



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

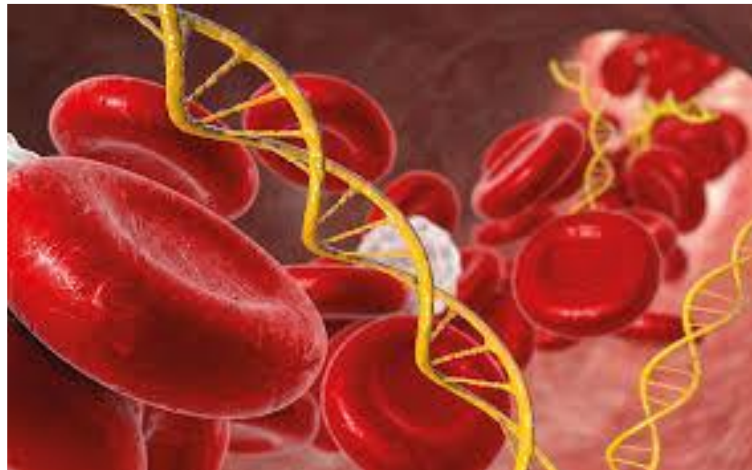


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Cell free DNA ως βιοδείκτης για τη διάγνωση καρκίνου**

POST GRADUATE THESIS

**Cell free DNA: Biomarker for cancer diagnosis**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ/NAME OF STUDENTS

**Κωνσταντίνα Νομικού**

Konstantina Nomikou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/ NAME OF THE SUPERVISOR

**Φραγκίσκη Ανθούλη Αναγνωστοπούλου**

Fragiski Anthouli Anagnostopoulou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

## **Cell free DNA: Biomarker for cancer diagnosis**

KONSTANTINA NOMIKOU

dml21022

FIRST SUPERVIVOR

Fragiski Anthouli Anagnostopoulou

SECOND SUPERVIVOR

Nikolaos Thalasinou

AIGALEO 2023

## Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κωνσταντίνα Νομκού του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 21022 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Κωνσταντίνα Νομκού



## **Επιτροπή εξέτασης**

**Ημερομηνία εξέτασης: 9/2/2024**

Όνοματα εξεταστών -Υπογραφή

1ος Εξεταστής Φραγκίσκη Ανθούλη - Αναγνωστοπούλου

2ος Εξεταστής Νικόλαος Θαλασσινός

## Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί ένα πρωταρχικό πρόβλημα δημόσιας υγείας και προβλέπεται πως τις επόμενες δεκαετίες θα αποτελέσει την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Έως τώρα κύριες μέθοδοι διάγνωσης αποτελούν οι τεχνικές απεικόνισης, οι ιστοπαθολογικές και οι κυτταρολογικές αναλύσεις οι οποίες όμως είναι αποτελεσματικές μόνο σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, ενώ οι τελευταίες είναι ιδιαίτερα επεμβατικές και χρονοβόρες. Δεδομένου ότι η δημιουργία μεταστάσεων έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, η έγκαιρη διάγνωση σε τοπική εντόπιση του όγκου θεωρείται απαραίτητη για την επιτυχή αντιμετώπιση του.

Η μέθοδος υγρής βιοψίας αποτελεί μία σχετικά νέα εναλλακτική τεχνικής διάγνωσης του καρκίνου και βασίζεται στην ανίχνευση διάφορων βιοδεικτών όπως είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cfDNA), άλλα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα αιμοπετάλια σε βιολογικά υγρά με πιο διαδεδομένα το αίμα, τα ούρα και το σάλιο. Το cfDNA απελευθερώνεται από τα κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος ως επακόλουθο κυτταρικού θανάτου όπως είναι η απόπτωση και η νέκρωση. Η ανάλυση του cfDNA όσον αφορά τους επιγενετικούς μηχανισμούς του καρκίνου όπως είναι η μεθυλίωση και οι τροποποιήσεις των ιστονών καθώς επίσης και η ανίχνευση πιθανών μεταλλαγών σε διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια στοχεύει στην έγκαιρη ανίχνευση της νόσου και στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της καρκινογένεσης.

Η υγρή βιοψία παρουσιάζεται ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει επαρκής ιστός σε δείγμα, είναι γρήγορη και ελάχιστα επεμβατική. Επιπλέον, η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης του όγκου σε πρώιμο στάδιο και δίνει κλινικά χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την νόσο και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης του ασθενή στη φαρμακευτική αγωγή. Περιορισμοί της μεθόδου αποτελούν η χαμηλή συγκέντρωση CTCs και ctDNA στο αίμα και η ανάγκη για ευαίσθητες και ειδικές τεχνικές απομόνωσης και ανάλυσης των βιοδεικτών. Η μέθοδος της υγρής βιοψίας έχει μελετηθεί σε διάφορα είδη καρκίνου και παρουσιάζεται ως μία ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική για την επιτυχή αντιμετώπιση της ασθένειας. Ωστόσο, σημειώνεται πως για την καθιέρωση της μεθόδου ως βασικό τρόπο διάγνωσης, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας των τεχνικών ανάλυσης και την διασφάλιση της ασφαλούς κλινικής χρήσης της.

**Λέξεις κλειδιά:** καρκίνος, υγρής βιοψία, βιοδείκτες, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cfDNA), ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα (cfNAS)

## Abstract

Cancer is a major public health issue and it is predicted that in the next decades it will be the leading cause of death worldwide. Until now, the main diagnosis methods are imaging techniques and histopathological analysis which are only effective in later stages of cancer, while the last one is highly invasive and expensive. Since metastasis cause greater mortality rates, early diagnosis of local cancer is considered vital for its effective treatment.

Liquid biopsy is a new alternative method of diagnosis and it is based on various biomarker detection such as circulating tumor cells (CTCs), cell free DNA (cfDNA), other nucleic acids, proteins and platelets in body fluids and especially in blood, urine and saliva. cfDNA is released in bloodstream as a result of cell death such as apoptosis and necrosis. The analysis of cfDNA and cancer epigenetic mechanisms (methylation, histone modification etc.) and mutation detection of tumor suppressor genes and oncogenes targets in early cancer detection and better understanding of cancer mechanisms.

Liquid biopsy appears to be especially useful in cases that there is not enough tissue to examine and the method is fast and minimally invasive. Furthermore, it allows early tumor detection and gives information about the disease and patient's response to treatment. Limitation of the method remains CTCs and ctDNA low blood concentration and the need for more sensitive and specific isolation and analysis techniques. Liquid biopsy has been studied in multiple cancer types and presents to be an especially useful method for effective cancer treatment. However, it is vital that further research will be made in order to improve the method's sensitivity and reassure its safe clinical use.

**Key words:** cancer, liquid biopsy, biomarkers, circulating cancer cells, cell free DNA, cell free nucleic acids

## Συντομογραφίες

Συντομογραφίες	Αγγλικός Όρος	Ελληνικός Όρος
CTCs	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα
cfDNA	Cell free DNA	Ελεύθερο DNA
ctDNA	Circulating tumor DNA	Κυκλοφορούν Καρκινικό DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεσοξυριβονουκλεϊνικό Οξύ
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊνικό Οξύ
DNMT	DNA methyltransferase	Μεθυλοτρανσφεράση του DNA
TSG	Tumor Suppressor Gene	Γονίδιο καταστολής του όγκου
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
MRI	Magnetic Resonance Imaging	Μαγνητική τομογραφία
CT	Computed Tomography	Αξονική τομογραφία
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
mRNA	Messenger RNA	Αγγελιαφόρο RNA
miRNA	MicroRNAs	ΜικροRNA
EVs	Extracellular Vesicles	Εξωκυτταρικά Κυστίδια
DAMPs	Damage-associated molecular patterns	Μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβη
NETs	Neutrophil Extracellular Traps	Εξωκυτταρικές παγίδες των ουδετεροφίλων
bp	Base Pair	Ζεύγος βάσεων
kb	Kilobase	Κιλο-βάση
lncRNA	Long non coding RNA	Μακρά μη κωδικοποιητικά RNA
circRNA	Circular RNA	Κυκλικό ιντρνικό RNA
cfNAS	cell free Nucleic Acids	Ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα
mtDNA	mitochondrial DNA	Μιτοχονδριακό DNA
EMVs	Extracellular Membrane Vesicles	Εξωκυττατικά Μεμβρανικά Κυστίδια
ncRNA	non coding RNA	Μη κωδικοποιητικό RNA
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
TEPS	Tumor Educated Platelets	Τροποποιημένα από όγκους αιμοπετάλια
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
MRD	Minimal Residual Disease	Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος



PFS	Progression-free survival	Επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου
OS	Overall Survival	Συνολική επιβίωση
HCC	Hepatocellular carcinoma	Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα
DD- cfDNA	Donor Derived cfDNA	cfDNA που προέρχεται από τον δότη

## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας .....	III
Περίληψη .....	V
Abstract.....	VII
Συνομογραφίες .....	VIII
Ενότητα A: Καρκίνος.....	2
A.1. Πρόλογος.....	2
A.2. Ορισμός.....	2
A.3.1. Καρκινογένεση .....	3
A.3.2. Θεωρίες για την ερμηνεία της καρκινογένεσης .....	4
A.4. Μετάσταση.....	4
A.5. Ογκοκατασταλτικά και πρωτοογκογονίδια.....	4
A.6. Επιγενετική .....	5
A.7. Επιγενετικοί μηχανισμοί στον καρκίνο .....	5
A.7.1. Μεθυλίωση του DNA .....	6
A.7.2. Τροποποιήσεις ιστονών .....	8
A.7.3. Αναδιαμόρφωση χρωματίνης .....	8
A.8.1. Μέθοδοι διάγνωσης καρκίνου.....	8
A.8.2. Καρκινικοί δείκτες.....	10
A.8.3. Νανοτεχνολογία.....	11
A.9. Αντιμετώπιση .....	11
Ενότητα B: Cell- free DNA .....	12
B.1. Ιστορική αναδρομή .....	12
B.2. Μέθοδος Υγρής Βιοψίας.....	13
B.3. CancerSEEK.....	15
B.4. Πλεονεκτήματα .....	16

B.5. Περιορισμοί.....	17
B.6. Cell- free DNA .....	19
B.5.1. Μηχανισμοί απελευθέρωσης cfDNA.....	20
B.7.2. Απόπτωση.....	21
B.7.3. Νέκρωση και νεκρόπτωση .....	21
B.7.4. NETosis .....	22
B.7.5. Άλλοι παθητικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης ctDNA.....	23
Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα .....	23
Χρωμοσωμική αστάθεια .....	24
B.7.6. Ενεργητική Έκκριση .....	24
B.8. Συγκέντρωση cfDNA στο αίμα .....	25
B.9. Παράγοντες διακύμανσης των επιπέδων cfDNA .....	25
B.10. Απομάκρυνση cfDNA.....	26
B.11. Χρήσεις cfDNA στη διάγνωση.....	28
Διάγνωση και παρακολούθηση νόσου.....	28
Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος.....	28
B.12. CfDNA σε μη παθολογικές καταστάσεις.....	29
Εγκυμοσύνη.....	29
Φυσική άσκηση .....	29
B.13. Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA).....	30
B.14. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs).....	32
B.15. Εμπλουτισμός CTCs.....	33
B.16. Cell- free Nucleic Acids (cf-NAS) .....	34
B.16.1. Cell-free mtDNA .....	35
B.16.2. Cell-Free RNA.....	35
B.16.3. miRNA .....	36

B.16.4. Εξωκυτταρικά κυστίδια.....	38
B.16.5. Εξωσώματα.....	38
B.16.6. Μικροκυστίδια.....	40
B.16.7 Tumor- Educated Platelets (TEPS).....	40
B.17. Χρήση άλλων βιολογικών υγρών στην υγρή βιοψία .....	42
Σάλιο .....	42
Ούρα.....	42
B.18. Συλλογή και διαχείριση cfDNA .....	43
B.19. Μέθοδοι Sequencing ctDNA.....	44
Ενότητα Γ: Εφαρμογές της μεθόδου υγρής βιοψίας σε διάφορα είδη καρκίνου.....	46
Γ.1. Καρκίνος του πνεύμονα.....	46
Γ.2. Καρκίνος του μαστού.....	47
Γ.3. Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	48
Γ.4. Καρκίνος ουροδόχου κύστης.....	49
Γ.5. Καρκίνος του νεφρού .....	50
Γ.6. Καρκίνος παγκρέατος.....	51
Γ.7. Καρκίνος του Θυρεοειδούς.....	52
Γ.8. Καρκίνος του προστάτη.....	53
Γ.9. Καρκίνος του ενδομητρίου .....	54
Γ.10. Αιματολογικές Κακοήθειες.....	55
Γ.11. Καρκίνος του ήπατος.....	56
Γ.12. Εφαρμογές της μεθόδου υγρής βιοψίας σε μη κακοήθη νοσήματα.....	57
Γ.12.1 Μεταμόσχευση.....	57
Γ.12.2. Καρδιαγγειακά Νοσήματα.....	57
Επίλογος .....	58
Βιβλιογραφία .....	60

## Ενότητα Α: Καρκίνος

### A.1. Πρόλογος

Ο καρκίνος αποτελεί ένα πρωταρχικό πρόβλημα δημόσιας υγείας καθώς παγκοσμίως η συχνότητα εμφάνισης του και η θνησιμότητα εξαιτίας αυτού ολοένα και αυξάνονται (Sara Fotouhia 2019) (Ye Zhang 2019). Παρά τις σημαντικές εξελίξεις όσον αφορά τη θεραπεία του και την έγκαιρη διάγνωση μέσω screening tests, χαρακτηρίστηκε ως πρώτο ή δεύτερο αίτιο θανάτου σε πάνω από 100 χώρες το 2019. Το 2020, σχεδόν 10 εκατομμύρια άνθρωποι απεβίωσαν λόγω καρκίνου παγκοσμίως (M. C. Arash Jamshidi 2022). Προβλέπεται πως τις επόμενες δεκαετίες ο καρκίνος θα αποτελέσει την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως και συγκεκριμένα μέχρι το 2030 εκτιμάται πως 30 εκατομμύρια άτομα θα χάνουν τη ζωή τους εξαιτίας αυτού κάθε χρόνο (Ye Zhang 2019) (Sara Fotouhia 2019).

Για την επιτυχή αντιμετώπιση του καρκίνου, σημαντικός παράγοντας είναι η έγκαιρη διάγνωση (Ye Zhang 2019). Ωστόσο, η διάγνωση κακοήθων όγκων πολλές φορές πραγματοποιείται σε προχωρημένο στάδιο, μετά από μία μετάσταση, με αποτέλεσμα να υπάρχουν χαμηλές πιθανότητες επιβίωσης. Για παράδειγμα, ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζει 90% πενταετούς επιβίωσης σε τοπική εντόπιση, ενώ μόνο 27% σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις (Ye Zhang 2019). Σε πολλές περιπτώσεις, οι ασθενείς με καρκίνο εμφανίζουν όγκο in-situ που παραμένει ανενεργός και τοπικά εντοπισμένος ισόβια, όμως το 90% των περιπτώσεων θνησιμότητας προκαλούνται από μεταστάσεις (Humaira Khan 2023).

Με σκοπό την εφαρμογή νέων μεθόδων έγκαιρης διάγνωσης, παρακάτω περιγράφεται η χρήση της «υγρής βιοψίας, η οποία διευκολύνει την διαχείριση των ασθενών με καρκίνο. Η μέθοδος βασίζεται στη μοριακή ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ταχύτητα, είναι ελάχιστα επεμβατική και προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες σχετικές με τον όγκο. Για την εφαρμογή της μεθόδου, ανιχνεύονται κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά νουκλεϊκά οξέα όπως είναι το cell free DNA (cfDNA), το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) ή και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) (Mina Nikanjam 2022).

### A.2. Ορισμός

Καρκίνος ορίζεται ως ο μη φυσιολογικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό του σώματος και αποτελείται από κύτταρα

που έχουν χάσει την ικανότητα να σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Ένας όγκος μπορεί να ανιχνευτεί «κατά λάθος» μέσω ενός εργαστηριακού ή ακτινολογικού ελέγχου ακόμη και για άσχετο σκοπό. Γενικά, για την απόδοση του όρου «καρκίνος», ένας όγκος πρέπει να έχει μέγεθος τουλάχιστον 1 cm ή να αποτελείται από ένα εκατομμύριο κύτταρα πριν την ανίχνευση του. Μέχρι τότε αυτός μπορεί να χαρακτηρίζεται ως «όζος». Εξαιρέση αποτελούν οι αιματολογικές κακοήθειες και ο καρκίνος του μυελού των οστών, όπου δε δημιουργείται κάποια «μάζα» και μπορούν να ανιχνευτούν με εργαστηριακούς ελέγχους.

Η ανικανότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού να αναγνωρίσουν και να καταστρέψουν τα νέα καρκινικά κύτταρα αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε άτομα με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα εξαιτίας χρόνιου στρες ή νόσου, ηλικίας, χημειοθεραπείας και κατάχρηση φαρμάκων όπως είναι τα αναλγητικά, τα αντιβιοτικά και τα κορτικοστεροειδή (Roy PS 2016).

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν τη πιθανότητα καρκινογένεσης είναι η ολοένα και αυξανόμενη ρύπανση, η ραδιενέργεια, η καθιστική ζωή, η μη ισορροπημένη διαίτα, η μόλυνση με καρκινογόνους μικροοργανισμούς και άλλες μεταβλητές, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα συχνοί στις αναπτυσσόμενες χώρες. Οποιαδήποτε από αυτούς τους παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στα γονίδια του κύτταρου ξενιστή με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκου. Τα κύτταρα αυτά γίνονται αθάνατα και είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται με ραγδαίους ρυθμούς σε σχέση με τα υγιή κύτταρα με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο (Mesfin Dessale 2022).

### **A.3.1. Καρκινογένεση**

Η ανάπτυξη καρκίνου αποτελεί μία δυναμική διαδικασία όπου λαμβάνουν μέρος διάφοροι παράγοντες όπως είναι τα καρκινικά, τα στρωματικά και τα ανοσοποιητικά κύτταρα (Dan Yu 2022). Για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό παραδεχόμαστε τρεις βασικές κατευθύνσεις σύμφωνα με τις οποίες μπορεί να επιδράσει κάθε καρκινογόνο αίτιο: α) επί του DNA, β) επί του mRNA και γ) επί του ενδοπλασματικού δικτύου (Αναγνωστοπούλου 2009).

### **A.3.2. Θεωρίες για την ερμηνεία της καρκινογένεσης**

1. Ερεθιστική θεωρία: Αναφέρεται η χρόνια επίδραση εξωγενών ή ενδογενών ερεθισμάτων επί του οργανισμού
2. Υπεραναγεννητική θεωρία: Προϋπόθεση αποτελεί η συνεχής καταστροφή και αναγέννηση των κυττάρων με αποτέλεσμα την κακοήθη εξαλλαγή
3. Εμβρυϊκή θεωρία: Έχει παρατηρηθεί ότι μερικές μορφές καρκίνου αναπτύσσονται σε ιστούς που ξέφυγαν από τη φυσιολογική τους θέση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής
4. Θεωρία της ιονίζουσας ακτινοβολίας: Ενοχοποιεί τις καρκινογόνες ιδιότητες της ιονίζουσας ακτινοβολίας.
5. Χημική θεωρία: Παρουσιάζονται καρκινογόνες ουσίες (π.χ. οι χρωστικές ανιλίνης)
6. Ορμονική θεωρία: Οι ορμόνες μπορούν να κατευθύνουν μερικές καταστάσεις προς την κακοήθη εξαλλαγή, παρόλο που οι ίδιες στερούνται καρκινογόνου ιδιότητας

### **A.4. Μετάσταση**

Μετάσταση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα έκτοπης ανάπτυξης, με αποτέλεσμα την εισβολή τους σε φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτόν από τον οποίο προέρχονται και να ιδρύουν νέες δευτερογενείς αποικίες (μεταστατικές εστίες) (Lewin 2004). Ευθύνεται για το 90% των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο και διακρίνεται στα εξής στάδια: Τοπική διήθηση των καρκινικών κυττάρων, είσοδος στα αγγεία, επιβίωση στην κυκλοφορία, έξοδος από τα αγγεία και τελική μετανάστευση και δημιουργία μετάστασης. Το ποσοστό επιβίωσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) είναι περίπου 2% και μόνο αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να δώσουν μετάσταση σε άλλα όργανα. Υπολογίζεται πως περίπου το 50% των κυττάρων που επιβιώνουν μεταναστεύουν στον μυελό των οστών (Rabia Zeeshan 2017).

### **A.5. Ογκοκατασταλτικά και πρωτοογκογονίδια**

Όπως αναφέρθηκε, ο καρκίνος παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως είναι η μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, η διαφυγή από τα φυσιολογικά μονοπάτια απόπτωσης, η έκκριση αυξητικού παράγοντα και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

κυττάρων. Η ανάπτυξη του όγκου, η διήθηση του και η μετάσταση διευκολύνονται από αλλαγές σε δύο είδη γονιδίων: τα ογκοκατασταλτικά και τα πρωτο-ογκογονίδια. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η απώλεια της λειτουργίας εξαιτίας επιγενετικών μηχανισμών όπως είναι οι μεταλλαγές οδηγεί στην ογκογένεση. Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που μεταφράζονται σε πρωτεϊνικά προϊόντα με σκοπό τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, τα ογκογονίδια είναι μη φυσιολογικά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων προωθούν την καρκινογένεση, μέσω της υπερβολικής ενεργοποίησης και παραγωγής σημάτων κυτταρικής ανάπτυξης. Τα πρωτο-ογκογονίδια μετατρέπονται σε ογκογονίδια μέσω διάφορων μηχανισμών όπως είναι οι μεταλλαγές, οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις κ.α. (McVeigh 2020).

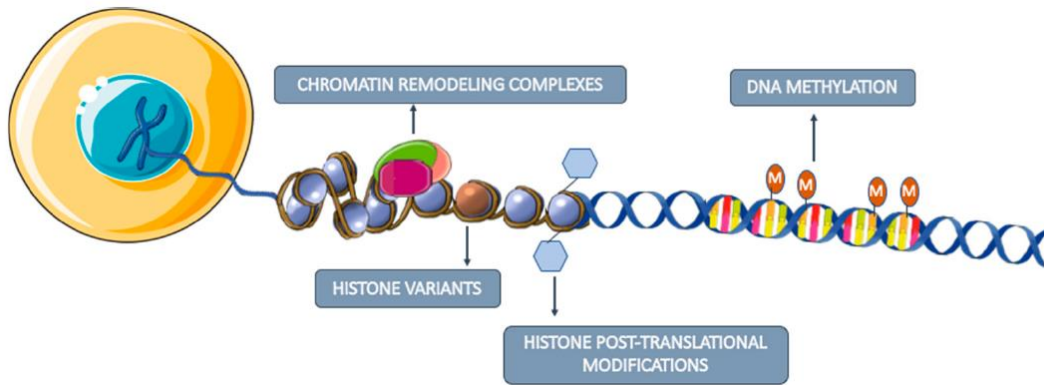
#### **A.6. Επιγενετική**

Επιγενετική ορίζονται οι μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων ή της χρωμοσωμικής σταθερότητας οι οποίες κληρονομούνται και οφείλονται στη μεθυλίωση του DNA, στις τροποποιήσεις των ιστονών ή τα μη κωδικοποιητικά RNA, χωρίς μεταβολή στην ακολουθία του DNA (Suganya Ilango 2020). Το 1975, οι Holliday και Pugh παρουσίασαν τα πρώτα στοιχεία για τον ρυθμιστικό ρόλο της μεθυλίωσης του DNA πάνω στην έκφραση των γονιδίων, η οποία συσχετίστηκε με την καρκινογένεση (Xiaofeng Dai 2021).

#### **A.7. Επιγενετικοί μηχανισμοί στον καρκίνο**

Οι επιγενετικές μεταβολές όπως είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών, η αναδιαμόρφωση της πρωτεΐνης και τα μη κωδικοποιητικά RNA συσχετίζονται στενά με την ανάπτυξη καρκίνου και την εξέλιξη του όγκου (Tongxin Ge 2022).





Εικόνα 1: Επιγενετικοί μηχανισμοί της ρύθμισης έκφρασης των γονιδίων (Vera Constâncio 2020)

### A.7.1. Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι μία χημική τροποποίηση η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της επιγενετικής έκφρασης των γονιδίων, τη γενετική αποτύπωση, την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και της σταθερότητας του γονιδιώματος (Atsuya Nishiyama 2021). Η διαδικασία περιλαμβάνει την ενζυματική προσθήκη μίας μεθυλομάδας στον άνθρακα που υπάρχει στη θέση 5' του δακτυλίου της από τις μεθυλοτρανσφεράσες και τον σχηματισμό 5-μεθυλοκυτοσίνης (5Mc) και καταλύεται από τρία ένζυμα, DNMT1, DNMT3A και DNMT3B (Xiaofeng Dai 2021) (Tongxin Ge 2022). Η μεθυλίωση παρατηρείται κυρίως σε νησίδες δινουκλεοτιδίων CpG (κυτοσίνη :C ενωμένη με φωσφοδιεστερικό δεσμό 3'-5' με την γουανίνη: G) και σε CpG νησίδια (Sonia Perales 2021). Αποτελεί την πρώτη επιγενετική τροποποίηση που παρατηρήθηκε στο ανθρώπινο γονιδίωμα για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση των γονιδίων (Chen Chen 2022).

Στον καρκίνο, η μεθυλίωση συνήθως μεταφράζεται σε καταστολή της μεταγραφής ογκοκατασταλικών γονιδίων, ενώ αντίθετα η απομεθυλίωση συσχετίζεται με την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων (Sonia Perales 2021). Η υπομεθυλίωση των CpG νησιδίων παρατηρήθηκε πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 και έκτοτε έχει αναφερθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως είναι ο όγκος εγκεφάλου, ο καρκίνος του στομάχου, του ήπατος και του μαστού (Chen Chen 2022) (Jian Cao 2020).

Ανιχνεύεται με αναλύσεις του γενετικού υλικού, αποτελεί την πιο εμφανή και γρήγορα αναγνωρίσιμη ανωμαλία της μεθυλίωσης του DNA. Η υπομεθυλίωση σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση της μεταγραφής και των ογκογονιδίων, μπορεί να

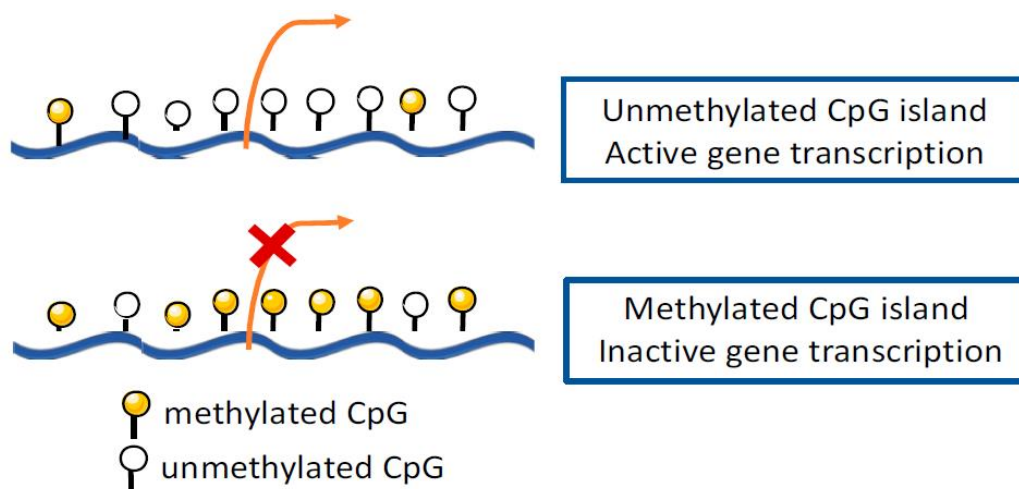
συνεισφέρει στην αύξηση των ανευπλοειδιών και της γενετικής αστάθειας, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης (Tongxin Ge 2022).

Η υπερμεθυλίωση του DNA παρατηρήθηκε πρώτη φορά στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Στους υγιείς ιστούς, τα CpG δινουκλεοτίδια του υποκινητή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, γενικά είναι μη μεθυλιωμένα και ενεργά. Ωστόσο, στα καρκινικά κύτταρα, περίπου το 5-10% αυτών υπερμεθυλιώνονται με αποτέλεσμα την καταστολή των TSG όπως είναι τα VHL, RB1, CDKN2A, GATA4 και MHL1. Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MHL1 έχει βρεθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου και συσχετίζεται με μικροδορυφορική γενετική αστάθεια. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η υπερμεθυλίωση του CDKN2A που οδηγεί στην απενεργοποίηση του στο αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου (Chen Chen 2022).

Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια στα οποία παρατηρείται η υπερμεθυλίωση του υποκινητή των CpG νησίδων είναι τα εξής:

1. BRCA1 και FOXO3a: Καρκίνος του μαστού
2. SET9: Καρκίνος του τραχήλου
3. pRB: Οικογενείς περιπτώσεις μονόπλευρου ρετινοβλαστώματος
4. VHL: Καρκίνος του νεφρού
5. P16INK4a: Μελάνωμα
6. P15INK4b: Αιματολογικές κακοήθειες
7. Hmlh1 και APC: Καρκίνος του παχέος εντέρου (Xiaofeng Dai 2021)

Σημειώνεται πως η μεθυλίωση μπορεί να παρατηρηθεί και στα ογκογονίδια (Xiaofeng Dai 2021).



Εικόνα 2: Μεθυλίωση DNA στη περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου (Vera Constância 2020)

### **A.7.2. Τροποποιήσεις ιστονών**

Το 1964, ο Vincent Allfrey υπέθεσε πως οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορεί να έχουν λειτουργική επίδραση στη ρύθμιση της μεταγραφής. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστό πως αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν όλες τις διαδικασίες που σχετίζονται με το DNA (Kouzarides 2012). Κάθε ιστόνη έχει ιδιαίτερα ευέλικτο αμινοτελικό άκρο πλούσιο σε λυσίνη και αργινίνη το οποίο μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα. Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, την μεθυλίωση, την ακυλίωση, τη φωσφορυλίωση κ.α. και κάποιες από αυτές μπορούν να μεταβάλλουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών και του DNA ή μπορούν να αναγνωριστούν από ειδικές πρωτεΐνες πρόσδεσης, να επηρεάσουν τη συμπίεση της χρωματίνης και να ρυθμίσουν τις διαδικασίες της μεταγραφής. Στα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται πως «χάνεται» η μονο-ακετυλίωση και η τρι-μεθυλίωση της ιστόνης H4 σε αρχικά στάδια της καρκινογένεσης (Tongxin Ge 2022) (Jian Cao 2020).

### **A.7.3. Αναδιαμόρφωση χρωματίνης**

Η δομή της χρωματίνης ρυθμίζεται δυναμικά από το DNA, τις τροποποιήσεις των ιστονών και τα CRCs (Chromatin Remodeling Complexes) που εξαρτώνται από το ATP (Tongxin Ge 2022). Η τροποποίηση της χρωματίνης θεωρείται ιδανικός μηχανισμός δυναμικής έκφρασης ν γονιδίων καθώς είναι γρήγορη και αναστρέψιμη. Η χρωματίνη αποτελεί μία περίπλοκη δομή που αναδιαμορφώνεται δυναμικά με σκοπό την ομαλή διεκπεραίωση κυτταρικών διαδικασιών όπως είναι η μεταγραφή, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, η αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA. Τα ένζυμα που τροποποιούν το περιβάλλον των χρωματίνων είναι πρωταρχικά συστατικά επιγενετικής συντήρησης και η διαταραχή της λειτουργίας τους μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση κάποιας νόσου (Morrison 2020).

### **A.8.1. Μέθοδοι διάγνωσης καρκίνου**

Το πρώτο γνωστό τεστ για την διάγνωση του καρκίνου αναφέρθηκε το 1965 από τον Joseph Gold και είναι για έναν από τα πιο κοινά είδη καρκίνου. Ο ίδιος παρατήρησε τη παρουσία ενός ασυνήθιστου αντιγόνου σε κάποια κύτταρα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, το οποίο απουσίαζε σε υγιή κύτταρα και το ονόμασε καρκινοεμβρυϊκό

αντιγόνο (CEA). Μέχρι τα τέλη του 1970, για την εφαρμογή τεχνικών διάγνωσης με βάση τον ορό του αίματος για διάφορες κακοήθειες χρησιμοποιούνταν ειδικοί βιοδείκτες που εντοπίζονται στο αίμα, στα ούρα και σε άλλα βιολογικά υγρά για συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους καθώς επίσης και οι μεγάλες αλλαγές στη συγκέντρωσή τους βοηθά στην διαφορική διάγνωση μεταξύ φυσιολογικού και μη κυττάρου (Humaira Khan 2023).

Έως τώρα, τεχνικές απεικόνισης, ιστοπαθολογικές και κυτταρολογικές αναλύσεις στοχεύουν στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Οι πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές απεικόνισης όπως είναι η ακτινογραφία, η μαγνητική (MRI) και η αξονική τομογραφία (CT), η ενδοσκόπηση και ο υπέρηχος, μπορούν να ανιχνεύσουν τον όγκο μόνο όταν υπάρχει οπτική αλλοίωση του ιστού. Ωστόσο, μέχρι τότε χιλιάδες καρκινικά κύτταρα θα έχουν πολλαπλασιαστεί, ίσως ακόμη και να έχουν δημιουργηθεί μεταστάσεις. Επιπρόσθετα, οι σύγχρονες μέθοδοι απεικόνισης αδυνατούν να διαχωρίσουν τους καλοήθεις από τους κακοήθεις όγκους.

Η βιοψία ιστού θεωρείται βασική μέθοδος για τη διάγνωση καρκίνου όσον αφορά την ταυτοποίηση μεταλλάξεων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ωστόσο, αυτή η τεχνική παρουσιάζει πολλούς περιορισμούς καθώς είναι ιδιαίτερα επεμβατική, ακριβή, χρονοβόρα διαδικασία, περιορίζεται από την ηλικία του ασθενή, μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές και δεν μπορεί να εφαρμοστεί για μικρές ποσότητες καρκινικού ιστού ή για την παρακολούθηση της θεραπείας (Melinda Szilágyi 2020) (Ondrej Pös 2018) (Athanasios Armakolas 2023). Επιπλέον, η βιοψία ιστού για τη διάγνωση του καρκίνου δεν αποτελεί ρεαλιστική προσέγγιση σε περιπτώσεις που ο όγκος δεν έχει διαμορφωθεί ακόμη (Zhao 2019). Επομένως, η κυτταρολογία και η ιστοπαθολογία δε μπορούν να εφαρμοστούν αποτελεσματικά και ανεξάρτητα για την ανίχνευση καρκίνου σε αρχικό στάδιο. Ως επακόλουθο, η ανάπτυξη τεχνολογιών για έγκαιρη διάγνωση αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση (Ye Zhang 2019).

Προς το παρόν, υπάρχουν μερικές μέθοδοι ελέγχου για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου όπως είναι η μαστογραφία για τον καρκίνο του μαστού, το τεστ PAP για τον καρκίνο του τραχήλου, ο τακτικός έλεγχος και η αξονική τομογραφία με σκοπό τη μείωση της θνησιμότητας λόγω καρκίνου του παχέος εντέρου και του πνεύμονα αντιστοίχως. Ωστόσο, όλες αυτές οι μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμένη ευαισθησία και εφαρμόζονται μόνο σε έναν μοναδικό τύπο καρκίνου (Zhao 2019).

## A.8.2. Καρκινικοί δείκτες

Σύμφωνα με το National Cancer Institute (NCI), καρκινικός δείκτης ορίζεται ως ένα βιολογικό μόριο όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα που εντοπίζονται στο σώμα και υποδεικνύουν ανάπτυξη καρκίνου. Οι μετρήσεις των επιπέδων ορισμένων καρκινικών δεικτών στο αίμα, τα ούρα, τα κόπρανα ή το σάλιο του ασθενούς μπορούν να επιτρέψουν την έγκαιρη διάγνωση, την αναγνώριση επανεμφάνισης του όγκου, την πρόβλεψη του κινδύνου ανάπτυξης νέου ή υπάρχοντος όγκου και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Οι κύριες προκλήσεις όσον αφορά την ανίχνευση των δεικτών σε αρχικό στάδιο της ασθένειας περιλαμβάνουν τις εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα και την ετερογένεια τους σε φυσιολογικά επίπεδα μεταξύ των εξεταζόμενων που οφείλεται στη διατροφή και της δραστηριότητας τους (κάπνισμα, ηλικία, παθήσεις, γενετικά χαρακτηριστικά, κ.α.). Επιπλέον, η συγκέντρωση ενός μόνο βιοδείκτη συνήθως δεν επαρκεί για την απόδειξη ύπαρξης κακοήθειας. Επομένως, η ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων βιοδεικτών κρίνεται αναγκαία για την έγκαιρη και αποτελεσματική διάγνωση (Humaira Khan 2023).

Πίνακας 1: Κύριοι καρκινικοί δείκτες (Xavier Filella 2023)

Καρκινικός Δείκτης	Κακοήθειες
<b><math>\alpha</math>- Φετοπρωτεΐνη (AFP)</b>	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, Καρκίνος των όρχεων και των ωοθηκών
<b>B2- Μικροσφαιρίνη</b>	Πολλαπλό μύελωμα
<b>B- Χοριακή Γοναδοτροπίνη (<math>\beta</math>- HCG)</b>	Χοριοκαρκίνωμα, Καρκίνος των όρχεων και των ωοθηκών
<b>CA 125</b>	Καρκίνος των ωοθηκών, του πνεύμονα και του ενδομητρίου
<b>CA 15-3</b>	Καρκίνος του μαστού
<b>CA 19-9</b>	Καρκίνος του παγκρέατος, Αδενοκαρκίνωμα της χοληφόρου οδού, Καρκίνος του παχέος εντέρου και των ωοθηκών
<b>CA 72-4</b>	Καρκίνος του στομάχου και του οισοφάγου
<b>Καλσιτονίνη</b>	Μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδή
<b>Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόο (CEA)</b>	Καρκίνος του παχέος εντέρου, του στομάχου, αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του μαστού
<b>Χρωμογρανίνη A</b>	Νευροενδοκρινικοί όγκοι
<b>CYFRA 21-1</b>	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
<b>Her-2-neu</b>	Καρκίνος του μαστού
<b>HE-4</b>	Καρκίνος των ωοθηκών
<b>Ειδική Νευρωνική Ενολάση (NSE)</b>	Νευροενδοκρινικοί όγκοι, μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
<b>ProGRP</b>	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
<b>Ειδικό Προστατικό Αντιγόο (PSA)</b>	Καρκίνος του Προστάτη
<b>S100</b>	Κακοήθες μελάνωμα
<b>Αντιγόο Καρκινώματος Πλακώδους Επιθηλίου (SCC)</b>	Καρκινώματα πλακωδών κυττάρων
<b>Θυρεοσφαιρίνη (Tg)</b>	Καρκίνος του θυρεοειδούς

### **A.8.3. Νανοτεχνολογία**

Παρόλο που η νανοτεχνολογία δεν έχει ακόμη αξιοποιηθεί πλήρως κλινικά για τη διάγνωση του καρκίνου, εντοπίζεται ήδη στην αγορά σε μία ποικιλία ιατρικών τεστ, όπως η χρήση νανοσωματιδίων στα τεστ εγκυμοσύνης. Για τη διάγνωση των όγκων, τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών όπως οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον όγκο, το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA), τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και τα εξωσώματα (Ye Zhang 2019). Η νανοτεχνολογία παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και τη δυνατότητα διεξαγωγής ταυτόχρονων μετρήσεων πολλαπλών στόχων (Ye Zhang 2019).

Για τη διάγνωση του καρκίνου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας αριθμός πρωτεϊνών όπως είναι το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), η Α-Φετοπρωτεΐνη, το PSA και το CA-125, οι οποίες ανιχνεύονται μέσω συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων με αντισώματα και τμήματα αντισωμάτων. Αυτή η αλληλεπίδραση μετατρέπεται σε σήμα το οποίο είναι μετρήσιμο. Μία τεχνική τύπου «σάντουιτς» είναι ιδιαίτερα συνηθισμένη για την ανίχνευση πρωτεϊνικών βιοδεικτών και περιλαμβάνει αρκετούς παράγοντες όπως είναι ο βιοδείκτης, το αντίσωμα καθήλωσης, ένα δεύτερο αντίσωμα καθήλωσης και ένα δευτερεύον αντίσωμα που προσδένεται στο αντίσωμα καθήλωσης. Το τελευταίο μπορεί να μετρηθεί οπτικά με διάφορες μεθόδους όπως είναι ο ανοσοφθορισμός (Ye Zhang 2019).

### **A.9. Αντιμετώπιση**

Συμβατικές προσεγγίσεις όσον αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί την κύρια θεραπεία για διάφορα είδη στερεών όγκων και η αποτελεσματικότητά αυτή κρίνεται από την παρουσία ή μη απομακρυσμένων μεταστάσεων και τοπικής διήθησης. Η χημειοθεραπεία είναι η χορήγηση κυτταροτοξικών παραγόντων από το στόμα ή ενδοφλέβια ή σε συνδυασμό, με αποτέλεσμα την πρόκληση κυτταροτοξικότητας τόσο στα υγιή όσο και στα καρκινικά κύτταρα. Στόχος είναι η παρεμπόδιση των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται, να εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς και να κάνουν μεταστάσεις. Άλλες συμβατικές τεχνικές αντιμετώπισης περιλαμβάνουν τη μεταμόσχευση μυελού των οστών και

περιφερικών βλαστοκυττάρων, την ορμονοθεραπεία, τη φωτοδυναμική θεραπεία, τη κρυοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία και τη γονιδιακή θεραπεία (Roy PS 2016).

## **Ενότητα B: Cell- free DNA**

### **B.1. Ιστορική αναδρομή**

Το cfDNA ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στον ορό ασθενών με καρκίνο το 1948 από τους Mandel και Metais (Hui Zhou 2022). Ο όρος περιλαμβάνει όλα τα είδη εξωκυτταρικών μορίων DNA που εντοπίζονται στον ορό ή στο πλάσμα και περιλαμβάνει γενωμικό και μιτοχονδριακό DNA, όπως επίσης και ξένο DNA βακτηριακής ή ιικής προέλευσης (Stefan Grabuschinig 2020). Αργότερα, το 1966 παρατηρήθηκε μία συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του cfDNA και της εμφάνισης της νόσου Συστηματικού Ερυθρηματώδη Λύκου (Nagy 2019). Το 1977, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα free DNA του πλάσματος ήταν σημαντικά υψηλά σε ασθενείς με κακοήθειες και συγκεκριμένα με νόσο προχωρημένου σταδίου (Hui Zhou 2022). Πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες για την χρήση του με στόχο τη διάγνωση ενός όγκου, οι οποίες ωστόσο απέτυχαν εξαιτίας των μη εξελιγμένων μοριακών τεχνικών (Nagy 2019). Ωστόσο, το 1989 αναφέρθηκε πρώτη φορά πως ένα ποσοστό cfDNA των ασθενών με καρκίνο προέρχεται από καρκινικά κύτταρα. Το 1994, αναγνωρίστηκαν οι μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS και NRAS στο cfDNA που βρισκόταν στο αίμα ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή οξεία μυελογενή λευχαιμία, γεγονός που αποτέλεσε τη βάση για τη διάγνωση των όγκων (Hui Zhou 2022).

Σημαντική ανακάλυψη αποτέλεσε η ανίχνευση του RhD και του φύλου του εμβρύου στο μητρικό πλάσμα με τη χρήση real-time PCR, η οποία έγινε δυνατή το 1997 (Nagy 2019). Αργότερα, το 1999, χρησιμοποιήθηκε η εξειδικευμένη για τη μεθυλίωση τεχνική PCR με σκοπό την αναζήτηση υπερμεθυλίωσης του υποκινητή γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση σε 22 ασθενείς που νοσούσαν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Το 2005, η αξιολόγηση των μεταλλάξεων του ctDNA χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για κλινική αξιολόγηση. Τα επόμενα 3 χρόνια, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε, αναλύθηκε το ctDNA 18 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις γονιδίων όπως τα APC, KRAS, TP53, και PIK3CA και παρατηρήθηκε πως το ποσοστό των μεταλλάξεων μεταβαλλόταν κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Hui Zhou 2022).



Η μη επεμβατική ανίχνευση γενετικών νοσημάτων του εμβρύου έγινε ευρέως διαδεδομένη το 2011, όπου και άρχισε να χρησιμοποιείται η ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων με μαζικά παράλληλο τρόπο. Σήμερα, πάνω από το 50% του προγεννητικού ελέγχου πραγματοποιείται από μη επεμβατικές τεχνικές (Non-Invasive Prenatal Testing) (Nagy 2019) (Ondrej Pös 2018).

Η κλινική αξιολόγηση του ctDNA για την ανίχνευση της μετάλλαξης EGFR για τη διάγνωση του καρκίνου εγκρίθηκε πρώτη φορά το 2014 και το 2016 ακολούθησε και η έγκριση της χρήσης της μεθόδου υγρής βιοψίας από το Εθνικό Ολοκληρωμένο Δίκτυο για τον Καρκίνο (NCCN) (Hui Zhou 2022). Ωστόσο, παρά την έγκριση της μεθόδου υγρής βιοψίας, η θνησιμότητα εξαιτίας του καρκίνου παρουσιάζεται ακόμη υψηλή. Ιδιαίτερα μετά την πανδημία του COVID-19, παρατηρήθηκαν διάφορες επιπλοκές στο σύστημα δημόσιας υγείας όσον αφορά τον έλεγχο, τη διάγνωση, την παρακολούθηση και την πρόσβαση στη θεραπεία (George Alexandrou 2023).

## **B.2. Μέθοδος Υγρής Βιοψίας**

Ο όρος «υγρή βιοψία» εισάχθηκε αρχικά από τους Pantel και Alix- Panabieres πριν 10 χρόνια για την περιγραφή των δεικτών του αίματος που σχετίζονται με τους κακοήθεις όγκους (Hui Zhou 2022). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μη επεμβατική διάγνωση του καρκίνου παρέχοντας χρήσιμες κλινικά πληροφορίες σχετικά με την έκβαση της νόσου, την παρακολούθηση αντίστασης στη φαρμακευτική αγωγή, την πρόωρη ανίχνευση κακοήθειας και την επιλογή θεραπείας (Ping Song 2022) (Francesca Galardi 2020). Η διαδικασία δειγματοληψίας για την εφαρμογή της μεθόδου είναι εύκολη, οικονομική, παρουσιάζει επαναληψιμότητα, θεωρείται κατάλληλη για την παρακολούθηση μίας θεραπείας και δεν επηρεάζεται από την ετερογένεια των όγκων. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση βιοδεικτών στα βιολογικά υγρά όπως είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα αιμοπετάλια, τα εξωκυτταρικά κυστίδια, το mRNA, το miRNA, οι πρωτεΐνες και το cfDNA (Zhao 2019) (Melinda Szilágyi 2020). Θεωρητικά, όλα τα βιολογικά υγρά είναι κατάλληλες πηγές βιοδεικτών για τη μέθοδο υγρής βιοψίας με πιο ευρέως διαδεδομένο τον ορό και το πλάσμα του αίματος και ακολούθως τα ούρα, το σάλιο και το υπεζωκοτικό υγρό (Melinda Szilágyi 2020) (Hallie Gaitsch 2023).

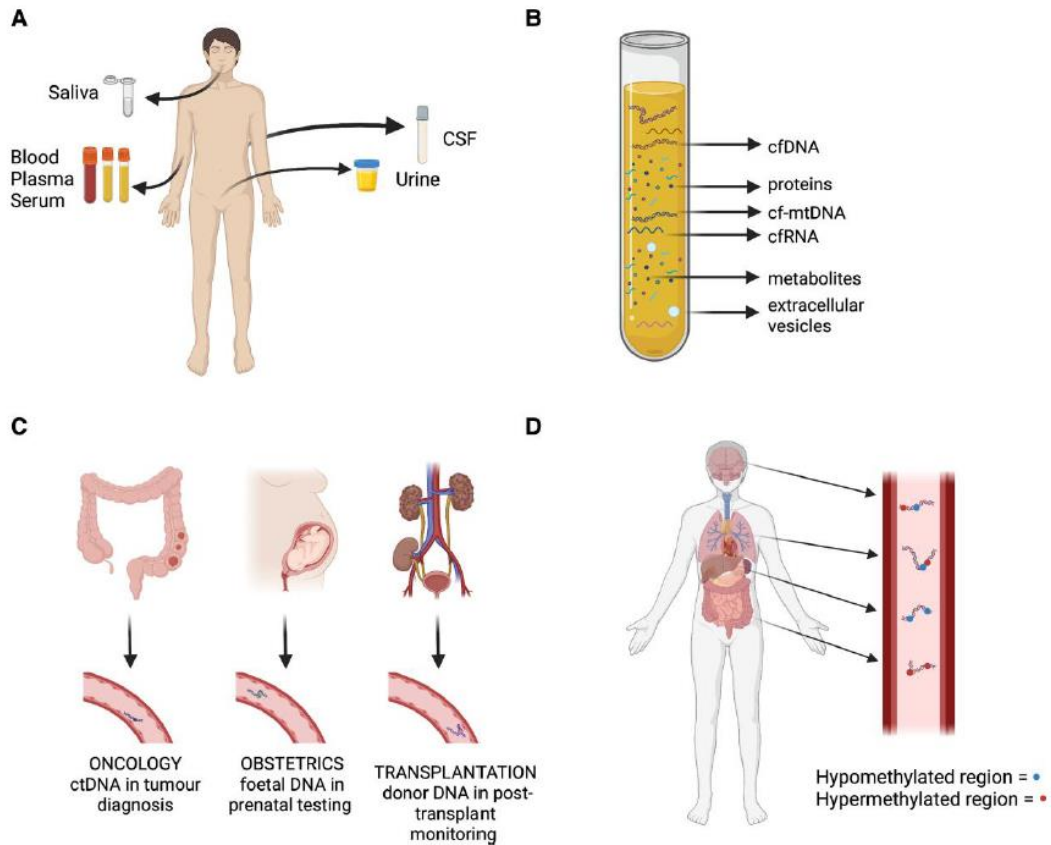
Βιολογικά, οι στόχοι της υγρής βιοψίας μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες. Η μία κατηγορία αναφέρεται σε μεγάλα ή μικρά μόρια χωρίς κύτταρα ή



χωρίς υποκυτταρική δομή όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια, οι υδρογονάνθρακες και άλλοι μικροί μεταβολίτες και μεταλλικά ιόντα. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει στόχους με κυτταρικές ή υποκυτταρικές δομές, όπως είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες, ανοσοποιητικά κύτταρα, τροποποιημένα από όγκους αιμοπετάλια, εξωκυτταρικά σωματίδια (EVs) και κυκλοφορούντα μιτοχόνδρια (Athanasios Armakolas 2023).

Η πιο επιτυχημένη εφαρμογή της μεθόδου αφορά την ανάλυση καρκινικού DNA από τμήματα cfDNA που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μέσω της απόπτωσης, της νέκρωσης ή/και την ενεργό έκκριση (Francesca Galardi 2020). Κάποια από τα γονίδια στα οποία έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις με τεχνικές ανάλυσης cf-DNA είναι τα εξής: TP53, KRAS, BRAF, HER2 (Melinda Szilágyi 2020). Μία μελέτη έδειξε πως μεταλλάξεις όπως οι KRAS και TP53 ανιχνεύονται στο cfDNA υγιών ατόμων έως και 2 χρόνια πριν από τη διάγνωση καρκίνου (Zhao 2019). Εκτός από τις μεταλλάξεις, πιθανούς διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες αποτελούν τα επίπεδα μεθυλίωσης, τα μοτίβα κατακερματισμού cfDNA, τα επίπεδα έκφρασης διαφορετικών ειδών cfRNA (miRNA, circular RNS κ.α.) στο πλάσμα, τα αιμοπετάλια και τα εξωκυτταρικά σωματίδια (Shanwen Chen 2022).

Έως τώρα είναι διαθέσιμο μόνο ένα test έγκαιρης ανίχνευσης διάφορων ειδών καρκίνου (multi- cancer early detection, MCED). Άλλοι μέθοδοι που αναπτύσσονται αξιοποιούν διαφορετικές πληροφορίες cfDNA και σε κάποιες περιπτώσεις διαφορετικούς κυκλοφορούντες αναλύτες (M. C. Arash Jamshidi 2022). Ο συνδυασμός της ανάλυσης των επιπέδων cfDNA σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες. Για παράδειγμα, η ανίχνευση των KRAS μεταλλάξεων στο πλάσμα για την διάγνωση του καρκίνου του παγκρέατος παρουσιάζει 30% ευαισθησία. Ωστόσο, όταν τα επίπεδα CA-19-9 αξιολογούνται σε συνδυασμό με τις KRAS μεταλλάξεις, η ευαισθησία αυξάνεται στο 60% και ακόμη περισσότερο (64%) όταν συμπεριλαμβάνονται 5 ακόμη πρωτεϊνικοί βιοδείκτες. (Sarah R. Greytak 2020)



Εικόνα 3: (A) Βιολογικά υγρά που χρησιμοποιούνται για τη μέθοδο υγρής βιοψίας: ολικό αίμα, πλάσμα, ορός, ούρα, υπεζωκοτικό υγρό, σάλιο κ.α., (B) Τα βιολογικά δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των επιπέδων cfDNA, cf-mtDNA, cfRNA, πρωτεϊνών, μεταβολιτών, εξωκυτταρικών κυστιδίων κ.α.. (C) Η μέθοδος υγρής βιοψίας χρησιμοποιείται κυρίως για την ογκολογία, τη γυναικολογία και τη χειρουργική των μεταμοσχεύσεων, (D) Μεθυλίωση του DNA και μη γενετικά χαρακτηριστικά του cfDNA (Hallie Gaitsch 2023)

### B.3. CancerSEEK

Η σχετικά καινούρια τεχνική CancerSEEK οποία αναπτύχθηκε το 2018 από τους Cohen et al., με σκοπό την ανίχνευση όγκων που είναι δύσκολο να διαγνωστούν. Χρησιμοποιώντας ένα πάνελ αποτελούμενο από 61 αμπλικόνια, αναλύθηκαν δείγματα αίματος με σκοπό την ανίχνευση συχνών μεταλλάξεων σε διάφορους τύπους στερεών όγκων όπως είναι του μαστού, του παχέος εντέρου, του οισοφάγου, του ήπατος, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του παγκρέατος, και του στομάχου. Το ποσοστό ανίχνευσης βελτιώθηκε περαιτέρω με την προσθήκη 8 γνωστών πρωτεϊνικών βιοδεικτών: CA-125, CEA, CA19-9, HGF, MPO, OPN, PRL και TIMP-1 (Andrea Campos-Carrillo 2019).

Το CancerSEEK ανιχνεύει 1,933 πιθανές μεταλλάξεις σε 16 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των TP53, NRAS CTNNB1, PIK3CA, KRAS, APC και PTEN στο cfDNA του πλάσματος μαζί με τους βιοδείκτες που αναφέρθηκαν, με σκοπό όχι μόνο την διάγνωση του όγκου αλλά και τον εντοπισμό της τοποθεσίας αυτού (Sarah R. Greytak 2020) (Ana Julia Aguiar de Freitas 2022). Η τεχνική CancerSEEK έχει ειδικότητα >99% για την ανίχνευση 8 διαφορετικών τύπου καρκίνου και η ευαισθησία της κυμαίνεται από 33% για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού έως 98% για τον καρκίνο των ωοθηκών (Andrea Campos-Carrillo 2019). Στο 83% των ασθενών που διαγνώστηκαν με την τεχνική, ήταν δυνατός ο εντοπισμός του όγκου σε μία από τις δύο τοποθεσίες (Sarah R. Greytak 2020). Το κυριότερο πλεονέκτημα του CancerSEEK είναι πως τα ποσοστά έγκαιρης ανίχνευσης είναι 69% ή παραπάνω για μερικούς από τους δυσκολότερους να διαγνωστούν τύπους καρκίνου, όπως είναι των ωοθηκών, του ήπατος, του παγκρέατος, του οισοφάγου και του στομάχου (Andrea Campos-Carrillo 2019).

#### B.4. Πλεονεκτήματα

Παρόλο που η μέθοδος της βιοψίας ιστού αποτελεί την κύρια μέθοδο για την μοριακή ανάλυση του όγκου, παρουσιάζει ιδιαίτερα μειονεκτήματα τα οποία η μέθοδος της υγρής βιοψίας αντιμετωπίζει αποτελεσματικά:

1. **Ανεπαρκής ιστός:** Το next-generation sequencing (NGS) που βασίζεται στη λήψη ιστού συχνά αποτυγχάνει εξαιτίας της έλλειψης επαρκούς ιστού στο δείγμα, πιθανώς λόγω της δύσκολης πρόσβασης στο σημείο που εντοπίζεται ο όγκος. Το cfDNA μπορεί να συμπληρώσει ή ακόμη και να αντικαταστήσει τη χρήση του ιστού στη διαδικασία της γονοτύπησης (Midhun Malla 2022).
2. **Χρόνος:** Η μέθοδος της υγρής βιοψίας προσφέρει το πλεονέκτημα γρήγορης διεκπεραίωσης της τεχνικής καθώς απαιτούνται μόνο 7 έως 10 ημέρες σε αντίθεση με εβδομάδες που απαιτούνται στις τεχνικές που βασίζονται στη λήψη ιστού (Midhun Malla 2022).
3. **Λήψη δείγματος:** Η παραδοσιακή λήψη δείγματος από ιστό είναι πολύ πιο επεμβατική σε σχέση με τη φλεβοπαρακέντηση, και σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα κρίνεται αδύνατη. Σημειώνεται πως παρουσιάζονται επιπλοκές στο 20% των περιπτώσεων παραδοσιακής βιοψίας (Midhun Malla 2022).

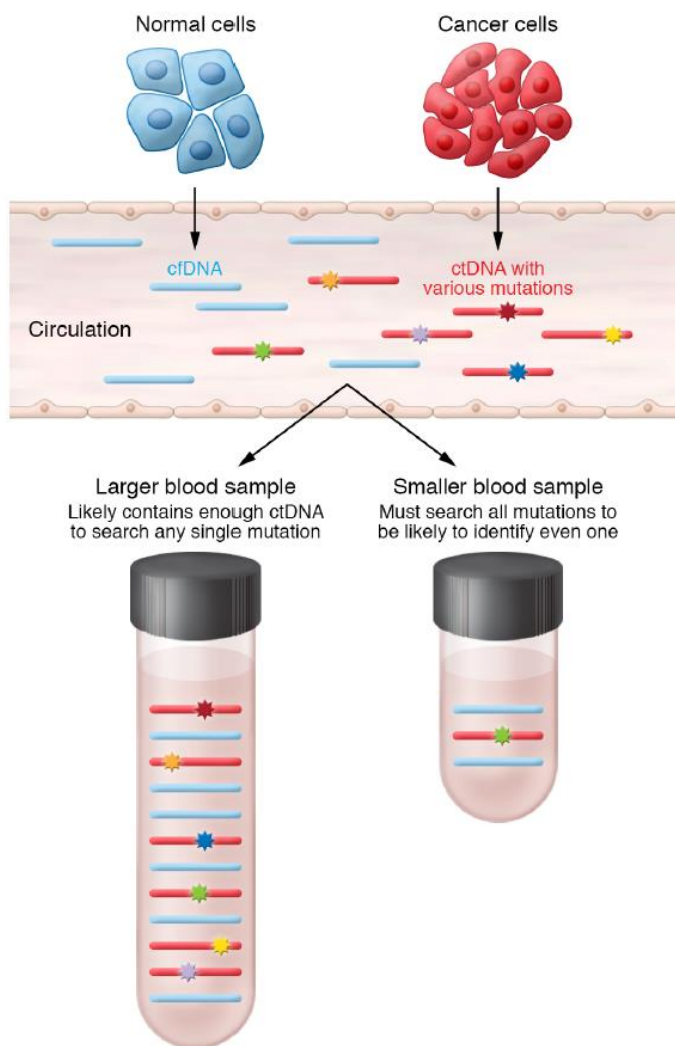
4. **Ετερογένεια μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στον ίδιο ασθενή:** Το τεστ NGS ιστού μπορεί να μην παρουσιάσει την ετερογένεια μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στον ίδιο ασθενή (intratumoral heterogeneity) ή/και την ικανότητα αλλαγής της γενετικής ποικιλότητας ενός μεμονωμένου όγκου με την πάροδο του όγκου (temporal heterogeneity) (Midhun Malla 2022).
5. **Παρακολούθηση υπολειπόμενης νόσου (MRD):** Ο όρος υπολειπόμενη νόσος όσον αφορά την παρακολούθηση της πορείας ενός όγκου, αναφέρεται στο ctDNA που ανιχνεύεται μετά από μία επέμβαση με σκοπό τη θεραπεία αυτού. Το ctDNA φαίνεται να είναι ένας καλός βιοδείκτης όσον αφορά την πρόβλεψη υποτροπής της νόσου ενός ασθενή. Φαίνεται πως σχεδόν όλοι οι ασθενείς (95%-100%) με θετική υπολειπόμενη νόσο υποτροπιάζουν μέσα στα πρώτα δύο χρόνια αν δεν ακολουθήσουν κάποια θεραπεία (Midhun Malla 2022).

### **B.5. Περιορισμοί**

Η μέθοδος της υγρής βιοψίας έχει κερδίσει το ενδιαφέρον της ιατρικής κοινότητας ως ένα μη επεμβατικό εργαλείο διάγνωσης και παρακολούθησης ασθενών με καρκίνο. Ωστόσο, ακόμη δε θεωρείται βασική διαγνωστική μέθοδος και χρησιμοποιείται κυρίως σε συνδυασμό με τη βιοψία ιστού. Κύριοι περιορισμοί της μεθόδου είναι οι εξής:

1. Έλλειψη ευαισθησίας και ακρίβειας για την ταυτοποίηση διάφορων ειδών καρκίνου σε σχέση με την παραδοσιακή βιοψία
2. Ασαφής εικόνα σχετικά με το αν η υγρή βιοψία παρέχει όλες τις γενετικές πληροφορίες του όγκου ή ένα κομμάτι αυτών
3. Ο αριθμός των CTCs, ctDNA, RNA, προγονικών και ώριμων ενδοθηλικών κυττάρων, τροποποιημένων από όγκους αιμοπετάλια, είναι σχετικά μικρός σε σχέση με άλλα συστατικά του αίματος, καθιστώντας την ανίχνευση τους δυσκολότερη
4. Απαιτείται μελέτη του προφίλ των ασθενών για την επιλογή τους στην εφαρμογή της μεθόδου καθώς οι μεταλλάξεις στόχοι δεν είναι ανιχνεύονται συχνά
5. Ευαισθησία και δυσκολία ανίχνευσης μερικών βιοδεικτών
6. Απαιτούνται ιδιαίτερα ειδικές και ευαίσθητες μέθοδοι για την απομόνωση πλάσματος

7. Η απελευθέρωση των βιολογικών υλικών που χρησιμοποιούνται για την υγρή βιοψία μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Saife N. Lone 2022).
8. Η συγκέντρωση του ctDNA είναι μόλις 1-10 ng/ml σε ασυμπτωματικούς ασθενείς. Επομένως, για να επιτευχθεί ευαισθησία 95% για τον έλεγχο του καρκίνου του μαστού, θα χρειαστούν 150-300 ml αίματος ανά τεστ
9. Εκτός από τα καρκινικά, υγιή και αιμοποιητικά κύτταρα επίσης αυξάνουν τη συγκέντρωση του cfDNA που κυκλοφορεί στο αίμα, με αποτέλεσμα αυξημένων ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Zhao 2019).



Εικόνα 4: Απαιτείται επαρκής ποσότητα δείγματος για την ανίχνευση μεταλλάξεων ctDNA (Park 2022)

## B.6. Cell- free DNA

Το εξωκυτταρικό DNA (cfDNA) απελευθερώνεται από τα κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Μπορεί να εντοπιστεί στο πλάσμα και άλλα βιολογικά υλικά όπως είναι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το υπεζωκοτικό υγρό, τα ούρα, το σάλιο κ.α. (Yan-yan Yan 2021). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που αποπίπτουν απελευθερώνουν το γενετικό τους υλικό στο αίμα, όπου κατακερματίζεται από νουκλεάσες και δημιουργείται το cfDNA. Αυτό αποτελείται από μικρά τμήματα δίκλωνου γενετικού υλικού μήκους περίπου 160 νουκλεοτίδια και έχει χρόνο ημιζωής 5-150 λεπτά (Ping Song 2022). Το cf-DNA εντοπίζεται στα βιολογικά υγρά σε τρεις διαφορετικές μορφές: Ελεύθερο, προσδεμένο σε πρωτεΐνες (νουκλεοσώματα, HDL, LDL) ή σε εξωκυτταρικά σωματίδια (εξωσώματα, μικροσωματίδια, αποπρωτικά σώματα) (Melinda Szilágyi 2020).

Πίνακας 1: Cell-free DNA in serum/plasma (Melinda Szilágyi 2020)

Είδος DNA	Μέγεθος	Συγκέντρωση	Κλινική Εφαρμογή
Γενομικό	166->10.000 bp	13,9 ± 3,7 mg/L	Προγεννητικός έλεγχος, διάγνωση καρκίνου, ανίχνευση μεταλλάξεων, εντόπιση όγκου
Μιτοχονδριακό	20-100 bp, <1-21 kbp	4,21 ± 0,38 αντίγραφα/L	Διάγνωση καρκίνου
Μικροβιακό	Ποικίλλει	20-450.000 μικροβιακό cfDNA/ μL ειδικό	Διάγνωση μικροβιακών μολύνσεων και καρκίνου

Τα μόρια cf-DNA εμφανίζονται στην κυκλοφορία με τρεις μορφές:

- Cell-Free DNA Fragments: Είναι «γυμνές» αλληλουχίες DNA που δεν είναι προσδεμένες σε κάποιο άλλο μόριο. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου, το γενομικό DNA σπάει και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Μόνο το γενετικό υλικό που συσχετίζεται με πρωτεΐνες είναι ανθεκτικό ως προς την δράση της DNAασης, ενώ τα ελεύθερα τμήματα αυτού χάνονται εντελώς στα βιολογικά υγρά.
- Vesicle- Bound DNA: Τα νουκλεϊκά οξέα εντοπίζονται στα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) όπου και προστατεύονται από την αποδόμηση. Αυτές οι μεμβρανικές δομές εξυπηρετούν την επικοινωνία των κυττάρων και τα κυστίδια

αναλόγως το μέγεθος και την προέλευση τους διακρίνονται σε εξωσώματα, μικροκυτίδια και αποπτωτικά σώματα. Επιπλέον, μπορεί να απελευθερωθούν από υγιή και καρκινικά κύτταρα. Στη δεύτερη περίπτωση, τα κυτίδια περιέχουν διάφορους παράγοντες ογκογένεσης σε μορφή ογκοπρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, γι αυτό και ονομάζονται ογκοσώματα.

- DNA- Macromolecule Complexes: Τα κυκλοφορούντα νουκλεοσώματα (Circulating Nucleosomes) είναι συμπλέγματα DNA-πρωτεϊνών που προέρχονται από την αποδόμηση χρωμοσωμικού DNA κατά τον κυτταρικό θάνατο και έχουν μέγεθος 180-200 ζεύγη βάσεων, τυλιγμένα γύρω από το οκταμερές των ιστονών (Melinda Szilágyi 2020) (Ondrej Pös 2018).

### **B.5.1. Μηχανισμοί απελευθέρωσης cfDNA**

Το cfDNA απελευθερώνεται στο αίμα ως επακόλουθο κυτταρικού θανάτου όπως είναι η απόπτωση, η νέκρωση, η πυρόπτωση, η φερρόπτωση ή θανάτου που σχετίζεται με εξωκυτταρικές «παγίδες» (ETosis). Αποτελείται κυρίως από δίκλωνο DNA πυρηνικής ή μιτοχondριακής προέλευσης, ενώ η πλειοψηφία αυτού παρουσιάζεται να είναι σε μορφή νουκλεοσωμάτων (Terpei Hashimoto 2021).

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να υποβληθούν σε κυτταρικό θάνατο είτε μέσω απόπτωσης είτε μέσω νέκρωσης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ctDNA. Η απόπτωση και η νέκρωση θεωρούνται πρωταρχικοί παράγοντες της κυκλοφορίας του ctDNA, ωστόσο η ακριβής συνεισφορά τους δεν είναι ακριβής. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός είναι ευρέως γνωστό χαρακτηριστικό του καρκίνου και προκαλεί τοπική εξάντληση θρεπτικών στοιχείων, υποξία, φλεγμονή, οξειδωτικό στρες, οξείδωση, παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων ειδικών για τον ιστό και μοριακών μηχανισμών πρόκλησης βλαβών (Pavel Stejskal 2023).

Από την άλλη πλευρά, άλλες μελέτες αναφέρουν πως το ctDNA που απελευθερώνεται από καρκινικά κύτταρα δεν συσχετίζεται με την διαδικασία της απόπτωσης ή της νέκρωσης άλλα αναλογεί στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G1. Αυτό υποδεικνύει την πιθανή απελευθέρωση του ctDNA από φυσιολογικά κύτταρα μέσω εξωσωμάτων ή άλλων οργανιδίων (Terpei Hashimoto 2021).



### **B.7.2. Απόπτωση**

Η απόπτωση, ως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, αποτελεί ένα αναγκαίο κομμάτι της φυσιολογικής διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης που απομακρύνει τα ανεπιθύμητα και κατεστραμμένα κύτταρα (Lood 2019).

Η διαδικασία της απόπτωσης χαρακτηρίζεται από τρία μονοπάτια: το εξωγενές, το ενδογενές και το μονοπάτι granzyme B, στο οποίο η κυτταροτοξική πρωτεάση granzyme B μεταφέρεται στα κύτταρα- στόχους μετά την απελευθέρωση της από κυτταροτοξικά κύτταρα. Και τα τρία από αυτά οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 με επακόλουθο την καταστροφή των κυττάρων. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 απελευθερώνει το ένζυμο DNAση που ενεργοποιείται από την κασπάση (CAD), η οποία διασπά το δίκλωνο DNA σε κομμάτια μεγέθους 180-200 bp, κυρίως σε περιοχές χρωματίνης εντός των νουκλεοσωμάτων, στην μορφή των οποίων «πακετάρεται» το cfDNA (Terpei Hashimoto 2021). Υπάρχουν πολλαπλά χαρακτηριστικά του cfDNA που υποδεικνύουν ότι αποτελεί προϊόν απόπτωσης όπως το ότι αποτελεί ένα δίκλωνο μόριο DNA χαμηλού μοριακού βάρους με μέσο όρο μήκους 150-200 bp και παρουσιάζεται στο τζελ ηλεκτροφόρησης ως «νουκλεοσωμικές μονάδες» (Lood 2019).

### **B.7.3. Νέκρωση και νεκρόπτωση**

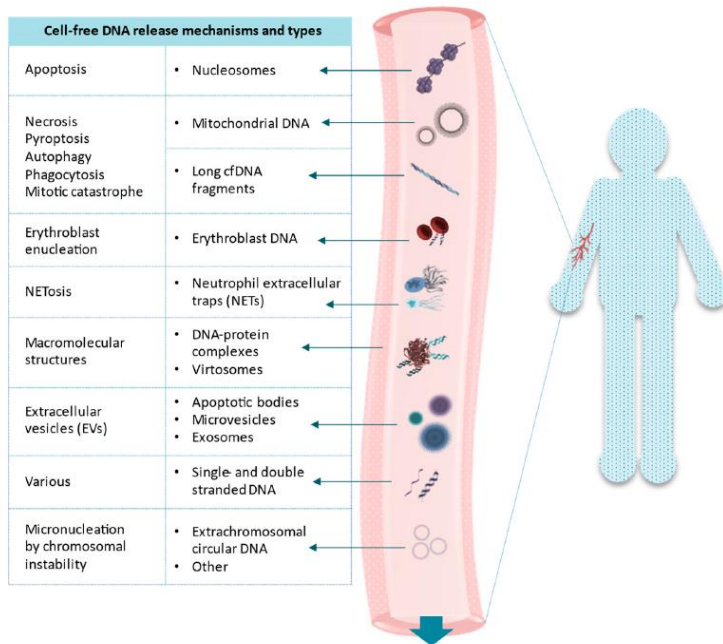
Η νέκρωση, σε αντίθεση με την απόπτωση, αποτελεί τυχαία μορφή κυτταρικού θανάτου που ακολουθεί ύστερα από την καταστροφή του κυττάρου και συμβαίνει σε περιπτώσεις τραύματος, τραυματισμού και σήψης (Lood 2019). Χαρακτηρίζεται από διόγκωση του κυττάρου, καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης εξαιτίας μη καθορισμένων μηχανικών ή χημικών γεγονότων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών όπως είναι το cfDNA. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, απελευθερώνονται τμήματα DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους (>10 kbp) λόγω της μη καθορισμένης «πέψης» της χρωματίνης. (Terpei Hashimoto 2021) (Lood 2019). Τα επίπεδα του cfDNA που απελευθερώνεται συσχετίζονται με τη σοβαρότητα του τραύματος, των μετα-τραυματικών επιπλοκών και τη θνησιμότητα των ασθενών με σήψη (Lood 2019, Lood 2019). Η νεκρόπτωση είναι ένας άλλος τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με μορφολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της νέκρωσης. Ενεργοποιείται από υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (DRs),



υποδοχείς IFN και TLR3/4 και οδηγεί στον τραυματισμό της μεμβράνης του πλάσματος και την απελευθέρωση DAMPs όπως το cfDNA (Terpei Hashimoto 2021).

#### **B.7.4. NETosis**

Ως ανοσολογική απόκριση έναντι των μικροβίων, όπως επίσης και κατά τη διάρκεια μίας «στείρας» φλεγμονής, τα ουδετερόφιλα υφίστανται μία μοναδική μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, γνωστού ως NETosis. Έχει ως αποτέλεσμα την εξώθηση μίας δομής μη συμπυκνωμένου DNA πυρηνικής προέλευσης επικαλυμμένο με ιστόνες, κωκκιώδεις και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες στον εξωκυτταρικό χώρο. Εκτός από τη διαδικασία που μόλις περιεγράφηκε που καταλήγει στο θάνατο των ουδετερόφιλων, αυτά μπορούν να υποβληθούν σε μία NETosis, κατά την οποία αποβάλλουν μία μικρή ποσότητα DNA, συνήθως μιτοχondριακής προέλευσης, επιτρέποντας την επιβίωση και τη συνέχιση της αντιμικροβιακής δράσης τους. Εφόσον δίκλωνο DNA αποτελεί τη δομική βάση των NETs, σε περιπτώσεις υπερβολικής NETosis ή προβληματικής απομάκρυνσης, τα υπολείμματα της διαδικασίας θα μπορούσαν να ευθύνονται για υψηλά επίπεδα του κυκλοφορούντος cfDNA. Ως επακόλουθο, η NETosis φαίνεται να συσχετίζεται με τα επίπεδα cfDNA σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, ο καρκίνος και ο οξύς τραυματισμός του πνεύμονα που σχετίζεται με τη μετάγγιση (Lood 2019).



Εικόνα 5: Μηχανισμοί απελευθέρωσης cfDNA (Stefan Grabuschnig 2020)

## B.7.5. Άλλοι παθητικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης ctDNA

### Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

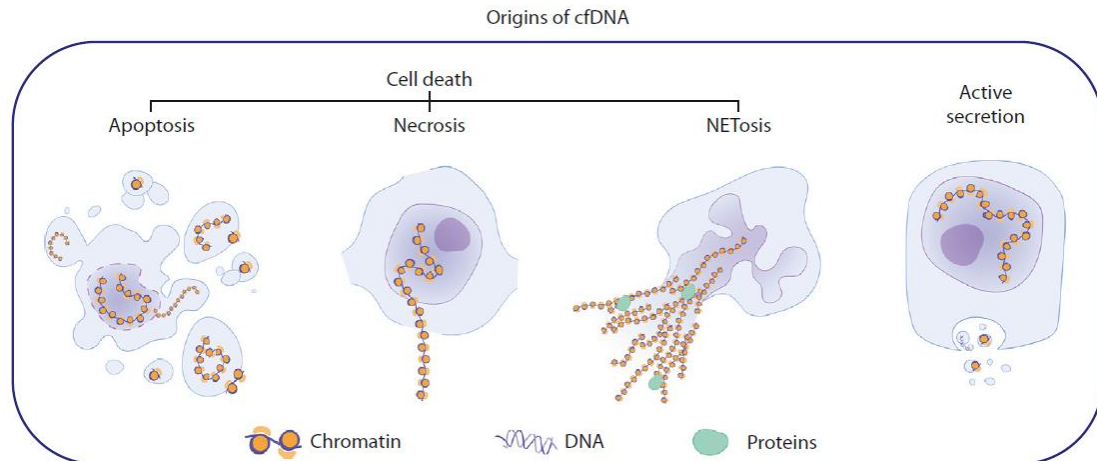
Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα είναι πιθανή πηγή ctDNA. Όταν τα CTCs απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, έρχονται αντιμέτωπα με αιμοδυναμικές δυνάμεις, την ταχύτητα της κυκλοφορίας του αίματος, συγκρούσεις με συστατικά του αίματος και δημιουργία συμπλεγμάτων με μη κακοήθη κύτταρα όπως είναι τα λευκοκύτταρα και τα θρομβοκύτταρα. Αυτό μπορεί να έχει ως συνέπεια την ρίξη των κυττάρων και την απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός απελευθέρωσης μπορεί να έχει ιδιαίτερη κλινική αξία, δεδομένης της σπανιότητας των καρκινικών κυττάρων, της έλλειψης δεδομένων και δυνατότητας ποσοτικοποίησης αυτών των γεγονότων. Πράγματι, η ποσότητα του γενετικού υλικού του ctDNA ισοδυναμεί με 100 έως και 1000 φορές περισσότερες από αυτή των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, το ctDNA συχνά εντοπίζεται σε δείγματα όπου τα CTCs δεν ανιχνεύονται, ενώ το αντίθετο δε παρατηρείται (Pavel Stejskal 2023).

## Χρωμοσωμική αστάθεια

Η χρωμοσωμική αστάθεια αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό του καρκίνου και μπορεί να οδηγήσει στη παθολογική έκκριση του ctDNA. Μπορεί να απελευθερωθεί μέσω μικροπυρήνων, κάποιων δομών που περιέχουν χρωμοσωμικό DNA που αποδομείται ακανόνιστα κατά τη διάρκεια της μίτωσης και συγκεντρώνεται σε άλλον πυρηνικό φάκελο. Τα επίπεδα σχηματισμού micronuclei αυξάνονται στα καρκινικά κύτταρα και μπορούν να θεωρηθούν πιθανή αιτία μετακίνησης του DNA στον εξωκυτταρικό χώρο. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωση του παραπάνω μηχανισμού απελευθέρωσης ctDNA (Pavel Stejskal 2023).

### B.7.6. Ενεργητική Έκκριση

Η ενεργητική έκκριση χαρακτηρίζεται από ομοιοστατικό, ρυθμισμένο και ενεργοεξαρτώμενη απελευθέρωση νεοσύνθετων νουκλεϊκών οξέων. Σε αυτή τη διαδικασία λαμβάνουν μέρος πρωτεΐνες των οποίων ο ρόλος είναι η απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων από βιώσιμα κύτταρα (Pavel Stejskal 2023). Η ενεργητική έκκριση πραγματοποιείται μέσω εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs), συμπεριλαμβανόμενων των εξωσωμάτων και των μικροσωματιδίων (microparticles) και λιποπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Το cfDNA που εντοπίζεται στα συνδεδεμένα με τη μεμβράνη EVs, μπορούν να προστατευτούν από την αποδόμηση από τις νουκλεάσες και να απελευθερωθούν στον εξωκυτταρικό χώρο. Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια μεγέθους 30-100 nm που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλους μεταβολίτες. Μέσω των βιολογικά ενεργών συστατικών τους, όπως το DNA, τα εξωσώματα φαίνεται να ρυθμίζουν διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες. Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε πως περισσότερο από το 93% του cfDNA του πλάσματος εντοπίζεται στα εξωσώματα, ενώ το μέγεθος της πλειοψηφίας αυτού είναι <200 bp. Από την άλλη πλευρά, μία διαφορετική μελέτη έδειξε πως τα εξωσώματα μπορούν να είναι επίσης η πηγή DNA υψηλού μοριακού βάρους (>10kb) (Lood 2019).



Εικόνα 6: Προέλευση cfDNA (Lo 2021)

## B.8. Συγκέντρωση cfDNA στο αίμα

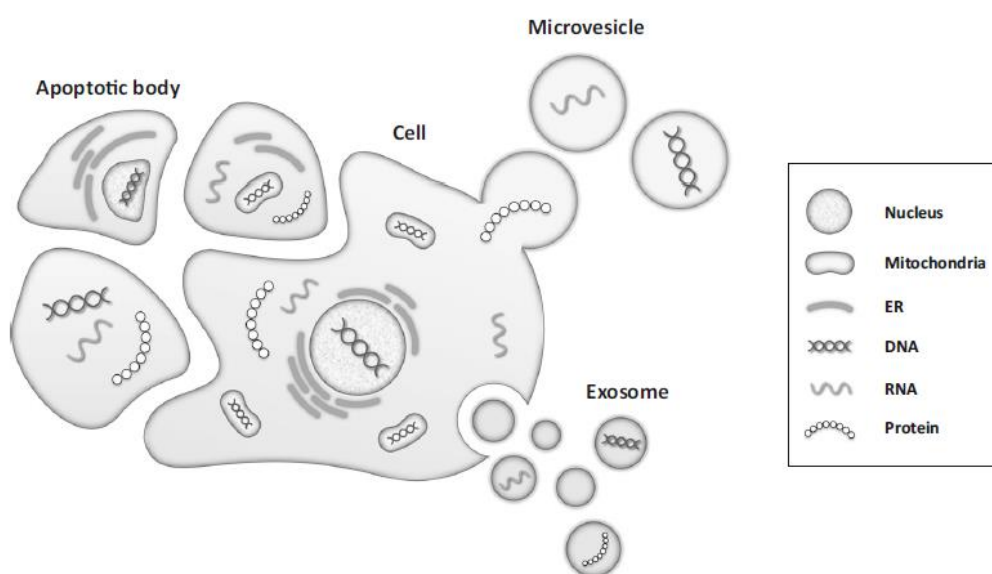
Η συγκέντρωση του cfDNA στο αίμα ποικίλει σημαντικά και κυμαίνεται από 0 έως 100 σε υγιή άτομα και πάνω από 1000 ng/ml σε ασθενείς με καρκίνο. Επιπλέον, υπάρχει αξιοσημείωτη διακύμανση στα επίπεδα μεταξύ ασθενών με διαφορετικά είδη κακοήθειας. Για παράδειγμα, η συχνότητα ανίχνευσης σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο στο πάγκρεας, στις ωοθήκες, στο παχύ έντερο, στο ορθό, στον οισοφάγο, στο μαστό, στο μελάνωμα και σε άλλες κακοήθειες είναι υψηλότερη από ότι σε ασθενείς με καρκίνο στον εγκέφαλο, στα νεφρά ή στον θυρεοειδή σε αρχικό στάδιο. Υπάρχει η υπόθεση ότι αυτή η διαφορά οφείλεται στην εντόπιση του όγκου καθώς η ανατομία του μπορεί να εμποδίζει την απελευθέρωση του cfDNA στα βιολογικά υγρά (Anatoli Kustanovich 2019).

## B.9. Παράγοντες διακύμανσης των επιπέδων cfDNA

Έχει αποδειχθεί πως η ολική ποσότητα του κυκλοφορούντος DNA είναι υψηλότερη σε ασθενείς με καρκίνο από ότι σε υγιή άτομα. Ωστόσο, η αυξημένη συγκέντρωση cfDNA δεν παρατηρείται μόνο σε κακοήθειες αλλά και στο πλάσμα εγκύων γυναικών και ασθενών που έχουν κάνει μεταμόσχευση. Υψηλά επίπεδα cfDNA μπορεί επίσης να παρατηρηθούν σε φυσιολογικές (πχ σωματική άσκηση) και μη κακοήθεις παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή, η νεφρική ανεπάρκεια, τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο διαβήτης, η καταστροφή ιστού, η σήψη και έμφραγμα του μυοκαρδίου (Justin MenceI

2022) (M. C. Arash Jamshidi 2022). Εκτός από τα παραπάνω νοσήματα, η ηλικία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ολική συγκέντρωση του cfDNA στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό πιθανώς οφείλεται περισσότερο στη μειωμένη ικανότητα απομάκρυνσης του από τον οργανισμό στις μεγαλύτερες ηλικίες παρά στην αυξημένη απελευθέρωση του από τα κύτταρα που πεθαίνουν. Και στις δυο περιπτώσεις, η σύνθεση του cfDNA παρουσιάζεται να είναι ίδια στα υγιή νεαρά και γηραιότερα άτομα (Hallie Gaitsch 2023).

Σημειώνεται πως το cfDNA στους υγιείς δότες απομονώνεται κυρίως από τα αιμοποιητικά κύτταρα, μέσω της απόπτωσης και η συγκέντρωσή του είναι 10 έως 30 ng/ml, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις τα επίπεδα μπορούν να αυξηθούν έως και 50 φορές. (Hallie Gaitsch 2023)(Marta Sant 2022) (Melinda Szilágyi 2020). Επιπρόσθετα, φαίνεται πως η συγκέντρωση του cfDNA μειώνεται σε ασθενείς που θεραπεύονται από τον καρκίνο (Ondrej Pös 2018).



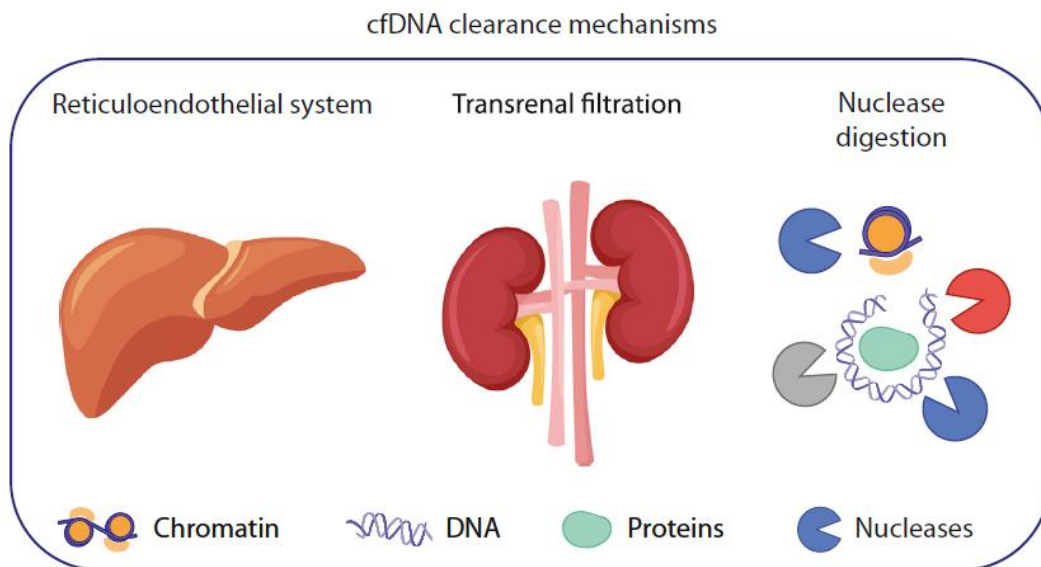
Εικόνα 7: Δημιουργία EVS (Ondrej Pös 2018)

## B.10. Απομάκρυνση cfDNA

Ο μηχανισμός με τον οποίο το cfDNA απομακρύνεται από το σώμα δεν είναι απολύτως κατανοητός (K. C. Re-I Chin 2019). Η γρήγορη απομάκρυνση του ωστόσο, κρίνεται αναγκαία για την αποφυγή όχι μόνο πιθανής φλεγμονής αλλά και ανάπτυξης αυτοανοσίας έναντι του DNA όπως παρατηρείται στον Συστηματικό Ερυθρηματώδη

Λύκο (Lood 2019). Το 1963, πραγματοποιήθηκε μία έρευνα σχετικά με την απομάκρυνση ξένου DNA μέσω του εμβολιασμού ραδιενεργού γενετικού υλικού σε ποντίκια. Αυτή η μελέτη έδειξε πως το 99% της ραδιενέργειας είχε απομακρυνθεί από την κυκλοφορία του αίματος μέσα στα πρώτα 30 λεπτά, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στα νεφρά και ύστερα στο ήπαρ και στον σπλήνα. Ωστόσο, τα επίπεδα cfDNA στο πλάσμα δε φάνηκαν να είναι ιδιαίτερα διαφορετικά σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή ασθενείς που έχουν υποστεί περιτοναϊκή διάλυση ή αιμοδιάλυση. Αυτό υποδεικνύει πως η απομάκρυνση του cfDNA από τον οργανισμό δεν πραγματοποιείται κυρίως από τα νεφρά, ενώ άλλες μελέτες ανέφεραν ως όργανα απομάκρυνσης τον σπλήνα και το ήπαρ, ενώ η διαδικασία φαίνεται πως ολοκληρώνεται μέσω της δράσης των νουκλεασών. Η ικανότητα των νουκλεασών να απομακρύνουν το cfDNA επηρεάζεται από το αν είναι προσδεμένο σε πρωτεΐνες, νουκλεοσώματα ή/και αντισώματα είτε από το αν κυκλοφορεί σε ελεύθερη μορφή ή περιτυλιγμένο σε εξωσώματα, μικροσωματίδια ή αποπτωτικά σώματα. Επιπλέον, με βάση την προέλευση του, πυρηνική ή μιτοχονδριακή, το cfDNA μπορεί να παρουσιάσει διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά και σταθερότητα (Lood 2019) (K. C. Re-I Chin 2019).

Ο χρόνος ημιζωής του cfDNA κυμαίνεται από τα 16 λεπτά έως τις 2,5 ώρες, και μπορεί να είναι μεγαλύτερος μετά τη πρόσδεση του σε συμπλέγματα πρωτεϊνών ή σε μεμβρανικά κυστίδια εξαιτίας της αντοχής του στη φαγοκυττάρωση. Η συσσώρευση του μπορεί να οφείλεται στην υπερβολική απελευθέρωση του DNA ύστερα από εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο, ανεπαρκή απομάκρυνση νεκρών κυττάρων ή των συνδυασμό αυτών (K. C. Re-I Chin 2019)



Εικόνα 8: Απομάκρυνση cfDNA από τον οργανισμό (Lo 2021)

## B.11. Χρήσεις cfDNA στη διάγνωση

### Διάγνωση και παρακολούθηση νόσου

Σε αντίθεση με το DNA που εξάγεται από την παραδοσιακή βιοψία ιστού, με το οποίο αξιολογείται ένα μικρό τμήμα του όγκου, το ctDNA προσφέρει μία καθολική εικόνα των μεταλλάξεων από όλο το φορτίο του όγκου του ασθενή. Το ctDNA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων, την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και τον καθορισμό της καταλληλότερης θεραπευτικής προσέγγισης με σκοπό την ελαχιστοποίηση του κόστους και των παρενεργειών (Andrea Campos-Carrillo 2019).

### Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος

Μετά την χειρουργική εκτομή του όγκου, η διάκριση των ασθενών που έχουν απαλλαγεί από την ασθένεια από αυτούς που παρουσιάζουν υπολειπόμενη νόσο φαίνεται να είναι απαιτητική. Οι έρευνες δείχνουν πως η παρουσία ctDNA στο πλάσμα του ασθενούς μετά από το χειρουργείο συσχετίζεται ιδιαίτερα με τον κίνδυνο υποτροπής και μπορεί να ανιχνευτεί μήνες πριν την επανεμφάνιση του όγκου με απεικονιστικές μεθόδους (Andrea Campos-Carrillo 2019).

## **B.12. cfDNA σε μη παθολογικές καταστάσεις**

### **Εγκυμοσύνη**

Είκοσι χρόνια πριν, το cfDNA αναγνωρίστηκε ως βιοδείκτης πλάσματος όταν το εμβρυϊκό γενετικό υλικό του χρωμοσώματος Y απομονώθηκε από το αίμα γυναικών που κυοφορούσαν έμβρυο αρσενικού φύλου και ενισχύθηκε. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, κύτταρα από την κυτταροτροφοβλάστη και την συγκυτιοτροφοβλάστη υφίστανται σύντηξη και απόπτωση με αποτέλεσμα τμήματα DNA να απελευθερώνονται από τον πλακούντα στην κυκλοφορία της μητέρας. Σε αντίθεση με την απομόνωση άθικτων εμβρυϊκών κυττάρων από το μητρικό αίμα, η ανάλυση τμημάτων cfDNA πραγματοποιείται σε δείγμα πλάσματος που περιέχει γενετικό υλικό της μητέρας και του πλακούντα. Η αναλογία του cfDNA που προέρχεται από τον πλακούντα ως προς το ολικό είναι γνωστό ως «εμβρυϊκό κλάσμα» και αυξάνεται αναλογικά με την εξέλιξη της εγκυμοσύνης (Diana W. Bianchi 2018).

Ο έλεγχος του cfDNA πραγματοποιείται κατά την δέκατη εβδομάδα της κύησης, καθώς τότε το fetal fraction στην κυκλοφορία της μητέρας μπορεί να αξιολογηθεί με στόχο ένα αξιόλογο και έγκυρο αποτέλεσμα. Άλλες τιμές που επηρεάζουν την ευαισθησία του ελέγχου είναι ο αριθμός των μορίων cfDNA που αναλύονται, η αναλογία βάσεων γουανίνης προς κυτοσίνη σε συγκεκριμένο χρωμόσωμα κ.α. (Diana W. Bianchi 2018).

### **Φυσική άσκηση**

Παρόλο που ο ρόλος του cfDNA σε παθολογικές καταστάσεις έχει μελετηθεί αρκετά, δεν υπάρχουν επαρκείς γνώσεις όσον αφορά την επίδραση της έντονης και χρόνιας φυσικής άσκησης στη συγκέντρωση του στο αίμα. Τα επίπεδα του cfDNA έχουν μελετηθεί σε μαραθώνιους, στην άρση βαρών, στο τρέξιμο κ.α. και παρουσιάζονται αισθητά αυξημένα αμέσως μετά την παύση της άσκησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συγκέντρωση του επιστρέφει στο φυσιολογικό μέσα στις πρώτες δύο ώρες της επαναφοράς, ενώ σε μαραθώνιους αγώνες παραμένει υψηλή μέχρι και 24 ώρες.

Έως τώρα μόνο μία μελέτη έχει αναλύσει την επίδραση της άρσης βαρών στη συγκέντρωση cfDNA, όπου μία μόνο προπόνηση έντονη άσκησης οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων και προκάλεσε περισσότερη φλεγμονή και τραυματισμό των μυών από ότι η αερόβια άσκηση. Σε μία άλλη έρευνα, μερικές εβδομάδες έντονης άσκησης είχαν



ως αποτέλεσμα την χρόνια αύξηση των επιπέδων του cfDNA που υποδεικνύει ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας ευαίσθητος βιοδείκτης για τον έλεγχο του κυτταρικού τραυματισμού και φλεγμονής που ακολουθούν την έντονη γυμναστική. Το cfDNA σε αντίθεση με την κινάση της κρεατινίνης (CK), παρουσιάζει μεγαλύτερη ανταπόκριση στην άσκηση καθώς τα επίπεδα του αυξάνονται μέσα στα πρώτα λεπτά. Επιπλέον, η μέτρηση αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί από τριχοειδικό αίμα χωρίς απαραίτητη φλεβοπαρακέντηση (Suzan Tug 2017).

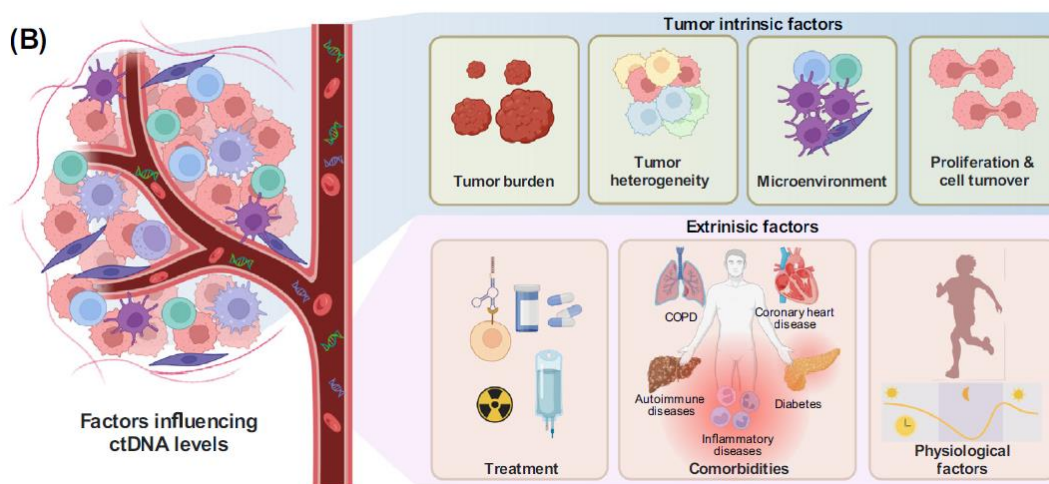
### **B.13. Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA)**

Η πρώτη πιθανή συσχέτιση μεταξύ cfDNA και καρκίνου αναφέρθηκε το 1987 όπου 10 από τους 37 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο παρουσίασαν μετρήσιμη ποσότητα cfDNA στο πλάσμα τους, σε σύγκριση με 0 στα 50 υγιή controls. Πιο πρόσφατα, το cfDNA που προέρχεται από όγκο, γνωστό και ως ctDNA παρουσιάστηκε ως εξαιρετικά ευαίσθητος και ειδικός βιοδείκτης για τη διάγνωση καρκίνου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους το ctDNA εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος δεν έχουν γίνει ακόμη πλήρως κατανοητοί. Είναι γενικά αποδεκτό πως οι κύριες πηγές του είναι η απόπτωση και η νέκρωση των καρκινικών κυττάρων. (Chen Lin 2021).

Το cfDNA είναι δίκλωνο και συνήθως τα μόρια ctDNA είναι μικρότερα από αυτά του cfDNA χωρίς μετάλλαξη. Το μέγεθος του σε πολλούς τύπους καρκίνου είναι λιγότερο από 167 ζεύγη βάσεων (Qianwei Ye1 2019). Ο μικρός χρόνος ημιζωής (15 λεπτά έως μερικές ώρες) διασφαλίζει την ανίχνευση του φορτίου του όγκου σε πραγματικό χρόνο, παρόλο που αυτό δυσκολεύει τη διατήρηση και τη χρήση του ως βιοδείκτη (Re-I Chin 2019) (Chen Lin 2021). Υπολογίζεται πως σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου που έχουν υποστεί ολική εκτομή, ο χρόνος ημιζωής ctDNA είναι λιγότερο από δύο ώρες. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα cfDNA παραμένουν σταθερά για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ακόμη και για τρεις μέρες στους 4 °C σε EDTA (Marta Sant 2022).

Ένα μαθηματικό μοντέλο όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα έχει δείξει πως τα καρκινικά κύτταρα αποβάλλουν το 0,014% του DNA τους στην κυκλοφορία του αίματος σε κάθε κυτταρικό θάνατο. Πολυάριθμες μελέτες έχουν παρουσιάσει σημαντικές αποκλίσεις στα επίπεδα ctDNA μεταξύ των ασθενών με διαφορετικά είδη όγκου. Για παράδειγμα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού, του παγκρέατος ή του ήπατος αποβάλλουν μεγαλύτερες ποσότητες ctDNA, ενώ το γλοίωμα, οι

θυρεοειδικοί όγκοι ή ο καρκίνος των νεφρών θεωρούνται κακοήθειες χαμηλού επιπέδου ctDNA. Επομένως, τα επίπεδα ctDNA αντανακλούν την βιολογία του όγκου καθώς επίσης συσχετίζονται με το φορτίο του, το μέγεθος, το στάδιο και τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν (Tina Moser 2023). Ασθενείς με καρκίνο σταδίου I έχουν λιγότερα από 10 αντίγραφα μεταλλάξεων του όγκου ανά 5 ml πλάσματος, ενώ σε ασθενείς τελευταίου σταδίου ο αριθμός αυτός αυξάνεται 10 έως 100 φορές (Zhao 2019). Η ποικιλία των επιπέδων νουκλεϊκού οξέος που ανιχνεύεται σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις με το μικροπεριβάλλον και την ετερογένεια του όγκου, τις μεταβολικές ιδιότητες του αναπτυσσόμενου καρκίνου, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανταπόκριση στη θεραπεία (Tina Moser 2023).



Εικόνα 9: Παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα ctDNA (Tina Moser 2023)

Όπως αναφέρθηκε, η ποσοτικοποίηση του ctDNA μέσω της μεθόδου υγρής βιοψίας έχει συσχετιστεί με κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου όπως είναι το στάδιο, το φορτίο, η αγγείωση και η ανταπόκριση στη θεραπεία (Shubin Hong 2023). Η ανίχνευση μεταλλάξεων γονιδίων σωματικών κυττάρων, πολλαπλασιασμών και συντήξεων επιτρέπει τη στοχευμένη θεραπεία σε πολλαπλά είδη καρκίνου όπως του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μελανώματος και του μαστού (Aleix Prat 2023). Εκτός από τα μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον όγκο, έρευνες δείχνουν πως τα επίπεδα ctDNA σε προχωρημένο στάδιο είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται σε αρχικά στάδια της νόσου (Chen Lin 2021). Σε γενικές γραμμές το ctDNA περιέχει γενετικά χαρακτηριστικά πανομοιότητα με τα καρκινικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται. Ωστόσο, αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό του ολικού cfDNA και έως τώρα δεν υπάρχει τρόπος να διακριθεί από άλλα

κυκλοφορούντα DNA πέρα από την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό. (Qianwei Ye1 2019). Πρόσφατα, η κλινική ανάλυση του ctDNA περιλαμβάνει 3 εγκεκριμένες από τον FDA τεχνικές: την ανίχνευση των EGFR μεταλλάξεων σε μη- μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, την ανίχνευση των PCK3CA μεταλλάξεων για τον καρκίνο του μαστού και τον καθορισμό της μεθυλίωσης του SEPT9 εκκινητή για τον ορθοκολικό καρκίνο (Sarah R. Greytak 2020). Εν κατακλείδι, η μέθοδος υγρής βιοψίας σε συνδυασμό με την ανάλυση του ctDNA μπορεί να προσφέρει μία καλύτερη εικόνα του γενετικού υπόβαθρου του όγκου σε σχέση με την βιοψία από ένα δείγμα καρκινικού ιστού (Chen Lin 2021).

#### **B.14. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)**

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Cancer Cells) ανακαλύφθηκαν το 1869 από τον Thomas Ashworth κατά τη διάρκεια της εξέτασης στο μικροσκόπιο περιφερικού αίματος ενός ασθενή με μεταστατικό καρκίνο (Hui Zhou 2022) (Qianwei Ye1 2019). Αποτελούν καρκινικά κύτταρα που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, προέρχονται είτε από τον πρωτοπαθή όγκο είτε από τις μεταστατικές εστίες και κρίνονται απαραίτητα για την αναγνώριση της εξέλιξης της ασθένειας (Wen Li 2022) (Ana Julia Aguiar de Freitas 2022). Συνήθως αυτά τα κύτταρα ακολούθως υφίστανται απόπτωση ή φαγοκυττάρωση, ωστόσο μερικά από αυτά (0,01%) «δραπετεύουν» και υποβάλλονται σε επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση. Με αυτόν τον τρόπο αποκτούν μεγαλύτερη ρευστότητα, επεμβατικότητα και ικανότητα να προσκολλούνται και να διεισδύουν το τοίχωμα των αγγείων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων (Wen Li 2022).

Τα CTCs μπορούν να ανιχνευτούν στο αίμα των ασθενών με μετάσταση και η ανάλυση τους προσφέρει πολλαπλά οφέλη, όπως είναι η ανάλυση των μορφολογικών και γενετικών πληροφοριών, η γενετική ανάλυση του γενότυπου του όγκου, η βελτίωση της κατάταξης των ασθενών και της κλινικής πρόγνωσης, η επίτευξη του στόχου δημιουργίας στοχευμένης θεραπείας και η επιτυχής παρακολούθησης αυτής (Wen Li 2022).

Σημειώνεται πως τα CTCs αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των κυττάρων του αίματος που υπολογίζεται έως μερικές εκατοντάδες ανά ml (Qianwei Ye1 2019). Ως εκ τούτου, η απομόνωση και ανάλυση τους αποτελεί πρόκληση σε

σχέση με το κυκλοφορούν καρκινικό DNA και απαιτείται τεχνική υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (ctDNA) (Qianwei Ye1 2019) (Justin Mencil 2022).

Ο χρόνος της κυκλοφορίας των CTCs στο αίμα είναι μικρός με τον χρόνο ημιζωής τους να είναι μόλις 1 έως 2,4 ώρες. Η ανίχνευση τους στο αίμα ενός ασθενή μήνες ή χρόνια μετά από την αφαίρεση ενός πρωταρχικού όγκου υποδεικνύει επανεμφάνιση του όγκου ή μετάσταση. Παρόλο που η απομόνωση των κυττάρων από το ολικό αίμα είναι περίπλοκη, μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες για τα επίπεδα DNA, RNA και πρωτεϊνών (Mina Nikanjam 2022).

Πίνακας 2: Διαφορές μεταξύ ctDNA/cfDNA και CTCs (Mina Nikanjam 2022)

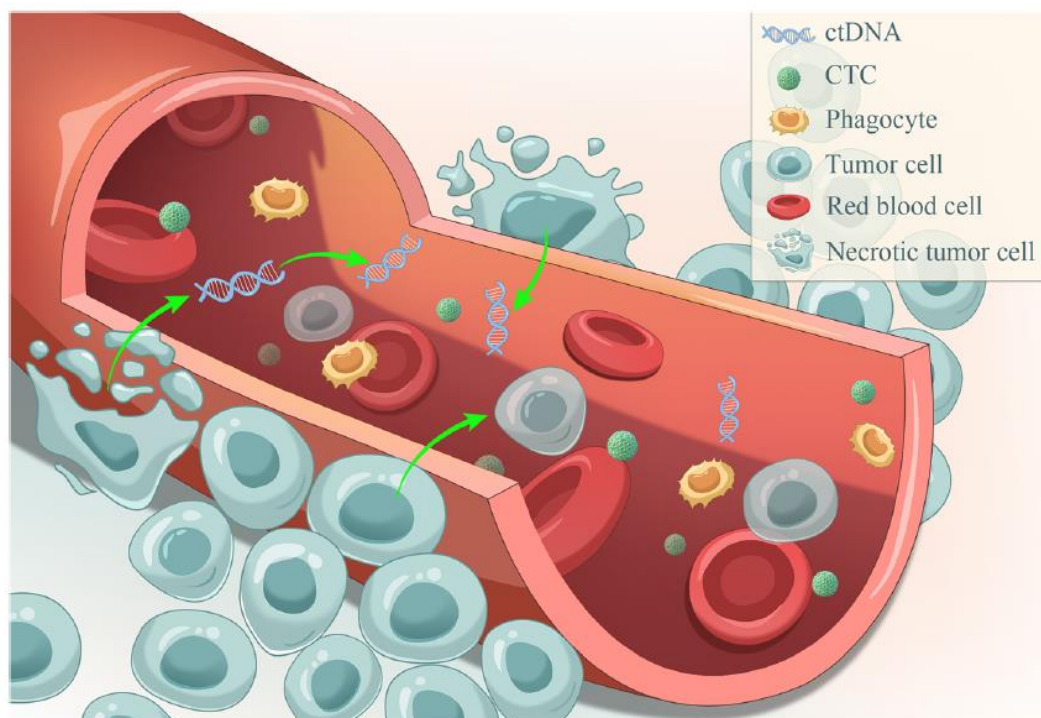
	ctDNA/ cfDNA	CTCs
Συλλογή/ Απομόνωση	Εύκολη	Δύσκολη
Ικανότητα καλλιέργειας	Όχι	Ναι
Πρόβλεψη ανταπόκρισης στη θεραπεία	Ναι	Ναι

### B.15. Εμπλουτισμός CTCs

Ο εμπλουτισμός των κυττάρων μέσω της ανοσογονικότητας και ο φυσικός εμπλουτισμός αποτελούν δύο από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση CTCs. Οι μέθοδοι ανοσοεμπλουτισμού διακρίνονται σε τεχνικές που βασίζονται στη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων και ανοσοαπορρόφησης. Οι μέθοδοι ανοσοαπορρόφησης βασίζονται στη χρήση microfluidic chips ενώ ο φυσικός εμπλουτισμός χρησιμοποιεί τις διαφορές μεταξύ των CTCs και των κυττάρων του αίματος όπως είναι το μέγεθος, η σχετική πυκνότητα και άλλα χαρακτηριστικά (Wen Li 2022).

Ο θετικός εμπλουτισμός των CTCs μπορεί να επιτευχθεί με προσεγγίσεις που αξιολογούν τις διαφορές μεταξύ των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος όπως είναι η διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας που σχετίζονται με τον όγκο (EpCAM, mucin-1, HER2 ή EGFR ή φυσιολογικές ιδιότητες όπως είναι το μέγεθος ή η ικανότητα παραμόρφωσης. Αντιθέτως, στον αρνητικό εμπλουτισμό των κυττάρων, τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος αφαιρούνται μέσω αντισωμάτων έναντι του CD45 ή άλλα αντιγόνα που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα ή τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα (Isabel Heidrich 2021).

Μετά την απομόνωση τους, οι μεταλλάξεις του γενετικού υλικού μπορούν να αναγνωριστούν με τεχνικές DNA, RNA και πρωτεϊνών (Mina Nikanjam 2022). Έως τώρα η ανίχνευση των CTCs πραγματοποιείται με τεχνικές ανοσοφθορισμού, in situ RNA υβριδισμός, ποσοτική PCR και κυτταρομετρία ροής (Wen Li 2022).



Εικόνα 10: CTCs και ctDNA στο περιφερικό αίμα (Qianwei Ye1 2019)

### B.16. Cell- free Nucleic Acids (cf-NAS)

Εκτός από τη χρήση του cfDNA όσον αφορά τη διάγνωση, ενδιαφέρουσα παρουσιάζεται η χρήση cell-free RNAs (cfRNAs) όπως είναι το microRNA (miRNA), το long non-coding RNA (lncRNA) και το circular RNA (circRNA), σε διαφορετικά είδη ασθενειών. Οι συγκεντρώσεις αυτών είναι εξαιρετικά σταθερές στον ορό ή στο πλάσμα λόγω της ενσωμάτωσής τους στα εξωκυτταρικά κυστίδια (μικροκυστίδια, εξωσώματα). Ως εκ τούτου, φαίνεται πως τα εξωσώματα θα μπορούσαν να βελτιώσουν ιδιαίτερα τις υπάρχουσες τεχνικές διάγνωσης. Παρόλο που το ακριβές περιεχόμενο των μικροκυστιδίων (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια) ακόμη διερευνάται, φαίνεται πως τα εξωσώματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά την ενδοκυτταρική και την εξωκυτταρική επικοινωνία (Nagy 2019).

Έρευνες δείχνουν πως τα cfNAS μπορούν να μεταφερθούν από τα σωματικά κύτταρα προς τα εμβρυικά. Αυτό καθιστά δυνατή τη μετάδοση ορισμένων



χαρακτηριστικών μέσω cfNAS και μπορεί να συνεισφέρει στην εξέλιξη (Ondrej Pös 2018).

### **B.16.1. Cell-free mtDNA**

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας, την αναπαραγωγή και την απόπτωση του κυττάρου. Το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό έχει μέγεθος 16.569 bp και παρουσιάζεται ως 100-10.000 αντίγραφα κυκλικών μορίων. Δεν περιβάλλεται από ιστόνες, επομένως είναι εμφανές ότι τα τμήματα cf-mtDNA θα είναι διαφορετικά. Το μέγεθος τους στα βιολογικά υγρά κυμαίνεται από 30 έως 80 bp και όπως το γενωμικό DNA, μπορεί να μεταφερθεί από EMVs. Μέσω αυτών, είναι δυνατή η μεταφορά ολόκληρου του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού σε κύτταρα με προβληματικό μεταβολισμό με σκοπό την επιδιόρθωση της μεταβολικής δραστηριότητάς του.

Από την άλλη πλευρά, αυτή η ικανότητα μεταφοράς γενετικού υλικού μπορεί να «αφυπνίσει» ανενεργά καρκινικά κύτταρα και να προκαλέσει ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Μεταλλάξεις του mtDNA συσχετίζονται με διάφορες ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης τύπου II, η κολπική μαρμαρυγή και ο καρκίνος (ορθοκολικός, του μαστού και του πνεύμονα). Το mtDNA διαδραματίζει βασικό ρόλο όσον αφορά την καταστροφή των κυττάρων του μυοκαρδίου. Γενικά, το DNA μιτοχονδριακής προέλευσης αναγνωρίζεται ως μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με βλάβες (DAMPs), εμφανίζει ομοιότητες με το DNA βακτηριακής προέλευσης και μπορεί να αποτελέσει παράγοντα φλεγμονής (Iuliia A. Polinaa 2020).

Επομένως, το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό παρουσιάζεται ως ένας πιθανός βιοδείκτης για την διάγνωση κάποιων νοσημάτων (Ondrej Pös 2018).

### **B.16.2. Cell-Free RNA**

Το cell-free RNA (cfRNA) απελευθερώνεται τόσο από καρκινικά όσο και από μη καρκινικά κύτταρα και προέρχεται από φυσιολογικούς ιστούς όπως είναι το στρώμα ή από το ανοσοποιητικό σύστημα ως απόκριση στην παρουσία όγκων. Οι αλλαγές στην έκφραση του RNA αποτελούν μία δυναμική διαδικασία και αντανακλούν την βλάβη ενός ιστού ή μία νόσο. Η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί κυρίως στη μελέτη microRNAs (miRNAs) λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας τους στην κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, φαίνεται πως υπάρχει ολόένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον

αφορά τη μελέτη των long RNAs (>200nt), όπως είναι το mRNAs και τα long non-coding RNAs (lncRNAs) (Lluc Cabús 2022).

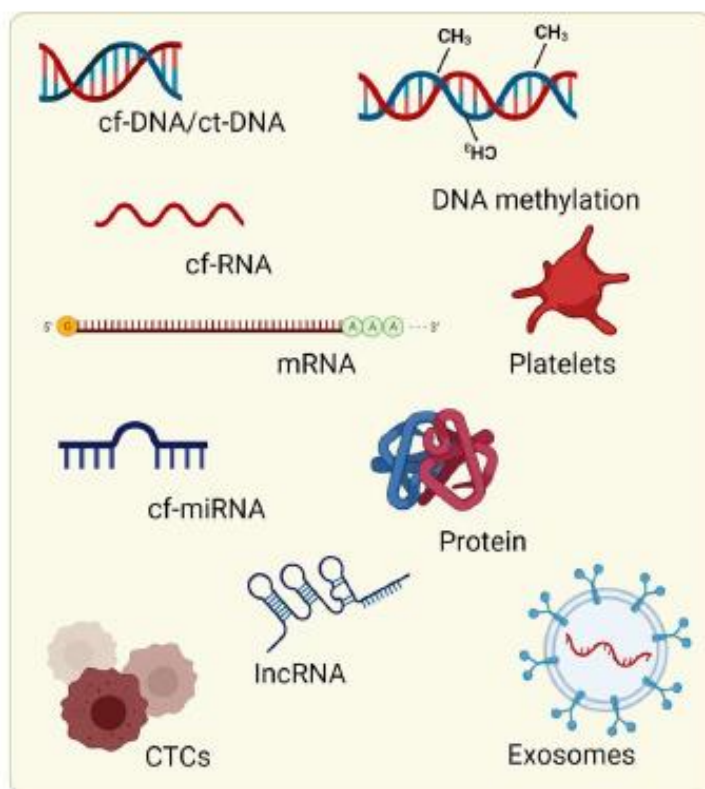
Τα κυκλοφορούν καρκινικό mRNA που κυκλοφορεί συνήθως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων και δίνει πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης σημαντικών γονιδίων. Στα καρκινικά κύτταρα, η υπερέκφραση του προσδέτη του μορίου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-L1) επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου. Η PD-L1 παρουσιάζει δύο κύριες προ-καρκινικές λειτουργίες: την απενεργοποίηση των T- κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς PD-1 και η μεταφορά σημάτων από κύτταρο σε κύτταρο με στόχο την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση της PD-L1 ανιχνεύεται στο ctRNA του πλάσματος σε όλους τους τύπους καρκίνου σε διάφορες συχνότητες, ενώ δεν ανιχνεύεται καθόλου σε υγιή άτομα. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα αντίστροφης μεταγραφάσης (hTERT) συχνά εντοπίζεται σε διαφορετικά είδη όγκου όπως είναι ο καρκίνος του μαστού και του παχέος εντέρου, σε αντίθεση με υγιή άτομα. Ωστόσο, παρουσιάζονται περιορισμοί όσον αφορά τη χρήση mRNA ως βιοδείκτη για υγρή βιοψία καθώς αυτό προστατεύεται μέσα σε εξωκυτταρικά κυστίδια και συσχετίζεται με συμπλέγματα πρωτεϊνών. Επιπλέον, το cell- free mRNA χαρακτηρίζεται από αστάθεια, βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση και είναι πιθανό να επιμολυνθεί κατά την επεξεργασία του δείγματος (Diego Fernández-Lázaro 1 2020).

### **B.16.3. miRNA**

Το κυκλοφορούν miRNA είναι μία υποκατηγορία μη-κωδικοποιητικού RNA (ncRNA) και αποτελείται από 18-22 νουκλεοτίδια ή μονόκλιωνα τμήματα ncRNA που μπορούν να ανιχνευτούν σχεδόν σε όλα τα βιολογικά υγρά (Yirizhati Aili 2020). Αντιπροσωπεύουν το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος και είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του 20-30% των κωδικοποιητικών γονιδίων. Τα κυκλοφορούντα miRNA έχουν μελετηθεί ως υποψήφιοι βιοδείκτες για τη διάγνωση διάφορων τύπων καρκίνου. Η προέλευση των miRNA που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι ασαφής καθώς μπορεί να εκκρίνονται είτε από τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, είτε από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Misako Nagasaka 2021). Η απελευθέρωση του στα βιολογικά υγρά ακολουθεί δύο μονοπάτια: Το παθητικό μονοπάτι βασίζεται κυρίως στον τραυματισμό του ιστού, στην απόπτωση και των νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα μπορεί

ενεργητικά να περικλείουν το miRNA σε εξωκυτταρικά κυστίδια όπως είναι τα εξωσώματα. Η δομή της μεμβράνης τους, προσδίδει σταθερότητα έναντι της αποδόμησης του από τις ριβονουκλεάσες (RNases). Επιπλέον, η ακέραια δομή των εξωσωμάτων δεν επηρεάζεται από μη-φυσιολογικές συνθήκες, όπως είναι η επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη, οι ακραίες τιμές pH ή η μακροπρόθεσμη φύλαξη του, επιτρέποντας την ανίχνευση του με εξαιρετική ευαισθησία (Bingqian Lin 2022).

Πρόσφατες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, δείχνουν ότι τα miRNAs που συμμετέχουν στη παθογένεση διάφορων ασθενειών, όπως ο καρκίνος και συγκεκριμένα στην καρκινογένεση, τη μετάσταση και την αντοχή στη θεραπεία. Τα miRNAs που μεταφέρονται από τα εξωσώματα (exo-miRNAs) περιέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τα αρχικά κύτταρα, τα κύτταρα υποδοχείς και την εξέλιξη της νόσου και έχει αναφερθεί πως αυτά που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα μπορούν να προωθήσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την αγγειογένεση. Επομένως, κρίνεται σημαντική η χρήση των exo-miRNAs ως στόχος ανίχνευσης στην υγρή βιοψία για την έγκαιρη διάγνωση, την παρακολούθηση της νόσου και της θεραπείας (Bingqian Lin 2022)



Εικόνα 11: Βιοδείκτες (Ana Julia Aguiar de Freitas 2022)



#### **B.16.4. Εξωκυτταρικά κυστίδια**

Ο όρος «εξωκυτταρικά κυστίδια» (EVs) περιγράφει κάθε είδος σωματιδίου που απελευθερώνεται στον εξωκυτταρικό χώρο από οποιοδήποτε είδος κυττάρου ανεξάρτητα από διαφορές όσον αφορά τη βιοσύνθεση του, συμπεριλαμβανομένων και των μικροοργανισμών. Τα είδη εξωκυτταρικών κυστιδίων διακρίνονται μεταξύ τους με βάση το μέγεθος, την πυκνότητα, την υποκυτταρική προέλευση, τη λειτουργία και το μοριακό φορτίο τους (Valentina R. Minciacchi 2016). Η ανίχνευση των EVs σε διάφορα είδη βιολογικών υγρών, όπως είναι το αίμα, το σάλιο, τα ούρα, το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, το μητρικό γάλα και το σπέρμα, καθιστά τη χρήση τους ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα όσον αφορά την υγρή βιοψία. Η ικανότητα τους να μεταφέρουν ειδικά μόρια όπως πρωτεΐνες, miRNAs, mRNAs, long noncoding RNAs και λιπίδια αντανακλά την κατάσταση του κυττάρου από το οποίο προέρχεται, και κατά επέκταση της εκάστοτε νόσου (Fumihiko Urabe 2020).

Τα EVs που σχετίζονται με τον καρκίνο μπορούν να διακριθούν στις εξής κατηγορίες: εξωσώματα (30-100 nm), μικροκυστίδια (100-1000 nm) και τα πρόσφατα αναγνωρισμένα ογκοσώματα (1-10 μm) (Valentina R. Minciacchi 2016).

#### **B.16.5. Εξωσώματα**

Τα εξωσώματα αποτελούν μέρος των εξωκυτταρικών σωματιδίων με λιπιδική διπλοστιβάδα που απελευθερώνονται ενεργά στα βιολογικά υγρά είτε μέσω της σύντηξης τους με την πλασματική μεμβράνη και ύστερα με εξωκυττάρωση είτε με άμεση απόπτωση από την κυτταρική επιφάνεια (W. Yu 2021) (Dan Yu 2022). Έχουν διάμετρο 40-160 nm και ενώ αρχικά θεωρούνταν κυστίδια με κύριο ρόλο την απόρριψη κυταρικών αποβλήτων, φαίνεται πως αναγνωρίζονται ως σημαντικούς παράγοντες όσον αφορά την διακυτταρική επικοινωνία (Dan Yu 2022). Επιπλέον, τα εξωσώματα φαίνεται να διαδραματίζουν μέρος σε διάφορες λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων όπως είναι η ενεργοποίηση ανάπτυξης τους, η καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης, η πρόκληση της αγγειογένεσης, η προώθηση μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και η δημιουργία μεταστάσεων, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικούς καρκινικούς δείκτες (W. Yu 2021).

Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως τα εξωσώματα επιδρούν σε πολυάριθμους υποδοχείς κυττάρων μέσω μίας ποικιλίας βιοενεργών χημικών εντός

κυστιδίων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση, την αγγειογένεση, τη δημιουργία όγκου, τον μεταβολισμό και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Ωστόσο, ως τώρα, για την μέθοδο της υγρής βιοψίας έχει εγκριθεί μόνο η κλινική εφαρμογή των ctDNA και CTCs από τον FDA (Athanasios Armakolas 2023).

Η ενεργή απελευθέρωση κυστιδίων από τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να περιλαμβάνει το μονοπάτι ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κίνησης. Είναι γνωστό πως ένα καρκινικό κύτταρο μπορεί να απελευθερώσει περισσότερα από 20.000 από αυτά τα κυστίδια μέσα σε 48 ώρες. Σημειώνεται πως υπάρχουν επίσης μεγαλύτερα κυστίδια μεγέθους έως και 10μm που μπορούν να περιέχουν RNA, DNA και πρωτεΐνες. Τα εξωσώματα και άλλα εξωκυτταρικά κυστίδια αποτελούν μία εναλλακτική και σε κάποιες περιπτώσεις συμπληρωματική μορφή υγρής βιοψίας για βέλτιστες συνολικές διαγνωστικές επιδόσεις. Τα εξωσώματα απελευθερώνονται συνεχώς από όλα τα ζωντανά κύτταρα και προσφέρουν δυνατότητες ευρύτερους φάσματος δεδομένου ότι περιέχουν DNA, RNA και πρωτεΐνες. Όπως αναφέρθηκε, τα νεκρά κύτταρα αποβάλουν μικρά τμήματα cfDNA στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης και της νέκρωσης, με ένα ποσοστό αυτού να αποτελεί τμήματα DNA από καρκινικά κύτταρα (ctDNA).

Όσον αφορά τις διαφορές μεταξύ CTCs και ctDNA, φαίνεται πως το δεύτερο παρουσιάζει σημαντικά περισσότερα πλεονεκτήματα στην υγρή βιοψία. Πρώτον, η παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά ( $10^9$  σωματίδια/ ml) καθιστά την απομόνωση τους ευκολότερη σε σχέση με τα ελάχιστα CTCs που εμπεριέχονται σε 1 ml δείγματος αίματος (Dan Yu 2022). Δεύτερον, τα εξωσώματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για ζωντανά καρκινικά κύτταρα, προσφέροντας τη δυνατότητα για ευκολότερη έγκαιρη διάγνωση. Σημειώνεται πως οι RNA μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με τη χρήση εξωσωμάτων μπορούν προστεθούν στο σήμα που «δίνει» το cfDNA και να αυξήσουν την ευαισθησία όσον αφορά την ανίχνευση μεταλλάξεων. Πολλαπλές μελέτες δείχνουν πως ο συνδυασμός του cfDNA με το εξωσωμικό RNA παρουσιάζει προτερήματα σε σχέση με την ανάλυση μόνο του cfDNA (W. Yu 2021). Τρίτον, τα εξωσώματα είναι σταθερά μόρια χάρη στην λιπιδική διπλοστιβάδα και κυκλοφορούν φυσιολογικά σε δυσχερή καρκινικό περιβάλλον. Η υψηλή βιολογικά σταθερότητα επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση των δειγμάτων για την απομόνωση και την ανίχνευση των εξωσωμάτων (Dan Yu 2022).

### **B.16.6. Μικροκυστίδια**

Τα μικροκυστίδια είναι μεγαλύτερα από τα εξωσώματα (100 έως 1000 nm) και η σύσταση της μεμβράνης τους είναι παρόμοια με αυτή του κυττάρου από το οποίο προέρχονται, έτσι ώστε αντιπροσωπεύουν το πρωτεϊνικό προφίλ του όγκου. Τα μικροκυστίδια προέρχονται από διαφορετικά είδη κυττάρων όπως είναι τα αιμοποιητικά, τα ενδοθηλιακά, τα βλαστοκύτταρα του μεσεγχύματος και τα καρκινικά κύτταρα. Τα μικροκυστίδια έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τη λειτουργία των κυττάρων υποδοχέων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του μοριακού περιεχομένου τους. Επιπλέον, βασικός ρόλος τους είναι η διακυτταρική επικοινωνία σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου, όπως είναι η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, η αγγειογένεση και η μετάσταση (Diego Fernández-Lázaro 1 2020).

### **B.16.7 Tumor- Educated Platelets (TEPS)**

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά απύρρηνα κύτταρα, έχουν διάμετρο 1 έως 3 μm και προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα. Στην πλειοψηφία τους παραμένουν αδρανή κατά τη διάρκεια της ζωής τους (7 έως 10 ημέρες) (Battinelli 2021). Κύρια λειτουργία τους είναι η θρόμβωση και η ομοιόσταση, η ανοσολογική επίβλεψη και επικοινωνία, η επιδιόρθωση των αγγείων και βοηθούν στη διαχείριση της φλεγμονής. Επιπλέον, έχουν ενεργό ρόλο όσον αφορά τη βιολογία του καρκίνου όπως επίσης και επηρεάζονται δυναμικά από την ύπαρξη ενός όγκου, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση τους για τη διάγνωση, πρόγνωση, πρόβλεψη και παρακολούθηση της νόσου (Joyce Varkey 2021).

Η έννοια των Tumor-Educated Platelets βασίζεται σε δύο παρατηρήσεις που σημειώθηκαν τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Αρχικά, το 1868, ο Trousseau παρατήρησε πως η άμεση πήξη του αίματος αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των ασθενών που νοσούν με καρκίνο, υποδεικνύοντας την άμεση επίδραση της νόσου στα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια. Ύστερα, το 1877, ο Billroth περιέγραψε τον θρόμβο «γεμάτο με στοιχεία σχετικά με τον όγκο», ως μέρος της μεταστατικής διαδικασίας, γεγονός που υποδηλώνει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των αιμοπεταλίων (Wurdinger 2019). Η μορφολογία των αιμοπεταλίων περιεγράφηκε πρώτη φορά στις αρχές του 1900, όμως μέχρι το 1966 δεν ήταν γνωστή η ικανότητα τους να συνθέτουν πρωτεΐνες παρά το γεγονός ότι δε διαθέτουν πυρήνα (Joyce Varkey 2021).

Κατά την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα καρκινικά κύτταρα, τα αιμοπετάλια γίνονται «educated» και το RNA προφίλ τους αναδιαμορφώνεται. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μέσω 3 βασικών σταδίων: απομόνωση των μορίων που σχετίζονται με τον όγκο, διαδικασία ματίσματος και τέλος τροποποίηση του μεγακαρυοκυττάρου. Η διαδικασία του ματίσματος (splicing) αποτελεί το στάδιο επεξεργασίας του RNA κατά το οποίο απομακρύνονται τα εσώνια και συνενώνονται τα εξώνια. Έτσι, ολοκληρώνεται η διαδικασία ωρίμανσης του ετερογενούς hnRNA (heterogenous RNA) σε mRNA ώστε να μεταφραστεί. Τα αιμοπετάλια ανταλλάζουν συνεχώς νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες μέσω κυστιδίων με τον όγκο και το μικροπεριβάλλον του, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανοσοποιητικού, των ενδοθηλιακών και των στρωματικών κυττάρων (Joyce Varkey 2021). Η τροποποίηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων εξυπηρετεί τη διαδικασία της αγγειογένεσης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων μέσω της απελευθέρωσης διάφορων αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και πρωτεασών (Battinelli 2021).

Η θρομβοκυττάρωση και η αναλογία αιμοπεταλίων προς λεμφοκύτταρα συσχετίζεται συχνά με την εμφάνιση περιστατικών καρκίνου και χαμηλό ποσοστό επιβίωσης. Ομοίως, ο μέσος όγκος και ο ρυθμός παραγωγής αιμοπεταλίων είναι επίσης αυξημένος σε αρχικά στάδια καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, αυτοί οι παράμετροι παρουσιάζουν ιδιαίτερη διακύμανση και μπορεί να επηρεαστούν από άλλες ασθένειες που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις επιτρέπουν τη μελέτη των πρωτεϊνών και του RNA των TEPS, πέρα από τα βασικά χαρακτηριστικά τους όπως είναι ο αριθμός και το μέγεθος (Battinelli 2021).

*Πίνακας 3: Χρονοδιάγραμμα ανακάλυψης των συστατικών της μεθόδου υγρής βιοψίας (Gaby Schobers 2021)*

<b>1869</b>	CTC	Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα (Ashworth)
<b>1893</b>	CFC	Κυκλοφορούντα εμβρυϊκά κύτταρα στο αίμα της μητέρας (Schmorl)
<b>1948</b>	CfNA	Ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα (Mandel και Metais)
<b>1967</b>	EV	Μικρά κυστίδια που εκκρίνονται από χονδροκύτταρα (Bonucci)
<b>1972</b>	Ab	Αποπτωτικά σώματα (Kerr et al.)
<b>1981</b>	Exosome	Εξωσώματα (Trams et al.)
<b>1997</b>	CffDNA	Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο μητρικό πλάσμα (Lo et al.)
<b>2000</b>	CffRNA	Ελεύθερο εμβρυϊκό RNA στο μητρικό (Poon et al.)

<b>2001</b>	Nucleosome	Κυκλοφορούντα νουκλεοσώματα στον ορό (Holdenrieder et al.)
<b>2004</b>	Placental exosome	Έκκριση τροφοβλαστικών κυττάρων από τη λιγάση (Abrahams et al.)
<b>2008</b>	cff-miRNA	Ελεύθερο εμβρυϊκό miRNA του πλακούντα στο μητρικό πλάσμα (Chim et al.)
<b>2009</b>	cfsRNA	Ελεύθερο σπερματικό RNA σε υγιή άτομα (Huang et al.)
<b>2013</b>	Cff-mtDNA	Μιτοχονδριακό DNA στο έμβρυο (Stigliani et al.)
<b>2016</b>	piRNA	Πρωτεΐνη PIWI σπερματικού πλάσματος που αλληλεπιδρά με το RNA στην ανδρική υπογονιμότητα (Hong et al.)
	FNE	Εμβρυϊκά νευρωνικά εξωσώματα στο μητρικό αίμα (Goetzi et al.)
	Nucleosome footprint	Το cfDNA αποτελεί in vivo νουκλεοσωμικό αποτυπώμα (Snyder et al.)

## B.17. Χρήση άλλων βιολογικών υγρών στην υγρή βιοψία

Όπως αναφέρθηκε, εκτός από το πλάσμα και τον ορό του αίματος, χρησιμοποιούνται και άλλα βιολογικά υγρά για την μέθοδο της υγρής βιοψίας:

### Σάλιο

Το σάλιο προσφέρει πρακτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με το αίμα λόγω της ευκολίας πρόσβασης, της μη επεμβατικότητας και του χαμηλού κόστους της δειγματοληψίας. Νέες τεχνολογίες που βασίζονται σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες όπως είναι η EFIRM (Electric field- induced release and measurement), ανιχνεύουν μεταλλάξεις EGFR σε δείγμα σάλιου για τη διάγνωση ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Παρόμοιες τεχνολογίες χρησιμοποιούνται και για την ανίχνευση βιοδεικτών σχετικών με τον καρκίνο του παγκρέατος, ενώ η φασματοσκοπική ανάλυση των μεταβολιτών του σάλιου είναι ενδεικτικοί για καρκίνο της στοματικής κοιλότητας (Saife N. Lone 2022).

### Ούρα

Η μη επεμβατική φύση της λήψης ούρων τα καθιστά χρήσιμο βιολογικό υλικό για την υγρή βιοψία σε περιπτώσεις που απαιτείται συχνή δειγματοληψία για την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου και της θεραπείας. Μελέτες δείχνουν πως με τη χρήση ούρων είναι δυνατή η ανίχνευση ουρολογικών και μη όγκων με ευαισθησία συγκρίσιμη με τη χρήση δείγματος αίματος.

## B.18. Συλλογή και διαχείριση cfDNA

Το cfDNA είναι ασταθές και χαμηλό σε συγκέντρωση βιολογικό δείγμα. Ως εκ τούτου, η κατάλληλη συλλογή και διαχείριση του κρίνονται απαραίτητες. Για την λήψη του αίματος συνιστάται η χρήση πεταλούδων με βελόνα μεγέθους 21-23G (Sarah R. Greytak 2020). Όπως αναφέρθηκε, το πλάσμα προτιμάται έναντι του ορού του αίματος καθώς το cfDNA απελευθερώνεται από τα κύτταρα του αίματος κατά τη διάρκεια δημιουργίας θρόμβου. Για τη συλλογή του δείγματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν σωληνάρια που περιέχουν EDTA, ωστόσο η επεξεργασία τους πρέπει να γίνει μέσα στις πρώτες 4 ώρες ώστε να περιοριστεί η απελευθέρωση του cfDNA από τα λευκοκύτταρα. Το πλάσμα μπορεί να αποθηκευτεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και μπορεί να υποστεί τη διαδικασία απόψυξης μόνο μία φορά (Sarah R. Greytak 2020). Σωληνάρια που μπορούν να αυξήσουν τον χρόνο πριν την επεξεργασία είναι τα εξής: Cell-Free DNA BCT, Cell-Free DNA Collection Tube και PAXgene Blood ccfDNA Tube (Rebecca L Edwards 2022). Αυτά μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για λιγότερο από 3 ημέρες (Sarah R. Greytak 2020).

Η προετοιμασία του δείγματος συνήθως αποτελείται από τέσσερα βήματα: Διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης, απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, καθαρισμός και συγκέντρωση του DNA. Η διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση υπερήχων, με ομογενοποίηση ή με χημική κατεργασία (George Alexandrou 2023). Για την απομόνωση του cfDNA έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. Ο μαγνητικός εμπλουτισμός (magnetic enrichment) του cfDNA μπορεί να επιτευχθεί από τη θετική φόρτιση μαγνητικών σφαιριδίων που προσδένονται στα αρνητικά φορτισμένο DNA και ίσως είναι η πιο αποτελεσματική τεχνική απομόνωσης μικρών τμημάτων DNA. Άλλες μέθοδοι είναι ο εμπλουτισμός που βασίζεται σε στήλες σιλικόνης (Silica column- based enrichment) και αξιοποιεί τη συγγένεια πρόσδεσης των μορίων DNA με υψηλό ποσοστό απομόνωσης (82-92%) και η φυγοκέντρωση (Diego Fernández-Lázaro 1 2020) (George Alexandrou 2023).

Ανεξάρτητα από τις συνθήκες συλλογής, το cfDNA μπορεί να αλλοιωθεί πριν την απομόνωση του. Για την αποφυγή της αλλοίωσης των επιπέδων ή της ποιότητας του cf-DNA, προτιμάται η άμεση επεξεργασία του δείγματος. Σε περιπτώσεις που είναι αναγκαία μεταφορά του βιολογικού υλικού, κρίνεται απαραίτητη η ήρεμη τοποθέτηση του σωληναρίου σε κάθετη θέση με σκοπό την αποφυγή της αιμοδιάλυσης. Επιπλέον,

για αξιόπιστα αποτελέσματα, πρέπει να αποφεύγονται οι ακραίες θερμοκρασίες (<10°C και >40°C) κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Ακόμη και υπό τις βέλτιστες συνθήκες χειρισμού του δείγματος, είναι δυνατή η αλλοίωση του σε δείγματα ολικού αίματος. Το πρόβλημα αυτό μπορεί περιοριστεί διαχωρίζοντας το πλάσμα πριν τη μεταφορά του σε ξηρό πάγο. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες περιγράφουν την ανάλυση του από δείγματα αίματος που μεταφέρονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Rebecca L Edwards 2022).

Η διαδικασία της φυγοκέντρισης για την προετοιμασία του πλάσματος κρίνεται απαραίτητη για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης και της ποιότητας του cfDNA ενώ ταυτόχρονα, εμποδίζει την επιμόλυνση του με γενωμικό DNA. Συνήθως η διαδικασία διακρίνεται σε δύο φυγοκεντρίσεις, η πρώτη σε χαμηλή και η δεύτερη σε υψηλότερη ταχύτητα με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών θραυσμάτων (Rebecca L Edwards 2022).

## B.19. Μέθοδοι Sequencing ctDNA

Η συγκέντρωση του ctDNA στον ορό του αίματος είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του πλάσματος. Ωστόσο, ο ορός περιέχει επιπρόσθετα DNA που προέρχεται από τα λευκά αιμοσφαίρια, επομένως οι τεχνικές που βασίζονται στη χρήση του πλάσματος στο αίμα παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία όσον αφορά την απομόνωση και την ανάλυση του γενετικού υλικού που προέρχεται από τον όγκο. Γενικά, η συγκέντρωση του ctDNA στο αίμα είναι χαμηλή, γι αυτό και απαιτούνται πολύ ευαίσθητες τεχνικές για την απομόνωση και την ανάλυση του.

Η ανάλυση του ctDNA μπορεί να ανιχνεύσει πολλαπλές γενωμικές αποκλίσεις όπως είναι οι σημειακές μεταλλάξεις, οι προσθήκες, οι ελλείψεις κ.α. Πλέον, είναι δυνατή η απομόνωση και η ανάλυση ctDNA σε συγκεντρώσεις χαμηλές όσο το 0,01%. Μερικές τεχνικές ctDNA Sequencing είναι οι εξής:

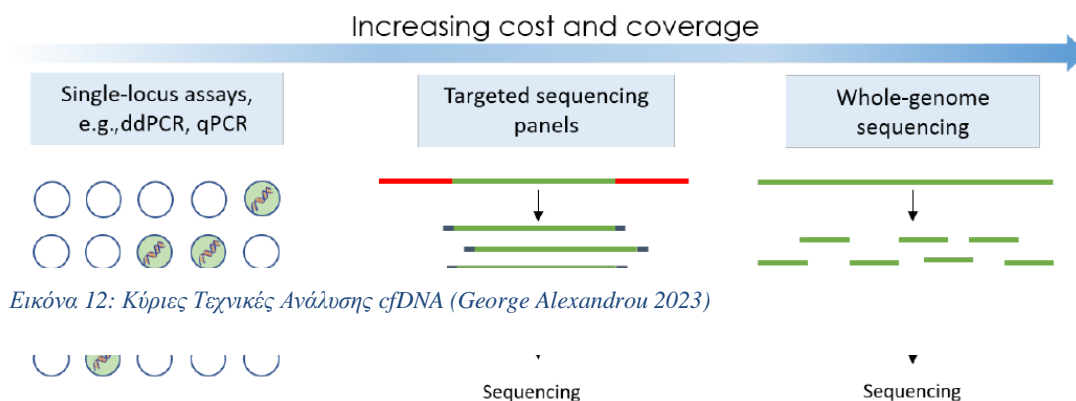
- **Droplet digital PCR (ddPCR):** Υψηλή ευαισθησία για ανίχνευση μεταλλάξεων αλληλόμορφων γονιδίων που δεν εντοπίζονται συχνά. Χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση πιθανών σπάνιων μεταλλάξεων (<0,1%). Ωστόσο, η ddPCR είναι περισσότερο περίπλοκη και παρουσιάζει μεγαλύτερο κίνδυνο επιμόλυνσης λόγω των πολλαπλών βημάτων μεταφοράς και πιεταρίσματος. Για την διεξαγωγή της τεχνικής απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό.

- **Beams, Emulsion, Amplification and Magnetics (BEAMing PCR):** Αποτελεί μία παραλλαγή της ddPCR και μία σχετικά ευαίσθητη και οικονομική μέθοδος για τον έλεγχο γνωστών μεταλλάξεων. Συνδυάζει PCR και κυτταρομετρία ροής και ανιχνεύει μεταλλάξεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως 0,01% σε εξαιρετική συμφωνία με τον ιστοπαθολογικό έλεγχο.
- **Next Generation Sequencing (NGS):** Στοχεύει στην ανάλυση πολλαπλών γονιδίων και καλύπτει ένα μεγαλύτερο φάσμα μεταλλάξεων καθώς μπορεί να αναλύσει ολόκληρες τις αλληλουχίες των γονιδίων που εξετάζονται. Οι μέθοδοι NGS περιλαμβάνουν τόσο στοχευμένες όσο και μη στοχευμένες προσεγγίσεις και διακρίνονται για την ικανότητα τους να πραγματοποιούν μαζικό παράλληλο sequencing εκατομμυρίων ακολουθιών του DNA. Στοχευμένες μέθοδοι όπως είναι οι Tam-Seq, Safe-SeqS και CAPP-Seq έχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών σπάνιων μεταλλάξεων στο ctDN και παρουσιάζουν υψηλή αναλυτική ευαισθησία. Ωστόσο, περιορίζονται στις μεταλλάξεις προκαθορισμένων γονιδίων σε αντίθεση με τις μη στοχευμένες μεθόδους όπως είναι οι τεχνικές whole genome sequencing ή whole-exome sequencing. Οι τελευταίες παρέχουν την δυνατότητα ανίχνευσης κλινικά σχετικών γενετικών αποκλίσεων χωρίς προαπαιτούμενες πληροφορίες για τον πρωταρχικό όγκο. Τα μειονεκτήματα των μη στοχευμένων μεθόδων NGS είναι η χαμηλή ευαισθησία, η ανάγκη για μεγαλύτερο όγκο δείγματος και το υψηλότερο κόστος (Isabel Heidrich 2021).
- **Tagged-Amplicon Deep Sequencing (Tam-Seq):** Επιτρέπει μία ιδιαίτερα ειδική και ευαίσθητη ανάλυση (97%) και μπορεί να ανιχνεύσει επίπεδα DNA της τάξης 2% χρησιμοποιώντας εκκινητές για την ταυτοποίηση γενωμικών ακολουθιών. Η διαδικασία χαρακτηρίζεται γρήγορη, οικονομική ενώ μπορεί να αναλύσει ταυτόχρονα εκατομμύρια μόρια DNA.
- **Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq):** Ταυτοποιεί μεταλλάξεις στο ctDNA/ cfDNA, χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες γενετικού υλικού, μπορεί να αναγνωρίσει πολλαπλές μεταλλάξεις σε ασθενείς με τον ίδιο τύπο όγκου και να αξιολογήσει την ετερογένεια αυτού. Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος είναι ικανή να εντοπίσει φορτία όγκου πριν την ιατρική απεικόνιση του.



- **Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS-Seq):** Αποτελεί την κύρια μέθοδο στην ανάλυση μεθυλίωσης του DNA. Παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια.
- **Whole Exome Sequencing (WES):** Χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό και την ανάλυση παρόντων μεταλλάξεων του όγκου και μπορεί να ταυτοποιήσει πιθανά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ωστόσο, παρουσιάζεται να έχει χαμηλότερη ευαισθησία από άλλες μεθόδους, είναι οικονομική και υψηλής απόδοσης.
- **Whole Genome Sequencing (WGS):** Αξιολογεί όλο το γενετικό υλικό του όγκου για τον καθορισμό μεταλλάξεων καθώς επίσης και μεταβολών άγνωστης σημασίας. Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η αμφίβολη ποιότητα, τα ηθικά ζητήματα, το χρόνο και το κόστος. Επιπλέον, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μπορεί να φανεί δύσκολη σε μη εξειδικευμένα κέντρα (Justin Mencil 2022) (Mina Nikanjam 2022) (Chen Lin 2021).

## Ενότητα Γ: Εφαρμογές της μεθόδου υγρής βιοψίας σε διάφορα είδη καρκίνου



Εικόνα 12: Κύριες Τεχνικές Ανάλυσης cfDNA (George Alexandrou 2023)

### Γ.1. Καρκίνος του πνεύμονα

Όσον αφορά τα επίπεδα ctDNA του πλάσματος για τη διάγνωση του πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα, οι ερευνητές αναφέρουν ότι είναι αισθητά αυξημένα σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) σε σχέση με υγιή άτομα και ασθενείς που αντιμετωπίζουν χρόνια λοίμωξη του αναπνευστικού. Επιπλέον, η ευαισθησία και η ειδικότητα των επιπέδων ctDNA για την διάκριση μεταξύ των ασθενών και υγιών ατόμων είναι 90 και 80,5% αντιστοίχως. Σε μία άλλη μελέτη, το ctDNA ανιχνεύτηκε

στο 100% των δειγμάτων πλάσματος από ασθενείς με στάδιο II-IV ΜΜΚΠ και στο 50% των δειγμάτων σε ασθενείς με στάδιο I. Τέλος, βρέθηκε πως η συκέντρωση ctDNA έχει μεγάλη συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου (Wen Li 2022).

## Γ.2. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο συνήθη τύπο καρκίνου στο γυναικείο φύλο παγκοσμίως και η μαστογραφία είναι η κύρια μέθοδος για τη διάγνωση του. Στην προσπάθεια ανάπτυξης μη επεμβατικών μεθόδων για την έγκαιρη ανίχνευση του όγκου, έχουν περιγραφεί βιοδείκτες που βασίζονται στο cfDNA, ctDNA, CTCs, miRNA, lncRNAs, αιμοπετάλια, mRNA, πρωτεΐνες και οργανικά συμπλέγματα που προέρχονται από το αίμα, τα ούρα και το σάλιο. Συγκεκριμένα, το cfDNA αναγνωρίζεται ως ένας βιοδείκτης έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου του μαστού μέσω της ανάλυσης της βλάβης και της μεθυλίωσης του DNA (Ana Julia Aguiar de Freitas 2022). Τα επίπεδα cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται σε υγιή άτομα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως οι ασθενείς με καλοήγη όγκο παρουσιάζει επίσης μεγαλύτερες συγκεντρώσεις cfDNA, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διάκριση τους από τους ασθενείς με κακοήθεια (Timothy Kwang Yong Tay 2021).

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με κακοήθεια έχουν σημαντικά πιο εκτεταμένη βλάβη του DNA σε σχέση με ασθενείς με καλοήθεις όγκους και υγιή άτομα, καθώς επίσης υπάρχει συσχέτιση με την σταδιοποίηση TNM (Ana Julia Aguiar de Freitas 2022). Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR και ανιχνεύτηκε η παρουσία μεταλλάξεων του PIK3CA στο 80% των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ενώ αντίθετα δεν ήταν δυνατή αυτή η ανίχνευση σε ασθενείς με εντοπισμένο όγκο. Ωστόσο, με τη χρήση πιο ευαίσθητων τεχνικών όπως είναι η PCR BEAMing ήταν δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας cfDNA στο 50% των ασθενών (Timothy Kwang Yong Tay 2021).

Το τεστ CancerSEEK παρουσιάζει ευαισθησία 33% και ειδικότητα 99% όσον αφορά την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Κατά την αξιολόγηση των μεταλλάξεων του PIK3CA, ενός ογκογονιδίου που μεταλλάσσεται σε υψηλή συχνότητα και εντοπίζεται στο 30% των ασθενών με καρκίνο του μαστού, παρατηρήθηκε 93,3% ευαισθησία και 100% ειδικότητα για την ανίχνευση της νόσου

σε αρχικό στάδιο. Επιπλέον, σε μία μελέτη που αξιολογήθηκε η έκφραση 5 miRNAs (miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p και miR-6875-5p) στον ορό ασθενών και υγιών γυναικών και φαίνεται πως βοήθησε στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε αρχικό στάδιο (in situ) με ευαισθησία 98,0% (Ana Julia Aguiar de Freitas 2022).

Γενικά, είναι προφανές πως η απουσία κάθαρσης του ctDNA αποτελεί σημαντικό παράγοντα πρόβλεψης ανεπαρκούς ανταπόκρισης στη θεραπευτική αγωγή και δημιουργίας μεταστάσεων, ενώ η απομάκρυνση του συσχετίζεται με βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών (M. J. M. Magbanua Ann Oncol).

### **Γ.3. Καρκίνος του παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί ένα πρωταρχικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας καθώς είναι από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους καρκίνου στις ανεπτυγμένες χώρες. Η διαχείριση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου έχει βασιστεί για δεκαετίες σε διαγνωστικές τεχνικές που βασίζονται στη βιοψία όπως είναι η κολονοσκόπηση και οι ιστοπαθολογικές ανάλυσεις του ιστού και απεικονιστικές μεθόδους. Ωστόσο, η κλινική αξιολόγηση της νόσου και της σταδιοποίησης του όγκου που βασίζεται σε αυτές τις τεχνικές αδυνατεί να προσφέρει κλινικά χρήσιμες προγνωστικές και προβλεπτικές πληροφορίες στο επίπεδο κάθε ασθενή. Τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με το στάδιο της νόσου είναι 94, 82, 67, και 11% για τα στάδια I, II, III, και IV αντίστοιχα, γεγονός που καθιστά την έγκαιρη διάγνωση κριτικής σημασίας.

Εκτός από την παρουσία CTCs και ctDNA, ο βιολογικός ρόλος των microRNAs όσον αφορά τη παθογένεση του όγκου γίνεται ολοένα και πιο εμφανής και η παρουσία τους στο περιφερικό αίμα του ασθενή φαίνεται να είναι ένας σημαντικός προβλεπτικός και προγνωστικός βιοδείκτης. Η μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA αποτελεί χαρακτηριστικό των περισσότερων στερεών όγκων και πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης για την έγκαιρη διάγνωση. Ο SEPT9 αποτελεί τον πιο ευρέως μελετημένο υποκινητή γονιδίου όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρόλο που η εφαρμογή της ανάλυσης του SEPT9 κρίνεται καταλληλότερη σε σχέση με τα τεστ CEA και κοπράνων, η μεθυλίωση του δεν μπορεί να προσφέρει διάκριση μεταξύ καρκίνου του παχέος εντέρου και πολύποδων ή αδενωμάτων. Ο συνδυασμός πολλαπλών βιοδεικτών είναι πιο πιθανό να επιτύχει μεγαλύτερη ευαισθησία, γι αυτό και πλέον

αξιολογείται η διαγνωστική αξία της ανάλυσης του SEPT9 σε συνδυασμό με άλλα μεθυλιωμένα γονίδια. Ένα πάνελ που αποτελείται από τους δείκτες μεθυλίωσης των γονιδίων BCAT1 και IKZF1 είχε 66% ευαισθησία και 94% ειδικότητα όσον αφορά την ανίχνευση του όγκου. Εναλλακτικές πηγές καρκινικού DNA από όγκους του παχέος εντέρου αποτελούν τα δείγματα κοπράνων ενώ έχει εγκριθεί ένα τεστ που συνδυάζει ctDNA κοπράνων και εξέταση αίματος (Cologuard) (María Marcuello 2019).

#### **Γ.4. Καρκίνος ουροδόχου κύστης**

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (BC) αποτελεί την τέταρτο πιο συχνό είδος καρκίνου στους άντρες και το πιο συχνό νεόπλασμα του ουροποιητικού συστήματος με 17.000 καταγεγραμμένους θανάτους το 2022 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Συσχετίζεται με καλό προσδόκιμο ζωής, χαμηλή θνησιμότητα αλλά και με υψηλά επίπεδα επανεμφάνισης έως και 80%. Κύρια μέθοδος διάγνωσης και παρακολούθησης παραμένει η επεμβατική και επίπονη βιοψία ιστού και κυστεοσκόπηση, η οποία συχνά συσχετίζεται με κίνδυνο μόλυνσης και αιματουρία (Shijie Li 2023). Η κυτταρολογία προσφέρει μία λιγότερο επεμβατική εναλλακτική αλλά φαίνεται να περιορίζεται από τη χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης (17%), ειδικά για όγκους σε αρχικά στάδια και εξαρτάται από την ακρίβεια της ανάλυσης των εργαστηριακών (Salagierski 2022).

Η μέθοδος της υγρής βιοψίας με τη χρήση δείγματος ούρων αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο διάγνωσης BC μέσω της οποίας είναι δυνατή η ανίχνευση βιοδεικτών όπως είναι το cf-DNA, το DNA, το RNA, πρωτεΐνες και καρκινικά κύτταρα (Yu Xiao 2022). Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τους τύπους καρκίνου ουροδόχου κύστης, αλλά φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη μετά από κυστεκτομή για θεραπευτικό σκοπό, προσφέροντας τη δυνατότητα ανίχνευσης ελάχιστης υπολειπόμενης (MRD) νόσου πριν από τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους μέσω τεχνικών ultra-deep targeted sequencing, οι οποίες ωστόσο παρουσιάζουν μέτρια ευαισθησία (Shijie Li 2023) (Pradeep S. Chauhan 2023).

Τα CTCs απελευθερώνονται στην κυκλοφορία στα πρώτα στάδια της νόσου, γεγονός που καθιστά την ανίχνευση τους χρήσιμη τεχνική για έγκαιρη διάγνωση. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως η παρουσία των CTCs συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο επανεμφάνισης της ασθένειας και την επιβίωση του ασθενή μετά από ολική κυστεκτομή (Shijie Li 2023).

Όσον αφορά το ctDNA, μελέτες δείχνουν πως η μεθυλίωση του υποκινητή ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει διαγνωστική αξία για τον καρκίνο ουροδόχου κύστης. Συγκεκριμένα, μία μελέτη αναφέρει την ανίχνευση του μεθυλιωμένου γονιδίου p16 στον ορό των ασθενών με ευαισθησία 22,6%, ειδικότητα 95% και θετική προγνωστική αξία 98%. Άλλες προσεγγίσεις αναφέρουν την ανίχνευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια όπως είναι τα FGFR3, PIK3CA, ERBB2 και EGFR, οι οποίες χαρακτηρίζονται συχνές στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Shijie Li 2023). Οι σωματικές μεταλλάξεις που χαρακτηρίζουν το ctDNA, το καθιστούν χρήσιμο βιοδείκτη καθώς ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου παρουσιάζει υψηλό φορτίο μεταλλαγών. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν μεταλλαγές του ctDNA που σχετίζονται με φάρμακα σε μεταστατικούς ασθενείς, γεγονός που τονίζει τη σημασία του στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (Xuan-Mei Piao 2021). Σχετικά με την επανεμφάνιση και την πρόγνωση της νόσου, έχει βρεθεί πως η ανίχνευση του ctDNA συσχετίζεται με την επανεμφάνιση της νόσου με 83% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα ctDNA είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με μεταστάσεις ή εξέλιξη της νόσου μετά από κυστεκτομή σε σχέση με υγιή άτομα (Shijie Li 2023).

## **Γ.5. Καρκίνος του νεφρού**

Ο καρκίνος του νεφρού (RCC) είναι ένας από τους δέκα πιο συχνούς τύπου καρκίνου στους άνδρες και το 2,2% των περιστατικών καρκίνου γενικά (Mingyang Li 2023) (Raimonda Kubiliute 2021). Φαίνεται πως η συχνότητα εμφάνισης του ολοένα και αυξάνεται και κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων διάγνωσης και ανίχνευσης κατάλληλων βιοδεικτών (Mingyang Li 2023). Η χρήση της υγρής βιοψίας με βάση μοριακούς βιοδείκτες σε συνδυασμό με απεικονιστικές μεθόδους θα μπορούσε τόσο να αυξήσει το ποσοστό έγκαιρης διάγνωσης όσο και να βοηθήσει στην διάκριση των περιπτώσεων υψηλού και χαμηλού κινδύνου (Raimonda Kubiliute 2021). Για το συγκεκριμένο είδος καρκινώματος, το αίμα και τα ούρα είναι τα κύρια δείγματα για υγρή βιοψία.

Όσον αφορά την ανάλυση ctDNA για την εφαρμογή της μεθόδου, φαίνεται πως το μέγεθος των τμημάτων του γενετικού υλικού συσχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και μεγάλη κλινική αξία. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν πως το ογκοκατασταλτικό γονίδιο VHL που καταστέλλει την εξέλιξη RCC μέσω του

μονοπατιού HIF/VHL, σχετίζεται με τον κληρονομικό καρκίνο του νεφρού. Επιπρόσθετα, τα γονίδια VHL, TP53, BAP1 και PBRM1 παρουσιάζουν μεγάλη συχνότητα μεταλλαγής σε ασθενείς με RCC (Mingyang Li 2023). Τέλος, η υπερμεθυλίωση του CPG υποκινητή που παρουσιάζεται συχνά και στον καρκίνο του νεφρού συσχετίζεται με την καταστολή ογκοτατασταλτικών γονιδίων και μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και στα προκαρκινικά στάδια (Raimonda Kubiliute 2021).

## Γ.6. Καρκίνος παγκρέατος

Ο καρκίνος παγκρέατος (PC) αποτελεί το έβδομο αίτιο θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο παγκοσμίως σε άνδρες και γυναίκες, προκαλώντας σχεδόν όσους θανάτους όσους και τα διαγνωσμένα περιστατικά εξαιτίας της μη έγκαιρης διάγνωσης. Μέχρι το 2030, αναμένεται να είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο στις Η.Π.Α., ενώ το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης παραμένει κάτω του 10% (Jinshou Yang 2021). Η διάγνωση βασίζεται κυρίως στην αναρρόφηση κυττάρων με λεπτή βελόνα καθοδηγούμενη από υπερήχους (EUS-FNA), η μαγνητική τομογραφία (MRI) και η αξονική τομογραφία (CT), οι οποίες όμως είναι επεμβατικές, έχουν υψηλό κόστος και εκθέτουν τους ασθενείς στην ακτινοβολία. Επιπλέον, οι περισσότεροι ασθενείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα προτού ο όγκος προκαλέσει απόφραξη του χοληδόχου πόρου ή εισβάλει στα περιβάλλοντα νεύρα.

Η μέθοδος της υγρής βιοψίας καθιστά τα CTCs ανιχνεύσιμα σε όλα τα στάδια, ακόμη και τα προκαρκινικά. Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει περιορισμένη ευαισθησία και τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποκολληθούν από τον όγκο και μέσα από την κυκλοφορία του αίματος, να οδηγήσουν στη δημιουργία μετάστασης. Σημειώνεται πως σε αντίθεση με τα CTCs που ανιχνεύονται πιο ευκολότερα στα τελικά στάδια του καρκίνου, τα κυκλοφορούντα επιθηλιακά κύτταρα, κυκλοφορούν στο αίμα πριν τη δημιουργία του όγκου (Kangchun Wang 2023). Ο συνδυασμός της ανίχνευσης CTCs και άλλων βιοδεικτών, αποτελούν μία αξιόπιστη και μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός CTCs και του GPC1 θετικού εξωσώματος χαρακτηρίζεται από 100% ευαισθησία για τη διάγνωση PC (Jinshou Yang 2021).

Όσον αφορά την ανάλυση του cfDNA, φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μικρότερων τμημάτων του και κακής πρόγνωσης (Sonia Perales 2021). Επιπλέον, Οι μεταλλάξεις KRAS χρησιμοποιούνται συχνά ως πρωταρχικός στόχος της

ανάλυσης του ctDNA, η ανίχνευση των οποίων όμως παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Από την άλλη πλευρά, η συνδυαστική ανάλυση των CA19-9, ctDNA και CTCs έχουν ευαισθησία και ειδικότητα 78 και 91% όσον αφορά τη διάγνωση PC (Kangchun Wang 2023). Τέλος, η κατάσταση μεθυλίωσης των ADAMTS1 και BNC1 στο cfDNA χαρακτηρίζεται από εξαιρετική διαγνωστική απόδοση στην έγκαιρη διάγνωση PC (Kangchun Wang 2023).

## Γ.7. Καρκίνος του Θυρεοειδούς

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς (TC) παρουσιάζεται ως η συχνότερη κακοήθεια του ενδοκρινικού συστήματος και ευθύνεται για το 2% περίπου όλων των τύπων καρκίνου (Chiara Romano 2021). Η πλειοψηφία των περιστατικών παρουσιάζουν θετική έκβαση, με ποσοστό 10ετούς επιβίωσης 85%. Η επανεμφάνιση του όγκου μπορεί να συμβεί μήνες έως και χρόνια μετά την αρχική διάγνωση. Περίπου το 50% των ασθενών υψηλού κινδύνου θα υποτροπιάσουν μέσα στα πρώτα 5 χρόνια. Η έγκαιρη αναγνώριση των ασθενών με μεγαλύτερη πιθανότητα επανεμφάνισης κρίνεται αναγκαία για τη διασφάλιση ακριβούς αξιολόγησης και λιγότερο επεμβατικών θεραπευτικών μεθόδων (Ayanthi A. Wijewardene 2021).

Η κύρια μέθοδος για την αρχική διάγνωση TC είναι η βιοψία αναρρόφησης με λεπτή βελόνα (FNAB), η οποία όμως παρουσιάζει μερικούς περιορισμούς εξαιτίας του υψηλού ποσοστού των ασαφών διαγνωστικών αποτελεσμάτων, ειδικά στην περίπτωση του θυλακιδώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. Όσον αφορά την μετεγχειρητική παρακολούθηση, η μέτρηση των επιπέδων της θυρεοσφαιρίνης (TG) μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία των αντισωμάτων anti-Tg. Για την αντιμετώπιση των παραπάνω, η μέθοδος υγρής βιοψίας θα μπορούσε να συνεισφέρει ιδιαίτερα στην διαχείριση του TC (Chiara Romano 2021).

Η έκφραση των γονιδίων που συσχετίζονται με τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να βοηθήσουν στην διάκριση μεταξύ των καλοηθών και των κακοηθών θυρεοειδικών οζιδίων με θυλακιδώδη χαρακτήρα. Για παράδειγμα, το γονιδίου SLC5A5 εκφράζεται λιγότερο σε ασθενείς με θυλακιδώδη καρκίνου του θυρεοειδούς σε σχέση με τους ασθενείς με θυλακιδώδες αδένωμα. Επιπλέον, στην μετεγχειρητική παρακολούθηση, τα επίπεδα ορού των κυκλοφορούντων επιθηλιακών κυττάρων (CECs) που εκφράζουν τα EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) και TSHR (thyroid-stimulating hormone receptor), είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με κίνδυνο



υποτροπής και η ανιχνεύσιμη Tg ορού εξαιτίας των TgAb (Chiara Romano 2021). Σημειώνεται πως η μεταλλαγή BRAF V600E είναι η πιο συχνή γενετική τροποποίηση στον TC (Fatemeh Khatami 2019). Δεν ανιχνεύεται ποτέ σε καλοήθη νοσήματα, αλλά ανιχνεύεται στα 2/3 των περιπτώσεων διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς. Επομένως, η ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης αποτελεί βασική μέθοδο αξιολόγησης του κινδύνου και των θεραπευτικών επιλογών (Ayanthi A. Wijewardene 2021).

Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε όσον αφορά τα επίπεδα μεθυλίωσης 5 γονιδίων καλσιτονίνης (calsitonin), E- καντχερίνη-ιστικός αναστολέα μεταλλοπρωτεϊνών 3 (E-cadherin- tissue inhibitor of metalloproteinase 3), σχετιζόμενη με το θάνατο πρωτεϊνική κινάση (death- associated protein kinase) και υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος- β2 (retinoic acid receptor- β2), παρουσίασε 77% ακρίβεια στη διαφορική διάγνωση μεταξύ διαφοροποιημένων όγκων του θυρεοειδούς και καλοηθών οζιδίων (Chiara Romano 2021). Η συνδυαστική ανάλυση των κυκλοφορούντων υπερμεθυλιωμένων SLC5A8 και SLC26A4 και της μεταλλαγής BRAF V600E φαίνεται να είναι ένα εύκολο, μη επεμβατικό εργαλείο για τη διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς και χαρακτηρίζεται από καλή επαναληψιμότητα (Fatemeh Khatami 2019).

## **Γ.8. Καρκίνος του προστάτη**

Ο καρκίνος του προστάτη (PCa) είναι το πιο διαδεδομένο είδος καρκίνου μεταξύ ανδρών και ειδικότερα 1 στους 9 άνδρες παρουσιάζει τη νόσο, με ποσοστό θνησιμότητα περίπου 2%. Η διάγνωση βασίζεται στην αξιολόγηση των επιπέδων του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA), στην ψηφιακή ορθική εξέταση με ακόλουθη βιοψία με βοήθεια διορθικού υπερηχογραφήματος. Δυστυχώς, η μικρή θετική προγνωστική αξία του PSA (30%), χαμηλή ειδικότητα οδηγεί σε μεγάλο αριθμό μη αναγκαίων βιοψιών και ανίχνευση ασυμπτωματικών όγκων χαμηλού κινδύνου. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη ακριβών μεθόδων για την διάγνωση του καρκίνου του προστάτη, όπως είναι η υγρή βιοψία (Milena Matuszczak 2021).

Χαρακτηριστικά του PCa είναι η σταδιακή ανάπτυξη γενετικής ετερογένειας και ετερογένειας των παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (Alexey S. Rzhnevskiy 2022). Η ανίχνευση των μεταλλαγών του γονιδίου AR συσχετίζεται με χειρότερη έκβαση της νόσου σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με ARSI (androgen receptor signaling inhibitors). Άλλες μεταλλάξεις η ανίχνευση των οποίων πριν τη θεραπεία είναι κλινικά



χρήσιμη περιλαμβάνουν τις TP53, RB1, και PTEN. Επιπρόσθετα, υπάρχουν μεταβολές της μεθυλίωσης του DNA όπως οι GSTP1, APC, RASSF1A με πιθανές μεταγραφικές ή φυσιολογικές επιδράσεις στην καρκινογένεση. Το υπερμεθυλιωμένο GSTP1, το πιο καλά μελετημένο μεθυλιωμένο γονίδιο αποτελεί ένα από τα πιο πρώιμα και συχνά χαρακτηριστικά του PCa. Δεδομένης της συχνής παρουσίας του, πολλαπλές μελέτες υποδεικνύουν πως η καταστολή του θα μπορούσε να έχει πρωταρχικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου (Blanca Trujillo 2022).

## Γ.9. Καρκίνος του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου (EC) αποτελεί τον πιο συχνό γυναικολογικό κακοήγη όγκο στις γυναίκες και τον τέταρτο πιο συχνό μετά από τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Επιπλέον, είναι η έβδομη πιο συχνή κακοήθης νόσος παγκοσμίως (Yan Shen 2023). Παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η διάγνωση του EC γίνεται νωρίς λόγω της μετεμμηνοπαυσιακής μητρορραγίας, έως και το 20% των περιστατικών εξελίσσονται σε καρκίνωμα προχωρημένου σταδίου (Laura Muinelo-Romay 2018).

Η διαγνωστική διαδικασία αποτελείται από πυελική εξέταση, διακολπικό υπερηχογράφημα, και στη συνέχεια ιστοπαθολογική παρατήρηση ενδομητριακής βιοψίας, η οποία ωστόσο μπορεί να προκαλέσει δυσφορία, αιμορραγία, μόλυνση με ποσοστό αποτυχημένης διάγνωσης έως και 25%. (Laura Muinelo-Romay 2018) (Yan Shen 2023). Τα περιστατικά EC μεταξύ νέων γυναικών αυξάνονται ολοένα και περισσότερο ενώ παρατηρούνται συχνότερα περισσότερο επιθετικοί υπότυποι του όγκου. Επομένως, υπάρχει επιτακτική ανάγκη βελτίωση των τεχνικών της προεγχειρητικής διάγνωσης, ενώ δυστυχώς η μέθοδος της υγρής βιοψίας δεν έχει μελετηθεί πλήρως όσον αφορά τον συγκεκριμένο τύπου καρκίνου (Marta Łukasiewicz 2021). Όσον αφορά τις επιγενετικές αλλαγές, ανιχνεύονται συχνά TP53 μεταλλάξεις στον ορώδη καρκίνο του ενδομητρίου και KRAS μεταλλάξεις στους ενδομητριακούς όγκους σταδίου 2 (Laura Muinelo-Romay 2018).

Οι μελέτες για τον καρκίνο του ενδομητρίου πάνω στο ctDNA είναι περιορισμένες. Το 2018, στην ετήσια συγκέντρωση της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας, σημειώθηκε πως η ευαισθησία ανίχνευσης του ctDNA στους ασθενείς με EC είναι λιγότερο από 10%, αλλά η ειδικότητα φτάνει έως και 95%. Επιπλέον, όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ctDNA και επανεμφάνισης

του όγκου, η πρόβλεψη υποτροπής παρουσιάζει 100% ευαισθησία και 83,3% ειδικότητα. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως το ctDNA αποτελεί καταλληλότερο εργαλείο πρόβλεψης επανεμφάνισης του όγκου σε σχέση με τις πρωτεΐνες CA125 και HE4. Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε πως πριν την αρχική θεραπεία ανιχνευόταν ctDNA στους ασθενείς ενώ μετά από αυτής τα επίπεδα του ήταν μη ανιχνεύσιμα. Επίσης, οι ctDNA αρνητικοί ασθενείς παρουσίαζαν καλύτερη επιβίωση χωρίς την εξέλιξη της νόσου (PFS) και ολική επιβίωση (OS), που υποδεικνύει πως το ctDNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της θεραπευτικής αγωγής (Yan Shen 2023).

## **Γ.10. Αιματολογικές Κακοήθειες**

Οι αιματολογικές κακοήθειες αναφέρονται στα νοσήματα που επηρεάζουν τον μυελό των οστών, το λεμφικό σύστημα, τα κύτταρα του αίματος και αποτελεί τον πιο συχνό τύπο όγκου μεταξύ παιδιών και νεαρών ενηλίκων. Η λευχαιμία, το λέμφωμα και το μυέλωμα είναι τα πιο κοινά είδη των αιματολογικών κακοηθειών. Οι συμβατικοί μέθοδοι διάγνωσης βασίζονται σε πλήρη ανάλυση των κυττάρων του αίματος με ακριβή μέτρηση του πληθυσμού τους σε συνδυασμό με μορφολογική εξέταση του μυελού των οστών, δείγμα από τον οποίον λαμβάνεται ιδιαίτερα επεμβατικά συνήθως με λεπτή βελόνα. Μετά τη θεραπεία, ο ασθενείς υποβάλλεται σε εξέταση του περιφερικού αίματος για μορφολογική, κυτταρογενετική η μοριακή αξιολόγηση (Bilal Abdulmawjood 2019).

Το προφίλ των μεταλλάξεων του cfDNA αναλύθηκε πρώτη φορά για τη διάγνωση αιματολογικών ασθενειών σε ασθενείς με οξεία μυελοειδή λευχαιμία (ΟΜΛ) και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ). Οι μεταλλαγές ανιχνεύτηκαν στο 60% των ασθενών και 20 χρόνια αργότερα, ανακαλύφθηκε πως το αίμα των ασθενών με ΟΜΛ/ΜΔΣ ήταν πλούσιο σε καρκινικό DNA. Πράγματι, είναι γνωστό πως οι ασθενείς που νοσούν από καρκίνο και συγκεκριμένα με οξεία μυελοειδή λευχαιμία παρουσιάζουν ανεβασμένα επίπεδα cfDNA σε σχέση με υγιή άτομα. Τα miRNAs φαίνονται να είναι σημαντικός βιοδείκτης στην ΟΜΛ καθώς τα μικρά μόρια του είναι άφθονα στο πλάσμα των ασθενών, ενώ τα επίπεδα του μειώνονται μετά τη χημειοθεραπεία. Ενδιαφέρουσα πληροφορία αποτελεί το γεγονός πως οι ασθενείς με ΟΜΛ που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία παρουσιάζουν μείωση στα κυκλοφορούντα νουκλεοσωμικά τμήματα DNA ενώ σε ασθενείς σε ύφεση παρατηρείται αρχική αύξηση των επιπέδων cfDNA μεταξύ της δεύτερης και της

τέταρτης μέρας μετά τη χημειοθεραπεία, πιθανών λόγω της υψηλής απόπτωσης ως ανταπόκριση σε αυτήν (Bilal Abdulmawjood 2019).

Γονιδιακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό του γενετικού προφίλ ασθενών με ΟΜΛ είναι οι εξής: Nucleophosmin 1 (NPM1), Πρωτο-ογκογονίδιο C-KIT, CCAAT/ enhancer binding protein alpha (CEBPA), FMS related kinase 3 (FLT3). Χρησιμοποιούνται για την πρόγνωση και άμεσες αποφάσεις σχετικά με τη θεραπεία μετά από την αρχική χημειοθεραπεία. Το NPM1 αποτελεί το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στην ΟΜΛ και ως εκ τούτου είναι πολύτιμος βιοδείκτης της νόσου (Bilal Abdulmawjood 2019).

### **Γ.11. Καρκίνος του ήπατος**

Ο καρκίνος του ήπατος χαρακτηρίζεται από σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως με περισσότερα από 900.000 διαγνωσμένα περιστατικά κάθε χρόνο και περισσότερους από 800.000 θανάτους. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) αποτελεί το 90% των περιπτώσεων και η επιβίωση των ασθενών που νοσούν συσχετίζεται ιδιαίτερα με το στάδιο της διάγνωσης. Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης είναι 34% στις περιπτώσεις εντοπισμένου όγκου και 3% σε μεταστατικούς όγκους. Η διάγνωση γίνεται με τη χρήση κοιλιακού υπερηχογραφήματος με ή χωρίς τη μέτρηση της α-φетоπρωτεΐνης όπου παρουσιάζεται ωστόσο περιορισμένη ευαισθησία (47 έως 84%) και ειδικότητα (67 έως 90%) (Zachariah H. Foda 2023).

Όσον αφορά τη χρήση της υγρής βιοψίας για τη διάγνωση του HCC, φαίνεται πως η συγκέντρωση cfDNA στο πλάσμα είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθενείς με HCC σε σχέση με ασθενείς με κίρρωση του ήπατος ή υγιή άτομα. Ο αριθμός των σωματικών μεταλλάξεων στο ctDNA αντανακλά το φορτίο του όγκου στους περισσότερους ασθενείς με HCC και αντιπροσωπεύει τις γενετικές πληροφορίες της πρώτης βιοψίας του όγκου. Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με καρκίνωμα μεγάλου μεγέθους (>5cm), ανιχνεύτηκε τουλάχιστον μία ανίχνευση σε 86% των περιστατικών (Xiaolin Wu 2020). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα συγκριτικά με άλλα είδη στερεών όγκων παρουσιάζει χαμηλότερο φορτίο μεταλλαγών.

Μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA, και συγκεκριμένα στα νησίδια CpG των ογκοκατασταλτικών γονιδίων φαίνεται να διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη HCC και προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος του όγκου, τον

κίνδυνο δημιουργίας μετάστασης και υποτροπής. Υπερμεθυλίωση των γονιδίων GSTP1 και RASSF1A παρατηρείται στο 50 και 70-93% των περιπτώσεων αντίστοιχα, και υπομεθυλίωση του LINE-1 περίπου στο 67% αυτών (Filippo Pelizzaro 2021).

## **Γ.12. Εφαρμογές της μεθόδου υγρής βιοψίας σε μη κακοήθη νοσήματα**

### **Γ.12.1 Μεταμόσχευση**

Το 1998, αναφέρθηκε η παρουσία του donor- derived cfDNA (DD-cfDNA) στο πλάσμα ασθενών που υπέστησαν μεταμόσχευση νεφρών ή ήπατος. Αυτό υπέδειξε πως το DD-cfDNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την απόρριψη ενός μοσχεύματος. Το DD-cfDNA στο αίμα βρίσκεται συνήθως σε υψηλότερη συγκέντρωση αμέσως μετά την μεταμόσχευση ενός οργάνου και σταδιακά μειώνεται όπου και φτάνει το 0,5% περίπου μέσα σε 10 ημέρες. Γενικά, υψηλά επίπεδα DD-cfDNA σχετίζονται με καταστροφή του μοσχεύματος και απόρριψη (Rebecca L Edwards 2022).

### **Γ.12.2. Καρδιοαγγειακά Νοσήματα**

Τα καρδιοαγγειακά νοσήματα, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, αποτελούν κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως και σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν πως τα επίπεδα του cfDNA είναι υψηλά σε ασθενείς με καρδιοαγγειακές παθήσεις (Jie Ren 2022). Αυτό οφείλεται σε πολλαπλούς καρδιομεταβολικούς παράγοντες κινδύνου όπως είναι η αυξημένη συστηματική φλεγμονή, τα ανεβασμένα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (χοληστερόλη και τριγλυκερίδια) και η υψηλότερη συστολική πίεση του αίματος (Iuliia A. Polinaa 2020).

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου προκαλείται από παρατεταμένη ισχαιμία, ταχεία ελάττωση του ATP και τελικά πρόκληση κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Η διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης των νεκρωτικών κυττάρων του μυοκαρδίου προκαλεί την απελευθέρωση τμημάτων DNA στην κυκλοφορία του αίματος. Το κυκλοφορούν cfDNA ανιχνεύεται μέσα στις πρώτες δύο ώρες από την έναρξη της στηθάγχης (Elinor Tan 2023). Η μη ελεγχόμενη υψηλή αρτηριακή πίεση αποτελεί χρόνια πάθηση που σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο θνησιμότητας και φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα για τα υψηλά επίπεδα cfDNA. Έρευνες που έχουν

πραγματοποιηθεί δείχνουν στενή συσχέτιση μεταξύ φλεγμονής και υπέρτασης, ωστόσο το αν η φλεγμονή αποτελεί αποτέλεσμα της υψηλής πίεσης του αίματος, είναι ακόμη διαφορούμενο (Iuliia A. Polinaa 2020).

Η χρήση του cfDNA ως βιοδείκτη για τη διάγνωση καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρδιακής ανεπάρκειας αποτελεί μία ελκυστική εναλλακτική για τα τεστ που χρησιμοποιούνται ως τώρα, καθώς όπως αναφέρθηκε τα επίπεδα cfDNA αυξάνονται έως και 50 φορές σε σχέση με αυτά των υγιών ατόμων. Το cfDNA στο πλάσμα των ασθενών συσχετίζεται με βιοδείκτες της νέκρωσης όπως είναι η τροπονίνη, η κινάση της κρεατινίνης (CK), και η CRP. Αυτή η στενή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων cfDNA και των βιοδεικτών θα μπορούσε να υποδεικνύει πως η ποσότητα του cfDNA που απελευθερώνεται εξαρτάται από τη σοβαρότητα του μυοκαρδιακού τραυματισμού. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί πως τα επίπεδα cfDNA είναι υψηλά σε ασθενείς με φυσιολογικές συγκεντρώσεις CK, υποδεικνύοντας μεγαλύτερη ευαισθησία. Επομένως, ο συνδυασμός ανίχνευσης cfDNA, CK και τροπονίνης θα μπορούσε να συμβάλλει σε μία πιο έγκαιρη διάγνωση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Iuliia A. Polinaa 2020).

## Επίλογος

Εν κατακλείδι, η μέθοδος της υγρής βιοψίας αποτελεί μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα προσέγγιση όσον αφορά τη διαχείριση των ασθενών με καρκίνο. Η ανάλυση βιοδεικτών όπως είναι το cfDNA, τα CTCs, το mRNA, το miRNA, τα εξωκυτταρικά κυστίδια κ.α. μπορεί να προσφέρει χρήσιμες κλινικά πληροφορίες όσον αφορά την αξιολόγηση κινδύνου εμφάνισης της νόσου, τη διάγνωση, τη πρόγνωση, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την παρακολούθηση πιθανής υποτροπής την έκβαση της νόσου. Με τη χρήση ευαίσθητων τεχνικών, είναι δυνατή η ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων ακόμη και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα ctDNA στα βιολογικά υγρά. Η μέτρηση της συγκέντρωσης ctDNA, η ανίχνευση μεταλλαγών σε ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια και η αναγνώριση επιγενετικών μηχανισμών όπως η μεθυλίωση και οι τροποποιήσεις ιστονών μπορούν να παρουσιάσουν μία συνολική εικόνα της νόσου. Η διαδικασία χαρακτηρίζεται εύκολη, οικονομική, καθόλου επεμβατική σε σχέση με τη παραδοσιακή βιοψία, παρουσιάζει επαναληψιμότητα και δεν επηρεάζεται από την ετερογένεια των όγκων.

Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει μερικά μειονεκτήματα όπως είναι η έλλειψη ευαισθησίας και ακρίβειας, η χαμηλή συγκέντρωση CTCs, ctDNA και RNA στο αίμα, η ανάγκη για ευαίσθητες και ειδικές τεχνικές και η αύξηση των επιπέδων cfDNA σε μη καρκινικές καταστάσεις με αποτέλεσμα αυξημένα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η συνδυαστική χρήση της υγρής βιοψίας με άλλες μεθόδους διάγνωσης και παρακολούθησης ενός όγκου φαίνεται να είναι ασφαλέστερη και πιο έγκυρη σε σχέση με εξαγωγή συμπερασμάτων βασισμένων αποκλειστικά σε αυτή. Επιπλέον, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών και της δυναμικής του βιοδεικτών της υγρής βιοψίας με στόχο τη βελτίωση της κλινικής χρήσης και της αξιοπιστίας της.

## Βιβλιογραφία

1. Aleix Prat, Fara Brasó-Maristany, Olga Martínez-Sáez, Esther Sanfeliu, Youli Xia, Meritxell Bellet, et al. 2023. "Circulating tumor DNA reveals complex biological features with clinical relevance metastatic breast cancer." *Nature Communications*, 14:1157.
2. Alexey S. Rzhavskiy, Alina Y. Kapitannikova, Denis V. Butnaru, Evgeniy V. Shpot, Simon A. Joosse, Andrei V. Zvyagin, et al. 2022. "Liquid Biopsy in Diagnosis and Prognosis of Non-Metastatic Prostate Cancer." *Biomedicines* 10: 3115.
3. Ana Julia Aguiar de Freitas, Rhafaela Lima Causin, Muriele Bertagna Varuzza, Stéphanie Calfa, Cassio Murilo Trovo Hidalgo Filho, Tatiana Takahasi Komoto et al. 2022. "Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer." *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9952.
4. Anatoli Kustanovich, Ruth Schwartz, Tamar Peretz & Albert Grinshpun. 2019. "Life and death of circulating cell-free DNA." *CANCER BIOLOGY & THERAPY* 8: 1057–1067.
5. Andrea Campos-Carrillo, Jeffrey N. Weitzel, Prativa Sahoo, Russell Rockne, Janet V. Mokhnatkin, Muhammed Murtaza et al. 2019. "Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool." *Pharmacol Ther.* 107458.
6. Arash Jamshidi, Minetta C. Liu, Eric A. Klein, Oliver Venn, Earl Hubbell, John F. Beausang, et al. 2022. "Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection." *Cancer Cell*, 40: 1537–1549.
7. Athanasios Armakolas, Maria Kotsari and John Koskinas. 2023. "Liquid Biopsies, Novel Approaches and Future Directions." *Cancers* 15: 1579.
8. Atsuya Nishiyama, and Makoto Nakanishi. 2021. "Navigating the DNA methylation landscape Navigating the DNA methylation landscape." *Trends in Genetics* Vol. 37, No. 11.
9. Ayanthi A. Wijewardene, Marthe Chehade, Matti L. Gild, Roderick J. Clifton-Bligh, Martyn Bullock et al. 2021. "Translational Utility of Liquid Biopsies in Thyroid Cancer Management." *Cancers* 13: 3443.
10. Battinelli, Harvey G. Roweth and Elisabeth M. 2021. "Lessons to learn from tumor-educated platelets." *blood* VOLUME 137, NUMBER 23.
11. Bilal Abdulmawjood, Catarina Roma-Rodrigues, Alexandra R. Fernandes, Pedro V. Baptista. 2019. "Liquid biopsies in myeloid malignancies." *Cancer Drug Resist* 2: 1044-61.
12. Bingqian Lin, Jinting Jiang, Jingxuan Jia and Xiang Zhou. 2022. "Recent Advances in Exosomal miRNA Biosensing for Liquid Biopsy." *Molecules* 27: 7145.
13. Blanca Trujillo, Anjui Wu, Daniel Wetterskog and Gerhardt Attard. 2022. "Blood-based liquid biopsies for prostate cancer: clinical opportunities and challenges." *British Journal of Cancer* 127: 1394 – 1402.
14. Chen Chen, Zehua Wang, Yi Ding, Lei Wang, Siyuan Wang, Haonan Wang, Yanru Qin. 2022. "DNA Methylation: From Cancer Biology to Clinical Perspectives." *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 27(12): 326.
15. Chen Lin, Xuzhu Liu, Bingyi Zheng, Rongqin Ke, Chi-Meng Tzeng. 2021. "Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS." *Life* 11: 890.

16. Chiara Romano, Federica Martorana, Maria Stella Pennisi, Stefania Stella, Michele Massimino, Elena Tirrò et al. 2021. "Opportunities and Challenges of Liquid Biopsy in Thyroid Cancer." *Int. J. Mol. Sci.* 22: 7707.
17. Dan Yu, Yixin Li, Maoye Wang, Jianmei Gu, Wenrong Xu, Hui Cai, et al. 2022. "Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy." *Molecular Cancer* 21: 56.
18. Diana W. Bianchi, Bethesda Rossa W.K. Chiu. 2018. "Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy." *N Engl J Med* 379(5): 464–473.
19. Diego Fernández-Lázaro 1, \* , Juan Luis García Hernández 2,3 , Alberto Caballero García, Alfredo Córdova Martínez 5, Juan Mielgo-Ayuso 5 and Juan Jesús Cruz-Hernández. 2020. "Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers." *Diagnostics* 10: 215.
20. Elinor Tan, Daniel Liu, Luke Perry, John Zhu., Ximena Cid-Serra, Adam Deane, et al. 2023. "Cell-free DNA as a potential biomarker for acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis." *IJC Heart & Vasculature* 101246.
21. Fatemeh Khatami, Bagher Larijani, Shirzad Nasiri, Seyed Mohammad Tavangar. 2019. "Liquid Biopsy as a Minimally Invasive Source of Thyroid Cancer Genetic and Epigenetic Alterations." *Int J Mol Cell Med Voll* 8., Suppl 1.
22. Filippo Pelizzaro, Romilda Cardin, Barbara Penzo, Elisa Pinto, Alessandro Vitale, Umberto Cillo et al. 2021. "Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma: Where Are We Now?" *Cancers* 13: 2274.
23. Francesca Galardi, Francesca De Luca, Dario Romagnoli, Chiara Biagioni, Erica Moretti, Laura Biganzoli, et al. 2020. "Cell-Free DNA-Methylation-Based Methods and Applications in Oncology." *Biomolecules*, 10(12):1677.
24. Fumihiko Urabe, Nobuyoshi Kosaka, Kagenori Ito, Takahiro Kimura, Shin Egawa, Takahiro Ochiya. 2020. "Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer." *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C29–C39.
25. Gaby Schobers, Rebekka Koeck, Dominique Pellaers, Servi J.C. Stevens, Merryn V.E. Macville, Aime'e D.C. Paulussen et al. 2021. "Liquid biopsy: state of reproductive medicine and beyond." *Human Reproduction* Vol.36, No.11, pp. 2824–2839.
26. George Alexandrou, Katerina-Theresa Mantikas, Rebecca Allsopp, Calista Adele Yapeter, Myesha Jahin, Taryn Melnick, et al. 2023. "The Evolution of Affordable Technologies in Liquid Biopsy Diagnostics: The Key to Clinical Implementation." *Cancers* 15: 5434.
27. Hallie Gaitsch, Robin J. M. Franklin, Daniel S. Reich. 2023. "Cell-free DNA-based liquid biopsies in neurology." *BRAIN* 146: 1758–1774 .
28. Hui Zhou, Liyong Zhu, Jun Song, Guohui Wang, Pengzhou Li, Weizheng Li et al. 2022. "Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer." *Molecular Cancer* 21:86.
29. Humaira Khan, Muhammad Raza Shah, Jiri Barek, Muhammad Imran Malik. 2023. "Cancer biomarkers and their biosensors: A comprehensive review." *Trends in Analytical Chemistry* 158.
30. Isabel Heidrich, Lucija Acˇkar, Parinaz Mossahebi Mohammadi, Klaus Pantel. 2021. "Liquid biopsies: Potential and challenges." *Int. J. Cancer* 148: 528–545.
31. Iuliia A. Polinaa, Daria V. Ilatovskayaa, Kristine Y. DeLeon-Pennell. 2020. "Cell free DNA as a diagnostic and prognostic marker for cardiovascular diseases." *Clinica Chimica Acta* 145-150.



32. Jian Cao, Qin Yan. 2020. "Cancer Epigenetics, Tumor Immunity, and Immunotherapy." *Trends Cancer* 6(7): 580–592.
33. Jie Ren, Lin Jiang, Xiaomeng Liu, Yuhan Liao, Xueyan Zhao, Fuchou Tang, et al. 2022. "Heart-specific DNA methylation analysis in plasma for the investigation of myocardial damage." *Journal of Translational Medicine* 20:36.
34. Jinshou Yang, Ruiyuan Xu, Chengcheng Wang, Jiangdong Qiu, Bo Ren, Lei You. 2021. "Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review." *Cancer Communications* 41: 1257–1274.
35. Joyce Varkey, Theodore Nicolaides. 2021. "Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors." *Cureus* 13(11): e19189.
36. Justin Mencil, Susanna Slater, Elizabeth Cartwright and Naureen Starling. 2022. "The Role of ctDNA in Gastric Cancer." *Cancers* 14: 5105.
37. Kangchun Wang, Xin Wang, Qi Pan, Bei Zhao. 2023. "Liquid biopsy techniques and pancreatic cancer: diagnosis, monitoring, and evaluation." *Molecular Cancer* 22:167.
38. Kouzarides, Mark A. Dawson and Tony. 2012. "Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy." *Cell* 150.
39. Laura Muinelo-Romay, Carlos Casas-Arozamena and Miguel Abal. 2018. "Liquid Biopsy in Endometrial Cancer: New Opportunities for Personalized Oncology." *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2311.
40. Lewin, Benjamin. 2004. *GENES VIII*. London: Pearson Education, Inc.
41. Lluc Cabús, Julien Lagarde, Joao Curado, Esther Lizano and Jennifer Pérez-Boza. 2022. "Current challenges and best practices for cell-free long RNA biomarker discovery." *Biomarker Research* 10: 62.
42. Lo, Diana S.C. Han and Y.M. Dennis. 2021. "The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology." *Trends in Genetics* Vol. 37, No. 8.
43. Lood, Bhargavi Duvvuri and Christian. 2019. "Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases." *Front. Immunol.* 10: 502.
44. M. J. M. Magbanua, L. Brown Swigart, H.-T. Wu, G. L. Hirst, C. Yau, D. M. Wolf et al. *Ann Oncol.* "Circulating tumor DNA in neoadjuvant treated breast cancer reflects response and survival." *Ann Oncol.* 32(2): 229–239.
45. María Marcuello, Veronika Vymetalkova, Rui P.L. Neves, Saray Duran-Sanchon, Hege Marie Vedeld, Emma Tham et al. 2019. "Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer." *Molecular Aspects of Medicine* 107-122.
46. Marta Łukasiewicz, Krzysztof Pastuszek, Sylwia Łapinska-Szumczyk, Robert Ró zanski, Sjors G. J. G. In 't Veld, Michał Bienkowski et al. 2021. "Diagnostic Accuracy of Liquid Biopsy in Endometrial Cancer." *Cancers* 13: 5731.
47. Marta Sant, Adrià Bernat-Peguera, Eudald Felip, Mireia Margel. 2022. "Role of ctDNA in Breast Cancer." *Cancers* 14: 310.
48. McVeigh, Mark R. Openshaw and Terri P. 2020. "Non-invasive Technology Advances in Cancer—A Review of the Advances in the Liquid Biopsy for Endometrial and Ovarian Cancers." *Front. Digit. Health* 2: 573010.
49. Melinda Szilágyi, Ondrej Pös, Éva Márton, Gergely Buglyó, Beáta Soltész, Judit Keser, et al. 2020. "Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application." *Int. J. Mol. Sci.* 21: 6827.

50. Mesfin Dessale, Getachew Mengistu , Hylemariam Mihiretie Mengist. 2022. "Nanotechnology: A Promising Approach for Cancer Diagnosis, Therapeutics and Theragnosis." *International Journal of Nanomedicine* 17: 3735–3749.
51. Midhun Malla, Jonathan M. Loree, Pashtoon Murtaza Kasi and Aparna Raj Parikh. 2022. "Using Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Current and Evolving Practices." *J Clin Oncol* 40: 2846-2857.
52. Milena Matuszczak, Jack A. Schalken and Maciej Salagierski. 2021. "Prostate Cancer Liquid Biopsy Biomarkers' Clinical Utility in Diagnosis and Prognosis." *Cancers* 13: 3373.
53. Mina Nikanjam, Shumei Kato and Razelle Kurzrock. 2022. "Liquid biopsy: current technology and clinical applications." *Journal of Hematology & Oncology* 15:131.
54. Mingyang Li, Lei Li, Jianyi Zheng, Zeyu Li, Shijie Li, Kefeng Wang, et al. 2023. "Liquid biopsy at the frontier in renal cell carcinoma: recent analysis of techniques and clinical application." *Molecular Cancer* 22: 37.
55. Misako Nagasaka, Mohammed Hafiz Uddin, Mohammed Najeeb Al-Hallak, Sarah Rahman, Suresh Balasubramanian, Ammar Sukari, et al. 2021. "Liquid biopsy for therapy monitoring in early-stage non-small cell lung cancer." *Molecular Cancer* 20: 82.
56. Nagy, Balint. 2019. "Cell-Free Nucleic Acids." *Int. J. Mol. Sci.* 20: 5645.
57. Ondrej Pös, Orsolya Biró, Tomas Szemes, Bálint Nagy. 2018. "Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications ." *European Journal of Human Genetics* 26: 937–945.
58. Park, Donna K. Dang and Ben H. 2022. "Circulating tumor DNA: current challenges for clinical utility." *J Clin Invest* 132(12): 154941.
59. Pavel Stejskal, Hani Goodarzi, Josef Srovnal, Marián Hajdúch, Laura J. van 't Veer, Mark Jesus M. Magbanua, et al. 2023. "Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance." *Molecular Cancer* 22: 15.
60. Ping Song, Lucia Ruoqia Wu, Yan Helen Yan, Jinny X. Zhang, Tianqing Chu, Lawrence N. Kwong, et al. 2022. "Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics." *Nat Biomed Eng.* 21: 6827.
61. Pradeep S. Chauhan, Alexander Shiang, Irfan Alahi, R. Taylor Sundby, Wenjia Feng, Bilge Gungoren, et al. 2023. "Urine cell-free DNA multi-omics to detect MRD and predict survival in bladder cancer patients." *Precision Oncology* 7: 6.
62. Qianwei Ye1, Sunbin Ling1, Shusen Zheng, and Xiao Xu. 2019. "Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA." *Molecular Cancer* 18: 114.
63. Rabia Zeeshan, Zeeshan Mutahir. 2017. "Cancer metastasis - tricks of the trade." *Bosn J Basic Med Sci* 17(3): 172-182.
64. Raimonda Kubiliute, Sonata Jarmalaite. 2021. "Epigenetic Biomarkers of Renal Cell Carcinoma for Liquid Biopsy Tests." *Int. J. Mol. Sci* 22: 8846.
65. Rebecca L Edwards, Jondavid Menteer, Rachel M Lestz, Lee Ann, Baxter-Lowe. 2022. "Cell-free DNA as a solid-organ transplant biomarker: technologies and approaches." *Biomark.Med.* 16(5): 401–415.
66. Re-I Chin, Kevin Chen, Abul Usmani, Chanelle Chua, Peter K. Harris, Michael S. Binkley, et al. 2019. "Detection of Solid Tumor Molecular Residual Disease (MRD) Using Circulating Tumor DNA (ctDNA)." *Mol Diagn Ther* 23(3): 311–331.

67. Robert Stawski, Dariusz Nowak and Ewelina Perda. 2022. "Cell-Free DNA: Potential Application in COVID-19 Diagnostics and Management." *Viruses* 14: 321.
68. Roy PS, Saikia BJ. 2016. "Cancer and cure: A critical analysis." *Indian Journal of Cancer* Volume 53: Issue 3.
69. Saife N. Lone, Sabah Nisar, Tariq Masoodi, Mayank Singh, Arshi Rizwan, Sheema Hashem, et al. 2022. "Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments." *Molecular Cancer* 21: 79.
70. Salagierski, Kiljanczyk and Maciej. 2022. "A Biopsy in Bladder Cancer—The Current Landscape in Urinary Biomarkers." *Int. J. Mol. Sci* 23: 8597.
71. Sara Fotouhia, Shahrokh Asadib, Michael W. Kattan. 2019. "A comprehensive data level analysis for cancer diagnosis on imbalanced data." *Journal of Biomedical Informatics*.
72. Sarah R. Greytak, Kelly B. Engel, Sonya Parpart-Li, Muhammed Murtaza, Abel J. Bronkhorst, Mark D. Pertile, et al. 2020. "Harmonizing cell-free DNA Collection and Processing Practices through Evidence-based Guidance." *Clin Cancer Res.* 26(13): 3104–3109.
73. Shanwen Chen, Yunfan Jin, Siqi Wang, Shaozhen Xing, Yingchao Wu, Yuhuan Tao, et al. 2022. "Cancer type classification using plasma cell-free RNAs derived from human and microbes." *eLife* 11: 75181.
74. Shijie Li, Kerong Xin, Shen Pan, Yang Wang, Jianyi Zheng, Zeyu Li, et al. 2023. "Blood-based liquid biopsy: insights into early detection, prediction, and treatment monitoring of bladder cancer." *Cellular & Molecular Biology Letters* 28:28.
75. Shubin Hong, Bo Lin, Minjie Xu, Quan Zhang, Zijun Huo, Mingyang Su, et al. 2023. "Cell-free DNA methylation biomarker for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma." *eBioMedicine* 90: 104497.
76. Sonia Perales, Carolina Torres, Cristina Jimenez-Luna, Jose Prados, Joaquina Martinez-Galan, Jose Manuel, et al. 2021. "Liquid biopsy approach to pancreatic cancer." *World J Gastrointest Oncol* 13(10): 1263-1287.
77. Stefan Grabuschnig, Abel Jacobus Bronkhorst, Stefan Holdenrieder, Ingund Rosales Rodriguez, Klaus Peter Schliep, Daniel Schwendenwein, et al. 2020. "Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms." *Int. J. Mol. Sci.* 21: 8062.
78. Suganya Ilango, Biswaranjan Paital, Priyanka Jayachandran, Palghat Padma, Ramalingam Nirmaladevi. 2020. "Epigenetic alterations in cancer." *Frontiers in Bioscience, Landmark* 1058-1109.
79. Suzan Tug, Anna-Katharina Tross, Patrick Hegen, Elmo Wanja Immanuel Neuberger, Susanne Helmig, Wolfgang SchoËllhorn, et al. 2017. "Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma." *PLoS ONE* 12(9): e0184668.
80. Teppei Hashimoto, Kohsuke Yoshida, Akira Hashiramoto, Kiyoshi Matsui. 2021. "Cell-Free DNA in Rheumatoid Arthritis." *Int. J. Mol. Sci* 22: 8941.
81. Timothy Kwang Yong Tay, Puay Hoon Tan. 2021. "Liquid Biopsy in Breast Cancer." *Arch Pathol Lab Med* Vol 145.
82. Tina Moser, Stefan K uhberger, Isaac Lazzeri, Georgios Vlachos, Ellen Heitzer. 2023. "Bridging biological cfDNA features and machine learning approaches." *Trends in Genetics* Vol. 39, No. 4.

83. Tongxin Ge, Xiang Gu, Renbing Jia, Shengfang Ge, Peiwei Chai, Ai Zhuang, et al. 2022. "Crosstalk between metabolic reprogramming and epigenetics in cancer: updates on mechanisms and therapeutic opportunities." *Cancer Communications* 42:1049–1082.
84. Valentina R. Minciocchi, Michael R. Freeman, and Dolores Di Vizio. 2016. "Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes." *Semin Cell Dev Biol* 40: 41–51.
85. Vera Constâncio, Sandra P. Nunes, Rui Henrique and Carmen Jerónimo. 2020. "DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types." *Cells* 9: 624.
86. W. Yu, J. Hurley, D. Roberts, S. K. Chakraborty, D. Enderle, M. Noerholm, et al. 2021. "Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges." *Ann Oncol.* 32(4): 466–477.
87. Wen Li, Ji-Bin Liu, Li-Kun Hou, Fei Yu, Jie Zhang, Wei Wu, et al. 2022. "Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring." *Molecular Cancer* 21: 25.
88. Wurdinger, Sjors G. J. G. In 't Veld and Thomas. 2019. "Tumor-educated platelets." *blood* VOLUME 133, NUMBER 22.
89. Xavier Filella, María Rodríguez-García and Esther Fernández-Galán. 2023. "Clinical usefulness of circulating tumor markers." *Clin Chem Lab Med* 61(5): 895–905.
90. Xiaofeng Dai, Tiejun Ren, Yuxin Zhang and Nan Nan. 2021. "Methylation multiplicity and its clinical values in cancer." *Expert Reviews in Molecular*.
91. Xiaolin Wu, Jiahui Li, Asmae Gassa, Denise Buchner, Hakan Alakus, Qiongzhu Dong et al. 2020. "Circulating tumor DNA as an emerging liquid biopsy biomarker for early diagnosis and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma." *International Journal of Biological Sciences* 16(9): 1551-1562.
92. Xuan-Mei Piao, Eun-Jong Cha, Seok Joong Yun, and Wun-Jae Kim. 2021. "Role of Exosomal miRNA in Bladder Cancer: A Promising Liquid Biopsy Biomarker." *Int. J. Mol. Sci.* 22: 1713.
93. Yan Shen, Rui Shi, Rong Zhao, Hongbo Wang. 2023. "Clinical application of liquid biopsy in endometrial." *Medical Oncology* 40: 92.
94. Yan-yan Yan, Qiao-ru Guo, Feng-hua Wang, Rameshwar Adhikari, Zhuang-yan Zhu, Hai-yan Zhang, et al. 2021. "Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer." *Front. Cell Dev. Biol.* 9:639233.
95. Ye Zhang, Maoyu Li, Xiaomei Gao, Yongheng Chen and Ting Liu. 2019. "Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities." *Journal of Hematology & Oncology* 12:137.
96. Yirizhati Aili, Nuersimanguli Maimaitiming, Yusufu Mahemuti, Hu Qin, Yongxin Wang, Zengliang Wang. 2020. "Liquid biopsy in central nervous system tumors: the potential roles of circulating miRNA and exosomes." *Am J Cancer Res* 10(12): 4134-4150.
97. Yu Xiao, Lingao Ju, Kaiyu Qian, Wan Jin, Gang Wang, Yan Zhao et al. 2022. "Non-invasive diagnosis and surveillance of bladder cancer with driver and passenger DNAmethylation in a prospective cohort study." *Clin. Transl. Med* 1008.
98. Zachariah H. Foda, Akshaya V. Annapragada, Kavya Boyapati, Daniel C. Bruhm, Nicholas A. Vulpescu, Jamie E. Medina. 2023. "Detecting Liver Cancer Using Cell-Free DNA Fragmentomes." *CANCER DISCOVERY* 617.

99. Zhao, Ming Chen and Hongyu. 2019. "Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection." *Human Genomics* 13:34.
100. Αναγνωστοπούλου, Δρ. Φρ. Ανθούλη-. 2009. *Ιστοπαθολογία με Στοιχεία Ογκολογίας*. Αθήνα: Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ ΕΠΕ.