρία μαζών	Κατάλληλη για όλους τους τύπους πρωτεϊνών	Πολύ υψηλή ευαισθησία, υψηλός βαθμός αυτοματοποίησης	Υψηλό κόστος, απαιτεί υψηλής ποιότητας δείγματα, σύνθετη διαδικασία και επεξεργασία δεδομένων

Πίνακας 3-4 μέθοδοι χαρακτηρισμού εξωκυτταρικών κυστιδίων

Υπάρχει μια δυσκολία στην απομόνωση και ποσοτικοποίηση των εξωκυτταρικών σωματιδίων καθώς είναι πολύ μικρότερα από πολλά συστατικά του αίματος. Καλύτερες μέθοδοι θεωρούνται αυτές που περιλαμβάνουν δυο βήματα αλλά είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη καθώς είναι χρονοβόρες και πιο πολύπλοκες από άλλες με μόνο ένα στάδιο υλοποίησης. Οπότε, η εφαρμογή τους ως δείκτες στην υγρή βιοψία στην κλινική πρακτική περιορίζεται λόγω έλλειψης επικυρωμένων τεχνικών που επιτρέπουν την οικονομικά και χρονικά αποδοτική καθαρότητά τους από βιολογικά υγρά. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η βελτίωση ή ανάπτυξη μεθόδων ικανών να ανιχνεύουν μικρές ποσότητες στόχων σε υψηλό υπόβαθρο θορύβου.

4 Η Υγρή Βιοψία στην κλινική πράξη

Η πρόσφατη ανακάλυψη του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cff-DNA) στο μητρικό πλάσμα έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης (NIPT-Non Invasive Prenatal Testing). Μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της ανακάλυψης είναι η σχετικά υψηλή συγκέντρωση θραυσμάτων εμβρυϊκού DNA στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας, γεγονός που επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευσή τους μέσω προηγμένων μοριακών τεχνολογιών που ακόμα όμως δεν έχει φτάσει σε διαγνωστικό επίπεδο.

4.1 Προγεννητικός Έλεγχος

4.1.1 ανίχνευση ανευπλοειδιών

Ο προγεννητικός έλεγχος εξελίχθηκε ραγδαία από την εποχή που ανακαλύφθηκε ότι είναι δυνατή η λήψη εμβρυϊκών κυττάρων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για ανάλυση. Έτσι στη δεκαετία του 1960, η έρευνα εστίασε ανάλυση κυττάρων του αμνιακού υγρού για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου και την καρυοτύπηση τους. Αργότερα κατά τη δεκαετία του 1980, η Βιοψία χοριακών λαχνών / τροφοβλαστικού ιστού επέτρεψε τη διενέργεια καρυοτύπου νωρίτερα στην εγκυμοσύνη, από το δεύτερο τρίμηνο στο πρώτο. Όμως, βασικός περιορισμός αυτών των τεχνικών είναι η επεμβατική τους φύση και σχετίζεται με κίνδυνο αποβολής.

Είναι γεγονός ότι η αυξανόμενη ηλικία μιας εγκύου αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης τρισωμίας 21, 13 και 18, όμως αυτό δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για άλλες ανευπλοειδίες, όπως αυτές των φυλετικών χρωμοσωμάτων ή διάφορες τριπλοειδίες (Carbone et al., 2021). Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (cff-DNA) έχει την δυνατότητα να συμβάλλει καθοριστικά στον εντοπισμό κήσεων με αυξημένο κίνδυνο για τρισωμία 21 ή 18, ώστε στη συνέχεια να προταθεί επεμβατική διαγνωστική διαδικασία για επιβεβαίωση.

Τα αποτελέσματα από τις μελέτες δείχνουν κάποια αύξηση του συνολικού DNA στο πλάσμα στην τρισωμία 21 και 13 έναντι δειγμάτων από έμβρυα χωρίς ανευπλοειδίες, ενώ για την τρισωμία 18 δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Για τις

ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων τα αποτελέσματα είναι πιο ενθαρρυντικά αλλά δεν δικαιολογούν την ευρεία χρήση της μεθόδου ως διαγνωστική. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων κρίνεται από την θέση λήψης των δειγμάτων, καθώς αυτά λαμβάνονται από τις χοριακές λάχνες και ο πλακούντας έχει υψηλό ποσοστό μωσαϊκισμού, οπότε και η ανάλυση που θα προκύψει μπορεί λανθασμένα να καταμετρήσει θραύσματα του X χρωμοσώματος ως εμβρυϊκή ανευπλοειδία, ενώ το έμβρυο να είναι ευπλοειδές. Επίσης η λύση των μητρικών κυττάρων είναι αυξημένη οπότε και αυξάνεται το φορτίο του ελεύθερου μητρικού DNA και πολλές φορές καλύπτοντας το εμβρυϊκό DNA. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα είναι η ανάλυση από τον ορό ή πλάσμα του αίματος (Bischoff et al., 2005; Carbone et al., 2021) οι πολλαπλές κυήσεις κλπ.

Παρόλο που οι μέθοδοι βελτίωσης της ακρίβειας στην ποσοτικοποίηση του εμβρυϊκού DNA μέσω αποτελεσματικότερων μεθόδων απομόνωσης DNA από πλάσμα/ορό αναμένεται να εξελιχθούν περαιτέρω, τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα υποδεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης είτε του εμβρυϊκού είτε του συνολικού DNA (εμβρυϊκού και μητρικού) μόνο ως πρόσθετου δείκτη για τον προγεννητικό έλεγχο ανευπλοειδιών αφού δεν μπορεί να αντικαταστήσει της υπάρχουσες μεθόδους (Bischoff et al., 2005).

4.1.2 Μη επεμβατική γονοτύπηση του εμβρυϊκού Ρέζους D

Η ανίχνευση της ομάδας ρέζους D (Rhesus D) του εμβρύου στις εγκύους με αρνητικό ρέζους είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη επιπλοκών όπως η αιμολυτική νόσος του νεογνού. Η χρήση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) για την ανίχνευση του Rh του εμβρύου σε μητέρες με αρνητικό Rh σήμερα ήδη χρησιμοποιείται ως διαγνωστική μέθοδος. Το εμβρυϊκό cffDNA αναλύεται για την παρουσία ή απουσία του γονιδίου RhD στο χρωμόσωμα 1, τα δεδομένα δείχνουν ότι η ακρίβεια της τεχνολογίας είναι σχεδόν 100% από το δεύτερο τρίμηνο και μετά. Επί του παρόντος, για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών (primers) και/ή ανιχνευτών (probes). Ωστόσο, για κλινική εφαρμογή μεγάλης κλίμακας, τείνουν να επικρατήσουν τα πρωτόκολλα που βασίζονται στην PCR πραγματικού χρόνου,

λόγω της διεργαστηριακής ομοιογένειας της μεθόδου και της σχετικής αντοχής τους στη μόλυνση από παραπροϊόντα PCR (Goldwaser & Klugman, 2018; Lo, 2001).

Μονογονιδιακές ασθένειες

Για την ανίχνευση μονογονιδιακών ασθενειών η μέθοδος ανάλυσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) βασίζεται στην ανάλυση χιλιάδων πολυμορφικών μόνο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs – single nucleotide polymorphisms), οι οποίοι διενεργούνται αποκλειστικά στα χρωμοσώματα που εντοπίζονται. Στη συνέχεια, τα μητρικά SNPs συγκρίνονται με την αλληλουχία SNP που προέκυψε από το συνολικό μείγμα μητρικού και εμβρυϊκού cfDNA στο πλάσμα και αυτά που διαφέρουν από τα μητρικά SNPs θεωρούνται ότι προέρχονται από το έμβρυο. Αυτή η προσέγγιση παρέχει λεπτομερή ανάλυση και συμβάλλει στον ακριβή εντοπισμό εμβρυϊκών χαρακτηριστικών ή ανωμαλιών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι όταν κυκλοφορεί και χρωμοσωμικό υλικό από Τρίτη πηγή όπως από ένα μεταμοσχευμένο όργανο.

Στην περίπτωση των συνδρόμων που σχετίζονται με μόνο-νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), η θετική προγνωστική αξία (PPV) του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) παραμένει αρκετά χαμηλή, με ποσοστό μόλις 13% για τα πιο συχνά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Di George, τα σύνδρομα Prader-Willi/Angelman, το σύνδρομο Cri-du-chat και άλλα. Παρ' όλα αυτά, διατίθεται διαγνωστικά τεστ από αρκετές ιατροφαρμακευτικές εταιρίες που όμως ορισμένοι οργανισμοί δεν συνιστούν τη χρήση αυτών των μεθόδων. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν απόψεις που υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη προσέγγιση αποτελεί τη μοναδική διαθέσιμη επιλογή και ότι οι μελλοντικοί υποψήφιοι γονείς θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να την επιλέξουν, υπό την προϋπόθεση ότι θα λάβουν επαρκή και κατάλληλη συμβουλευτική καθοδήγηση (Carbone et al., 2021; Goldwaser & Klugman, 2018).

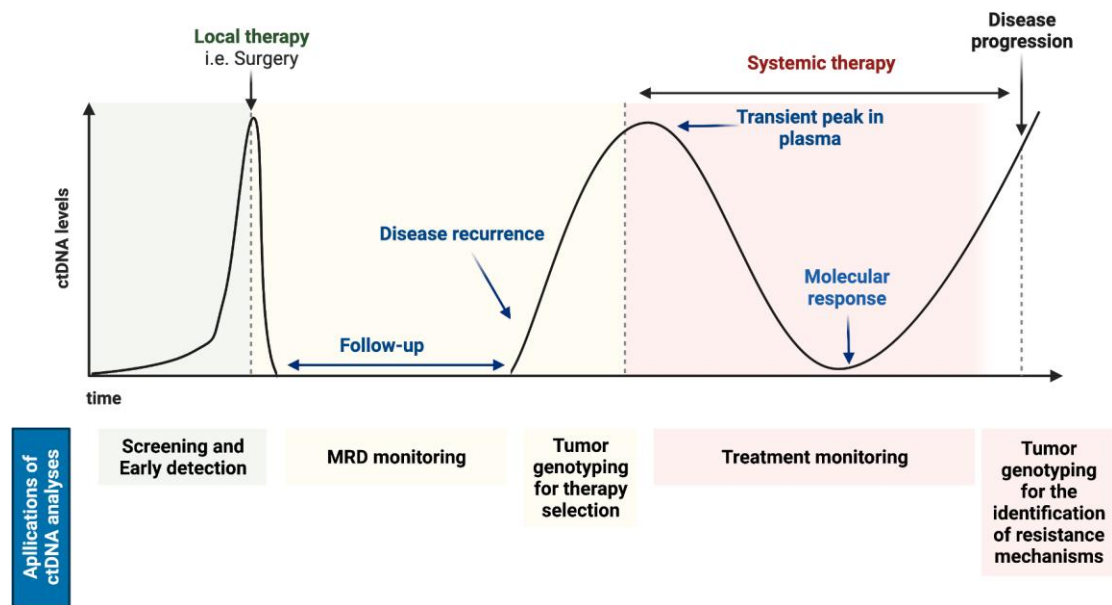
Επίσης υπάρχει ενδιαφέρον για την συσχέτιση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) με επιπλοκές στην εγκυμοσύνη όπως την προεκλαμψία, τον πρόωρο τοκετό, τον διεισδυτικό πλακούντα κ.α (Bischoff et al., 2005).

4.2 Καρκίνος

4.2.1 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) είναι οι δύο κύριες κατηγορίες καρκίνου του πνεύμονα. Ο SCLC αντιπροσωπεύει περίπου το 15–20% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και ο NSCLC, που αποτελεί περίπου το 80–85% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, υποδιαιρείται περαιτέρω σε τρεις άλλους ιστολογικούς τύπου: το αδenoκαρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα (SCC) και το καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων. Η βιοψία είναι μονόδρομος για την ιστολογική αξιολόγηση και διάγνωση του όγκου μέχρι στιγμής, όμως οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για τη συλλογή ιστού είναι ιδιαίτερα επεμβατικές και ενδέχεται να συνοδεύονται από πολλές παρενέργειες. Περαιτέρω, υπάρχει η πιθανότητα ο ασθενής να μην είναι κατάλληλος υποψήφιος για βιοψία δεδομένου την κλινική του κατάσταση. Επιπλέον, η βιοψία προέρχεται από ένα μικρό μόνο τμήμα του όγκου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ημιτελή αξιολόγηση του όγκου λόγω της ετερογένειας του.

Η υγρή βιοψία από την άλλη, χρησιμοποιείται πλέον στην κλινική διαχείριση, ειδικά για την καθοδήγηση της θεραπείας και την παρακολούθηση της νόσου, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Εκτός από το γεγονός ότι αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδο, η υγρή βιοψία επιτρέπει επίσης τη συλλογή δειγμάτων σε τακτά διαστήματα, διευκολύνοντας την έγκαιρη ανίχνευση υπολειμματικής νόσου, υποτροπών και χημειοαντίστασης. Αν και κατάλληλα σωματικά υγρά για την ανίχνευση διαγνωστικών, προγνωστικών και προβλεπτικών βιοδεικτών για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) είναι το πλάσμα, τα πτύελα, το σάλιο, τα κόπρανα, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και οι πλευριτικές συλλογές, κ.α., όμως παρόλα αυτά δεν συλλέγονται δείγματα τυχαία καθώς η επιλογή του σωματικού υγρού πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη τον τύπο του καρκίνου, τη θέση του, το στάδιο που βρίσκεται, κλπ (Casagrande et al., 2023).



Εικόνα 4-1 Εφαρμογές Υγρής Βιοψίας

πιθανές εφαρμογές της υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη σε διάφορα στάδια.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.08.004>

Από τις μεγαλύτερες επιτυχίες στην έρευνα στην υγρή βιοψία είναι η έγκριση το 2016 από τον FDA ενός τεστ για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) βασισμένος στην ανίχνευση ctDNA. Πριν από την έγκριση του τεστ, πολλοί ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μπορεί να υποβάλλονταν σε λάθος θεραπεία ή σε καθόλου θεραπεία, είτε επειδή τα δείγματα από τις συμβατικές βιοψίες ήταν ανεπαρκή ή μη διαθέσιμα. Το τεστ που διατίθεται στο εμπόριο υπό την ονομασία cobas® EGFR mutation test v2, (Roche Molecular Systems, Inc.) σχεδιάστηκε ως συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδος, για την ανίχνευση ελλείψεων στο εξόνιο 19 ή της μετάλλαξης p.L858R στο εξόνιο 21 του γονιδίου **EGFR** σε ασθενείς υποψήφιους για θεραπεία με erlotinib με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Σε μεταγενέστερο χρόνο, διερευνήθηκε το πλάσμα ως πηγή ctDNA, έναντι του ορού, αποδεικνύοντας ότι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με θεραπευτικό σχήμα erlotinib και doxatei παρουσίασαν σημαντικά βελτιωμένα ποσοστά ανταπόκρισης και επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) σε αυτούς στους οποίους ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του **EGFR** στο πλάσμα. Κατόπιν, το διπλά διανυσμένο πλάσμα καθιερώθηκε ως το πρότυπο για την απομόνωση ctDNA από το αίμα (Malapelle et al., 2022). Πέρα από το παραπάνω τεστ επίσης εγκρίθηκε από τον FDA άλλο ένα διαγνωστικό τεστ, το

Idylla TM ctEGFR Mutation Assay που χρησιμοποιεί ctDNA για την ανίχνευση της μετάλλαξης p.(Tyr790Met) που σχετίζεται με αντίσταση στη θεραπεία.

Πέρα από τα τεστ για συγκεκριμένα γονίδια έχουν εγκριθεί ή είναι υπό έγκριση στις Ηνωμένες Πολιτείες αλλά και στην Ιαπωνία, οι συνοδευτικές ή συνδρομητικές διαγνωστικές (companion diagnosticⁱ) υγρές βιοψίες που βασίζονται σε γενομική ανάλυση πολλαπλών όγκων μέσω NGS (Next-Generation Sequencing), όπως τα: **Guardant360® CDx** και **FoundationOne® Liquid CDx** (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA). Επιπλέον, οι επικαιροποιημένες κατευθυντήριες οδηγίες μοριακής ανάλυσης από: το **College of American Pathologists (CAP)**, την **IASLC** και την **Association for Molecular Pathology (AMP)** προτείνουν πλέον ότι η χρήση πάνελ γενετικής ανάλυσης πολλαπλών γονιδίων είναι προτιμότερα από πολλαπλά τεστ μεμονωμένων γονιδίων, για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων εκτός από τους EGFR, ALK και ROS1 (Malapelle et al., 2022).

Πέρα από την επιτυχής προσέγγιση με ctDNA, οι μελέτες στρέφονται και σε άλλους βιοδείκτες όπως βιοδείκτες cfDNA Μεθυλίωσης, CTC, Extracellular Vesicles, και άλλους. Η μεθυλίωση DNA είναι η χημική τροποποίηση όπου προστίθεται μια μεθυλομάδα (-CH₃) σε μία κυτοσίνη και συμβαίνει σε περιοχές πλούσιες σε βάσεις CG που ονομάζονται νησίδες CpG, συνήθως συναντώνται σε θέσεις υποκινητών πολλών γονιδίων και συχνά οδηγεί σε σίγαση γονιδίων, ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά σε γονίδια καταστολής όγκων. Από την άλλη πλευρά, η μεταγραφική ενεργοποίηση μεθυλιωμένων γονιδίων συνδέεται με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως και του καρκίνου του πνεύμονα (Casagrande et al., 2023).

Το cfDNA προερχόμενο από πλάσμα ασθενών με πρώιμο στάδιο μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), συμπεριλαμβανομένων και ασθενών διαγνωσμένων στο στάδιο ΙΑ έδειξε σημαντικές διαφορές στο επίπεδο μεθυλίωσης του DNA, υποδεικνύοντας ότι η μεθυλίωση του DNA θα μπορούσε να

ⁱ Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) ορίζει τα συνοδευτικά διαγνωστικά ως εξετάσεις που παρέχουν πληροφορίες για να καθοδηγήσουν τη ασφαλή και αποτελεσματική χρήση ενός αντίστοιχου θεραπευτικού προϊόντος.

χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο και την πρόωπη ανίχνευση του NSCLC, συνδυαστικά με απεικονιστικές εξετάσεις. Πέρα από διαγνωστικός βιοδείκτης η μεθυλίωση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως προβλεπτικός βιοδείκτης ή βιοδείκτης εκτίμησης κινδύνου αφού όπως προέκυψε από την συνδυασμένη ανάλυση μεθυλίωσης των CDO1 και HOXA9 αυτή συσχετίστηκε με δυσμενείς εκβάσεις, ενώ ο συνδυασμός μεθυλίωσης των PTGDR και AJAP1 συσχετίστηκε με ευνοϊκές εκβάσεις της νόσου. Περαιτέρω δοκιμές κρίνονται απαραίτητες για την βελτίωση της ευαισθησίας όλων των παραπάνω μεθόδων για την χρήση τους στην κλινική πράξη(Casagrande et al., 2023).

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) είναι κύτταρα που αποσπώνται από τη μάζα του όγκου είτε μηχανικά, είτε λόγω απώλειας των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων και εισέρχονται στο κυκλοφορικό σύστημα. Ήδη έχει εγκριθεί από τον FDA το **CellSearch CTC kit®** (Veridex LLC, Raritan, NJ, USA) που χρησιμοποιείται για προγνωστική εκτίμηση. Αυτή η μέθοδος ανιχνεύει μικροσφαιρίδια σιδηρομαγνητικού υλικού κατά των EpCAM σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα όγκου από δείγματα περιφερικού αίματος. Επίσης μια μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα η έκφραση των γονιδίων **PIK3CA**, **AKT2**, **TWIST** και **ALDH1** ήταν υψηλότερη στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) σε σύγκριση με ασθενείς με μη μεταστατική νόσο(Casagrande et al., 2023).

Με παρόμοιο σκεπτικό μελετώνται οι τρόποι που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος τα εξωσώματα, τα διάφορα microRNA, τα αυτοαντισώματα ώστε να βρεθεί συσχετισμός μεταξύ της αλλαγής στο επίπεδο έκφρασης ή απελευθέρωσης τους στο αίμα με τον καρκίνο του πνεύμονα(Casagrande et al., 2023).

Τέλος η ανοσοθεραπεία έχει φέρει σημαντική επανάσταση στην κλινική διαχείριση των ασθενών με καρκίνο, ιδιαίτερα σε εκείνους με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) στους οποίους δεν ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε ογκογονίδια. Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση υψηλών επιπέδων έκφρασης του μορίου PD-L1 (programmed death-ligand 1) στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων μέσω ανοσοϊστοχημείας ή ανοσοκυτταροχημείας παραμένει η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την επιλογή των ασθενών για θεραπεία με

αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (ICI). Εκτός από το PD-L1, άλλοι βιοδείκτες βρίσκονται αυτή τη στιγμή υπό διερεύνηση (Malapelle et al., 2022).

4.2.2 Καρκίνος του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνά διαγνωσμένη μορφή καρκίνου στις γυναίκες και οι επιλογές θεραπείας οι τεχνικές διάγνωσης, πρόγνωσης και παρακολούθησης της πορείας της θεραπείας του διαφέρουν ανάλογα με τον κλινικό υπότυπο του καρκίνου. Η πρώιμη διάγνωση είναι ζωτικής σημασίας και έχει σημαντικό αντίκτυπο στην έκβαση της ασθένειας και σε αυτό συμβάλλουν οι διαθέσιμες διαγνωστικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν τη μαστογραφία και τη βιοψία ιστού, ωστόσο παρουσιάζουν περιορισμούς. Όσο προοδεύουν οι καινοτόμες τεχνολογίες, όπως η εξατομικευμένη ιατρική και η γενετική ανάλυση, η υγρή βιοψία αναδεικνύεται ως μια λιγότερο επεμβατική προσέγγιση για τη διάγνωση και την παρακολούθηση του καρκίνου του μαστού (Wu & Chu, 2022).

Όπως για τον καρκίνο του πνεύμονα, έτσι και για τον καρκίνο του μαστού γίνονται διάφορες μελέτες και κλινικές δοκιμές που αφορούν την υγρή βιοψία. Αν και τα διάφορα μόρια και σωματίδια συνυπάρχουν στο ίδιο δείγμα, είτε είναι πλάσμα, ορός ούρα, σάλιο, κ.λ.π. αυτά για να διαχωριστούν και να συλλεχθούν απαιτούν διαφορετικές τεχνικές και μεθόδους. Έτσι θα γίνει μια παρουσίαση των βιοδεικτών σύμφωνα με τον κλινικό στόχο που έχουν να πετύχουν όπως προγνωστικοί, διαγνωστικοί, προβλεπτικοί, κ.α. αλλά και το είδος του βιοδείκτη όπως CTC, ctDNA, TEPs κ.α.

Το ctDNA έχει επιτυχώς να επιδείξει την χρησιμότητα του ως βιοδείκτης στην υγρή βιοψία μέσω του τεστ CancerSEEK, που είναι ένα πολυκαρκινικό αιματολογικό τεστ σχεδιασμένο να ανιχνεύει οκτώ τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, για την αξιολόγηση μεταλλάξεων σε 16 γονίδια ctDNA (όπως τα TP53, NRAS, CTNNB1, PIK3CA, KRAS, APC και PTEN) το οποίο έχει ευαισθησία 33% και ειδικότητα 99% για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού μέσω πλάσματος. Περαιτέρω, η ανίχνευση CTCs ως βιοδεικτών υγρής βιοψίας για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού έχει αποφέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Έχει αναπτυχθεί μια ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη διαγνωστική

μέθοδο βασισμένη σε τεχνολογία μοριακών ανιχνευτών ενεργοποιούμενων από νουκλεάση, με την οποία μέσω ανάλυσης πλάσματος επιτεύχθηκε η διάκριση μεταξύ ασθενών με καρκίνο του μαστού και υγιών ατόμων (Freitas et al., 2022).

Η απομεθυλίωση του DNA είναι γνωστό ότι παρατηρείται σχεδόν σε όλους τους τύπους καρκίνου και γίνονται δοκιμές για αξιόπιστο δείκτη σε αυτή την κατεύθυνση. Ενθαρρυντικά είναι και τα δεδομένα από μελέτες που επισημαίνουν τη μεγάλη δυναμική των miRNAs ως διαγνωστικών βιοδεικτών για τον καρκίνο του μαστού αλλά χωρίς ακόμη να μπορούν να καθοριστούν κάποια miRNA ως υποψήφια για εφαρμογή στην κλινική πράξη. Εκτός των παραπάνω γίνονται μελέτες και για άλλους βιοδείκτες όπως τα lncRNA, τα TEPs, mRNAs κ.α.

Η αντίσταση στα φάρμακα έχει καταστεί το μεγαλύτερο εμπόδιο για την επιτυχία των αντικαρκινικών θεραπειών, αυτοί οι μηχανισμοί υπονομεύουν την αποτελεσματικότητα των θεραπειών και απαιτούν την ανάπτυξη εξατομικευμένων και πολυπαραγοντικών θεραπευτικών στρατηγικών. Έχει βρεθεί ότι η αύξηση των miR-148a-3p και miR-374a-5p στο αίμα σχετίζεται άμεσα ως αντίδραση μετά από θεραπεία με trastuzumab, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προβλεπτικοί βιοδείκτες. Επιπλέον, στη συνέχεια, τα miRNAs συνδέθηκαν με τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού και τις σηματοδοτικές οδούς AMPK και MAPK. Αρκετές ακόμα μελέτες ακολουθούν για την αξιολόγηση CTC, ctDNA και άλλων βιοδεικτών (Freitas et al., 2022). Επίσης πολλές μελέτες και δοκιμές αξιολογούν ένα ευρύ πλήθος βιοδεικτών και με διαφορετικές μεθόδους ως δείκτες προβλεπτικοί, επιλογής θεραπείας κ.α.

Στην κλινική πράξη έχουν εγκριθεί τρεις μέθοδοι που όμως δεν είναι ειδικοί για τον καρκίνο του μαστού. Έχουν αναφερθεί και στην παρουσίαση για τον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι μέθοδοι **CellSearch CTC kit®**, **Guardant360® CDx** και **FoundationOne® Liquid CDx** (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA) όπου η πρώτη χρησιμοποιεί CTC και οι άλλες δύο ctDNA ως στόχους.

Τα παραπάνω είναι μερικές μόνο εφαρμογές καθώς οι μελέτες επικεντρώνονται σε πολλούς τύπων καρκίνων όπως του παγκρέατος, του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, του καρκίνου του παχέος εντέρου και πολλούς άλλους, με τους ίδιους βιοδείκτες ή ειδικούς για τον κάθε τύπο καρκίνου και ιστού. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και

στην εύρεση κατάλληλων δοτών σε μεταμοσχεύσεις αλλά και παρακολούθηση της πορείας μια μεταμόσχευσης.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι η βιοψία ιστού δεν θα αντικατασταθεί από την υγρή βιοψία. Όμως η υγρή βιοψία δείχνει μια δυναμική που μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο: στην αποτελεσματικότερη διάγνωση, στην επιλογή βέλτιστης προσωποποιημένης θεραπείας, στην παρακολούθηση ασθενών για επανεμφάνιση ή πρόοδο μιας νόσου κ.α.

5 Συστήματα ανίχνευσης

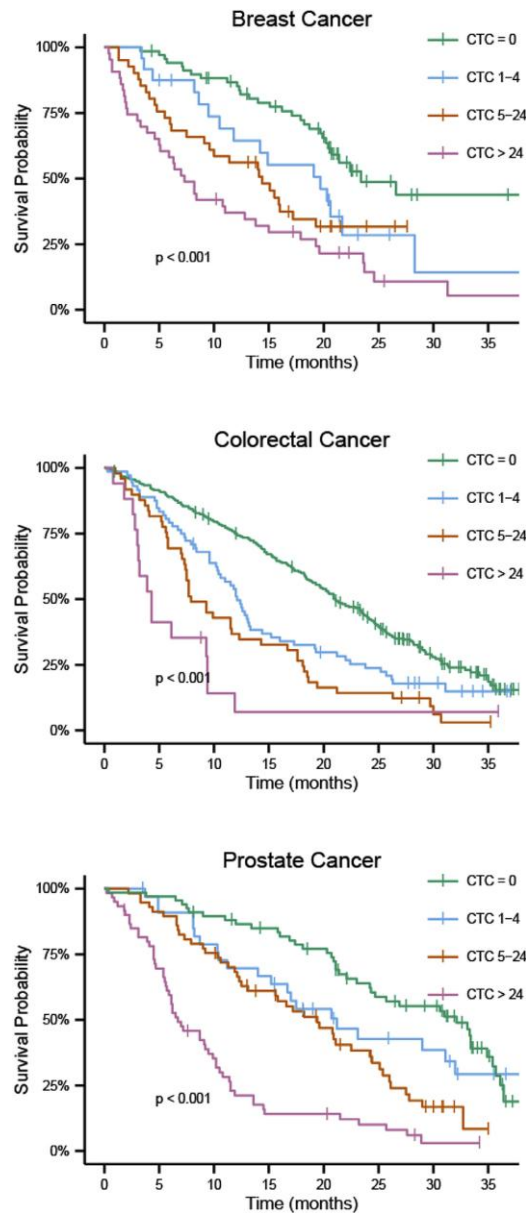
5.1 *CellSearch system*(*Coumans & Terstappen, 2015*)

Το σύστημα το ποίο είναι εγκεκριμένο από τον Αμερικάνο οργανισμό Φαρμάκων FDA, σχεδιάστηκε να κάνει εμπλουτισμό μέσω μαγνητικών σφαιριδίων με ανοσοσυμπλοκοποίηση, με φθορίζουσα σήμανση για την ανίχνευση σπάνιων κυτταρικών πληθυσμών. Για να είναι δυνατή η επεξεργασία δειγμάτων αίματος έως και 96 ώρες μετά τη λήψη, χρησιμοποιείται το κιτ συλλογής αίματος CellSave. Εάν απαιτούνται βιώσιμα κύτταρα ή λήψη RNA από το εμπλουτισμένο δείγμα, συνιστάται η χρήση σωλήνα αίματος με EDTA. Για διαφορετικά κύτταρα έχει σχεδιαστεί και ένα διαφορετικό σύστημα εμπλουτισμού

- Καρκινικά κύτταρα: Χρησιμοποιείται το αντίσωμα VU1D9 που αναγνωρίζει τον παράγοντα EpCAM (CTC kit, CXC kit, CTC profile kit).
- Κύτταρα μελανώματος: Χρησιμοποιείται το αντίσωμα που αναγνωρίζει τον παράγοντα CD146 (CMC kit).
- Ενδοθηλιακά κύτταρα: Χρησιμοποιείται επίσης αντίσωμα για τον παράγοντα CD146 (CEC και CEC profile kit).
- Κύτταρα μυελώματος: Χρησιμοποιείται το αντίσωμα για τον παράγοντα CD138 (CMMC kit) (Weiss et al., 2014).

Τέλος, η καταμέτρηση των CTC, γίνεται μέσω ενός διαφορετικού κιτ, το CTC kit.

Ο επιπολασμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTC) αξιολογήθηκε από δείγματα αίματος από: υγιείς δότες, ασθενείς με καλοήθειες ασθένειες και σε δείγματα από 964 ασθενείς με μεταστατικούς καρκίνους. Στον πληθυσμό ελέγχου δεν ανιχνεύθηκαν ουσιαστικά CTC, ενώ το 36% των δειγμάτων αίματος από ασθενείς με καρκίνο περιείχαν περισσότερα από 2 CTC ανά 7,5 mL αίματος. Το εύρος των CTC που ανιχνεύτηκαν στους ασθενείς με καρκίνο κυμαίνονταν από 0 έως 23.618 CTC ανά 7,5 mL. (Εικόνα 5-1)



Εικόνα 5-1 Η σχέση μεταξύ CTC και επιβίωσης σε διάφορους καρκίνους

Η σχέση μεταξύ κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTC) και επιβίωσης με καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη μελετήθηκε μέσω καμπυλών Kaplan-Meier. Οι καμπύλες αναπαριστούν την επιβίωση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού (πάνω), παχέος εντέρου (μεσαία) και προστάτη (κάτω), ταξινομημένων σε ομάδες βάσει του αριθμού CTC (0, 1-4, 5-24 και >24 CTC) πριν από την έναρξη μιας νέας θεραπευτικής γραμμής. Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με δεδομένα από τις μελέτες.

<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.12.002>

5.2 Guardant360 system(Guardant360 CDx Technical Information, 2024)

Μια διαφορετική μέθοδος θα αναλυθεί παρακάτω που αντί για την αναγνώριση CTCs, στόχο έχει την αναγνώριση ctDNA. Το Guardant360® CDx είναι μία *in vitro* διαγνωστική μέθοδος βασισμένη στην αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS), σχεδιασμένη για την ποιοτική ανίχνευση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια. Χρησιμοποιεί τεχνολογία υβριδοποίησης υψηλής απόδοσης (high through put) για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (SNVs) και εισαγωγών/διαγραφών (indels) σε 55 γονίδια, την διακύμανση αριθμού αντιγράφων (CNAs) σε 2 γονίδια, και την γονιδιακή σύντηξη 4 γονιδίων. Η ανάλυση πραγματοποιείται μέσω κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (cfDNA) που απομονώνεται από το πλάσμα αίματος περιφερικής φλεβικής αιμοληψίας, το οποίο συλλέγεται σε σωλήνες Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes (BCTs). Το τεστ **Guardant360® CDx** προορίζεται για χρήση ως συνοδευτική ή συνδρομητική διαγνωστική εξέταση (companion diagnostic), με σκοπό την αναγνώριση ασθενών που μπορούν να επωφεληθούν από συγκεκριμένες θεραπείες, όπως αυτές καθορίζονται στην εγκεκριμένη επισήμανση των θεραπευτικών προϊόντων που παρατίθενται παρακάτω στον Πίνακα 5-1:

Guardant360® CDx		
Ενδείξεις	Βιοδείκτης	Θεραπεία
Μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (NSCLC)	EGFR εξόνιο 19 διαγραφές, L858R, και T790M*	TAGRISSO® (osimertinib)
	Εισαγωγές στο εξόνιο 20 του EGFR	RYBREVA TM (amivantamab-vmjw)
	Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις ERBB2/HER2 (SNVs και εισαγωγές στο εξόνιο 20)	ENHERTU® (fam-trastuzumab deruxtecan-nxki)
	KRAS G12C	LUMAKRAS TM (sotorasib)

Πίνακας 5-1 Guardant360® CDx

Επιπλέον των παραπάνω, το τεστ Guardant360® CDx έχει σχεδιαστεί για την αποτύπωση ενός προφίλ μοριακών γονιδιακών μεταλλάξεων σε καρκινικά κύτταρα, το οποίο απαιτείται να γίνεται από εξειδικευμένους επαγγελματίες υγείας. Η χρήση του προορίζεται για ασθενείς με ήδη διαγνωσμένο καρκίνο, με οποιοδήποτε συμπαγές κακοήθες νεόπλασμα, και συνδυάζεται με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα. Η εξέταση βοηθά τους κλινικούς ιατρούς στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων και στη διαμόρφωση εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας βάσει του μοριακού προφίλ των όγκων. Το τεστ ανιχνεύει τις παρακάτω μεταλλάξεις. Άλλα τεστ που έχουν εγκριθεί από τον FDA είναι το Therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit της Qiagen το FoundationOne Liquid CDx από την Foundation Medicine και το ctDx FIRST της Resolution Biosciences. Στοχεύουν σε μεταλλάξεις που προκαλούν καρκίνο όπως και πολλά ακόμα που είναι στο στάδιο των μελετών και της ανάπτυξης όπως το CancerSEEK.

5.3 fecal occult blood rapid test (FOBT)(Kaur et al., 2024)

Στην χώρα μας ανακοινώθηκε ένα πρόγραμμα, όπου όλοι οι πολίτες άνω των πενήντα ετών θα προμηθευτούν ένα διαγνωστικό rapid test που θα διενεργήσουν μόνοι τους. Από τα αποτελέσματα που θα ανακοινωθούν από τους ίδιους μέσω των φαρμακοποιών θα διενεργηθούν και περαιτέρω εξετάσεις αν απαιτείται. Η όλη διαδικασία έχει σκοπό την ευαισθητοποίηση αλλά και την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου που παρουσιάζει μια αύξηση τα τελευταία χρόνια ιδίως σε νεότερες ηλικίες.

Η εξέταση για ανίχνευση λανθάνοντος αίματος στα κόπρανα (**FOBT**, Fecal Occult Blood Test) αποτελεί διαγνωστική μέθοδο για τον εντοπισμό κρυφού (λανθάνοντος) αίματος στα κόπρανα και κύρια χρήση του είναι η έγκαιρη ανίχνευση καρκίνου του παχέος εντέρου. Όταν το αίμα εισέρχεται στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, η σφαιρίνη (globin) του μορίου της αιμοσφαιρίνης διασπάται πλήρως από πρωτεολυτικά ένζυμα, ενώ η αίμη (heme) μετατρέπεται σε πορφυρίνες από βακτηριακή δράση από όπου προκύπτει το χρώμα των κοπράνων. Αντίθετα, η αιμοσφαιρίνη που φτάνει στο κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου παραμένει κατά μεγάλο μέρος αδιάσπαστη. Σε φυσιολογικούς ανθρώπους, η απώλεια αίματος από το πεπτικό σύστημα είναι 0,5–1,5 mL ημερησίως, ποσότητα που δεν ανιχνεύεται από την FOBT.

Νεότερες μέθοδοι, όπως η ανοσοχημική ανάλυση κοπράνων (**FIT**, Fecal Immunochemical Test), χρησιμοποιούν αντισώματα για την ανίχνευση αίματος στα κόπρανα και έχουν αντικαταστήσει την FOBT στον έλεγχο για καρκίνο του παχέος εντέρου λόγω της αυξημένης ειδικότητας, ευαισθησίας και μειωμένου κόστους και θεωρούνται πιο αξιόπιστες για τον έλεγχο του καρκίνου του παχέος εντέρου λόγω της δυνατότητάς τους να εντοπίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια μικρές ποσότητες αίματος χωρίς να επηρεάζονται από τη διατροφή του ασθενούς.

6 Επίλογος

Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκε η σημαντική συνεισφορά της υγρής βιοψίας στη διάγνωση, παρακολούθηση και την εξατομικευμένη θεραπεία στην κλινική πράξη. Η υγρή βιοψία αποτελεί έναν καινοτόμο και μη επεμβατικό τρόπο συλλογής γενετικών και μοριακών δεδομένων από σωματικά υγρά με μη επεμβατικό ή ελάχιστα επεμβατικό τρόπο μια ποικιλία από βιοδείκτες που κυκλοφορούν στο αίμα, όπως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), ελεύθερα κυκλοφορούν DNA (cfDNA), TEPs κ.α.. Η τεχνολογία αυτή αποβλέπει στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου, την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία την αναγνώριση μηχανισμών αντοχής σε φαρμακευτικά σχήματα και πολλές ακόμα εφαρμογές.

Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν πως, αν και η υγρή βιοψία δεν αντικαθιστά ακόμη πλήρως τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους, εντούτοις προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες που βελτιώνουν την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα θεραπευτικής προσέγγισης. Επιπλέον, η ενσωμάτωση της υγρής βιοψίας στη ρουτίνα της κλινικής πρακτικής προϋποθέτει τη συνεχή ανάπτυξη και βελτίωση των μεθόδων ανάλυσης, καθώς και την περαιτέρω τυποποίηση της διαδικασίας.

Κλείνοντας, η υγρή βιοψία δεν είναι μόνο ένα εργαλείο διάγνωσης αλλά και ένας καταλύτης για τη μετάβαση σε ένα μοντέλο ιατρικής βασισμένο στη μοριακή κατανόηση των ασθενειών. Με τις μελλοντικές εξελίξεις στη βιοτεχνολογία και τη μοριακή ιατρική, η υγρή βιοψία έχει τη δυνατότητα να γίνει αναπόσπαστο μέρος της σύγχρονης κλινικής πράξης, φέρνοντας νέες ελπίδες για βελτίωση της πρόγνωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Βιβλιογραφία

- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2013). Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1), 110–118. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discovery*, 11(4), 858–873. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
- Allinson, J. L. (2018). Clinical Biomarker Validation. *Bioanalysis*, 10(12), 957–968. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0061>
- Andree, K. C., van Dalum, G., & Terstappen, L. W. M. M. (2016). Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Molecular Oncology*, 10(3), 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.12.002>
- Batool, S. M., Yekula, A., Khanna, P., Hsia, T., Gamblin, A. S., Ekanayake, E., Escobedo, A. K., You, D. G., Castro, C. M., Im, H., Kilic, T., Garlin, M. A., Skog, J., Dinulescu, D. M., Dudley, J., Agrawal, N., Cheng, J., Abtin, F., Aberle, D. R., ... Balaj, L. (2023). The Liquid Biopsy Consortium: Challenges and opportunities for early cancer detection and monitoring. *Cell Reports Medicine*, 4(10). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101198>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Best, M. G., Wesseling, P., & Wurdinger, T. (2018). Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression

- Monitoring. *Cancer Research*, 78(13), 3407–3412.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0887>
- Biopsy—NHS*. (n.d.). Retrieved March 31, 2024, from
<https://www.nhs.uk/conditions/biopsy/>
- Bischoff, F. Z., Lewis, D. E., & Simpson, J. L. (2005). Cell-free fetal DNA in maternal blood: Kinetics, source and structure. *Human Reproduction Update*, 11(1), 59–67. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh053>
- Bittla, P., Kaur, S., Sojitra, V., Zahra, A., Hutchinson, J., Folawemi, O., & Khan, S. (2023). Exploring Circulating Tumor DNA (CtDNA) and Its Role in Early Detection of Cancer: A Systematic Review. *Cureus*, 15(9), e45784. <https://doi.org/10.7759/cureus.45784>
- Britto, F., & Shetty J, V. R. (2020). *BIOPSY-AN OVERVIEW*.
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Carbone, L., Cariati, F., Sarno, L., Conforti, A., Bagnulo, F., Strina, I., Pastore, L., Maruotti, G. M., & Alviggi, C. (2021). Non-Invasive Prenatal Testing: Current Perspectives and Future Challenges. *Genes*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/genes12010015>
- Casagrande, G. M., Silva, M. D., Reis, R. M., & Leal, L. F. (2023). Liquid Biopsy for Lung Cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24032505>

- Castro-Giner, F., & Aceto, N. (2020). Tracking cancer progression: From circulating tumor cells to metastasis. *Genome Medicine*, 12(1), 31.
<https://doi.org/10.1186/s13073-020-00728-3>
- Celià-Terrassa, T., & Jolly, M. K. (2020). Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036905>
- Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2021). Cell-free fetal DNA coming in all sizes and shapes. *Prenatal Diagnosis*, 41(10), 1193–1201.
<https://doi.org/10.1002/pd.5952>
- Coumans, F., & Terstappen, L. (2015). Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells by the CellSearch Approach. In T. Kroneis (Ed.), *Whole Genome Amplification: Methods and Protocols* (pp. 263–278). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2990-0_18
- Cowling, T., & Loshak, H. (2016). *An Overview of Liquid Biopsy for Screening and Early Detection of Cancer*. (pp. 1–13).
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- De Sota, R. E., Quake, S. R., Sninsky, J. J., & Toden, S. (2024). Decoding bioactive signals of the RNA secretome: The cell-free messenger RNA catalogue. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 26, e12. Cambridge Core.
<https://doi.org/10.1017/erm.2024.12>

- Diamantopoulou, Z., Castro-Giner, F., & Aceto, N. (2020). Circulating tumor cells: Ready for translation? *Journal of Experimental Medicine*, 217(8), e20200356. <https://doi.org/10.1084/jem.20200356>
- Ding, S. C., Chan, R. W. Y., Peng, W., Huang, L., Zhou, Z., Hu, X., Volpi, S., Hiraki, L. T., Vaglio, A., Fenaroli, P., Bocca, P., Tam, L. S., Wong, P. C. H., Tam, L. H. P., Jiang, P., Chiu, R. W. K., Allen Chan, K. C., & Dennis Lo, Y. M. (2022). Jagged Ends on Multinucleosomal Cell-Free DNA Serve as a Biomarker for Nuclease Activity and Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Chemistry*, 68(7), 917–926. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac050>
- Ding, S. C., & Lo, Y. M. D. (2022). Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy. In *Diagnostics* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040978>
- Ding, Z., Wang, N., Ji, N., & Chen, Z.-S. (2022). Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. *Molecular Cancer*, 21(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2022). Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.812774>
- Freitas, A. J., Causin, R. L., Varuzza, M. B., Calfa, S., Hidalgo Filho, C. M., Komoto, T. T., Souza, C. D., & Marques, M. M. (2022). Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms23179952>

- Gahan, P. B., & Stroun, M. (2010). The virtosome—A novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochemistry and Function*, 28(7), 529–538. <https://doi.org/10.1002/cbf.1690>
- Gening, S. O., Abakumova, T. V., Gafurbaeva, D. U., Rizvanov, A. A., Antoneeva, I. I., Miftakhova, R. R., Peskov, A. B., & Gening, T. P. (2021). The Detection of Stem-Like Circulating Tumor Cells Could Increase the Clinical Applicability of Liquid Biopsy in Ovarian Cancer. *Life*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/life11080815>
- Gertler, R., Rosenberg, R., Fuehrer, K., Dahm, M., Nekarda, H., & Siewert, J. R. (2003). Detection of Circulating Tumor Cells in Blood Using an Optimized Density Gradient Centrifugation. In H. Allgayer, M. M. Heiss, & F. W. Schildberg (Eds.), *Molecular Staging of Cancer* (pp. 149–155). Springer Berlin Heidelberg.
- Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D., & Mann, M. (2017). Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology*, 13(9), 942. <https://doi.org/10.15252/msb.20156297>
- Goldwaser, T., & Klugman, S. (2018). Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 109(2), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.019>
- Guardant360 CDx Technical Information*. (2024, November 28). https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf20/P200010S008C.pdf
- Gullo, G., Scaglione, M., Buzzaccarini, G., Laganà, A. S., Basile, G., Chiantera, V., Cucinella, G., & Zaami, S. (2023). Cell-Free Fetal DNA and Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Chromosomopathies and Pediatric Monogenic Diseases:

- A Critical Appraisal and Medicolegal Remarks. In *Journal of Personalized Medicine* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/jpm13010001>
- Han, D. S. C., & Lo, Y. M. D. (2021a). The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends in Genetics*, 37(8), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.005>
- Han, D. S. C., & Lo, Y. M. D. (2021b). The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends in Genetics*, 37(8), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.005>
- Hickford, E. S., Dejager, L., Yuill, D., Kotian, A., Shankar, S., Staelens, L., Ulrichs, H., Lewis, S., Louber, J., Williams, A., Le Provost, G. S., & Cutler, P. (2023). A Biomarker Assay Validation Approach Tailored to The Context of Use and Bioanalytical Platform. *Bioanalysis*, 15(13), 757–771. <https://doi.org/10.4155/bio-2023-0110>
- Hoering, A., LeBlanc, M., & Crowley, J. J. (2008). Randomized phase III clinical trial designs for targeted agents. *Clinical Cancer Research*, 14(14), 4358–4367. Scopus. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0288>
- Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., & Gu, Y. (2021). The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103166. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166>
- Huang, J., Hong, W., Wan, M., & Zheng, L. (2022). Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm*, 3(3), e162. <https://doi.org/10.1002/mco2.162>
- Ignatiadis, M., Sledge, G. W., & Jeffrey, S. S. (2021). Liquid biopsy enters the clinic—Implementation issues and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(5), 297–312. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00457-x>

- In 't Veld, S. G. J. G., & Wurdinger, T. (2019). Tumor-educated platelets. *Blood*, 133(22), 2359–2364. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-12-852830>
- Ivanov, M., Baranova, A., Butler, T., Spellman, P., & Mileyko, V. (2015). Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC Genomics*, 16(13), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S13-S1>
- Ju, S., Chen, C., Zhang, J., Xu, L., Zhang, X., Li, Z., Chen, Y., Zhou, J., Ji, F., & Wang, L. (2022). Detection of circulating tumor cells: Opportunities and challenges. *Biomarker Research*, 10(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00403-2>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kaur, K., Zubair, M., & Adamski, J. J. (2024). Fecal Occult Blood Test. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy*, 20(8), 1057–1067. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
- Lenshof, A., & Laurell, T. (2014). Acoustophoresis. In B. Bhushan (Ed.), *Encyclopedia of Nanotechnology* (pp. 1–6). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_423-2
- Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: Biology and clinical

- significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 404.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
- Liu, Y. (2022). At the dawn: Cell-free DNA fragmentomics and gene regulation. *British Journal of Cancer*, 126(3), 379–390. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01635-z>
- Lo, Y. M. D. (2001). Fetal DNA in maternal plasma: Application to non-invasive blood group genotyping of the fetus. *Transfusion Clinique et Biologique*, 8(3), 306–310. [https://doi.org/10.1016/S1246-7820\(01\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S1246-7820(01)00118-5)
- Lo, Y. M. D., Han, D. S. C., Jiang, P., & Chiu, R. W. K. (2021). Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science*, 372(6538), eaaw3616. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3616>
- Ma, Y.-C., Wang, L., & Yu, F.-L. (2013). Recent Advances and Prospects in the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells (ISET) Methodology. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 12(4), 295–309. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500328>
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3–15.
- Malapelle, U., Pisapia, P., Pepe, F., Russo, G., Buono, M., Russo, A., Gomez, J., Khorshid, O., Mack, P. C., Rolfo, C., & Troncone, G. (2022). The evolving role of liquid biopsy in lung cancer. *Lung Cancer*, 172, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.08.004>
- Martel, J. M., & Toner, M. (2014). Inertial Focusing in Microfluidics. In *Annual Review of Biomedical Engineering* (Vol. 16, Issue Volume 16, 2014, pp. 371–

- 396). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-121813-120704>
- Mirza, S., Jain, N., & Rawal, R. (2017). Evidence for circulating cancer stem-like cells and epithelial–mesenchymal transition phenotype in the pleurospheres derived from lung adenocarcinoma using liquid biopsy. *Tumor Biology*, 39(3), 1010428317695915. <https://doi.org/10.1177/1010428317695915>
- Mitsios, A., Arampatzioglou, A., Arelaki, S., Mitroulis, I., & Ritis, K. (2017). NETopathies? Unraveling the Dark Side of Old Diseases through Neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Morgan, T. M. (2019). Liquid biopsy: Where did it come from, what is it, and where is it going? In *Investigative and clinical urology* (Vol. 60, Issue 3, pp. 139–141). <https://doi.org/10.4111/icu.2019.60.3.139>
- Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8381–8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>
- Najafi, S., Asemani, Y., Majidpoor, J., Mahmoudi, R., Aghaei-Zarch, S. M., & Mortezaee, K. (2024). Tumor-educated platelets. *Clinica Chimica Acta*, 552, 117690. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117690>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: Current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Ou, F.-S., Michiels, S., Shyr, Y., Adjei, A. A., & Oberg, A. L. (2021). Biomarker Discovery and Validation: Statistical Considerations. *Journal of Thoracic Oncology*, 16(4), 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.01.1616>

- Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2010). Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine*, 16(9), 398–406.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.001>
- Park, C., Abafogi, A. T., Ponnuvelu, D. V., Song, I., Ko, K., & Park, S. (2021). Enhanced Luminescent Detection of Circulating Tumor Cells by a 3D Printed Immunomagnetic Concentrator. *Biosensors*, 11(8).
<https://doi.org/10.3390/bios11080278>
- Pereira-Veiga, T., Schneegans, S., Pantel, K., & Wikman, H. (2022). Circulating tumor cell-blood cell crosstalk: Biology and clinical relevance. *Cell Reports*, 40(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111298>
- Phillippe, M. (2015). Cell-Free Fetal DNA, Telomeres, and the Spontaneous Onset of Parturition. *Reproductive Sciences*, 22(10), 1186–1201.
<https://doi.org/10.1177/1933719115592714>
- Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. (2019). Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytologica*, 63(6), 449–455. <https://doi.org/10.1159/000499337>
- Qi, T., Pan, M., Shi, H., Wang, L., Bai, Y., & Ge, Q. (2023). Cell-Free DNA Fragmentomics: The Novel Promising Biomarker. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021503>
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J. M., Porta, R., Cobo, M., Garrido, P., Longo, F., Moran, T., Insa, A., De Marinis, F., Corre, R., Bover, I., ... Paz-Ares, L. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label,

- randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 13(3), 239–246.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X)
- Roweth, H. G., & Battinelli, E. M. (2021). Lessons to learn from tumor-educated platelets. *Blood*, 137(23), 3174–3180.
<https://doi.org/10.1182/blood.2019003976>
- Saini, M., Szczerba, B. M., & Aceto, N. (2019). Circulating Tumor Cell-Neutrophil Tango along the Metastatic Process. *Cancer Research*, 79(24), 6067–6073.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1972>
- Sobsey, C. A., Ibrahim, S., Richard, V. R., Gaspar, V., Mitsa, G., Lacasse, V., Zahedi, R. P., Batist, G., & Borchers, C. H. (2020). Targeted and Untargeted Proteomics Approaches in Biomarker Development. *PROTEOMICS*, 20(9), 1900029. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900029>
- Sozzi, G., Boeri, M., Rossi, M., Verri, C., Suatoni, P., Bravi, F., Roz, L., Conte, D., Grassi, M., Sverzellati, N., Marchiano, A., Negri, E., La Vecchia, C., & Pastorino, U. (2014). Clinical Utility of a Plasma-Based miRNA Signature Classifier Within Computed Tomography Lung Cancer Screening: A Correlative MILD Trial Study. *Journal of Clinical Oncology*, 32(8), 768–773.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.4357>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6). https://journals.lww.com/co-hivandaids/fulltext/2010/11000/what_are_biomarkers_.3.aspx
- Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., & Nagy, B. (2020). Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main

- Characteristics and Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186827>
- Thiam, H. R., Wong, S. L., Wagner, D. D., & Waterman, C. M. (2020). Cellular Mechanisms of NETosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 36, 191–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>
- Todenhöfer, T., Pantel, K., Stenzl, A., & Werner, S. (2020). Pathophysiology of Tumor Cell Release into the Circulation and Characterization of CTC. In F. Schaffner, J.-L. Merlin, & N. von Bubnoff (Eds.), *Tumor Liquid Biopsies* (pp. 3–24). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_1
- Udomruk, S., Orrapin, S., Pruksakorn, D., & Chaiyawat, P. (2021). Size distribution of cell-free DNA in oncology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 166, 103455. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103455>
- Vorobjeva, N. V. (2020). Neutrophil Extracellular Traps: New Aspects. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 75(4), 173–188. <https://doi.org/10.3103/S0096392520040112>
- Wang, X., Wang, L., Lin, H., Zhu, Y., Huang, D., Lai, M., Xi, X., Huang, J., Zhang, W., & Zhong, T. (2024). Research progress of CTC, ctDNA, and EVs in cancer liquid biopsy. *Frontiers in Oncology*, 14. <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1303335>
- Weerasinghe, P., & Buja, L. M. (2012). Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Experimental and Molecular Pathology*, 93(3), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.09.018>

- Wishart, G., Templeman, A., Hendry, F., Miller, K., & Pailhes-Jimenez, A.-S. (2024). Molecular Profiling of Circulating Tumour Cells and Circulating Tumour DNA: Complementary Insights from a Single Blood Sample Utilising the Parsortix® System. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(1), 773–787. <https://doi.org/10.3390/cimb46010050>
- Wu, H.-J., & Chu, P.-Y. (2022). Current and Developing Liquid Biopsy Techniques for Breast Cancer. *Cancers*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/cancers14092052>
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- Zhou, Z., Ma, M.-J. L., Chan, R. W. Y., Lam, W. K. J., Peng, W., Gai, W., Hu, X., Ding, S. C., Ji, L., Zhou, Q., Cheung, P. P. H., Yu, S. C. Y., Teoh, J. Y. C., Szeto, C.-C., Wong, J., Wong, V. W. S., Wong, G. L. H., Chan, S. L., Hui, E. P., ... Jiang, P. (2023). Fragmentation landscape of cell-free DNA revealed by deconvolutional analysis of end motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(17), e2220982120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2220982120>
- Σκορίλας Ανδρέας. (2020). Κεφαλαιο 3.2. Κριτήρια επιλογής διαγνωστικών δοκιμασιών. In *Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική—Βασικές αρχές και σύγχρονες προσεγγίσεις*. Broken Hill Publishers Ltd.