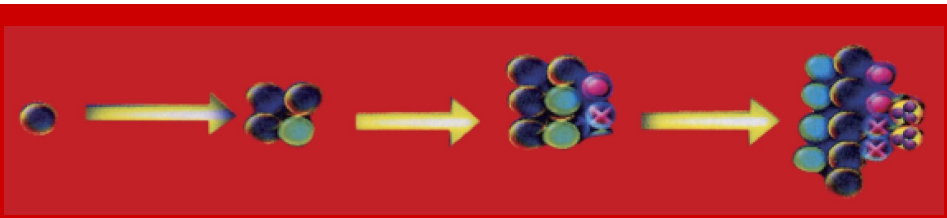
CANCER PREVENTION

Τόμος 11, Τεύχος 2, Ιούλιος – Δεκέμβριος 2016 ISSN: 1790-6970

ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΛΗΨΙΣ

- ΕΠΙΣΗΜΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ – Ε.Ε.Π.Ο.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY OF PREVENTIVE ONCOLOGY – HE.SO.P.O.



Ε.Ε.Π.Ο.

Νεότερα δεδομένα από το συνέδριο της European Society of Medical Oncologist (ESMO) 2016
Editorial: Π. Β. Γκινόπουλος

American Society of Clinical Oncology 2017: Εξελίξεις στην έρευνα του καρκίνου
Π. Γκινόπουλος, Β. Αλιβιζάτος, Π. Αθανασόπουλος, Π. Πατρικάκος, Π. Δημητρίου

Νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα - Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας
Γ. Τσινιάς, Α. Μπόνας

Γονιδιακή αξιολόγηση και ρίσκο εμφάνισης καρκίνου
Π. Γκινόπουλος, Ν. Χαροκόπος, Β. Αλιβιζάτος, Ε. Παπαδημητρίου

Η εφαρμογή της γνωσιακής συμπεριφοριστικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο:Βιβλιογραφική ανασκόπηση
Αλ. Μουσούρος

Ψευδομύξωμα περιτοναίου: Παρουσίαση περιστατικού
Π. Καραϊσκάκης, Α. Πέτσα, Τ. Κοκκινόπουλος

Οργανολογία της πρωτεϊνωμικής
Θ. Κουρέλης, Κ. Κουρέλης , Δ. Μπασιούκα, Μ. Κουτρούλη, Π. Κουτσιαρά, Ε. Γκαμούλου, Στ. Γιώτης, Α. Ακτύπη, Σ. Ξυνόγαλος και Π. Γκινόπουλος

Κόσμος...Ελλάδα...Δορυφορικά

ΠΛΗΡΩΜΕΝΟ ΤΕΛΟΣ
Ταχ. Γραφείο
ΚΕΜΠ.ΑΘ
Αριθμός Άδειας
4149
ΟΜΑΔΙΚΗ ΕΠΙΣΤΟΛΗ
ΕΛΤΑ Hellenic Post
E.T.S. Events & Travel Solutions A.E.

ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΛΗΨΙΣ
Επίσημο περιοδικό της
Ελληνικής Εταιρείας Προληπτικής
Ογκολογίας – Ε.Ε.Π.Ο.

Διοικητικό Συμβούλιο Ε.Ε.Π.Ο.
Πρόεδρος: Παναγιώτης Β. Γκινόπουλος
Αντιπρόεδρος: Παντελής Κοκκινόπουλος
Ταμίας: Μιχαήλ Κουράτος
Μέλη: Μαρία Κρητικού
Κωνσταντίνα Θεοδωροπούλου

Εκδότης: Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας
Διευθυντής Σύνταξης: Παναγιώτης Β. Γκινόπουλος
Αναπληρωτής: Γεώργιος Σαμέλης
Γενικός Γραμματέας: Βασίλειος Αλιβιζάτος
Σύμβουλος Έκδοσης: Ανδρέας Μαζαράκης
Καλλιτεχνική Διεύθυνση, Γραμματειακή υποστήριξη & Marketing: Τσαγρή Χαραλαμπία
Επιμέλεια Άρθρων: Μαρίνα Παναγιωτοπούλου

Συντακτική Επιτροπή
Αγγελάκης Χρήστος
Αλιβιζάτος Βασίλειος
Αποστολόπουλος Νικόλαος
Γιαννιός Ιωάννης
Γκιάφης Αναστάσιος
Γώγος Χαράλαμπος
Δημητριάδης Κωνσταντίνος
Δημόπουλος Μελέτιος – Αθανάσιος
Καμούτσης Χαράλαμπος
Καρβελάς Φώτιος
Λέντζας Ιωάννης
Μπαφαλούκος Δημήτριος
Μπασιάρης Χαράλαμπος
Μπόνας Απόστολος
Ξυδάκης Εμμανουήλ
Παπακωνσταντίνου Χρήστος
Παπαπολυχρονιάδης Κωνσταντίνος
Sacco Rosario
Sammarco Giuseppe
Σκρουμπής Γεώργιος
Σουγλέρη Μαρία
Σταθόπουλος Γεώργιος
Σταράκης Ιωάννης
Teodossiu Giovanni
Φιλιώτης Νικόλαος

Επιστημονική – Συμβουλευτική Επιτροπή
Πρόεδρος: Παπαπολυχρονιάδης Κωνσταντίνος
Βαρθαλίτης Ιωάννης
Γεωργακόπουλος Δημήτριος
Καρβελάς Φώτιος
Κοκκινόπουλος Παντελής
Σαμέλης Γεώργιος
Triggiani Edoardo

Διεύθυνση για αλληλογραφία – Γραμματεία
Ηρώων Πολυτεχνείου 104 & Τερτσέτη, Πάτρα, Τ.Κ. 26442
Τηλ. Επικοινωνίας: 2610-431465, 6977-559518
email: drginop@otenet.gr, site: www.cancerprevention.gr
Επιμέλεια έκδοσης: Ε.Ε.Π.Ο.

CANCER PREVENTION
Official Journal of the
Hellenic Society of Preventive
Oncology – HE.SO.P.O.

Board of the HE.SO.P.O.
President: Panagiotis V. Ginopoulos
Vice President: Pantelis Kokkinopoulos
Treasurer: Michael Kouratos
Members: Kritikou Maria
Theodoropoulou Konstantina

Publisher: Hellenic Society of Preventive Oncology
Editor in Chief: Panagiotis V. Ginopoulos
Associate Editor: George Samelis
Secretary: Vasileios Alivizatos
Editor Consultant: Andreas Mazarakis
Art Director, Secretary & Marketing:
Tsagri Charalampia
Editing of articles: Marina Panagiotopoulou

Editorial Board
Agelakis Christos
Alivizatos Vasileios
Apostolopoulos Nikolaos
Giannios Ioannis
Giaffis Anastasios
Gogos Charalambos
Dimitriadis Konstantinos
Dimpoulos Meletios – Athanasios
Kamoutsis Charalambos
Karvelas Fotios
Lentzas Ioannis
Bafaloukos Dimitrios
Basiaris Charalambos
Bonas Apostolos
Xidakis Emanouil
Papakonstantinou Christos
Papapolychroniadis Konstantinos
Sacco Rosario
Sammarco Gueseppe
Skroubis Georgios
Sougleri Maria
Stathopoulos Georgios
Starakis Ioannis
Teodossiu Giovanni
Filiotis Nikolaos

Scientific – Consultative Committee
President: Papapolychroniadis Konstantinos
Varthalitis Ioannis
Georgakopoulos Dimitrios
Karvelas Fotios
Kokkinopoulos Pantelis
Samelis Georgios
Triggiani Edoardo

Διαχείριση καταχωρήσεων:
E.T.S. Events & Travel Solutions A.E.,
Ελ. Βενιζέλου 154, 17122 Ν. Σμύρνη,
Τηλ.: 210 98 80 032, Fax: 210 98 81 303
E-mail: ets@otenet.gr, ets@events.gr, site:www.events.gr

Περιεχόμενα

3 Editorial
Νεότερα δεδομένα από το συνέδριο της European Society of Medical Oncologist 2016
Π. Β. Γκινόπουλος

7 Κόσμος…Ελλάδα…Δορυφορικά

Άρθρα – Ανασκοπήσεις

12 **American Society of Clinical Oncology 2017: Εξελίξεις στην έρευνα του καρκίνου**
Π. Γκινόπουλος, Β. Αλιβιζάτος, Π. Αθανασόπουλος, Π. Πατρικάκος, Π. Δημητρίου

35 **Νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα - Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας**
Γ. Τσινιάς, Α. Μπόνας

41 **Γονιδιακή αξιολόγηση και ρίσκο εμφάνισης καρκίνου**
Π. Γκινόπουλος, Ν. Χαροκόπος, Β. Αλιβιζάτος, Ε. Παπαδημητρίου

53 **Η εφαρμογή της γνωσιακής συμπεριφοριστικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο: Βιβλιογραφική ανασκόπηση**
Αλ. Μουσούρος

61 **Ψευδομύξωμα περιτοναίου: Παρουσίαση περιστατικού**
Π. Καραϊσκάκης, Α. Πέτσα, Τ. Κοκκινόπουλος

65 **Οργανολογία της πρωτεϊνωμικής**
Θ. Κουρέλης, Κ. Κουρέλης , Δ. Μπασιούκα, Μ. Κουτρούλη, Π. Κουτσιαρά, Ε. Γκαμούλου, Στ. Γιώτης, Α. Ακτύπη, Σ. Ξυνόγαλος και Π. Γκινόπουλος

97 Η Ιατρική στην Αρχαία Ελλάδα
Φιλόξενος, Κλαύδιος ο Αλεξανδρεύς

98 Οδηγίες για τους συγγραφείς

Contents

3 Editorial
New advances from the European Society of Medical Oncologist Congress 2016
P. V. Ginopoulos

7 World…Greece…Satellite

Articles – Reviews

12 **American Society of Clinical Oncology 2017: Advances in cancer research**
P. Ginopoulos, V. Alivizatos, P. Athanasopoulos, P. Patrikakos, P. Dimitriou

35 **Neuroendocrine tumors of the larynx- Literature overview**
G. Tsinias, A.Bonas

41 **Genetic evaluation and cancer risk**
P. Ginopoulos, N. Charokopos, V. Alivizatos, E. Papadimitriou

53 **The application of cognitive behavioral therapy in cancer patients: An empirical review**
Al. Mousouros

61 **Pseudomyxoma peritonei: Case report**
P. Karaiskakis, A. Petsa, T. Kokkinopoulos

65 **Organology in Proteomics Analysis**
Th. Kourelis, K. Kourelis, D. Basiouka, M. Koutrouli, P. Koutsiara, E. Gamoulou, St Giotis A. Aktypi, S.Xynogalos and P. Ginopoulos

97 Medicine in Ancient Greece
Philoxenos, Claudius of Alexandria

98 **Instructions to authors**

Editorial

Νεότερα δεδομένα από το συνέδριο της European Society of Medical Oncologist (ESMO) 2016

New advances from the European Society of Medical Oncologist (ESMO) Congress 2016

Panagiotis V. Ginopoulos, MD, PhD
Clinical Oncologist
Chairman of Clinical Oncology Department
General Hospital of Patras
President of the Hellenic Society of Preventive Oncology

«*Από την αντιμετώπιση της νόσου, στη φροντίδα του πάσχοντος*»: αυτό ήταν το σύνθημα του φετινού συνεδρίου της ESMO, το οποίο σκοπό είχε την εναρμόνιση της κλινικής έρευνας με τις ανάγκες του ασθενούς, με τελικό στόχο την επίτευξη της καλύτερης δυνατής θεραπείας έναντι του καρκίνου για όλους τους ογκολογικούς ασθενείς. Η συμμετοχή στο συνέδριο ξεπέρασε κάθε προηγούμενο, ενώ, σύμφωνα με τους διοργανωτές, κάποια από τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν, έχουν τη δυνατότητα να αλλάξουν την κλινική πρακτική.

Κυρίαρχο θέμα του συνεδρίου ήταν η ανοσοθεραπεία, η οποία απεκάλυψε και νέες πτυχές των ιδιοτήτων της, οι οποίες φαίνεται να αλλάζουν άρδην τα δεδομένα τόσο στο μελάνωμα όσο και στον καρκίνο του πνεύμονος.

Συγκεκριμένα, σε μελέτη φάσεως III με ipilimumab έναντι placebo (EORTC 18071) ως επικουρική θεραπεία του μελανώματος, 951 ασθενείς, σταδίου 3, που είχαν υποβληθεί σε ολική εκτομή, τυχαιοποιήθηκαν σε ipilimumab 10mg/kg (κάθε τρεις εβδομάδες για 4 δόσεις και μετά κάθε 3 μήνες έως 3 χρόνια) ή placebo. Καταρχάς, επετεύχθη ο πρωταρχικός σκοπός της μελέτης με σημαντική βελτίωση της επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής υπέρ του ipilimumab. Έτσι, σε διάστημα των 5.3 ετών, υπήρχε μείωση του ρίσκου θανάτου κατά 28% και μείωση του ρίσκου απομακρυσμένης μετάστασης κατά 24%. Η 5εντής συνολική επιβίωση ήταν 11% υψηλότερη με το ipilimumab (65%) σε σύγκριση με το placebo (54%). Οι τοξικότητες ήταν παρόμοιες με αυτές που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες και περιελάμβαναν grade 3-4 γαστρεντερικές (16%), ηπατικές (11%) και ενδοκρινικές (8%).

Αναφορικά με τον καρκίνο του πνεύμονος, στο συνέδριο παρουσιάστηκαν τα, δυνητικά καινοτόμα, αποτελέσματα μελέτης, για την νεοεπικουρική χορήγηση του nivolumab σε ασθενείς με πρώιμο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος (ΜΜΚΠ) (χειρουργήσιμο, σταδίου I-IIIA). Σε 18 ασθενείς χορηγήθηκαν προεγχειρητικά δύο δόσεις nivolumab: 7 ασθενείς είχαν ουσιαστική παθολογοανατομική ανταπόκριση (<10% παρουσία υπολειπόμενης νόσου), 1 ασθενής είχε ολική παθολογοανατομική ανταπόκριση και 13 ασθενείς σταθερή νόσο. Το nivolumab ήταν καλά ανεκτό χωρίς ιδιαίτερα θέματα ασφάλειας των ασθενών. Παρενέργειες grade

3-4 αναφέρθηκαν για ένα ασθενή και έγινε διακοπή της θεραπείας. Δεν υπήρξε καθυστέρηση του χειρουργείου για κανένα ασθενή, υποδεικνύοντας ότι τα οφέλη αυτής της νεοεπικουρικής θεραπείας ξεπερνούν τα δυνητικά ρίσκα. Λόγω των αποτελεσμάτων της, η μελέτη θα διευρυνθεί , και η μία ομάδα θα λάβει τρίτη δόση nivolumab προεγχειρητικά και η άλλη θα λάβει, προεγχειρητικά, το συνδυασμό nivolumab και ipilimumab.

Πιθανά να γίνεται εφικτή η δυνατότητα ουσιαστικής βελτίωσης της έκβασης του πρώιμου ΜΜΚΠ. Σε όποια περίπτωση, μένει να αποδειχθεί εάν αυτή η συρρίκνωση του όγκου θα αποφέρει και καλύτερη επιβίωση.

Σημαντική ήταν και η πρώτη μελέτη με αναστολέα τυροσινικής κινάσης, το sunitinib, ως επικουρική θεραπεία στον καρκίνο του νεφρού, η οποία ανέφερε παρατεταμένη επιβίωση ελεύθερης νόσου. Στη διπλή τυφλή, μελέτη φάσεως III, την S-TRAC, 615 ασθενείς υψηλού ρίσκου, που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία, τυχαιοποιήθηκαν μετεγχειρητικά σε sunitinib (50mg ημερησίως) ή placebo για 1 έτος. Η επιβίωση ελεύθερης νόσου ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με το placebo (μέσος χρόνος 6.8 vs 5.6 μήνες). Η μελέτη υποδεικνύει ότι το sunitinib μπορεί να ωφελήσει τους ασθενείς σε μια πιο διευρυμένη βάση λαμβάνοντας υπόψη και τις παρενέργειες και το κόστος θεραπείας.

Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, το cabozantinib σε σύγκριση με το sunitinib ως 1ης γραμμής θεραπεία, στον μεταστατικό καρκίνο του νεφρού βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου και την ανταπόκριση. Στη μελέτη φάσεως II, ALLIANCE, 157 ασθενείς με μεσαίο ή πτωχό ρίσκο, χωρίς προηγούμενη συστηματική θεραπεία, τυχαιοποιήθηκαν σε cabozantinib (60mg ημερησίως) ή sunitinib (50mg ημερησίως για 4 εβδομάδες και 2 εβδομάδες διακοπή). Η μέση επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου ήταν σημαντικά αυξημένη υπέρ του cabozantinib (8,2 vs 5,6 μήνες) με αντίστοιχη μείωση του ποσοστού υποτροπής ή θανάτου της τάξεως του 31% στους 20,8 μήνες παρακολούθησης των ασθενών. Επίσης, η ολική ανταπόκριση ήταν ιδιαίτερα υψηλή με το cabozantinib σε σύγκριση με το sunitinib (46% vs 18%). Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το cabozantinib έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως 1ης γραμμής θεραπεία στο μεταστατικό καρκίνο του νεφρού.

Η ενδοκρινική θεραπεία στον καρκίνο του μαστού αποτέλεσε θέμα ευρείας συζήτησης και παρουσιάσεων. Στο συνέδριο παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα δύο τυχαιοποιημένων μελετών φάσεως III, που έχουν την δυνατότητα να αλλάξουν την κλινική πρακτική αφενός όμως προτείνουν δύο διαφορετικά στάνταρντ αρχικής θεραπευτικής προσέγγισης για ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν λάβει προηγούμενη ορμονοθεραπεία. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθιερωθεί η βέλτιστη ακολουθία των προσεγγίσεων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης MONALEESA-2, στην οποία συμμετείχαν 668 ασθενείς με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και αρνητικό HER, οι οποίοι δεν είχαν λάβει προηγούμενη ενδοκρινική θεραπεία, αναφέρουν όφελος στην επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου με την προσθήκη του επιλεκτικού αναστολέα του CDK4/6, ribociclib στη λετροζόλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης FALCON, το fulvestrant είναι πιο αποτελεσματικό από την αναστροζόλη σε ασθενείς με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων ή/και προγεστερόνης, με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού που δεν είχαν λάβει προηγούμενη ενδοκρινική θεραπεία. Μεταξύ των 462 ασθενών που τυχαιοποιήθηκαν, το fulvestrant μείωσε σημαντικά την πιθανότητα προόδου νόσου σε σύγκριση με την αναστροζόλη, με μέσο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου της τάξεως των 16,6 μηνών έναντι των 13, 8 μηνών.

Μία εκ των μελετών που ξεχώρισαν προερχόταν από το Instituto Nazionale dei Tumori του Μιλάνου, για τα σαρκώματα. Η μελέτη έδειξε ότι νεοεπικουρική θεραπεία τριών κύκλων πλήρων δόσεων με επιρουβικίνη και ιφωσφαμίδη έχει σημαντικό κλινικό όφελος έναντι χημειοθεραπειών βάσει του ιστολογικού τύπου. Στη μελέτη συμμετείχαν 286 ενήλικες ασθενείς με σάρκωμα μαλακών μορίων υψηλού ρίσκου υποτροπής, στους οποίους η πιθανότητα επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής στους 46 μήνες (μέση παρακολούθηση 12,34 μήνες) ήταν 62% υπέρ της επιρουβικίνης και ιφωσφαμίδης έναντι 38% για τη θεραπεία βάσει του ιστολογικού τύπου. Η ολική επιβίωση ήταν παρόμοια (89%

vs 64%), με μια αύξηση >20% στην επιβίωση ελεύθερης υποτροπής και ≥10% στην συνολική επιβίωση υπέρ της επιρουβικίνης – ιφωσφαμίδης. Σε ανάλυση υποομάδων ασθενών που έλαβαν θεραπεία βάσει του ιστολογικού τύπου, οι ασθενείς με μυξοειδές λιποσάρκωμα υψηλού grade είχαν επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου και συνολική επιβίωση με το trabectedin παρόμοια με αυτήν της επιρουβικίνης – ιφωσφαμίδης. Αυτή η υποομάδα θα διευρυνθεί ώστε να διερευνηθεί αυτό το αποτέλεσμα.

Η οικογένεια πρωτεϊνών PARP εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Τα γονίδια BRCA1/2 κωδικοποιούν για ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA ανεξάρτητα του PARP, που σημαίνει ότι όγκοι θετικοί σε μετάλλαξη του BRCA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην αναστολή του PARP. Στο συνέδριο παρουσιάστηκαν τα δεδομένα από την πρώτη ολοκληρωμένη μελέτη φάσεως III ενός αναστολέα PARP σε 553 γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών. Η θεραπεία διατήρησης με το niraparib βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου σε σύγκριση με placebo σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών με γαμετικές μεταλλάξεις στο BRCA (21 vs 5.5 μήνες) και σε ασθενείς αρνητικές για γαμετικές μεταλλάξεις στο BRCA [αργότερα αναγνωρίστηκε ως homologous recombination DNA repair deficiency (HRD), μια άλλη ανωμαλία στην διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA] (12.9 vs 3.8 μήνες). Επίσης, το niraparib βελτίωση σημαντικά την επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου σε ασθενείς που δεν είχαν μεταλλάξεις στο BRCA ούτε HRD (9.3 vs 3.9 μήνες).

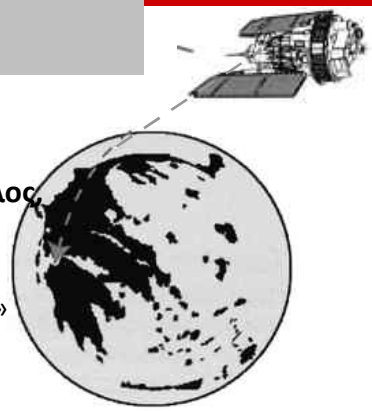
Τα δεδομένα αυτά ενισχύθηκαν περαιτέρω από τα αποτελέσματα δύο άλλων μελετών φάσεως II με τον ανασταλέα του PARP, rucaparib σε γυναίκες με καρκίνο ωοθηκών υψηλού grade, με γαμετικές ή σωματικές μεταλλάξεις στο BRCA, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε ≥2ης γραμμής θεραπείες. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν τα θετικά αποτελέσματα που επιτυγχάνονται με την αναστολή του PARP σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών με γαμετικές μεταλλάξεις στο BRCA και ανοίγουν νέους δρόμους στην αντιμετώπιση των ασθενών αυτών. Πάντως, παραμένει η πρόκληση της αναγνώρισης των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις στο BRCA που μπορεί να ωφεληθούν από τη θεραπεία με αναστολέα PARP και πιθανά το θέμα βελτίωσης των τεστ ανίχνευσης ασθενών με ανεπάρκεια επιδιόρθωσης του DNA.

Στο συνέδριο επίσης παρουσιάστηκαν αποτελέσματα μελετών με αναστολείς του PD-1/PD-L1 στον καρκίνο ουροδόχου κύστης (για τον οποίο έχει ήδη εγκριθεί από τον FDA το atezolizumab). Το pembrolizumab στη μελέτη KEYNOTE-052 ως 1ης γραμμής θεραπείας σε 374 ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο και το nivolumab στη μελέτη CheckMate 275 σε 265 ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνο αναφέρουν πολύ υποσχόμενα ποσοστά αντικειμενικής και ολικής ανταπόκρισης ενώ αναμένονται νεότερα δεδομένα για τη διάρκεια διατήρησης της ανταπόκρισης. Πάντως, τα δεδομένα αυτά, μαζί με εκείνα που οδήγησαν στην έγκριση του atezolizumab υποδεικνύουν ότι στο κοντινό μέλλον η ανοσοθεραπεία θα αποτελέσει στάνταρντ θεραπευτική προσέγγιση 1ης γραμμής σε αυτούς τους ασθενείς.

Αναφορά θα πρέπει να γίνει επίσης και στα καρκινοειδή του πνεύμονος ή του θύμου αδένα, για τα οποία υπάρχουν ελάχιστες θεραπευτικές επιλογές. Στο φετινό συνέδριο, παρουσιάστηκε η πρώτη μελέτη που είναι πλήρως αφιερωμένη σε αυτές τις ογκολογικές οντότητες. Στη μελέτη φάσεως II LUNA, οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν pasireotide LAR ή everolimus ή συνδυασμό των δύο. Πρωταρχικός σκοπός της μελέτης ήταν η επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου στους 9 μήνες, της οποίας τα ποσοστά που επιτεύχθηκαν ήταν υποσχόμενα και στις τρεις ομάδες, και κυρίως στον συνδυασμό.

Τέλος, θα ήθελα να αναφερθώ στο SPECTAcolor (Screening Platform for Efficient Clinical Trial Access in advanced colorectal cancer), μια πρωτοβουλία της ESMO να συντονίσει τη γονιδιακή αλληλούχιση των δειγμάτων ιστού ασθενών από 32 κέντρα, 11 χωρών, για την αναγνώριση αιτιολογικών γονιδιακών εξαλλαγών και, εάν είναι εφικτό, να συνδυάσει τους ασθενείς με τις ανάλογες μελέτες με στοχευμένες θεραπείες σε εξέλιξη. Τα σχετικά αποτελέσματα για τους πρώτους, 400 ασθενείς του SPECTAcolor παρουσιάστηκαν στο συνέδριο. Το 10% των ασθενών είχαν δυνητικά αγώγιμες μεταλλάξεις

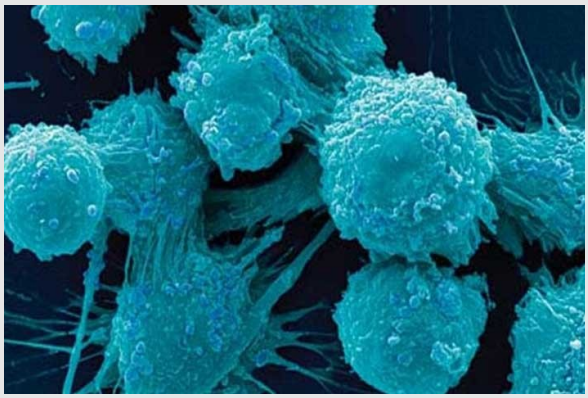
που τους κατέστησαν υποψήφιους για συμμετοχή σε μελέτες με ειδικά κριτήρια ένταξης επί μεταλλαγμένων γονιδίων. Εκτός του SPECTAcolor, υπάρχουν και τα αντίστοιχα προγράμματα για το μελάνωμα (SPECTAmel), πνεύμονα (SPECTAlung), εγκέφαλο (SPECTAbrain) και προστάτη (SPECTAprostate).



Ν. Χαροκόπος, Σ. Κοκκινόπουλος, Τ. Κοκκινόπουλος, Β. Γιαννακόπουλος, Π. Γκινόπουλος

Τμήμα Κλινικής Ογκολογίας Γενικού Νοσοκομείου Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»
Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας - ΕΕΠΟ

Τα καρκινικά κύτταρα εξαπατούν τα δίκτυα επιδιόρθωσης του DNA για να παραμείνουν ζωντανά



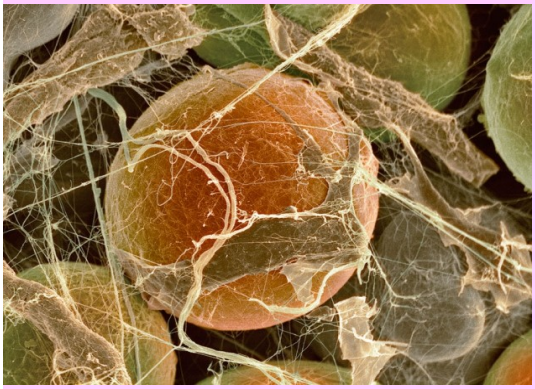
Μελέτη που δημοσιεύθηκε στο Cell Reports, από το Πανεπιστήμιο του Pittsburgh Cancer Institute, αποκάλυψε τον τρόπο με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα εξαπατούν τα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA ώστε να αποτρέπουν τη μείωση των τελομερών και έτσι να επιτρέπουν την εξάπλωση του όγκου.
Από την στιγμή ολοκλήρωσης ενός κυττάρου, ξεκινά η αντίστροφη μέτρηση η οποία καθορίζει τη διάρκεια ζωής του. Το ρολόι αυτό της αντίστροφης μέτρησης είναι ένα τελομερές. Τα καρκινικά κύτταρα εξαπατούν αυτό το ρολόι, επαναρυθμίζοντάς το και επιμηκύνοντάς το κάθε φορά που αυτό υφίσταται μείωση, με αποτέλεσμα τη συνέχιση της κυτταρικής διαίρεσης και εξάπλωσης του όγκου.
Παρότι στους περισσότερους τύπους καρκίνου αυτό γίνεται μέσω αύξησης της δράσης της τελομεράσης, η οποία επιμηκύνει τα τελομερή, το 15% των καρκίνων χρησιμοποιούν έναν διαφορετικό μηχανισμό (ALT- alternative lengthening of telomeres). Επίσης, αυξανόμενα στοιχεία υποδεικνύουν ότι οι όγκοι που ενεργοποιούν το μονοπάτι ALT είναι επιθετικοί και πιο ανθεκτικοί στην θεραπεία.
Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια νέα τεχνική (BioID – dependet biotinylation), η οποία άμεσα αναγνώρισε πρωτεΐνες οι οποίες μορφολογικά έμοιαζαν, και ως εκ τούτου δυνητικά σχετίζονταν, με την επιμήκυνση τελομερών σε καρκινικά κύτταρα. Συγκρίνοντας καρκινικά κύτταρα στα οποία ήταν ενεργή η τελομεράση ή το ALT, η τεχνική BioID αναγνώρισε 139 πρωτεΐνες οι οποίες ήταν μοναδικές στα κύτταρα με ενεργοποιημένο ALT. Μάλιστα, η εύρεση του ενζύμου Polη (DNA polymerase η) ξάφνιασε τους ερευνητές καθώς είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται μόνο σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες από υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία δεν χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη. Ο ρόλος αυτού του ενζύμου στο μονοπάτι ALT είναι εντελώς ανεξάρτητος συγκριτικά με τις υπάρχουσες γνώσεις γι' αυτό. Τα νέα δεδομένα για το μονοπάτι ALT ανοίγει νέους τομείς έρευνας και πολλών δυνητικών στόχων.

Cancer/Oncology/Biology/Biochemistry News, 10/11/2016

Με ποιον τρόπο η διατροφή υψηλή σε λιπαρά ενισχύει την εξάπλωση του καρκίνου

Σε μελέτη του Ερευνητικού Ινστιτούτου της Βαρκελώνης, η οποία δημοσιεύθηκε στο Nature, παρατηρήθηκε πρωτεΐνη η οποία έχει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση, ένα εύρημα το οποίο μπορεί να προωθήσει αντι-μεταστατικές θεραπείες άμεσα.
Στη μελέτη αναλύθηκαν μεταστατικά και μη μεταστατικά κύτταρα από όγκους ασθενών με διαφορετικούς τύπους νόσου (μελάνωμα, καρκίνο στοματικής κοιλότητας, ωοθηκών, ουροδόχου

κύστης, πνεύμονος, μαστού). Στα μεταστατικά κύτταρα παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης CD36. Όταν η πρωτεΐνη αυτή προστίθεντο σε μη μεταστατικά καρκινικά κύτταρα, αυτά ξεκινούσαν τη μετάσταση, επιβεβαιώνοντας το ρόλο της CD36 στην εξάπλωση του καρκίνου. Παρότι ακόμα οι ερευνητές δεν έχουν δοκιμάσει αυτή την διαδικασία σε όλους τους τύπους καρκίνου, δηλώνουν ότι ο CD36 είναι ένας γενικός δείκτης των μεταστατικών κυττάρων, ο πρώτος που γνωρίζουν που είναι γενικά ειδικός στη μετάσταση.



Στη συνέχεια διερευνήθηκε πως διατροφή υψηλή σε λιπαρά μπορεί να συμβάλει στην εξάπλωση του καρκίνου. Τάισαν τα πειραματόζωα με διατροφή υψηλή σε λίπη πριν γίνει τους γίνει έγχυση με ανθρώπινο καρκίνο στοματικής κοιλότητας. Σε σύγκριση με αυτά με φυσιολογική διατροφή, αυτά με διατροφή υψηλή σε λίπη έδειξαν αυξημένη μετάσταση και σχηματισμό μεγαλύτερων όγκων. Στη συνέχεια διερεύνησαν εάν η πρωτεΐνη CD36 εμπλέκεται στην αυξημένη μετάσταση λόγω ανταπόκρισης στα υψηλά διατροφικά λίπη. Για 2 ημέρες, χορηγήθηκε παλμιτικό οξύ σε καρκίνους στοματικής κοιλότητας, και μετά αυτοί, μαζί με όγκους που δεν τους είχε χορηγηθεί παλμιτικό οξύ, χορηγήθηκαν σε πειραματόζωα με πρωτεΐνη CD36, τα οποία είχαν φυσιολογική διατροφή. Όλα τα πειραματόζωα στα οποία είχε χορηγηθεί παλμιτικό οξύ ανέπτυξαν μεταστάσεις σε σύγκριση με τα μισά πειραματόζωα στα οποία δεν είχε χρησιμοποιηθεί παλιμιτικό οξύ.

Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα ευρήματα υποδεικνύουν μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης λίπους και αύξησης της μεταστατικής δυνατότητας μέσω του CD36.

Επίσης, στα πλαίσια της μελέτης χορηγήθηκαν σε πειραματόζωα με ανθρώπινους καρκίνους στοματική κοιλότητας, αντισώματα για μπλοκάρισμα του CD36, τα οποία απέτρεψαν την εξάπλωση του καρκίνου. Συγκεκριμένα, σε ήδη εξαπλωμένους όγκους, παρατηρήθηκε μείωση της τάξεως του 80-90% στο αριθμό των μεταστατικών εστιών καθώς και του μεγέθους τους. Στο 20% των πειραματόζωων οι μεταστάσεις εκριζώθηκαν. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες από τη θεραπεία.

Cancer/Nutrition/Biology News, 8/12/2016

Νέα ανοσοθεραπεία επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα στον καρκίνο του παγκρέατος

Ασθενείς υπεβλήθησαν σε νέα θεραπεία, την IMM-101 μαζί με χημειοθεραπεία έδειξαν σημαντικό όφελος επιβίωσης συγκριτικά με αυτούς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία. Επίσης, ο συνδυασμός δεν επέδειξε επιπλέον τοξικότητα.

Στη μελέτη, η μια ομάδα ασθενών έλαβε γεμσιταβίνη, μέσω drip, «αργή ενδοφλέβια χορήγηση», καθώς και ένα κύκλο με IMM-101. Η άλλη ομάδα έλαβε μόνο χημειοθεραπεία.

Κάποιοι ασθενείς που έλαβαν τη συνδυασμένη θεραπεία επιβίωσαν σημαντικά περισσότερο (έτη) από το αναμενόμενο ενώ η ολική μέση επιβίωση αυξήθηκε κατά 59% (2.6 μήνες). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι ο μεταστατικός καρκίνος του παγκρέατος είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους και το προσδόκιμο επιβίωσης μετά τη διάγνωση είναι πολύ μικρό, με μέση επιβίωση της τάξεως των 6-11 μηνών. Η μελέτη δημοσιεύθηκε στο British Journal of Cancer.

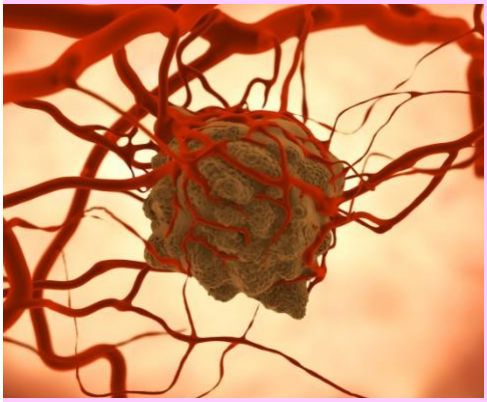
Pancreatic Cancer/Immune system/Vaccines News, 11/9/ 2016

Καρκίνος παχέως εντέρου: μόριο αποτρέπει κύτταρα να γίνουν καρκινικά

Αφορά το NLRC3, μέλος μιας ευρύτερης οικογένειας πρωτεϊνών (NOD-like receptor, NLR), οι οποίες βοηθούν στον έλεγχο του ανοσοποιητικού και άλλων λειτουργιών.

Προηγούμενες μελέτες είχαν παρατηρήσει μια ιδιαίτερα μειωμένη έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το NLRC3 σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο παχέως εντέρου υποδεικνύοντας

έτσι μια δυνητική εμπλοκή της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη του καρκίνου. Στη δεδομένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι το NLRC3 ρυθμίζει μια βασική κυτταρική διαδικασία, το μονοπάτι PI3K-mTOR, το οποίο ελέγχει την κυτταρική διαίρεση, την ανοσοανταπόκριση, τη φλεγμονή και τον καρκίνο.
Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα με καρκίνο παχέως εντέρου, όπου παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα του NLRC3 όπως στις μελέτες με ανθρώπινο ιστό. Επίσης, τα πειραματόζωα με έλλειψη του NLRC3 είχαν υψηλότερη προδιάθεση για κολίτιδα και καρκίνο του παχέως εντέρου ενώ πειραματόζωα με τεχνητή προδιάθεση ανάπτυξης πολυπόδων του παχέως εντέρου και έλλειψη του NLRC3, έδειξαν μεγαλύτερη ανάπτυξη όγκου. Σε περαιτέρω μελέτες, παρατηρήθηκε ότι το NLRC3 κατέχει ενεργό ρόλο, ιδιαίτερα στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου, στην αποτροπή της φλεγμονής και της ανάπτυξης κακοήθειας.



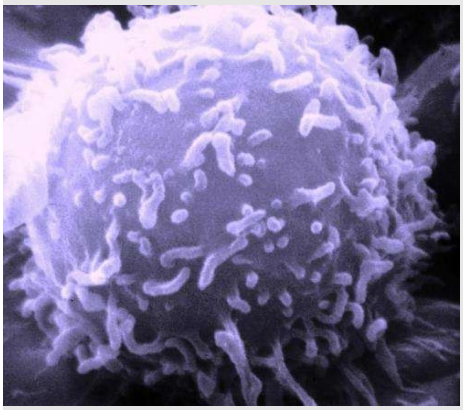
Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές παχέως εντέρου, όπου παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μειωμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε υπερ-έκφραση του NLRC3. Επίσης παρατηρήθηκε ότι το NLRC3 αναστέλλει τα μονοπάτια PI3K-mTOR και ότι αυτά ενεργοποιούνται νωρίς κατά την καρκινογένεση.
Συνοπτικά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το NLRC3 έχει σημαντικό ρόλο στην διακοπή της ανώμαλης κυτταρικής αύξησης – όταν δεν είναι παρών, αναπτύσσεται ο όγκος. Αυτό εγείρει το ερώτημα του εάν η αύξηση της έκφρασης του NLRC3 μπορεί να αποτελέσει έναν τρόπο μπλοκαρίσματος των κυτταρικών διεργασιών που οδηγούν στην καρκινογένεση.
«*Όσον αφορά την ανάπτυξη φαρμάκων, μπορεί να είναι δύσκολη η στόχευση του μονοπατιού PI3K-mTOR, λόγω του τόσο κομβικού ρόλου του στην κυτταρική σηματοδότηση, αντ' αυτού θα μπορούσαμε να στοχεύσουμε το NLRC3 και να μπλοκάρουμε εγκαίρως την καρκινογένεση*», σχολιάζουν οι ερευνητές.
Συμπληρωματικές μελέτες μπορεί να επιφέρουν ακόμα πιο χρήσιμα δεδομένα για το ρόλο και των άλλων μελών της οικογένειας NLR. Η μελέτη δημοσιεύτηκε στο Nature.

Colorectal Cancer/Biology/Biochemistry News, 13/12/2016

Μελέτη αποκαλύπτει τον τρόπο εξάπλωσης του καρκίνου πριν ακόμα δημιουργηθεί όγκος

Δύο μελέτες από το Icahn School of Medicine, Mount Sinai και το Πανεπιστήμιο του Regensburg, Γερμανία, οι οποίες δημοσιεύθηκαν στο Nature, αναφέρουν ότι πριν ακόμα δημιουργηθεί όγκος, καρκινικά κύτταρα του μαστού με ελάχιστες δεδομένες μοριακές εξαλλαγές μπορούν να εξαπλωθούν σε όργανα, να παραμείνουν «σιωπηλά» για μεγάλες χρονικές περιόδους, και μετά να δραστηριοποιηθούν προκαλώντας μεταστάσεις.
Η μελέτη, η οποία διεξήχθη σε πειραματόζωα και δοκιμάστηκε σε ανθρώπινα δείγματα, λύνει το μυστήριο της δημιουργίας μεταστάσεων στον καρκίνο του μαστού χωρίς την ύπαρξη πρωτοπαθούς εστίας (η οποία μπορεί να μην δημιουργηθεί ποτέ) στα πλαίσια αυτού του νέου μοντέλου πρώιμης διασποράς και μετάστασης.
Οι δύο μελέτες ουσιαστικά αναγνώρισαν τους πρώτους μηχανισμούς που επιτρέπουν στα κύτταρα να εξαπλώνονται πρώιμα στην εξέλιξη του καρκίνου και να δημιουργούν μεταστάσεις.
Στη μελέτη από το Mount Sinai, δύο εξαλλαγές στα καρκινικά κύτταρα του μαστού – ένα ενεργοποιημένο ογκογονίδιο και ένα απενεργοποιημένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο-, ενεργοποίησαν κύτταρα να ταξιδέψουν από τον μαστικό ιστό στους πνεύμονες και άλλα μέρη του σώματος. Εκεί, τα κύτταρα παρέμειναν ανενεργά έως ότου ενεργοποιήθηκε μια αυξητική μεταστροφή και δημιουργήθηκε μετάσταση στους πνεύμονες.
«*Βιολογικά, το νέο αυτό μοντέλο της πρώιμης μετάστασης θέτει υπό αμφισβήτηση όλα όσα θεωρούσαμε ότι γνωρίζαμε για τον τρόπο με τον οποίο ο καρκίνος εξαπλώνεται και δημιουργεί μεταστάσεις. Φαίνεται ότι θα πρέπει να αλλάξουμε τις ιδέες μας για το θέμα των μεταστάσεων,*

και ελπίζουμε ότι τα ευρήματα αυτά θα επαναπροσδιορίσουν τον τρόπο αντιμετώπισης των μεταστάσεων», σχολιάζουν οι ερευνητές.



Ένα σημαντικό εύρημα από την ομάδα του Mount Sinai είναι ότι τα περισσότερα πρώιμα διασκορπισμένα κύτταρα παραμένουν ανενεργά ενώ οι περισσότερες χημειοθεραπείες και στοχευμένες θεραπείες στοχεύουν αυτά τα κύτταρα. Επομένως αυτά τα καρκινικά κύτταρα θα διαφύγουν αυτών των θεραπειών ακόμα και αν εξουδετερώσουν τον αρχικό όγκο. Επίσης, εγείρονται νέα ερωτήματα για τον τρόπο που αυτά τα κύτταρα προάγουν την δημιουργία μεταστάσεων: τις δημιουργούν από μόνα τους, θέτουν το έδαφος για μεταγενέστερη άφιξη κυττάρων από όγκους που δεν ανιχνεύθηκαν πρώιμα, ή συνεργάζονται με μεταγενέστερα αφιχθέντα κύτταρα; Η μελέτη αποκαλύπτει νέους βιολογικούς μηχανισμούς πρώιμης διασποράς οι οποίοι πρέπει να διερευνηθούν ώστε να γίνει πλήρως κατανοητός ο τρόπος στόχευσης των «σπόρων» μετάστασης.

Η δεύτερη μελέτη από το πανεπιστήμιο του Regensburg παρέχει συμπληρωματικά βασικά μηχανιστικά στοιχεία πάνω στον έλεγχο αυτής της πρώιμης διασποράς και απόδειξη των προκλινικών ευρημάτων σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και όγκους. Οι ερευνητές από τις δυο ομάδες οδηγήθηκαν στα ευρήματα τους ανεξάρτητα και μετά συνεργάστηκαν στο πρόγραμμα.

Και οι δύο ομάδες μελέτησαν πολύ πρώιμα στάδια καρκίνου του μαστού συμπεριλαμβανομένου του DCIS, αφού το 2-3% των γυναικών με DCIS πεθαίνουν λόγω μεταστάσεων χωρίς ποτέ να δημιουργηθεί πρωτοπαθής εστία. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η καλύτερη εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι η πρώιμη μετάσταση δημιουργείται πριν ή καθώς αναπτύσσεται το DCIS. Ένα σημαντικό εύρημα της δεύτερης μελέτης είναι ότι σε πειραματόζωα το 80% των μεταστάσεων προήλθε από την πρώιμη διασπορά κυττάρων και όχι από μεγάλους όγκους. Στην πραγματικότητα αναγνωρίστηκε ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η εξάπλωση είναι πιο αποτελεσματική σε πρώιμες βλάβες σε σύγκριση με μεγάλους όγκους.

Και στις δύο μελέτες βρέθηκε ότι η πρώιμη εξάπλωση καρκινικών κυττάρων είναι μια επέκταση της φυσιολογικής διαδικασίας δημιουργίας του δικτύου των γαλακτοφόρων πόρων του μαστού στις γυναίκες.

Σε αυτή την αρχέγονη διαδικασία ενεργοποιούνται δύο βασικά μονοπάτια, το p38, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, και το HER2, ένα ογκογονίδιο. Η απενεργοποίηση του p38 και η ενεργοποίηση του HER2, ενεργοποιεί ένα στοιχείο του μονοπατιού σηματοδότησης EMT (epithelial to mesenchymal transition). Το EMT προάγει τη κίνηση των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη ιστών. Επίσης, η δεύτερη μελέτη έδειξε ότι ο υποδοχέας σηματοδότησης προγεστερόνης, είναι σημαντικός για αυτή την πρώιμη διασπορά μέσω ρύθμισης cues που εμπλέκονται στα EMT και στην αύξηση, ένας μηχανισμός που υποδεικνύονταν σε πρώιμες μελέτες της ομάδας.

Καθώς το γαλακτοφόρο δίκτυο αναπτύσσεται, τα p38, HER και το EMT εναλλακτικά ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται. Αυτό, σε συνεργασία με τη σηματοδότηση προγεστερόνης, επιτρέπει στα μαστικά κύτταρα να κινούνται μέσω του μαστικού αδένα, και να δημιουργούν ένα δίκτυο γαλακτοφόρων πόρων το οποίο εκβάλει στη θηλή.

Στη μελέτη παρατηρήθηκε ότι εάν το HER2 υπερεκφράζεται ή είναι μεταλλαγμένο, και το p38 είναι οριστικά απενεργοποιημένο, το EMT ενεργοποιούνταν συνεχόμενα, επιτρέποντας στα κύτταρα να απομακρύνονται από το μαστικό αδένα και να κατευθύνονται προς το υπόλοιπο σώμα μέσω του αίματος. Η παρατήρηση αυτή έγινε μέσω χρήσης 3D τεχνολογίας και υψηλής ανάλυσης απεικονιστικών μέσων με απευθείας παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο σε ζώντα πειραματόζωο. Παρότι και οι δυο μελέτες επικεντρώνονται στον καρκίνο του μαστού, παρόμοιες διαδικασίες μπορεί να ελέγχουν την πρώιμη διασπορά και μετάσταση και σε άλλους καρκίνους όπως μελάνωμα και παγκρεατικό καρκίνο, του οποίου η πρώιμη διασπορά έχει συσχετιστεί με την EMT.

«*Παρότι τα ευρήματα μας προσθέτουν ένα ολόκληρο επίπεδο πολυπλοκότητας στην κατανόηση του καρκίνου, προσθέτουν και ενέργεια στις προσπάθειες μας να λύσουμε τελικά το μεγάλο θέμα στον καρκίνο, την διακοπή των μεταστάσεων*» σχολιάζουν οι ερευνητές.

Breast Cancer News, 16/12/2016

Νέος συσχετισμός μεταξύ καρκίνου του προστάτη και μετάλλαξης DNA

Δεδομένες μεταλλάξεις στο DNA ανδρών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο ρόλο από αυτόν που θεωρούνταν ότι είχαν ως σήμερα. Οι υπεύθυνοι της μελέτης, η οποία δημοσιεύθηκε στο New England Journal of Medicine, ευελπιστούν ότι το εύρημα αυτό θα βοηθήσει στην αλλαγή των στάνταρντ κατευθυντήριων θεραπευτικών οδηγιών και θα προωθήσει τη χρήση φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σε άλλους καρκίνους.

Στη μελέτη διερευνήθηκαν κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, οι οποίες είναι ήδη γνωστές ότι συναντώνται πιο συχνά σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό.

Στη μελέτη όμως καταδείχθηκε ότι οι μεταλλάξεις αυτές ήταν ακόμα πιο επικρατούσες σε άτομα με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Το 10% των ανδρών με επιθετικό καρκίνο του προστάτη επέδειξαν κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις συναντώνται σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA όπως τα BRCA1, BRCA2, τα οποία παράγουν ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες. Είναι γνωστό ότι τα BRCA1, BRCA2 αυξάνουν το ρίσκο για καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, και είναι υπεύθυνα για το 20-25% των κληρονομούμενων καρκίνων του μαστού. Δεν ήταν όμως πλήρως αναγνωρισμένη η επίδρασή τους στο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη.

Στη μελέτη αναφέρεται ότι το 11.8% των ανδρών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη (ανεξαρτήτου ηλικίας ή οικογενειακού ιστορικού) είχε μεταλλάξεις σε ένα από τα 20 γονίδια επιδιόρθωσης του DNA τα οποία διερευνήθηκαν στη μελέτη. Αυτό το ποσοστό είναι περίπου τέσσερις φορές υψηλότερο από τον γενικό πληθυσμό και διπλάσιο από το ποσοστό που συναντάται σε άνδρες με τοπικό καρκίνο του προστάτη.

Το BRCA2 έδειξε την πιο ξεκάθαρη αλλαγή στην επίπτωση του γονιδίου: άνδρες με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη είχαν 18 φορές υψηλότερη πιθανότητα να έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA2 σε σύγκριση με τους άνδρες χωρίς καρκίνο προστάτου.

Οι ερευνητές σημειώνουν ότι τα αποτελέσματα είναι σημαντικά για άνδρες με καρκίνο του προστάτη καθώς αυτά μπορεί να δώσουν προτεραιότητα σε δεδομένες θεραπείες. Είναι επίσης σημαντικό για τους συγγενείς τους καθώς μπορεί να έχουν κληρονομήσει ένα γονίδιο που να τους προδιαθέτει να εμφανίσουν έναν εκ των διαφόρων τύπων καρκίνου, και η πληροφόρηση να ενισχύσει την πρώιμη ανίχνευση και θεραπεία.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 692 άνδρες με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη που αντιμετωπίσθηκαν σε διάφορα κέντρα, τα οποία διεξήγαγαν ανεξάρτητη ανάλυση των 20 αυτών γονιδίων. Επίσης, το ότι τα άτομα δεν επιλέχθηκαν λόγω ηλικίας ή οικογενειακού ιστορικού, καθώς και το ότι η ανάλυση έγινε σε διάφορα εργαστήρια, τα οποία όμως έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα, προσθέτει στη μελέτη ιδιαίτερη αξιοπιστία και ενισχύει επιπλέον τα αποτελέσματα.

Η μελέτη θα μπορούσε να ανοίξει τη πόρτα για άλλες θεραπείες στο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Οι αναστολείς PARP και τα πλατινούχα σκευάσματα ήδη χρησιμοποιούνται σε κάποιες περιπτώσεις όπως στον καρκίνο ωοθηκών σε άτομα με μεταλλάξεις σε γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA.

Prostate cancer/Genetics News, 7/7/ 2016

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 2017: ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

[1]Π. Γκινόπουλος, [2]Β. Αλιβιζάτος, [2]Π. Αθανασόπουλος, [2]Π. Πατρικάκος, [2]Π. Δημητρίου

[1]ΜΧΜΘ- Ογκολογικό, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»
[2]Χειρουργική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αποτελεί παγκοσμίως μια από τις πιο επείγουσες προκλήσεις στον τομέα της υγείας. Γενικά, οι εξελίξεις στην έρευνα του καρκίνου από έτος σε έτος είναι ουσιαστικές και οι καινοτομίες που σημειώνονται εξαιρετικές. Σε όποια περίπτωση, η νέα γνώση που συλλέγεται κάθε χρόνο βοηθά και καθοδηγεί την περαιτέρω έρευνα και εν τέλει βοηθά τον ογκολογικό ασθενή.

Η αναφορά «Εξελίξεις στην έρευνα του καρκίνου» αναδεικνύει τις πιο υποσχόμενες εξελίξεις στην έρευνα του καρκίνου κατά το τελευταίο έτος (11/2015-10/2016) κατά το οποίο σημειώθηκαν νέες επιτυχίες με την ανοσοθεραπεία. Η έρευνα απέδειξε ότι αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι αποτελεσματική έναντι αρκετών, δύσκολα αντιμετωπίσιμων καρκίνων. Κατά το προηγούμενο χρόνο, ο FDA ενέκρινε οκτώ νέες θεραπείες και δώδεκα νέες χρήσεις ήδη εγκεκριμένων θεραπειών. Οι νέες εγκρίσεις περιλαμβάνουν ανοσοθεραπείες για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και του πολλαπλούν μυελώματος και στοχευμένες θεραπείες για δύσκολα αντιμετωπίσιμες μορφές του καρκίνου του πνεύμονος, του νεφρού, της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ΧΛΛ) και του πολλαπλούν μυελώματος. Οι εγκρίσεις για νέες χρήσεις διεύρυναν τις θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με μελάνωμα, σάρκωμα, ΧΛΛ, λέμφωμα, νευροενδοκρινείς όγκους, καρκίνου του μαστού, πνεύμονος, νεφρού και κεφαλής – τραχήλου. Επίσης, ο FDA ενέκρινε το πρώτο τεστ υγρής βιοψίας.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 2017: ADVANCES IN CANCER RESEARCH

[1]P. Ginopoulos, [2]V. Alivizatos, [2]P. Athanasopoulos, [2]P. Patrikakos, [2]P. Dimitriou

[1]Dept of Clinical Oncology, General Hospital of Patras «St Andreas»
[2]Surgery Clinic, *General Hospital of Patras «St Andreas»*

ABSTRACT

Cancer is one of the world's most pressing health care challenges. On the whole, research progress from one year to the next is incremental, and true breakthroughs are exceptional. Nevertheless, every year brings new knowledge that helps direct further research and ultimately patients with cancer.

"Clinical Cancer Advances", highlights the most promising advances in cancer research over the past year (11/ 2015 – 10/ 2016) where there has been a wave of new successes with immunotherapy. Research has proven this approach can be effective against a wide range of hard-to-treat cancer.

In the past year FDA approved eight new cancer treatments and twelve new uses of previously approved cancer therapies. The new approvals include immunotherapies for bladder cancer and multiple myeloma and targeted treatments for hard-to-treat forms of lung and kidney cancers, chronic lymphocytic leukemia (CLL) and multiple myeloma. New–use approvals have broadened treatment options for patients with melanoma, sarcoma, CLL, lymphoma, neuroendocrine tumors and breast, lung, kidney and head and neck cancers. In addition, the FDA approved the first liquid biopsy test.

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ: ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ 2.0

Κατά το 2016 ο FDA ενέκρινε πέντε νέες χρήσεις των αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού: καρκίνος του πνεύμονος, κεφαλής και τραχήλου, ουροδόχου κύστης, νεφρών και λέμφωμα Hodgkins. Πάντως, πολλοί άλλοι ασθενείς με τον ίδιο τύπο καρκίνου είτε δεν ωφελούνται από την ανοσοθεραπεία ή παρουσιάζουν ένα βραχυπρόθεσμο αποτέλεσμα. Επιπλέον, μια νέα μελέτη προάγει την ικανότητά μας να αναγνωρίζουμε ασθενείς που είναι πιθανότερο να ωφεληθούν από την ανοσοθεραπεία, απαλλάσσοντας τους από τις παρενέργειες και τα υψηλά κόστη.

Πρόοδος με τους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού

Η ανοσοθεραπεία παρατείνει την επιβίωση σε προχωρημένο μελάνωμα. Η έγκριση του αναστολέα σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού ipilimumab, καθιέρωσε την πρώτη θεραπεία που θα μπορούσε να παρατείνει την επιβίωση των ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα. Έως το τέλος του 2014, ο FDA ενέκρινε δύο επιπλέον αναστολείς σημείων ελέγχου στο προχωρημένο μελάνωμα: το pembrolizumab και το nivolumab. Σε μελέτες, οι δύο αυτοί παράγοντες έδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από το ipilimumab με λιγότερες παρενέργειες.

Το 2016, αναφέρθηκαν τα αποτελέσματα από τη μακροχρόνια παρακολούθηση 655 ασθενών που συμμετείχαν σε πρώιμη κλινική μελέτη με το pembrolizumab[1]. Η μέση επιβίωση ήταν 23 μήνες, και το ποσοστό της 24μηνης επιβίωσης ήταν 49%. Συρρίκνωση των όγκων παρατηρήθηκε στο ένα τρίτο των ασθενών ενώ οι ανταποκρίσεις που διατηρήθηκαν άνω του 1 έτους ήταν της τάξεως του 44%Το pembrolizumab ήταν γενικά καλά ανεκτό. Σοβαρές παρενέργειες παρατηρήθηκαν μόνο στο 14% των ασθενών. Οι πιο συχνές παρενέργειες ήταν κόπωση, κνησμός και εξάνθημα.

Τα ευρήματα είναι παρόμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί για το nivolumab, με το οποίο παρατηρήθηκε 24μηνη επιβίωση της τάξεως του 43% σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα[2]. Συγκριτικά, μια ανάλυση δεδομένων από αρκετές μελέτες με το ipilimumab ανέφερε μέση επιβίωση της τάξεως των 11.4 μηνών[3]. Μελέτες σε εξέλιξη, διερευνούν συνδυασμούς διάφορων αναστολέων των σημείων ελέγχου, οι οποίοι φαίνεται να έχουν καλύτερα αποτελέσματα από τη μονοθεραπεία, αν και επιφέρουν περισσότερες παρενέργειες[4].

Μια μεγάλη μελέτη ανέφερε ότι η επικουρική ανοσοθεραπεία επίσης βοηθά στην παράταση της επιβίωσης ασθενών με χειρουργήσιμο μελάνωμα σταδίου III[5]. Παρά το χειρουργείο, η πλειοψηφία αυτών των ασθενών θα παρουσιάσει υποτροπής της νόσου μέσα στην 4ετία από το χειρουργείο. Στη μελέτη, ασθενείς με ολική αφαίρεση της νόσου τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν ipilimumab ή placebo. Το ποσοστό της 5ετούς επιβίωσης ήταν 65% στην ομάδα που έλαβε το ipilimumab και 54% στην ομάδα με το placebo. Η ανοσοθεραπεία μείωσε τα ποσοστά υποτροπής και μακρινής μετάστασης. Στην 5ετία, οι περισσότεροι ασθενείς που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεν είχαν ακόμα παρουσιάσει υποτροπή (41% ν 30%) ή μακρινή μετάσταση (48% ν 39%).

Επιπλέον, η δόση του ipilimumab ήταν σχεδόν τριπλάσια από την εγκεκριμένη δόση (10mg/kg ν 3mg/kg). Η υψηλότερη δόση επιλέχθηκε βάσει αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών, σύμφωνα με τα οποία η υψηλότερη δόση θα μπορούσε να ήταν πιο αποτελεσματική, με περισσότερες, βέβαια, παρενέργειες. Στη μελέτη αυτή, το 54% των ασθενών παρουσίασε μια σοβαρή παρενέργεια και πέντε (1%) ασθενείς απεβίωσαν λόγω των παρενεργειών.

Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το ipilimumab σε υψηλή δόση μπορεί παρατείνει την επιβίωση ασθενών με μελάνωμα σταδίου III μετά το χειρουργείο. Οι παρενέργειες είναι συνήθεις και μπορεί να είναι απειλητικές για τη ζωή. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προσεκτικά τα ρίσκα και τα οφέλη για κάθε ασθενή κατά την απόφαση της θεραπευτικής προσέγγισης.

Αναστολείς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 παρατείνουν την επιβίωση στον προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονος. Οι ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό

καρκίνο του πνεύμονος (ΜΜΚΠ) έχουν φτωχή πρόγνωση. Μέχρι την έγκριση των αναστολέων pembrolizumab και nivolumab το 2015, το μέσο προσδόκιμο επιβίωσης με στάνταρντ χημειοθεραπεία ήταν μόνο 10 μήνες.

Το 2016, δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα μεγάλης μελέτης η οποία συνέκρινε το pembrolizumab με την στάνταρντ χημειο-θεραπεία με δοσεταξέλη σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, με θετικό PD-L1 (programmed death ligand -1), που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία[6]. Η μέση επιβίωση ήταν 10.4 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν pembrolizumab και 8.5 για τους ασθενείς με τη δοσεταξέλη. Στην ομάδα των ασθενών με τα υψηλότερα επίπεδα PD-L1, η μέση επιβίωση με το pembrolizumab ήταν ακόμα υψηλότερη (14.9 ν 8.2 μήνες). Το ποσοστό σοβαρών παρενεργειών ήταν αρκετά χαμηλότερο στην ομάδα που έλαβε το pembrolizumab σε σύγκριση με τη δοσεταξέλη (16% ν 35%). Η ανοσοθεραπεία λοιπόν, παρέτεινε την επιβίωση και ήταν πιο καλά ανεκτή σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία για πολλούς ασθενείς.

Τα αποτελέσματα αυτά καθιέρωσαν το pembrolizumab ως μια νέα στάνταρντ επιλογή για ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία. Επίσης, η μελέτη πυροδότησε, σε παγκόσμιο επίπεδο, τη συζήτηση για τη σημασία της ανάλυσης του δείκτης PD-L1 σε επιλεγμένους ασθενείς που είναι πιο πιθανό να ωφεληθούν από τους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού.

Ευρήματα από μια άλλη μεγάλη μελέτη υποδεικνύουν ότι το pembrolizumab μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικό από τη χημειοθεραπεία ως αρχική θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό ΜΜΚΠ με υψηλά επίπεδα PD-L1 (>50% των καρκινικών κυττάρων θετικά για PD-1)[7], ενώ μια παρόμοια μελέτη απέτυχε να επιδείξει ανωτερότητα του nivolumab έναντι της χημειοθεραπείας στο ίδιο πλαίσιο[8]. Τα ευρήματα αυτά θα αλλάξουν την αρχική θεραπεία του μεταστατικού ΜΜΚΠ δεδομένου ότι κάθε νεοδιαγνωσθέντας ασθενείς θα πρέπει να υποβάλλεται σε ανάλυση του PD-L1. Ασθενείς με υψηλά επίπεδα PD-L1 πιθανά να υποβάλλονται σε ανοσοθεραπεία και όχι σε χημειοθεραπεία.

Ένας άλλος αναστολέας των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού, το atezolizumab, εγκρίθηκε από τον FDA, το 2016, για ασθενείς με μεταστατικό ΜΜΚΠ, που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία[9]. Η έγκριση βασίστηκε σε δύο μεγάλες μελέτες, στις οποίες οι ασθενείς που έλαβαν atezolizumab είχαν μεγαλύτερη επιβίωση (13.8 και 12.6 μήνες αντιστοίχως) από αυτούς που υποβλήθηκαν σε στάνταρντ χημειοθεραπεία με δοσεταξέλη (9.6 και 9.7 μήνες αντιστοίχως). Οι πιο συχνές παρενέργειες του atezolizumab ήταν η κόπωση, μειωμένη όρεξη, βήχας και ναυτία. Το atezolizumab είχε ήδη εγκριθεί για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Τον Οκτώβριο του 2016, ο FDA ενέκρινε το pembrolizumab ως 1ης γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, θετικό στο PD-L1[10].

Η πρώτη νέα θεραπεία για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως μετά από 3 δεκαετίες.

Ελάχιστες εξελίξεις είχαν σημειωθεί στην αντιμετώπιση του προχωρημένου καρκίνου της ουροδόχου κύστης επί δεκαετίες έως την έγκριση του atezolizumab από τον FDA, το 2016[11]. Η έγκριση του βασίστηκε σε μια πρώιμη μελέτη ασθενών με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο, οι οποίοι είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία[12]. Για ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, με πρόοδο νόσου μετά την αρχική χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα, τα ποσοστά ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία ήταν πάντα πτωχά, με συρρίκνωση των όγκων μόνο στο 10% των ασθενών. Αντίθετα, το ποσοστό ανταπόκρισης στο atezolizumab ήταν 15%, στη μελέτη, και 27% στην ομάδα των ασθενών με αυξημένα επίπεδα PD-L1.

Το 2016, αναφέρθηκαν τα προκαταρκτικά αποτελέσματα από δύο μελέτες για το pembrolizumab σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ουροδόχου κύστης. Σε μια μελέτη, ασθενείς που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία είχαν αυξημένη επιβίωση με το pembrolizumab σε σύγκριση τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία[13]. Μια άλλη μελέτη, υποδεικνύει ότι το pembrolizumab μπορεί να είναι επίσης αποτελεσματικό ως αρχική (1ης γραμμής) θεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο της ουροδόχου κύστης που δεν είναι υποψήφιοι για χημειοθεραπεία με σισπλατίνη. Παρατηρήθηκε συρρίκνωση

των όγκων στο 24%. Στην ομάδα των ασθενών με υψηλά επίπεδα PD-L1, το 37% αυτών είχε συρρίκνωση των όγκων και το 13% είχε ολική ανταπόκριση[14]. Το pembrolizumab διερευνάται επίσης σε ασθενείς με πρώιμου σταδίου, επιφανειακό καρκίνο ουροδόχου κύστης ανθεκτικό στο BCG (Bacillus Calmette-Guerin) (ClinicalTrials.gov identifiers:NCT02603432)

Ανοσοθεραπεία παρατείνει την επιβίωση σε υποτροπιάζοντα καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου που παρουσιάζουν πρόοδο νόσου εντός του 6μήνου μετά από χημειοθεραπεία δεν υπάρχουν θεραπευτικές επιλογές για παράταση της επιβίωσης.

Μια πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει ότι το nivolumab μπορεί να επιφέρει μια παράταση επιβίωσης[15]. Η 1 έτους επιβίωση των ασθενών που έλαβαν nivolumab ήταν άνω του 2πλασιου σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν την στάνταρντ χημειοθεραπεία (36% ν 17%). Η μέση επιβίωση ήταν 7.5 μήνες στην ομάδα που έλαβε το nivolumab και 5.1 μήνες στην ομάδα με τη χημειοθεραπεία.

Λιγότεροι ασθενείς στην ομάδα με το nivolumab είχαν σοβαρές παρενέργειες (13% ν 35%). Η ποιότητα ζωής των ασθενών που έλαβαν το nivolumab ήταν σταθερή ενώ χειροτέρεψε αυτών που έλαβαν χημειοθεραπεία. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης, ο FDA, ενέκρινε το nivolumab για την θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζων ή μεταστατικό πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής και τραχήλου το Νοέμβριο του 2016[16].

Μελέτες σε εξέλιξη διερευνούν το εάν ο συνδυασμός του nivolumab με το ipilimumab μπορεί περαιτέρω να βελτιώσει τα κλινικά αποτελέσματα (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT02741570 & NCT02823574). Το pembro-lizumab είναι ήδη εγκεκριμένο στον υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου.

Επιβράδυνση της προόδου νόσου στον καρκίνο των ωοθηκών. Μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2015 αναφέρει ότι το nivolumab μπορεί να ωφελήσει ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που υποτροπιάζουν μετά από χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα. Σε μια μελέτη με 20 ασθενείς, 3 (15%) είχαν συρρίκνωση του όγκου μετά από θεραπεία με το nivolumab και 6 (30%) είχαν σταθερή νόσο[17]. Δύο ασθενείς είχαν ολική ανταπόκριση, η δε μία εξ αυτών είχε ανθεκτική νόσο στη χημειοθεραπεία (διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα). Αυτά τα πρώιμα ευρήματα ώθησαν περαιτέρω έρευνα για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότερης ένταξης της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο των ωοθηκών. Μελέτες υπό εξέλιξη διερευνούν το συνδυασμό του nivolumab με άλλες ανοσο-θεραπείες στον υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT02737787, NCT02335918 & NCT01928394)

Το λέμφωμα Hodgkins φαίνεται ιδιαίτερα ευαίσθητο στους αναστολείς του PD-1. Το 2016, τα αποτελέσματα μελέτης οδήγησαν σε μια νέα θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς με λέμφωμα Hodgkins: το Nivolumab[18]. Αυτό προέκυψε από προη-γούμενη ανακάλυψη γονιδιακών αλλαγών στα κύτταρα Reed – Sternberg. Αυτές οι γονιδιακές αλλαγές επέφεραν πληθώρα μορίων PD-L1/2 γεγονός που υποδεικνύει ότι το κλασσικό λέμφωμα Hodgkins είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στους αναστολείς του σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού PD-1.

Μια πρόσφατη ανάλυση δειγμάτων βιοψιών από νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με κλασσικό λέμφωμα Hodgkins έδειξε ότι οι γονιδιακές αλλαγές που οδήγησαν στην πληθώρα μορίων PD-L1/2 είναι ιδιαίτερα συχνές[19]. Τέτοιες γονιδιακές αλλαγές βρέθηκαν στο 97% από τα 108 δείγματα που αναλύθηκαν. Αυτές μπορεί να είναι και η αιτία των ποσοστών ανταπόκρισης σε αναστολείς του PD-1, τα οποία είναι υψηλότερα από κάθε άλλο τύπο καρκίνου που έχει δοκιμαστεί έως σήμερα.

Ο FDA ενέκρινε το nivolumab στην αντιμετώπιση του λεμφώματος Hodgkins βάσει αποτελεσμάτων μελέτης στην οποία 53 (66%) από τους 80 ασθενείς μπήκαν σε ύφεση ενώ 7 ασθενείς είχαν πλήρης ανταπόκριση[20]. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με κλασσικό λέμφωμα Hodgkins που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν τουλάχιστον 50% μείωση της νόσου, ενώ οι ανταποκρίσεις διατηρήθηκαν, κατά μέσο όρο, 8 μήνες. Το nivolumab γενικά ήταν καλά ανεκτό. Οι πιο συνήθεις παρενέργειες όποιου βαθμού ήταν κόπωση, αντίδραση στην έκχυση και εξάνθημα. Σοβαρές παρενέργειες όπως ουδετεροπενία και αυξημένη λιπάση, παρατηρήθηκε μόνο στο 5% των ασθενών.

Σε μια άλλη μελέτη, το pembrolizumab ήταν επίσης αποτελεσματικό σε νεαρούς ασθενείς με υποτροπιάζων ή ανθεκτικό κλασσικό λέμφωμα Hodgkins[21]. Οι 20 (64%) από τους 31 ασθενείς, παρουσίασαν ύφεση της νόσου, και από αυτούς, οι πέντε είχαν ολική ανταπόκριση. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς είχαν κάποια μείωση στο μέγεθος του όγκου, και οι περισσότερες ανταποκρίσεις διατηρήθηκαν πάνω από 24 εβδομάδες. Το Απρίλιο του 2016 ο FDA ανέδειξε το pembrolizumab ως μια καινοτόμα θεραπεία στην αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος κλασικού λεμφώματος Hodgkins.

Μελέτες σε εξέλιξη διερευνούν συνδυασμούς του nivolumab με το brentuximab vedotin και το ipilimumab (ClinicalTrials.gov identifiers NCT02758717, NCT01896999 & NCT02304458). Το pembrolizumab διερευνάται επίσης και σε άλλους αιματολογικούς καρκίνους όπως και στο πολλαπλούν μυέλωμα (ClinicalTrials.gov identifiers NCT01953692)

Νεότερα δεδομένα για την επιλογή ασθενών

Παρά τη συνεχώς διευρυνόμενη χρήση της ανοσοθεραπείας, δεν έχει λυθεί ακόμα ένα δύσκολο βιολογικό παζλ. Γιατί οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού έχουν αποτελέσματα σε κάποιους καρκίνους και όχι σε όλους; Μεταξύ των ασθενών με τον ίδιο τύπο καρκίνου, γιατί κάποιοι ανταποκρίνονται στην ανοσοθεραπεία και άλλοι όχι;

Το επόμενο βήμα στην έρευνα της ανοσοθεραπείας θα επικεντρωθεί στην απάντηση αυτών των ερωτημάτων. Δεδομένου του υψηλού κόστους και των σημαντικών παρενεργειών της ανοσοθεραπείας, είναι πολύ σημαντική η δυνατότητα προσδιορισμού του ποιου θα ωφεληθεί τα μέγιστα. Παρότι δεν μπορεί να υπάρξει απόλυτη βεβαιότητα εάν η νόσος θα ανταποκριθεί στη θεραπεία, στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να υπολογιστεί το όφελος βάσει βιολογικών χαρακτηριστικών ή βιοδεικτών του ασθενή και του όγκου.

Μόλις έχει ξεκινήσει η αποκάλυψη δεικτών που να μπορούν να προβλέψουν μια ευνοϊκή ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία, π.χ. αναμένεται ότι ασθενείς με υψηλά επίπεδα PD-L1 θα ανταποκριθούν καλά στους αναστολείς σημείων ελέγχου του PD-1 και ότι ασθενείς χωρίς PD-1 δεν θα ωφεληθούν καθόλου. Πάντως, σε αρκετούς διαφορετικούς καρκίνους, όπως των ωοθηκών και στο μελάνωμα, η συσχέτιση μεταξύ PD-L1 και ανταπόκρισης στους υποδοχείς των σημείων ελέγχου του PD-1 είναι λιγότερη ξεκάθαρη. Σε αρκετές μελέτες, ασθενείς με χαμηλά επίπεδα PD-L1, μεταξύ αυτών και καρκίνοι του πνεύμονος, ανταποκρίθηκαν στους αναστολείς του PD-1.

Ένα βασικό ζήτημα είναι η έλλειψη προτυποποίησης των αναλύσεων του PD-1 και του PD-L1. Δεν είναι ξεκάθαρο ποια τεχνική είναι βέλτιστη ή εάν θα πρέπει να προσμετράτε η έκφραση μόνο στα καρκινικά κύτταρα ή στα καρκινικά κύτταρα και στα περιβάλλονται στρωματικά ή/και ανοσοποιητικά κύτταρα. Επίσης, ακόμα και στη χρήση μιας τεχνικής και μιας μεθόδου ανάλυσης, τα όρια ποικίλουν. Τα θέματα αυτά πρέπει να λυθούν προτού αυτοί οι βιοδείκτες θεωρηθούν επαρκείς για κλινικές αποφάσεις.

Επίσης διερευνώνται και οι αιτίες που οδηγούν σε ανάπτυξη της νόσου μετά από ανταπόκριση της σε αναστολείς των σημείων ελέγχου του PD-1. Μια πιλοτική μελέτη σε ασθενείς με μελάνωμα ανέφερε ότι μεταλλάξεις σε δεδομένα γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό μπορεί να είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο PD-1[22].

Οι αναστολείς των σημείων ελέγχου έχουν καλά αποτελέσματα σε υπερ-μεταλλαγμένους καρκίνους.

Παρότι η έρευνα για τους βιοδείκτες των αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού και άλλων τύπων ανοσοθεραπείας βρίσκεται σε εξέλιξη, έχουν προκύψει κάποια βασικά στοιχεία. Κατά πρώτον, φαίνεται ότι όγκοι με μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων είναι πιο ευαίσθητοι στους αναστολείς των σημείων ελέγχου. Η πιθανή εξήγηση αυτού είναι ότι όγκοι με περισσότερες μεταλλάξεις παράγουν πιο ανώμαλες πρωτεΐνες (αντιγόνα) έτσι ώστε το ανοσοποιητικό σύστημα να τα αναγνωρίζει ως ξένα σώματα.

Έχουν προταθεί αρκετά τεστ για την αξιολόγηση της επιβάρυνσης των μεταλλάξεων. Ένα από αυτά εμπλέκει την αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος του καρκίνου και απλή καταμέτρηση των μεταλλάξεων. Άλλη προσέγγιση είναι η αλληλούχιση μόνο ενός

επιλεγμένου πάνελ αντιπροσωπευτικών γονιδίων και επαναπροσδιορισμός του ποσοστού των μεταλλάξεων μέσα στο πάνελ. Ένα τρίτο, αφορά την αξιολόγηση υποκατάστατων δεικτών της συχνότητας των μεταλλάξεων. Μια άλλη τεχνική προσδιορίζει την παρουσία ενός υπερμεταλλαγμένου φαινοτύπου π.χ. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (APOBEC) enzymes.

Καρκίνοι με μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, αποκαλούμενοι ως υπερμεταλλαγμένοι καρκίνοι, είναι κυρίαρχα εκείνοι που προκαλούνται από το κάπνισμα (π.χ. πνεύμονος, κεφαλής και τραχήλου, ουροδόχου κύστης) ή από την υπεριώδη ακτινοβολία (π.χ. μελάνωμα, κεφαλής κι τραχήλου). Ουσιαστικά, η έκθεση σε καπνό και υπεριώδη ακτινοβολία έχει συσχετιστεί με μοναδικά πρότυπα γονιδιακών αλλαγών ή υπογραφών[23]. Για αυτό δεν αποτελεί έκπληξη ότι στις κλινικές μελέτες έως σήμερα, αυτοί είναι και οι καρκίνοι στους οποίους η αναστολή των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού είναι πιο αποτελεσματική.

Επίσης, οι καρκίνοι ασθενών με ανεπάρκεια επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης, η οποία υπομονεύει την ικανότητα ενός κυττάρου να επιδιορθώσει τη βλάβη στο DNA, έχουν πολλές μεταλλάξεις. Έρευνα υποδεικνύει ότι ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου ή του εγκεφάλου, με αυτή την ανεπάρκεια, ωφελούνται από αναστολείς των σημείων έλεγχου. Αυτές ο θεραπείες, πάντως, έχουν χαμηλή επίδραση σε ασθενείς με καρκίνους του ίδιου τύπου, οι οποίοι όμως δεν έχουν αυτή την ανεπάρκεια. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα είναι μεν υποσχόμενα αλλά προκαταρκτικά. Μελέτες σε εξέλιξη, αναμένεται να βοηθήσουν στο προσδιορισμό του εάν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένα ή περισσότερα τεστ για να εστιάσουν την ανοσοθεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχουν στους ασθενείς εκείνους που είναι πιθανότερο να ωφεληθούν.

Καρκίνος παχέως εντέρου. Η ανεπάρκεια επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης συναντάται στο 15% των καρκίνων παχέως εντέρου, μπορεί όμως να εμφανιστεί και σε άλλους καρκίνους του γαστρεντερικού, καθώς και σε καρκίνους του ενδομητρίου, προστάτη και ωοθηκών. Μια κλινική μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2015, υποδεικνύει μια συσχέτιση μεταξύ αυτής της ανεπάρκειας και της ανταπόκρισης σε αναστολείς των σημείων ελέγχου[24]. Μεταξύ των ασθενών με ανεπάρκεια επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης, 4 από τους 10 ασθενείς ανταποκρίθηκαν στο pembrolizumab. Αντίθετα, κανένας από τους 18 ασθενείς που δεν είχαν ανεπάρκεια επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης δεν ανταποκρίθηκε στο pembrolizumab. Οι ασθενείς με την ανεπάρκεια είχαν κατά μέσο όρο 1.782 μεταλλάξεις ανά όγκο, ενώ οι ασθενείς με φυσιολογική επιδιόρθωση λανθασμένης σύζευξης είχαν μόνο 73 μεταλλάξεις ανά όγκο.

Παρότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα, αυτά τα πρώιμα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η εξέταση για ανεπάρκεια επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης ή για τον αριθμό των μεταλλάξεων στον όγκο, αποκαλούμενο ως φορτίο μετάλλαξης, μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση ασθενών που πιθανά ωφεληθούν από ανοσοθεραπεία με PD-1/PD-L1.

Καρκίνωμα Merkel cell. Το Merkel cell καρκίνωμα, ένας σπάνιος, επιθετικός, καρκίνος του δέρματος, φαίνεται να είναι ευαίσθητος σε αναστολείς των σημείων ελέγχου PD-1. Σε προχωρημένο στάδιο, παρουσιάζει πρόοδο νόσου 3 μήνες μετά την αρχική προσέγγιση με χημειοθεραπεία. Το καρκίνωμα Merkel cell προκαλείται από υπεριώδη ακτινοβολία ενώ, σχεδόν, 4 στις 5 περιπτώσεις σχετίζονται με λοίμωξη με τον Merkel cell polyomavirus (MCPyV).

Το PD-L1 συναντάται στα μισά καρκινώματα Merkel cell, ενώ το PD-1 είναι παρών στα καρκινικά και στα MCPyV κύτταρα του ανοσοποιητικού. Επίσης, ο μέσος αριθμός των μεταλλάξεων στα Merkel cell καρκινώματα, αρνητικά για MCPyV, είναι μεγαλύτερος από τον αναφερόμενο σε άλλους καρκίνους που ανταποκρίνονται σε θεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου PD-1/PD-L1. Αυτός ο υψηλός αριθμός μεταλλάξεων σε συνδυασμό με τους δείκτες PD-1 και PD-L1, υποδεικνύει ότι το καρκίνωμα Merkel cell μπορεί να είναι κατάλληλο για θεραπεία με αναστολείς του σημείου ελέγχου PD-1.

Σε μια πιλοτική μελέτη, παρατηρήθηκε συρρίκνωση των όγκων στους 14 (56%) από του 26 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνωμα Merkel cell με τον αναστολέα pembrolizumab[25]. Οι ανταποκρίσεις διήρκησαν από 2.2

έως 9.7 μήνες. Σε μια άλλη μελέτη, οι 28 (32%) από τους 88 ασθενείς με ανθεκτικό στη χημειοθεραπεία καρκίνωμα Merkel cell, είχαν συρρίκνωση των όγκων μετά από θεραπεία με τον αναστολέα του PD-L1, avelumab[26]. Παρότι απαιτείται μεγαλύτερης διάρκειας παρακολούθηση και μεγαλύτερες μελέτες, αυτά τα πρώιμα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι αναστολείς των σημείων ελέγχουν μπορούν να επιβραδύνουν την εξέλιξη του καρκινώματος Merkel cell.

Τα καρκινώματα Merkel cell που σχετίζονταν με τον MCPyV έχουν 100 φορές λιγότερες μεταλλάξεις (μέσο όρο 12 μεταλλάξεις) σε σύγκριση με αυτούς που είναι αρνητικοί στον MCPyV. Ουσιαστικά, όγκοι θετικοί στον MCPyV, έχουν λιγότερες μεταλλάξεις από αυτές που αναφέρονται για καρκίνους που ανταποκρίνονται φτωχά σε αναστολείς του PD-1 όπως του προστάτη και του παγκρέατος. Παρά τον μικρό αριθμό μεταλλάξεων, όγκοι θετικοί σε MCPyV, έχουν υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης στο pembrolizumab (62%) συγκριτικά με τους αρνητικούς στον MCPyV (44%).

Οι όγκοι που είναι θετικοί στον MCPyV πιθανά να ανταποκρίνονται στην ανοσοθεραπεία λόγω του ότι οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον ιό προκαλούν ανοσοανταπόκριση. Αυτό σημαίνει ότι όταν οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του PD-1 αποδεσμεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αυτό είναι ήδη έτοιμο να αντιδράσει έναντι του καρκίνου. Αυτό το εύρημα μπορεί να εμπλέκεται θεραπευτικά και με άλλους καρκίνους που σχετίζονται με ιούς.

ΡΙΣΚΟ ΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟ, ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ SCREENING ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η ολοένα αυξανόμενη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου έχει επιφέρει νέα δεδομένα για τις γονιδιακές μεταλλάξεις οι οποίες προδιαθέτουν τα άτομα για διάφορους τύπους καρκίνου. Είναι σημαντική η γνώση του ότι ένα άτομο είναι φορέας μιας μετάλλαξης για προδιάθεση στον καρκίνο, διότι η έκβαση μπορεί να βελτιωθεί μέσω συχνού screening και προληπτικής χειρουργικής παρέμβασης.

Επιπλέον γονίδια που σχετίζονται με ρίσκο για καρκίνο των ωοθηκών. Μια γυναίκα με μια μόνο συγγενή α' βαθμού (μητέρα, κόρη, ή αδελφή) με καρκίνο των ωοθηκών έχει τριπλάσιο ρίσκο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Το ρίσκο δε αυξάνει όσο αυξάνουν οι συγγενείς α΄ βαθμού με καρκίνο των ωοθηκών.

Περίπου το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών σχετίζονται με γονιδιακές μεταλλάξεις οι οποίες κληρονομούνται, π.χ. η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών είναι 36% σε γυναίκες με μεταλλάξεις στο BRCA1 και 12% για εκείνες με μεταλλάξεις στο BRCA2. Συγκριτικά, στο γενικό πληθυσμό, το εφόρου ζωής ρίσκο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών είναι μόλις 1% ή 2%[27].

Μια πρόσφατη μεγάλη μελέτη έδειξε ότι μεταλλάξεις σε δύο άλλα γονίδια σχετίζονται με προδιάθεση για καρκίνο των ωοθηκών. Γυναίκες με μεταλλάξεις στα γονίδια RAD51C και RAD51D έχουν, αντίστοιχα, πενταπλάσιο και 12πλάσιο ρίσκο για καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με γυναίκες στον γενικό πληθυσμό[28]. Υπολογίστηκε ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια RAD51 μπορεί να είναι υπεύθυνα για μία στις 120 περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών.

Παρότι αυτές οι μεταλλάξεις είναι σπάνιες, είναι σημαντική η γνώση αυτών των παραγόντων ρίσκου έτσι ώστε να γίνουν οι απαραίτητες ενέργειες για μείωση του ρίσκου. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν σε μια αλλαγή των εθνικών κατευθυντήριων οδηγιών για την γονιδιακή εξέταση, και πλέον συστήνουν να λαμβάνεται υπόψη το χειρουργείο (σαλπιγγο-ωοθηκεκτομή) για γυναίκες με μεταλλάξεις στα γονίδια RAD51C ή RAD51D. Για γυναίκες με μεταλλάξεις υψηλού ρίσκου όπως στα BRCA1/2, η αφαίρεση των ωοθηκών και των σαλπίγγων μπορεί να μειώσει το ρίσκο για καρκίνο των ωοθηκών κατά 70-96%.

Για γυναίκες που έχουν ήδη διαγνωστεί με καρκίνο των ωοθηκών, η διερεύνηση για μεταλλάξεις στο RAD51 μπορεί επίσης να βοηθήσει στις θεραπευτικές αποφάσεις. Προηγούμενη έρευνα έχει υποδείξει ότι γυναίκες με τέτοιες μεταλλάξεις μπορεί να ανταποκριθούν καλά σε μια νέα κατηγορία φαρμάκων, τους αναστολείς poly (ADP-ribose) polymerase (PARP).

Αναγνώριση γονίδιων προδιάθεσης για καρκίνο του παγκρέατος. Κατά προσέγγιση, ένας στους 10 καρκίνους παγκρέατος σχετίζεται με κληρονομική γονιδιακή μετάλλαξη. Όταν συναντάται καρκίνος του

παγκρέατος σε δύο ή περισσότερους συγγενείς α΄ βαθμού, αναφέρεται ως οικογενής παγκρεατικός καρκίνος. Η προδιάθεση για καρκίνο του παγκρέατος έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις σε αρκετά διαφορετικά γονίδια, μεταξύ αυτών και τα BRCA1/2. Το 2015, μια προοπτική μελέτη αναφέρει μεταλλάξεις στο BRCA στο 5% των ασθενών με πορογενές αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος[29].

Η συχνότητα των μεταλλάξεων στο BRCA ήταν υψηλότερη (12%) μεταξύ 33 ασθενών Εβραίων Ασκενάζι (σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, μεταλλάξεις στο BRCA είναι πιο συχνές σε γυναίκες Ασκενάζι για καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό). Παρότι οι αριθμοί ήταν χαμηλοί, το εύρημα αυτό οδήγησε σε αλλαγή των εθνικών κατευθυντήριων οδηγιών για την γονιδιακή εξέταση και συστήνεται κάθε Εβραίος με παγκρεατικό καρκίνο να υποβάλλεται σε εξέταση για BRCA1/2. Σε συγγενείς φορέων μετάλλαξης στα BRCA1/2, οι οποίοι έχουν την οικογενή μετάλλαξη, μπορεί να προταθούν κατάλληλες προληπτικές στρατηγικές, μεταξύ αυτών screening για ανίχνευση καρκίνου του παγκρέατος σε πρώιμο στάδιο.

Δεδομένου ότι το μέσο άτομο έχει μόνο 1% πιθανότητα να εμφανίσει καρκίνο του παγκρέατος, σε όλη του τη ζωή, δεν προτείνεται το screening για τον δεδομένο τύπο καρκίνου στον γενικότερο πληθυσμό. Πάντως, το επιλεκτικό screening σε άτομα με υψηλό ρίσκο για καρκίνο του παγκρέατος μπορεί να ανιχνεύσει προκακοήθεις όγκους ή καρκίνους πρώιμου σταδίου, τα οποία αμφότερα είναι δυνητικά ιάσιμα με χειρουργείο.

Το όφελος αυτού του screening αξιολογήθηκε σε μια πρόσφατη προοπτική μελέτη screening σε 411 ασυμπτωματικά άτομα με οικογενή καρκίνο του παγκρέατος ή μεταλλάξεις σε γνωστά γονιδια προδιάθεσης για καρκίνο του παγκρέατος (π.χ. CDKN2A, BRCA1/2, και PALB2)[30]. Το screening περιελάμβανε ετήσια μαγνητική τομογραφία, χολαγγειοπαγκρεα-τογραφία, και ενδοσκοπικό υπέρηχο. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης των ατόμων ήταν 32 μήνες.

Ανιχνεύθηκε παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα σε 13 (7%) από τους 178 φορείς μεταλλάξεων στο CDKN2A, εννέα από τους οποίους υποβλήθηκαν σε χειρουργείο. Η 5ετής επιβίωση ήταν 24%, η οποία είναι 5πλάσια υψηλότερη από την 5ετη επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. Επίσης, το screening ανίχνευσε καρκίνο του παγκρέατος σε μόλις δύο (0.9%) άτομα από τα 214 με οικογενή καρκίνο του παγκρέατος και έναν (5%) από τους 19 ασθενείς με μεταλλάξεις στο BRCA.

Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που επιδεικνύει επιτυχία στην ανίχνευση πρώιμων καρκίνων και ευνοϊκά αποτελέσματα με χειρουργική προσέγγιση μέσω screening για καρκίνο του παγκρέατος σε πληθυσμό υψηλού ρίσκου. Παρότι το screening ήταν ξεκάθαρα χρήσιμο στην ανίχνευση παγκρεατικού καρκίνου μεταξύ ατόμων με μεταλλάξεις στο CDKN2A, περισσότερη έρευνα απαιτείται στην αξιολόγηση του οφέλους του σε άλλες ομάδες υψηλού ρίσκου, πχ. στον οικογενή καρκίνο του παγκρέατος ή με μεταλλάξεις στο BRCA.

Διευρυμένη γονιδιακή εξέταση αποκαλύπτει γονιδιακές μεταλλάξεις προδιάθεσης για καρκίνο. Άτομα με σύνδρομο Lynch έχουν ένα ιδιαίτερα αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου παχέως εντέρου, ενδομητρίου, ωοθηκών, στομάχου, παγκρέατος, ουροποιητικού, και άλλων καρκίνων, συχνά σε νεαρή ηλικία. Το σύνδρομο προκαλείται από μεταλλάξεις στα εξής γονίδια: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ή EPCAM. Η κλασική εξέταση για το σύνδρομο, διερευνά μεταλλάξεις σε αυτά τα πέντε γονίδια. Ωστόσο, πάνω από τις μισές οικογένειες με υποψία για σύνδρομο Lynch, έχουν αρνητικά αποτελέσματα για τέτοιες μεταλλάξεις, κάτι που υποδεικνύει ότι άλλες γονιδιακές αλλαγές μπορεί να προκαλούν αυξημένο ρίσκο για καρκίνο.

Σε μελέτη, χρησιμοποιήθηκε πολυγονιδιακό πάνελ, το οποίο ταχέως αναλύει πολυάριθμα γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο[31]. Αξιολογήθηκαν 25 τέτοια γονίδια σε 1.260 άτομα που παραπέμφθηκαν για διερεύνηση ύπαρξης του συνδρόμου Lynch. Παρότι 114 (9%) συμμετέχοντες είχαν μια μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια για το σύνδρομο, 71 (6%) είχαν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, π.χ. 15 άτομα είχαν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 ή BRCA2, και εννέα είχαν μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο προδιάθεσης για καρκίνο παχέως εντέρου.

Η μελέτη έδειξε ότι το πολυγονιδιακό πάνελ μπορεί να επιφέρει κλινικά χρήσιμες πληροφορίες που μπορεί να διαφύγουν από την πιο περιορισμένη εξέταση για το σύνδρομο. Μπορεί να ανιχνεύσει γονιδιακές αλλαγές για τις οποίες δεν θα υπήρχε υποψία βάσει του οικογενειακού ιστορικού μόνο, επιτρέποντας έτσι τη χρήση προληπτικών μέτρων όπως screening και χειρουργείου.

Ένα μειονέκτημα της ευρείας γονιδιακής εξέτασης είναι η πιθανότητα ανεύρεσης γονιδιακών μεταλλάξεων με αβέβαιη κλινική σημασία, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει ιδιαίτερο άγχος στα άτομα. Στη μελέτη, το 38% των ατόμων είχαν ένα ή περισσότερα τέτοια ευρήματα.

Η ημερήσια πρόσληψη βιταμίνης D μειώνει το ρίσκο για καρκίνο του δέρματος. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν διερευνηθεί διάφορες βιταμίνες και συμπληρώματα στην πρόληψη του καρκίνου. Ωστόσο ελάχιστες ουσίες αναγνωρίστηκαν να έχουν προστατευτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου έως σήμερα. Πρόσφατη μελέτη, αναγνώρισε μια μορφή της βιταμίνης Β3, η οποία ονομάζεται νικοτιναμίδη και η οποία μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος σε άτομα με υψηλό ρίσκο για τη νόσο.

Σε μια κλινική μελέτη ατόμων με ιστορικό καρκίνου του δέρματος (μη μελάνωμα), το ποσοστό νέων διαγνώσεων καρκίνου του δέρματος ήταν 23% χαμηλότερο μεταξύ αυτών που λάμβαναν τη βιταμίνη δις ημερησίως για ένα έτος[32]. Το εύρημα αυτό είναι το πρώτο ξεκάθαρο στοιχείο ότι οι καρκίνοι του δέρματος μπορούν να προληφθούν με μια απλή, χαμηλού κόστους, βιταμίνη μαζί με προστασία για τον ήλιο. Σε όποια περίπτωση, τα άτομα με υψηλό ρίσκο για καρκίνο του δέρματος θα πρέπει να συνεχίσουν τις τακτικές εξετάσεις στους ιατρούς τους.

Αυτή η κλινική μελέτη, στηρίχθηκε σε δεδομένα προκλινικών και πρώιμων κλινικών μελετών δεκαετίας που ανέφεραν ότι η νικοτιναμίδη όχι μόνο βοηθά τα δερματικά κύτταρα να επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA που προκλήθηκαν από την υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά βοηθά και το ανοσοποιητικό σύστημα του δέρματος έναντι του υπεριώδους φωτός. Το ανοσοποιητικό σύστημα του δέρματος βοηθά στην εκρίζωση ανώμαλων κυττάρων πριν αυτά μετατραπούν σε καρκινικά.

ΠΡΟΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΕΡΑΝ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΈΙΑΣ

Στοχευμένη θεραπεία.

Υποσχόμενη νέα θεραπεία για την οξεία μυελοειδή λευχαιμία (ΟΜΛ). Αυτός το τύπος καρκίνου είναι δύσκολα αντιμετωπίσιμος, με μόνο το 27% των ασθενών να επιβιώνει 5 χρόνια μετά την διάγνωση[33] ενώ δεν υπάρχουν νέες αποτελεσματικές θεραπείες από την δεκαετία του ’90. Το 2015, προκαταρκτικά ευρήματα μπορεί να οδηγήσουν σε ένα νέο στάνταρντ αντιμετώπισης του περίπου ένα τρίτου των ασθενών με ΟΜΛ, και συγκεκριμένα εκείνων με μεταλλάξεις στο γονίδιο FLT3[34]. Οι ασθενείς με ΟΜΛ θετική στο FMS-related tyrosine kinase 3 (FLT3) έχουν πτωχή πρόγνωση και υψηλή πιθανότητα υποτροπής.

Σε μια μεγάλη κλινική μελέτη, ασθενείς (717) που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία, έλαβαν στοχευμένη θεραπεία έναντι του FLT3, το midostaurin σε συνδυασμό με στάνταρντ χημειοθεραπεία, και επιβίωσαν περισσότερο από εκείνους που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία. Η μέση επιβίωση ήταν 75 μήνες για τους ασθενείς με τη συνδυασμένη θεραπεία και 26 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν μόνον χημειοθεραπεία. Το midostaurin επίσης διπλασίασε τη μέση επιβίωση ελεύθερης συμβάντων (ορίζεται ως θάνατος, υποτροπή, ή μη ολική ύφεση μέσα σε 61 ημέρες) σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία μόνη της (8 v 3.6 μήνες). Τα συνολικά ποσοστά των σοβαρών παρενεργειών και θανάτων σχετιζόμενων με τη θεραπεία ήταν παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων.

Νέα θεραπεία που στοχεύει βιοδείκτη βελτιώνει την έκβαση σε υποτροπή οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ). Το 2016, διαγνώστηκαν 2.636 περιπτώσεις με ΟΛΛ στις ΗΠΑ[35]. Παρότι επιτυγχάνεται ολική ύφεση στην πλειοψηφία των ασθενών με ΟΛΛ μετά την αρχική θεραπεία, οι περισσότεροι τελικά θα υποτροπιάσουν. Η πρόγνωση είναι πτωχή και απαιτούνται πιο αποτελεσματικές θεραπείες.

Μια νέα θεραπεία, το inotuzumab ozogamicin, μπορεί να βελτιώσει την έκβαση για ηλικιωμένους ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ, σύμφωνα με μια μελέτη σε εξέλιξη[36]. Το

inotuzumab ozogamicin ανήκει σε μια νεα κατηγορία φαρμάκων γνωστή ως ADCs (antibody-drug conjugates). Αυτά αποτελούνται από ένα αντίσωμα που συνδέεται χημικά με το αντικαρκινικό φάρμακο καλιχεαμικίνη (calicheamicin). Το αντίσωμα στοχεύει το μόριο CD22, το οποίο ανευρίσκεται στα καρκινικά κύτταρα στο 90% των ασθενών με Β-ΟΛΛ και βοηθά στην χορήγηση της καλιχεαμικίνης.

Σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν inotuzumab ozogamicin ή στάνταρντ εντατική χημειοθεραπεία. Το ποσοστό της ολικής ύφεσης ήταν άνω του διπλάσιου στην ομάδα με το inotuzumab ozogamicin σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε την στάνταρντ θεραπεία (81% v 29%). Αντίστοιχα ο μέσος χρόνος έως προόδου νόσου ήταν 5 v 1.8μήνες και η μέση επιβίωση ήταν 7.7 v 6.7 μήνες.

Μια σοβαρή παρενέργεια του inotuzumab ozogamicin ήταν η φλεβοαποφρακτική ηπατική νόσος, η οποία παρατηρήθηκε στο 11% των ασθενών. Το inotuzumab ozogamicin ενδέχεται να γίνει η νέα στάνταρντ θεραπεία σε ηλικιωμένους ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική Β-ΟΛΛ.

Εξελίξεις στην αντιμετώπιση του προχωρημένο ΜΜΚΠ, με θετικό ALK. Το 3-7% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ είναι θετικό στο ALK (anaplastic lymphoma kinase). Η πρώτη θεραπεία που στόχευε όγκους θετικούς στο ALK ήταν το crizotinib, το οποίο εγκρίθηκε από τον FDA, το 2011. Παρότι το crizotinib συρρικνώνει τους όγκους σε ένα μεγάλο ποσοστών των ασθενών, αυτοί συνήθως υποτροπιάζουν κατά τον πρώτο χρόνο της θεραπείας.

Για να αντιμετωπιστεί το θέμα της ανθεκτικότητας στο crizotinib, δημιουργήθηκαν πιο ισχυροί, επόμενης γενιάς αναστολείς του ALK. Ένας τέτοιος παράγοντας, το alectinib, έδειξε υποσχόμενα αποτελέσματα σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, ανθεκτικό στο crizotinib, μεταξύ αυτών και ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις[37]. Σε μελέτη, το 48% των ασθενών ανταποκρίθηκαν στο alectinib, με μέση διάρκεια της ανταπόκρισης τους 13.5 μήνες.

Σημειωτέον, στο 75% των ασθενών με ΜΜΚΠ και εγκεφαλικές μεταστάσεις, σημειώθηκε συρρίκνωση των εγκεφαλικών μεταστάσεων με το alectinib, ένα υποσχόμενο εύρημα αφού η χημειοθεραπεία έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα στο ΚΝΣ, με ποσοστά ανταπόκρισης της τάξεως του 45%. Το 2015, ο FDA ενέκρινε το alectinib, για ασθενείς με ΜΜΚΠ, με θετικό ALK, με δυσανεξία στο crizotinib ή πρόοδο νόσου μετά από crizotinib[38]. Συνολικά το alectinib, ήταν καλά ανεκτό, με πιο συχνές παρενέργειες τη ναυτία και τη διάρροια. Σοβαρές ανωμαλίες στα ηπατικά ένζυμα παρατηρήθηκαν στο 6% των ασθενών.

Προκαταρκτικά ευρήματα από μια μελέτη σε εξέλιξη υποδεικνύουν ότι το alectinib μπορεί επίσης να βοηθήσει ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, με θετικό ALK, που δεν έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία[39]. Στη μελέτη σημειώθηκε συρρίκνωση των όγκων στο 92% των σθενών που έλαβαν alectinib σε σύγκριση με το 79% των ασθενών που έλαβαν crizotinib. Επίσης, οι ασθενείς με το alectinib είχαν 66% χαμηλότερο ρίσκο προόδου νόσου σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν crizotinib. Επίσης το alectinib ήταν καλύτερα ανεκτό με λιγότερες παρενέργειες. Μόνο μια παρενέργεια, η δυσκοιλιότητα, παρατηρήθηκε σε άνω του 30% των ασθενών που είχαν λάβει alectinib. Αντίθετα, αρκετές παρενέργειες καταγράφηκαν σε πάνω από τους μισούς ασθενείς που έλαβαν crizotinib, όπως ναυτία, διάρροια, έμμετος, διαταραχές οράσεως. Μια άλλη παγκόσμια μελέτη φάσεως ΙΙΙ βρίσκεται σε εξέλιξη για την σύγκριση της ίδιας θεραπευτικής προσέγγισης (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02075840).

Νέο σχήμα επιβραδύνει την εξέλιξη του πολλαπλούν μυελώματος. Πρώιμα αποτελέσματα μελέτης υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός τριών φαρμάκων μπορεί να βελτιώσει την έκβαση σε ασθενείς με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό πολλαπλούν μυέλωμα[40]. Το νέο θεραπευτικό σχήμα αποτελείται από τον στάνταρντ συνδυασμό του bortezomib και dexamethasone συν προσθήκη του νέου παράγοντα daratumumab. Το τριπλό σχήμα μείωσε το ρίσκο προόδου νόσου κατά 70% σε σύγκριση με τον στάνταρντ συνδυασμό. Επίσης, με τον τριπλό συνδυασμό αυξήθηκε το ποσοστό των μερικών ανταποκρίσεων από 29% σε 59%, και το ποσοστό των ολικών ανταποκρίσεων από 9% σε 19%. Οι παρενέργειες ήταν γενικά

παρόμοιες μεταξύ των δύο σχημάτων. Πάντως, χαμηλά αιμοπετάλια, περιφερική νευροπάθεια, διάρροια και αναιμία ήταν πιο συχνά στην ομάδα του τριπλού συνδυασμού.

Το daratumumab είναι μία από τις πρώτες αντικαρκινικές θεραπείες με δύο τρόπους δράσεις: μπορεί να εξουδετερώσει απευθείας τα καρκινικά κύτταρα και να προτρέψει το ανοσοποιητικό σύστημα να επιτεθεί στον καρκίνο. Βάσει των αποτελεσμάτων, ο FDA ενέκρινε το daratumumab στην αντιμετώπιση του πολλαπλούν μυελώματος το 2015.

Απαιτείται μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας παρακολούθηση των ασθενών ώστε να προσδιοριστεί εάν η προσθήκη του daratumumab βοηθά στην αύξηση της επιβίωσης. Εν τω άμα, βρίσκεται σε εξέλιξη μια κλινική μελέτη για το daratumumab σε συνδυασμό με διαφορετικό στάνταρντ θεραπευτικό σχήμα σε ασθενείς με υποτροπιάζων πολλαπλούν μυέλωμα (Clinical Trials.gov identifier: NCT01615029). Σε εξέλιξη βρίσκονται και άλλες μελέτες για την διερεύνηση διαφορών σχημάτων με βάση το daratumumab σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα που δεν έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02252172 και NCT02195479).

Νέα τάξη στοχευμένων θεραπειών στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Το 2016 δημοσιεύθηκαν νεότερα δεδομένα από μεγάλη κλινική μελέτη για μια νέα στοχευμένη θεραπεία στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού: το palbociclib[41]. Το palbociclib είναι ένα χάπι το οποίο μπλοκάρει δύο μόρια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του καρκίνου του μαστού στην ορμονοθεραπεία: το CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) και το CDK6 (cyclin –dependent kinase 6). Οι αναστολείς των CDK4/6 είναι μια νέα τάξη στοχευμένων θεραπειών που μπορεί να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου στο μέλλον.

Στη μελέτη συμμετείχαν γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και αρνητικό HER2, οι οποίες είχαν πρόοδο νόσου με την προηγούμενη ορμονοθεραπεία. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν palbociclib συν στάνταρντ ορμονοθεραπεία (π.χ. fulvestrant) ή placebo συν fulvestrant. Η προσθήκη του palbociclib στην ορμονοθεραπεία διπλασίασε σχεδόν το μέσο χρόνο έως προόδου νόσου, σε 9.5 μήνες σε σύγκριση με 4.6 μήνες για το fulvestrant συν placebo. Περίπου τα δύο τρίτα των γυναικών είχαν κλινικό όφελος από το σχήμα με το palbociclib ενώ στο ένα τέταρτο των ασθενών παρατηρήθηκε συρρίκνωση του όγκου. Το όφελος του palbociclib παρατηρήθηκε ανεξάρτητα από το βαθμό της ανθεκτικότητας στην ορμονοθεραπεία, το επίπεδο των ορμονικών υποδοχέων και το επίπεδο μεταλλάξεων του PIK2CA. Το ποσοστό των σοβαρών παρενεργειών ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα που έλαβε το palbociclib (73% v 22%). Οι πιο συχνές παρενέργειες ήταν οι χαμηλές αιματολογικές αναλύσεις (ουδετεροπενία, αναιμία, λευκοπενία).

Το palbociclib έχει επίσης διερευνηθεί ως αρχική θεραπεία στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού σε συνδυασμό με ορμονοθεραπεία. Σε μια μεγάλη μελέτη, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού, με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων και αρνητικό HER2 έλαβαν είτε letrozole συν placebo ή letrozole συν palbociclib. Το palbociclib αύξησε το χρόνο έως προόδου νόσου από 14 μήνες σε 25 μήνες[42]. Οι παρενέργειες του σχήματος palbociclib συν letrozole ήταν παρόμοιες με αυτές που έχουν καταγραφεί για το palbociclib σε συνδυασμό με fulvestrant π.χ. χαμηλές αιματολογικές μετρήσεις, κόπωση και ναυτία.

Σε μια άλλη μελέτη, για 1^{ης} γραμμής θεραπεία στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού, με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε letrozole συν placebo ή letrozole συν ribociclib, έναν αναστολέα του CDK4/6[43]. Στη μελέτη το ribociclib επιβράδυνε ουσιαστικά την πρόοδο της νόσου. Μετά από 18 μήνες, το 63% των ασθενών στην ομάδα με το ribociclib δεν είχε πρόοδο νόσου σε σύγκριση με το 42% των ασθενών στην ομάδα placebo. Τα κλινικά αποτελέσματα και οι παρενέργειες για το ribociclib και το palbociclib ήταν σχεδόν πανομοιότυπα.

Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν το ribociclib ή το palbociclib θα αυξήσει την ολική επιβίωση διότι αφενός το χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών δεν ήταν επαρκές αλλά και κανένας βιοδείκτης δεν μπόρεσε να προβλέψει ποιος θα ωφεληθεί ή όχι από την προσθήκη αυτών των φαρμάκων.

Πάντως, αυτά τα ευρήματα έχουν ήδη αλλάξει την στάνταρντ αντιμετώπιση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς. Ο FDA ενέκρινε το palbociclib συν fulvestrant για γυναίκες με πρόοδο νόσου μετά από ορμονοθεραπεία, τον Φεβρουάριο του 2016[44]. Το palbociclib είχε ήδη εγκριθεί σε συνδυασμό με το letrozole ως αρχική ορμονοθεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων και αρνητικό HER2.

Πιο αποτελεσματικές θεραπείες στον προχωρημένο καρκίνο του νεφρού. Οι εξελίξεις στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου του νεφρού οδήγησαν στην ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν δύο μοριακά μονοπάτια: το VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) και το mTOR (mammalin target of rapamycin). Οι θεραπείες αυτές, εισαχθείσες προς δεκαετίας περίπου, παρέτειναν την μέση επιβίωση από 1 σε 3 έτη σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του νεφρού. Η τρέχουσα στάνταρντ θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με υποτροπιάζων, προχωρημένο καρκίνο του νεφρού περιλαμβάνει τους αναστολείς του VEGFR, axitinib και sorafenib και τον αναστολέα του mTOR, everolimus.

Το 2016, ευρήματα από μια μεγάλη μελέτη υπέδειξαν μια πιο αποτελεσματική στοχευμένη θεραπεία για τον υποτροπιάζοντα καρκίνο του νεφρού[45].Το cabozantinib είναι μια θεραπεία από το στόμα, η οποία μπλοκάρει διαφορετικούς στόχους στα καρκινικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένου των τυροσινικών κινασών MET, VEGFR2 και AXL. Η μέση συνολική επιβίωση ήταν 16.5 μήνες στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν το στάνταρντ παράγοντα everolimus έναντι 21.4 μήνες για την ομάδα που έλαβε το cabozantinib. Οι ασθενείς που έλαβαν το cabozantinib είχαν χαμηλότερο ρίσκο για πρόοδο νόσου κατά 49% και σημαντικά υψηλότερα ποσοστά συρρίκνωσης του όγκου (17% v 3%). Σοβαρές παρενέργειες που καταγράφηκαν πιο συχνά στην ομάδα με το cabozantinib σε σύγκριση με το everolimus, περιελάμβαναν υπέρταση, διάρροια και κόπωση. Η αναιμία ήταν πιο συχνή στην ομάδα του everolimus. Βάσει αυτών των ευρημάτων, ο FDA ενέκρινε το cabozantinib για τη θεραπεία σθενών με προχωρημένο καρκίνο του νεφρού που έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία με αναστολέα VEGFR[46].

Δύο άλλες μεγάλες μελέτες διερεύνησαν αναστολείς του VEGFR σε ασθενείς με προχωρημένο, μη μεταστατικό, καρκίνο του νεφρού με υψηλό ρίσκο υποτροπής μετεγχειρητικά. Παρότι το 40% των ασθενών με καρκίνο του νεφρού σταδίου III υποτροπιάζει μετεγχειρητικά[47], δεν υπάρχει στάνταρντ θεραπεία αντιμετώπισης αυτών των ασθενών, η δε στάνταρντ μετεγχειρητική στρατηγική είναι η παρακολούθηση.

Στη μελέτη S-TRAC (Sunitinib Treatment of Renal Adjuvant Cancer), ασθενείς με διαυγοκυτταρικό καρκίνο του νεφρού σταδίου III τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν sunitinib ή placebo μετεγχειρητικά[48]. Το χρονικό διάστημα έως προόδου νόσου ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στην ομάδα του sunitinib (μέσος χρόνος 6.8 έτη)σε σύγκριση με την ομάδα placebo (μέσος χρόνος 5.6 έτη). Το ποσοστό παρενεργειών όπως δερματικό εξάνθημα, υπέρταση και κόπωση, ήταν υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών που έλαβε sunitinib σε σύγκριση με την ομάδα placebo (63% v 22%). Παρότι αυτά τα ευρήματα είναι ενθαρρυντικά, απαιτείται μεγαλύτερης διάρκειας παρακολού-θηση για να προσδιοριστεί το εάν το sunitinib παρατείνει την επιβίωση σε αυτούς τους ασθενείς.

Αντίθετα, σε μια πολύ μεγαλύτερη μελέτη, την ASSURE (Adjuvant Sorafenib or Sunitinib for Unfavorable Renal Carcinoma, EGOG-ACRIN E2805), δεν αναφέρθηκε καμία σημαντική διαφορά στην χρονική διάρκεια της επιβίωσης ελεύθερης νόσου μεταξύ των ασθενών που έλαβαν placebo (μέσος χρόνος 6.6 έτη), sunitinib (μέσος χρόνος 5.8 έτη) ή sorafenib (μέσος χρόνος 6.1 έτη) μετά το χειρουργείο[49]. Οι πιο συνήθεις παρενέργειες στις ομάδες που έλαβαν sunitinib και sorafenib ήταν η υπέρταση, σύνδρομο παλαμών–πελμάτων, εξάνθημα και κόπωση. Πέντε ασθενείς απεβίωσαν λόγω θεραπείας: ένας στην ομάδα του sorafenib και τέσσερις στην ομάδα του sunitinib. Οι υπεύθυνοι της μελέτης συμπέραναν ότι αμφότερα το sorafenib και το sunitinib δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως επικουρική θεραπεία στον προχωρημένο καρκίνο του νεφρού, υψηλού ρίσκου.

Δεν θα πρέπει να γίνεται επικουρική χρήση των αναστολέων VEGFR στην κλινική πρακτικά έως ότου γίνουν διαθέσιμα συμπληρωματικά δεδομένα που να διευθετούν τα διαφορετικά αποτελέσματα των δύο προαναφερόμενων μελετών.

Υποσχόμενη θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών. Με επιβίωση της τάξεως των 12-18 μηνών, οι ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών έχουν άμεση ανάγκη για καλύτερες θεραπείες. Αποτελέσματα μελέτης που δημοσιεύτηκαν το 2016, υποδεικνύουν μια νέα προσέγγιση αυτού του δύσκολα αντιμετωπίσιμου καρκίνου[50]. Σε μια μελέτη, πρώιμου σταδίου, τέσσερις από τις 10 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, θετικό στον folate receptor-α και ανθεκτικό στην στάνταρντ χημειοθεραπεία με πλατίνα, παρουσίασαν συρρίκνωση του όγκου μετά την χορήγηση του IMGN853 (mirvetuximab soravtansine). Οι πιο συνήθεις παρενέργειες ήταν διάρροια, οφθαλμικά προβλήματα, βήχας, κόπωση και μειωμένη όρεξη.

Το IMGN853 ανήκει σε μια νέα κατηγορία αντικαρκινικών θεραπειών γνωστής ως ADCs. Εμπεριέχει ένα αντίσωμα που στοχεύει τον folate receptor-α (ένας δείκτης που συναντάται στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών) και ένα δραστικό αντικαρκινικό φάρμακο το DM4, το οποίο μπλοκάρει την κυτταρική διαίρεση και αύξηση. Υπό εξέλιξη βρίσκονται και άλλες κλινικές μελέτες με το IMGN853 σε γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών, με θετικό folate receptor-α (ClinicalTrials.gov identifiers : NCT02631876 & NCT02606305).

Συνδυασμός θεραπευτικών προσεγγίσεων

Οι ογκολογικοί ασθενείς υποβάλλονται σε δύο και περισσότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά την διάρκεια της νόσου τους. Τέτοιες συνδυασμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν βελτιωμένα αποτελέσματα συγκριτικά με την κάθε προσέγγιση ξεχωριστά, όμως αυτή η βελτίωση συνοδεύεται συνήθως και από αύξηση των παρενεργειών. Όπως με όλες τις νέες προσέγγισες, τα οφέλη και η ασφάλεια τους αξιολογούνται στα πλαίσια κλινικών μελετών έναντι της στάνταρντ προσέγγισης, προτού να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πρακτική. Κατά το 2016, μελέτες σημείωσαν σημαντικές εξελίξεις με συνδυασμούς θεραπευτικών προσεγγίσεων στο γλοίωμα και στον καρκίνο του παχέως εντέρου.

Η προσθήκη χημειοθεραπείας στην ακτινοθεραπεία παρατείνει την επιβίωση ασθενών με γλοίωμα. Το γλοίωμα grade 2 είναι σπάνιο, αποτελώντας το 5-10% όλων των καρκίνων του εγκεφάλου και συνήθως συναντάται σε νεότερα άτομα. Παρότι τα γλοιώματα χαμηλού grade εξελίσσονται με αργό ρυθμό σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου του εγκεφάλου, οδηγούν σε επιδείνωση των νευρολογικών συμπτωμάτων και συχνά σε πρόωρο θάνατο.

Σε μελέτη[51], ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να υποβληθούν σε ακτινοθεραπεία ή σε ακτινοθεραπεία ακολουθούμενη από χημειο-θεραπεία (PCV, procarbazine, CCNU, vincristine). Η μέση επιβίωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη μεταξύ των ασθενών με τη συνδυασμένη θεραπεία (13.3 έτη) συγκριτικά με αυτή των ασθενών που έλαβαν μόνο ακτινοθεραπεία (7.8 έτη). Η προσθήκη της χημειοθεραπείας επίσης επιβράδυνε την πορεία της νόσου: στην 10ετία, μόνο το 21% των ασθενών αυτής της ομάδας είχε πρόοδο νόσου. Αντίθετα, στην ομάδα που έλαβε μόνο ακτινοθεραπεία το 51% των ασθενών παρουσίασε πρόοδο νόσου.

Θέση του όγκου στο παχύ έντερο: Ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη στις θεραπευτικές αποφάσεις. Ένας απρόσμενος παράγοντας μπορεί να βοηθήσει στην εξήγηση του γιατί κάποιοι ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου έχουν καλύτερα αποτελέσματα από κάποιους άλλους. Σύμφωνα με ανάλυση των δεδομένων μιας μεγάλης μελέτης, ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέως εντέρου έχουν αυξημένη επιβίωση εάν η νόσος ξεκινά από την αριστερή πλευρά του εντέρου σε σύγκριση με τη δεξιά πλευρά[52].

Στη μελέτη, οι ασθενείς έλαβαν FOLFOX (fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin) ή FOLFIRI (fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin) μαζί με μία από τις στάνταρντ στοχευμένες θεραπείες στον προχωρημένο καρκίνο του παχέως εντέρου: cetuximab ή bevacizumab. Σε προηγούμενες μελέτες, τα δύο θεραπευτικά σχήματα είχαν παρόμοια αποτελέσματα. Σε αυτή τη μελέτη, η μέση επιβίωση για τους ασθενείς με όγκους στην αριστερή πλευρά

ήταν 33 μήνες και μόνο 19 μήνες για τους ασθενείς με όγκους στην δεξιά πλευρά.

Μια περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων από δύο άλλες μελέτες επίσης αναφέρει ότι η επιβίωση ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του παχέως εντέρου που ξεκινούσε από την αριστερή πλευρά ήταν υψηλότερη από αυτούς που οι όγκοι ξεκινούσαν στη δεξιά πλευρά[53]. Μεταξύ των ασθενών με τους όγκους στην αριστερή πλευρά, ο συνδυασμός cetuximab και FOLFIRI ήταν πιο αποτελεσματικός από τον συνδυασμό bevacizumab και FOLFIRI, ενώ οι ασθενείς με όγκους στη δεξιά πλευρά είχαν περιορισμένα οφέλη από έκαστο συνδυασμό.

Προς το παρόν, τα ευρήματα αυτών των μελετών υποδεικνύουν ότι στις θεραπευτικές αποφάσεις για ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέως εντέρου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η θέση του πρωτοπαθούς όγκου. Για ασθενείς με καρκίνους παχέως εντέρου στην δεξιά πλευρά, το cetuximab μπορεί να μην έχει κάποιο όφελος. Πάντως, για τους ασθενείς που ο πρωτοπαθής όγκος εμφανίζεται στο αριστερό κόλον, το σχήματα με βάση το bevacizumab ή το cetuximab είναι αποτελεσματικά, με το cetuximab να φαίνεται ότι επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα όταν συνδυάζεται με την χημειοθεραπεία.

Τέλος, μια ανάλυση δεδομένων από 66 κλινικές μελέτες και πάνω από 1.4 εκατομμύρια ασθενείς, αναφέρει ότι οι ασθενείς με πρωτοπαθή εστία στην αριστερή πλευρά σχετίστηκαν με καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς με πρωτοπαθή εστία στην δεξιά πλευρά του εντέρου, ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου[54]. Συνολικά, οι ασθενείς με όγκους στην αριστερή πλευρά είχαν 20% χαμηλότερο ρίσκο θανάτου. Αυτή η ανάλυση υποδεικνύει ότι η θέση της πρωτοπαθούς εστίας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν καθορίζεται η πρόγνωση και ο σχεδιασμός μελλοντικών κλινικών μελετών σε αμφότερους πρώιμους και προχωρημένους καρκίνους του παχέως εντέρου.

Χημειοθεραπεία

Κατά το 2016, πραγματοποιήθηκαν σημαντικές εξελίξεις στη χημειοθεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος και της λευχαιμίας.

Καρκίνος του παγκρέατος: Ο συνδυασμός δύο φαρμάκων αυξάνει την πιθανότητα παράτασης της επιβίωσης. Ο καρκίνος του παγκρέατος συνήθως διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο και μόνο το 29% των ασθενών επιβιώνουν ένα έτος μετά τη διάγνωση. Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται σχετικά νωρίς ώστε να υποβληθούν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου έχουν μια πιθανότητα για αύξηση της επιβίωσης τους. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, η στάνταρντ αντιμετώπιση του χειρουργηθέντος παγκρεατικού καρκίνου είναι η χημειοθεραπεία με γεμσιταβίνη, της οποίας όμως τα οφέλη είναι σχετικά μέτρια, με μόνο το 20% των ασθενών να επιβιώνουν στην 5ετία.

Μια πρόσφατη μελέτη, αναφέρει ότι η προσθήκη δεύτερου χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, της καπεσιταμπίνης, στη γεμσιταβίνη μπορεί να βοηθήσει στην παράταση της επιβίωσης αυτών των ασθενών[55]. Στη μελέτη, η μέση επιβίωση ήταν 28 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν τον συνδυασμό και 25.5 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν τη γεμσιταβίνη μόνο της. Παρά τη μικρή διαφορά στη μέση επιβίωση, η προσθήκη της καπεσιταμπίνης αύξησε την πιθανότητα επιβίωσης στην 5ετία από 16% σε 29%.

Τα αποτελέσματα της μελέτης όρισαν ένα νέο στάνταρντ θεραπευτικής προσέγγισης για την χρήση της γεμσιταβίνης μαζί με την καπεσιταμπίνη ως επικουρική θεραπεία στον καρκίνο του παγκρέατος. Η γεμσιταβίνη και η καπεσιταμπίνη έχουν εγκριθεί από τον FDA για διάφορους τύπους καρκίνου και είναι διαθέσιμα και ως γενόσημα.

Ο συνδυασμός ήταν συνολικά καλά ανεκτός, χωρίς σημαντική αύξηση των παρενεργειών συγκριτικά με την γεμσιταβίνη μόνη της. Η ασφάλεια του συνδυασμού επιτρέπει την πιθανότητα προσθήκης και άλλων παραγόντων σε αυτό το σχήμα με σκοπό την περαιτέρω βελτίωση του οφέλους του ασθενούς.

Παράταση της επιβίωσης ασθενών με υψηλού ρίσκου οξεία μυελοειδή λευχαιμία (ΟΜΛ). Με την τρέχουσα θεραπεία, οι ασθενείς με ΟΜΛ επιβιώνουν για μόνο 6 μήνες μετά τη διάγνωση. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει υπάρξει ελάχιστη βελτίωση στην επιβίωση αυτών των ασθενών όμως οι εξελίξεις του τελευταίου έτους αφορούν μια υποσχόμενη στοχευμένη θεραπεία (αναφέρεται στην Στοχευμένη θεραπεία) αλλά και ένα

βελτιωμένο χημειοθεραπευτικό σχήμα[56] για την αντιμετώπιση αυτών των ασθενών.

Το νέο φάρμακο ονομάζεται CPX-351 και εμπεριέχει cytarabine και daunorubicin σε ένα λιπόσωμα, το οποίο βοηθά τη χημειοθεραπεία να φθάνει μέσα στα καρκινικά κύτταρα. Το CPX-351 δοκιμάστηκε σε μια μελέτη ηλικιωμένων ασθενών, νεοδιαγνωσθέντες με δευτερογενή ΟΜΛ. Η δευτερογενής ΟΜΛ εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της θεραπείας άλλου καρκίνου ή λόγω περιβαλλοντολογικής έκθεσης σε ακτινοβολία ή δεδομένα χημικά.

Στη μελέτη, οι ασθενείς που έλαβαν το CPX-351 επιβίωσαν σχεδόν 4 μήνες περισσότερο (μέση επιβίωση 10 μήνες) από τους ασθενείς που έλαβαν τη στάνταρντ συνδυασμένη χημειοθεραπεία (μέση επιβίωση 6 μήνες) με τα ίδια φάρμακα. Στην διετία, το 31% των ασθενών της ομάδας που έλαβε το CPX-351 επιβίωναν σε σύγκριση με το 12% των ασθενών που έλαβαν τη στάνταρντ χημειοθεραπεία. Δεν υπήρχαν διαφορές στις παρενέργειες μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών.

Τα ευρήματα αυτά αντιπροσωπεύουν μια πολυαναμενόμενη εξέλιξη στη θεραπεία ηλικιωμένων ασθενών με υψηλού ρίσκου ή δευτερογενή ΟΜΛ. Ο FDA ανέδειξε το CPX-351 ως μια καινοτόμα θεραπεία στην αντιμετώπιση της ΟΜΛ.

Νέα δεδομένα για την λαπαροσκοπική του καρκίνου του ορθού

Τα τελευταία χρόνια, η λαπαροσκοπική χειρουργική έχει αναδειχθεί ως μια θελκτική εναλλακτική της κλασσικής χειρουργικής λόγω του μικρότερου χρόνου ανάρρωσης και των χαμηλότερων ποσοστών επιπλοκών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια κάμερας και εργαλείων που εισέρχονται μέσω μικρών τομών στην κοιλιακή χώρα.

Ασθενείς με πρώιμο και τοπικά προχωρημένο καρκίνο του ορθού μπορούν να ιαθούν μέσω του χειρουργείου με την προϋπόθεση της πλήρους αφαίρεσης της κακοήθειας. Πάντως, η επιλογή μεταξύ ανοικτού και λαπαροσκοπικού χειρουργείου δεν είναι εύκολη για αυτούς τους ασθενείς. Οι ειδικοί έχουν εκφράσει ανησυχίες αναφορικά με το εάν το λαπαροσκοπικό χειρουργείο μπορεί να αφαιρεί όλο τον όγκο όπως γίνεται με το ανοικτό χειρουργείο. Κατ΄ επέκταση οι ασθενείς που υποβάλλονται σε λαπαροσκοπική μπορεί να έχουν αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και κατ' επέκταση μικρότερη επιβίωση.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, τα ποσοστά της χειρουργικής επιτυχίας (π.χ. ολική αφαίρεση του όγκου) ήταν ουσιαστικά χαμηλότερα στους ασθενείς με καρκίνο του ορθού που υποβλήθηκαν σε λαπαροσκοπικό χειρουργείο συγκριτικά με αυτούς που υποβλήθηκαν σε ανοικτό χειρουργείο (82% v 87%)[57]. Παρόμοιες τάσεις παρατηρήθηκαν και σε μια άλλη μεγάλη μελέτη όπου επιτυχές χειρουργείο πραγματοποιήθηκε στο 82% των ασθενών που υποβληθήκαν σε λαπαροσκοπική και στο 89% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε ανοικτό χειουργείο[58].

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τις ανησυχίες ότι το λαπαροσκοπικό χειρουργείο μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερες υποτροπές και μειωμένη επιβίωση. Οι ασθενείς που συμμετείχαν σε αυτές τις μελέτες θα συνεχίσουν να παρακολουθούνται ώστε να απαντηθεί αυτό το ερώτημα. Εν τω άμα, η τακτική χρήση της λαπαροσκοπικής σε ασθενείς σταδίου ΙΙ ή ΙΙΙ καρκίνου του ορθού δεν συστήνεται. Αντίθετα η λαπαροσκοπική είναι μια αποδεκτή διαδικασία για ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου.

Η παρατεταμένη ορμονοθεραπεία μειώνει περαιτέρω το ρίσκο υποτροπής στον καρκίνο του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να υποτροπιάσει πολλά χρόνια μετά αφότου μια ασθενής ολοκληρώσει την θεραπεία της για καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς. Για να μειωθεί η πιθανότητα υποτροπής, πολλές ασθενείς λαμβάνουν ορμονοθεραπεία μετεγχειρητικά. Το 2016, αποτελέσματα μελέτης αναφέρουν ότι η παρατεταμένη χρήση των αναστολέων αρωματάσης από την στάνταρντ διάρκεια των 5 ετών σε 10 έτη μπορεί να μειώσει περαιτέρω το ρίσκο της υποτροπής[59].

Στη μελέτη συμμετείχαν μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού, οι οποίες είχαν ολοκληρώσει την 5ετή αγωγή με αναστολέα αρωματάσης ως 1ης γραμμής θεραπεία ή μετά από ταμοξιφαίνη. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν τον

αναστολέα αρωματάσης λετροζόλη για 5 επιπλέον χρόνια ή placebo.

Η πιθανότητα υποτροπής ή εμφάνισης δεύτερου καρκίνου στον άλλο μαστό ήταν 34% χαμηλότερη στην ομάδα της λετροζόλης συγκριτικά με την ομάδα placebo. Στη 5ετή παρακολούθηση, το 95% των γυναικών που έλαβαν λετροζόλη και το 91% των γυναικών της ομάδας placebo παρέμεναν ελεύθερες νόσου. Τα ποσοστά δεύτερων καρκίνων του μαστού ήταν χαμηλότερα στην ομάδα με τη λετροζόλη (0.2% v 0.5%). Η 5ετής επιβίωση δεν ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των δύο ομάδων (λετροζόλη 94% v placebo 93%).

Οι παρενέργειες της ορμονοθεραπείας είναι δύσκολα ανεκτές ιδιαίτερα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Παρότι στην ομάδα με την λετροζόλη τα οστικά άλγη, τα κατάγματα και η οστεοπόρωση ήταν πιο συχνά σε σχέση με την ομάδα placebo, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην συνολική ποιότητα ζωής ή στα συμπτώματα λόγω εμμηνόπαυσης.

Περαιτέρω, μια ξεχωριστή ανάλυση δεδομένων άνω των 45.000 ασθενών που παρακολουθούνταν για 15 χρόνια μετά την 5ετή λήψη ορμονοθεραπείας παρέχει μια πιο ακριβή αξιολόγηση του ρίσκου υποτροπής σύμφωνα με το αρχικό στάδιο, grade και κατάσταση λεμφαδένων[60]. Τα ευρήματα θα βοηθήσουν στις αποφάσεις για την συνέχιση της ορμονοθεραπείας μετά την 5ετία.

Αυτά τα ευρήματα είναι σημαντικά για εκατομμύρια γυναίκες που διαγιγνώσκονται κατ' έτος με καρκίνο του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και παρέχουν καθοδήγηση σε ιατρούς και ασθενείς για το εάν θα πρέπει να συνεχιστεί η ορμονοθεραπεία μετά το πέρας της στάνταρντ 5ετούς αγωγής, ιδιαίτερα στις ασθενείς που ανέχθηκαν καλά τη θεραπεία στην 5ετία.

ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Το μελάνωμα εξελίσσεται μέσω διαδοχικών γονιδιακών αλλαγών.

Οι προηγούμενες μελέτες για τις γονιδιακές μεταλλάξεις του μελανώματος συνήθως επικεντρώνονταν στο προχωρημένο στάδιο της νόσου με αποτέλεσμα να μην είναι καλά κατανοητή η σειρά με την οποία εμφανίζονται διακριτές γονιδιακές μεταλλάξεις καθώς το μελάνωμα εξελίσσεται από καλοήθεις δερματικές βλάβες. Η γνώση αυτών των γονιδιακών αλλαγών θα βελτίωναν τη διάγνωση και την πρόγνωση του μελανώματος.

Μια νέα ανάλυση 293 γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο σε 37 πρωτοπαθή μελανώματα και προκαρκινικές βλάβες, έδειξε ότι καθώς το μελάνωμα εμφανίζεται και εξελίσσεται εμφανίζονται διακριτές γονιδιακές αλλαγές με έναν σταδιακό τρόπο[61]. Για παράδειγμα, οι καλοήθεις δερματικοί όγκοι έχουν μόνο μεταλλάξεις στο BRAF V600E ενώ οι ενδιάμεσες προκαρκινικές βλάβες έχουν μεταλλάξεις και στο NRAS και σε άλλα γονίδια. Εξαλλαγές στο γονίδιο CDKN2A εμφανίζονταν αποκλειστικά σε διηθητικά μελανώματα ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια PTEN και TP53 εμφανίζονταν μόνο σε προχωρημένα μελανώματα.

Η μελέτη επίσης, επιβεβαίωσε ότι το υπεριώδες φως είναι ένας βασικός παράγοντας αμφότερα για την αρχική ανάπτυξη του μελανώματος και της εξέλιξης του από το αρχικό σε προχωρημένο στάδιο. Επίσης βρέθηκαν mutational υπογραφές στην έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία σε όλα τα στάδια, από τους καλοήθεις όγκους έως τα διηθητικά μελανώματα. Η συχνότητα των μεταλλάξεων σχετιζόμενων με την υπεριώδη ακτινοβολία αύξαναν καθώς αύξανε το στάδιο της νόσου. Τα ευρήματα της μελέτης δημιουργούν τη βάση για βελτίωση των κριτηρίων της διάγνωσης και πρόγνωσης του μελανώματος.

Επέκταση των θεραπευτικών επιλογών με εξατομικευμένες προσεγγίσεις

Κάθε ογκολογικός ασθενής με προχωρημένη νόσο θα φτάσει τελικά σε σημείο όπου δεν θα υπάρχουν άλλες αποτελεσματικές θεραπείες. Στην τρέχουσα εποχή των εξατομικευμένων θεραπειών, η μοριακή ανάλυση του όγκου φέρει συμπληρωματικές θεραπευτικές επιλογές για κάποιους από αυτούς τους ασθενείς.

Μια μελέτη υποστηρίζει τη χρήση της εκτεταμένης γονιδιακής ανάλυσης σε ασθενείς με δύσκολα αντιμετωπίσιμους καρκίνους. Στη μελέτη αναλύθηκαν 236 γονίδια από όγκους 300 και άνω ασθενών, με διαφορετικούς τύπους καρκίνου[62]. Μεταλλάξεις που μπορούν να στοχευθούν με υπάρχοντες παράγοντες (actionable mutations) βρέθηκαν σε όλους

σχεδόν τους ασθενείς (93%), και το 38% έλαβε θεραπεία σύμφωνα με την μετάλλαξη. Ασθενείς με περισσότερες τέτοιες μεταλλάξεις και ανάλογες θεραπείες είχαν πιο συχνές και μεγαλύτερης διάρκειας υφέσεις, καθώς και μεγαλύτερη επιβίωση.

Με μελέτη σε εξέλιξη χορηγεί σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο των οποίων τα προηγούμενα γονιδιακά τεστ έδειξαν ανωμαλίες σε δεδομένα μοριακά μονοπάτια, τις αντίστοιχες στοχευμένες θεραπείες[63]. Η αντιστοίχιση των θεραπειών είναι εκτός των εγκριθέντων ενδείξεων από τον FDA. Στη μελέτη παρατηρήθηκε συρρίκνωση των όγκων σε 29 (22%) από τους πρώτους 129 ασθενείς που εισήχθησαν στη μελέτη. Αυτοί οι ασθενείς είχαν 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

ΜΕ ΤΟ ΒΛΕΜΜΑ ΣΤΡΑΜΜΕΝΟ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Η υγρή βιοψία βοηθά στην εξατομίκευση της αντικαρκινικής θεραπείας. Σχεδόν κάθε ασθενής με υποψία κακοήθειας θα υποβληθεί σε βιοψία του όγκου, η οποία, ουσιαστικά, είναι η βασική μέθοδος με την οποία διαγιγνώσκονται οι περισσότεροι τύποι καρκίνου και προσδιορίζεται το grade ή το στάδιο τους. Σε κάποιες όμως περιπτώσεις, λόγω της θέσης του όγκου ή της γενικής κατάστασης υγείας του ασθενούς, δεν είναι δυνατή ή ασφαλής η πραγματοποίηση βιοψίας.

Επί δεκαετίες, γίνεται χρήση βιοδεικτών για την παρακολούθηση των ασθενών, όπως το CEA, CA125, CA15-3/CA27.29, CA19-9 και το PSA για τον καρκίνο του παχέως εντέρου, ωοθηκών, μαστού, παγκρέατος και προστάτη αντίστοιχα. Κατά τα τελευταία 15 χρόνια έχουν αναφερθεί διάφορες στρατηγικές ανίχνευσης και ανάλυσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και, πιο πρόσφατα, η ικανότητα καταμέτρησης κυκλοφορούντος δείγματος DNA. Αυτές οι προσεγγίσεις ονομάζονται υγρές βιοψίες και οι οποίες προσφέρουν, εύκολα, την δυνατότητα του προσδιορισμού αλλαγών στην επιβάρυνση του καρκίνου καθώς και στον γονότυπου και φαινότυπο του καρκίνου στο χρόνο.

Στην υγρή βιοψία, συλλέγεται το κυκλοφορούν DNA του όγκου από τα υγρά του σώματος και αναλύεται, παρέχοντας τις πληροφορίες εκείνες που θεωρούνται αντιπροσωπευτικές για την γονιδιακές αλλαγές του όγκου. Επειδή αυτές οι αλλαγές εξελίσσονται καθώς η νόσος εξαπλώνεται, οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διακοπή θεραπείας για την οποία αρχίζει να δημιουργείται ανθεκτικότητα, όπως γίνεται με τις κυκλοφορούντες πρωτεΐνες και τα καρκινικά κύτταρα ή για αλλαγή της θεραπείας, σύμφωνη με την διαφορετική μετάλλαξη όπως αυτή εμφανίζεται πλέον.

Ακόμα και για τους ασθενείς που υποβάλλονται στην κλασσική βιοψία, η υγρή βιοψία μπορεί να είναι πιο ασφαλής, γρήγορη και βολική, και πιθανά πιο διαφωτιστική, π.χ. η βιοψία αντιπροσωπεύει ένα τμήμα του όγκου, όμως μελέτες για την ετερογένεια του όγκου αναφέρουν ότι διαφορετικά τμήματα του όγκου στον ίδιο ασθενή μπορεί να έχουν διαφορετικούς γονότυπος και φαινότυπους. Έτσι, μια υγρή βιοψία μπορεί να δώσει μια ολοκληρωμένη εικόνα της σύστασης του όγκου και όχι μόνο πληροφορίες από την θέση όπου έγινε η βιοψία με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται κάποιες σημαντικές μεταλλάξεις. Αλλά και στην περίπτωση της υγρής βιοψίας μπορεί να μην ανιχνευθούν βασικές μεταλλάξεις, οι οποίες ανιχνεύονται με την κλασσική βιοψία.

Η υγρή βιοψία βοηθά στις θεραπευτικές αποφάσεις για τον καρκίνο του πνεύμονος. Ένα τεστ υγρής βιοψίας ήδη χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονος ενώ άλλα βρίσκονται υπό εξέλιξη μέσω χρήσης διαφόρων τεχνολογιών. Το τεστ διερευνά το κυκλοφορούν DNA του όγκου στο αίμα για μια δεδομένη μετάλλαξη στο γονίδιο EGFR, την T790M. Η μετάλλαξη αυτή συναντάται στο 60% των ασθενών που θα παρουσιάσουν ανθεκτικότητα στις στοχευμένες θεραπείες έναντι του EGFR, afatinib, gefitinib και erlotinib. Είναι σημαντική η γνώση αυτής της μετάλλαξης διότι υπάρχουν ήδη διαθέσιμες θεραπείες (π.χ. osimertinib, rociletinib) που στοχεύουν αυτή την γονιδιακή αλλαγή. Πάντως, οι ασθενείς που δεν έχουν αυτή την μετάλλαξη δεν θα πρέπει να λαμβάνουν τέτοιες θεραπείες διότι είναι λιγότερο αποτελεσματικές σε όγκους, αρνητικούς σε T790M.

Η διερεύνηση της μετάλλαξης T790M πλέον συστήνεται για όλους τους ασθενείς με ΜΜΚΠ, με θετικό EGFR που παρουσιάζουν πρόοδο νόσου παρά τη θεραπεία έναντι του EGFR.

Ωστόσο, πολλοί ασθενείς δεν μπορούν να υποβληθούν στο τεστ λόγω μη προσβάσιμης θέσης του όγκου, ανεπαρκούς δείγματος ιστού ή για λόγους ασφαλείας λόγω της γενικότερης υγείας του ασθενούς. Για αυτούς τους ασθενείς είναι πλέον διαθέσιμη η υγρή βιοψία. Το τεστ γνωστό ως cobas EGFR Mutation Test v2, εγκρίθηκε από τον FDA το 2015 για να αναγνωρίζει τους ασθενείς που μπορούν να ωφεληθούν από το osimertinib[64].

Το 2016, εγκρίθηκε και η χρήση του ως συγκριτικό διαγνωστικό μέσο για την αναγνώριση ασθενών με διαφορετικό τύπο μετάλλαξης του EGFR, οι οποίοι μπορεί να ωφεληθούν από αρχική θεραπεία με το erlotinib[65]. Σε μια πρώιμη μελέτη, η υγρή βιοψία ανεγνώρισε έξι από τους δέκα ασθενείς θετικούς στο T790M[66].

Εν τω άμα διερευνούνται και άλλα τεστ υγρής βιοψίας για ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονος. Ένα τεστ που χρησιμοποιεί την τεχνική BEAMing αναγνώρισε επτά από τους δέκα ασθενείς να έχουν αυτή την μετάλλαξη[67]. Ένα άλλο τεστ που χρησιμοποιεί τη μέθοδο droplet digital polymerase chain reaction αναγνώρισε οκτώ από τους δέκα ασθενείς με όγκους θετικούς στην T790M[68]. Το τεστ αυτό μπορεί επίσης να ανιχνεύει και άλλες μεταλλάξεις του EGFR καθώς και του KRAS.

Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι η ανταπόκριση στο rociletinib, το οποίο στοχεύει το EGFR, ήταν παρόμοια ανεξάρτητα από το αν η κατάσταση του T790M ανιχνεύθηκε μέσω κλασσικής βιοψίας ή υγρής βιοψίας αίματος ή ούρων. Για την ανάλυση του αίματος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική BEAMing ενώ για την ανάλυση ούρων η τεχνική short footprinting. Η ανάλυση των ούρων και του αίματος ανίχνευσε αρκετές περιπτώσεις με θετικό T790M, τις οποίες δεν ανίχνευσε η βιοψία ιστού[69,70].

Οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν ότι η ακρίβεια της μοριακής ανάλυσης δειγμάτων αίματος ή ούρων είναι υψηλή και ότι τέτοιες αναλύσεις προβλέπουν την έκβαση της θεραπείας με EGFR παρόμοια με τις αντίστοιχες της κλασσικής βιοψίας[67,71]. Επίσης, πρώιμα αποτελέσματα αναφέρουν ότι ανεξάρτητα του τρόπου με τον οποίο ανιχνεύεται η T790M, οι ασθενείς ανταποκρίνονται στο osimertinib και το rociletinib εξίσου καλά.

Πάντως, μια αρνητική υγρή βιοψία δεν είναι τόσο αξιόπιστη όσο μια αρνητική βιοψία ιστού. Για αυτό, όποτε είναι δυνατό, ασθενείς με αρνητική εξέταση αίματος ή ούρων θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλασσική βιοψία για επιβεβαίωση.

Η υγρή βιοψία μπορεί να επιφέρει νέες στοχευμένες θεραπευτικές επιλογές. Άλλο ένα τεστ υγρής βιοψίας αναφέρθηκε κατά το 2016, το οποίο μπορεί, με ακρίβεια και γρήγορα να αναλύσει δείγματα αίματος για ένα ευρύ πάνελ γονιδιακών αλλαγών συμπεριλαμβανομένου και του EGFR T790M[72]. Μια ανάλυση δειγμάτων αίματος από 15.000 ασθενείς με 50 διαφορετικούς τύπους καρκίνου έδειξε ότι τα πρότυπα των γονιδιακών αλλαγών στο κυκλοφορών DNA του όγκου ήταν παρόμοιες με αυτές του όγκου.

Η ανάλυση αίματος ανίχνευσε το 94% έως το 100% των αλλαγών στα γονίδια EGFR, BRAF, KRAS, ALK, RET και ROS1 οι οποίες είχαν ανιχνευθεί προηγουμένως στην βιοψία του όγκου των ίδιων ασθενών. Επίσης, παρείχε καθοδήγηση για στοχευμένη θεραπεία που θα μπορούσε να αντιστοιχιστεί με τις γονιδιακές αλλαγές που ανιχνεύθηκαν στο κυκλοφορών DNA του όγκου. Τέτοιες συμπληρωματικές θεραπευτικές επιλογές αναγνωρίστηκαν για τα δύο τρίτα περίπου των ασθενών, οι οποίοι είχαν ανεπαρκές δείγμα ιστού για βιοψία.

Η υγρή βιοψία προβλέπει την υποτροπή στον καρκίνο του παχέως εντέρου. Το 2016, προτάθηκε μια εντελώς διαφορετική χρήση των υγρών βιοψιών. Σύμφωνα με μια μεγάλη μελέτη, η ανίχνευση κυκλοφορούντος DNA του όγκου στο αίμα μπορεί επακριβώς να προβλέψει ποιοι ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου σταδίου II βρίσκονται σε ρίσκο για υποτροπή[73].

Η ανίχνευση του κυκλοφορούντος DNA του όγκου μετεγχειρητικά είναι μια ένδειξη ότι έχουν παραμείνει καρκινικά κύτταρα και αυτό θέτει τον ασθενή σε υψηλότερο ρίσκο υποτροπής.

Συνολικά, οι ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου σταδίου II έχουν χαμηλό ρίσκο υποτροπής και τέσσερις στους πέντε έχουν ιαθεί μόνο με χειρουργείο. Ασθενείς με υψηλό ρίσκο υποτροπής μπορεί να χρειάζονται συμπληρωματική θεραπεία μετά το χειρουργείο για να μειώσουν τις πιθανότητες

υποτροπής. Αυτό το νέο τεστ αίματος μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση περισσότερων ασθενών που μπορούν να ωφεληθούν από την χημειοθεραπεία μετά το χειρουργείο.
Στη μελέτη, το 80% περίπου των ασθενών, στους οποίους ανιχνεύθηκε κυκλοφορών DNA του όγκου στο αίμα μετά το χειρουργείο, υποτροπίασαν. Αντίθετα, μόλις το 10% των ασθενών με αρνητικά αποτελέσματα για παρουσία κυκλοφορούντος DNA όγκου, είχαν υποτροπή της νόσου. Αυτά τα ευρήματα αφορούν άνω των 300.000 ατόμων παγκοσμίως που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του παχέως εντέρου σταδίου ΙΙ κάθε χρόνο.

Διευρύνοντας τις επιλογές στοχευμένης θεραπείας στον καρκίνο των ωοθηκών

Οι ασθενείς με υποτροπιάζων καρκίνο των ωοθηκών έχουν περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές και η μέση επιβίωση είναι συνήθως 1-2 έτη από την διάγνωση. Οι στάνταρντ θεραπείες για τον υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών περιλαμβάνουν το bevacizumab, το οποίο επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου για περίπου 3 μήνες και μια νέα στοχευμένη θεραπεία, το olaparib. Το olaparib ήταν το πρώτο φάρμακο μιας νέας κατηγορίας στοχευμένης θεραπείας, το οποίο μπλοκάρει το PARP. Παρότι το olaparib είναι πιο αποτελεσματικό από το bevacizumab, έχει εγκριθεί μόνο για ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA, οι οποίες συναντώνται στο 10-15% των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών.
Το 2016, μελέτη αναφέρει ότι ένας διαφορετικός αναστολέας του PARP, το niraparib, είναι αποτελεσματικός σε ένα ευρύτερο φάσμα ασθενών με προχωρημένο, υποτροπιάζων καρκίνο των ωοθηκών[74]. Στη μελέτη συμμετείχαν δύο ομάδες ασθενών: ασθενείς με γαμετικές μεταλλάξεις στο BRCA και ασθενείς χωρίς αυτές τις μεταλλάξεις. Στην ομάδα των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις στο BRCA, υπήρχε μια υποομάδα ασθενών με μια άλλη ανωμαλία στην διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA, η οποία ονομάζεται homologous recombination DNA repair deficiency (HRD). Όλες οι ασθενείς είχαν ανταποκριθεί σε χημειοθεραπεία που εμπεριείχε πλατίνα.
Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν niraparib ή placebo. Το niraparib επιβράδυνε την εξέλιξη της νόσου σε όλες τις ομάδες των ασθενών, όμως ήταν πιο αποτελεσματικό στις ασθενείς με μεταλλάξεις στο BRCA. Σε αυτή την ομάδα, ο μέσος χρόνος έως προόδου νόσου ήταν 21 μήνες με το niraparib και 5.5 μήνες με το placebo. Μεταξύ των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις στο BRCA, υπήρχε πρόοδος νόσου μετά από μια μέση χρονική περίοδο της τάξεως των 9.3 μηνών με το niraparib σε σύγκριση με τους 3.9 μήνες με το placebo. Στην υποομάδα των ασθενών με HRD, ο μέσος χρόνος έως προόδου νόσου ήταν 12.9 μήνες με το niraparib και 3.8 μήνες με το placebo.
Οι πιο συχνές παρενέργειες του niraparib ήταν χαμηλές αιματολογικές μετρήσεις και αναιμία ενώ η ποιότητα ζωής που αναφέρθηκε ήταν συγκρίσιμη με αυτή του placebo.
Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα οφέλη του niraparib δεν περιορίζονται αυστηρά σε ασθενείς με γαμετικές μεταλλάξεις στο BRCA, επεκτείνοντας έτσι την πρόσβαση στους αναστολείς του PARP. Σε όποια περίπτωση χρειάζονται περαιτέρω μελέτες ώστε να προσδιοριστεί η πιο κατάλληλη στρατηγική για την χρήση των αναστολέων PARP σε αυτόν τον πληθυσμό.

REFERENCES

1. Ribas A, Hamid O, Daud A, et al: Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. JAMA 315:1600-1609, 2016
2. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, et al: Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. J Clin Oncol 32:1020-1030, 2014
3. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al: Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. J Clin Oncol 33:1889-1894, 2015
4. Postow M, Chesney J, Pavlick A, et al: Initial report of overall survival rates from a randomized phase II trial evaluating the combination of nivolumab (NIVO) and ipilimumab (IPI) in patients with advanced melanoma (MEL). Presented at the 107th

Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans, LA, April 16-20, 2016 (abstr CT002)

5. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, et al: Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy. N Engl J Med [epub ahead of print on October 7, 2016]
6. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al: Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. Lancet 387:1540-1550, 2016
7. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al: Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. N Engl J Med [epub ahead of print on October 8, 2016]
8. Socinski M, Creelan B, Hom L, et al: CheckMate 026: A phase 3 trial of nivolumab vs investigator's choice of platinum-based doublet chemotherapy as first-line therapy for stage IV/reccurrent programmed death ligand 1-positive NSCLC. Presented at the 2016 European Society for Medical Oncology, Copenhagen, Denmark, October 7-11, 2016 (abstr LBA7-PR)
9. US Food and Drug Administration: Atezolizumab (TECENTRIQ). http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm525780.htm
10. US Food and Drug Administration: Pembrolizumab (KEYTRUDA) checkpoint inhibitor. http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm526430.htm
11. US Food and Drug Administration: FDA approves new, targeted treatment for bladder cancer. http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm501762.htm
12. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al: Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum - based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancet 387:1909-1920, 2016
13. Business Wire: Merck's KEYNOTE-045 studying KEYTRUDA (pembrolizumab) in advanced bladder cancer (urothelial cancer) meets primary endpoint and stops early.http://www.businesswire.com/news/home/20161021005182/en/Merck%E2%80%99s-KEYNOTE-045-Studying-KEYTRUDA%C2%AE-pembrolizumab-Advanced-Bladder
14. Balar A, Bellmunt J, O'Donnell PH, et al: Pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for advanced/unresectable or metastatic urothelial cancer: Preliminary results from the phase 2 KEYNOTE-052 study. Presented at the 2016 European Society for Medical Oncology, Copenhagen, Denmark, October 7-11, 2016 (abstr LBA32-PR)
15. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al: Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med [epub ahead of print on October 8, 2016]
16. US Food and Drug Administration: Nivolumab for SCCHN. http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm528920.htm
17. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, et al: Safety and antitumor activity of anti-PD-1 antibody, nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer. J Clin Oncol 33:4015-4022, 2015
18. US Food and Drug Administration: Nivolumab (Opdivo) for Hodgkin lymphoma. http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm501412.htm
19. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, et al: PD-L1 and PD-L2 genetic alterations define classical Hodgkin lymphoma and predict outcome. J Clin Oncol 34:2690-2697, 2016
20. Younes A, Santoro A, Shipp M, et al: Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: A multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. Lancet Oncol 17:1283-1294, 2016
21. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, et al: Programmed death-1 blockade with pembrolizumab in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure. J Clin Oncol 34:3733-3739, 2016

22. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al: Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. N Engl J Med 375:819-829, 2016
23. Roberts SA, Gordenin DA: Hypermutation in human cancer genomes: Footprints and mechanisms. Nat Rev Cancer 14:786-800, 2014
24. Le DT, Uram JN, Wang H, et al: PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. N Engl J Med 372:2509-2520, 2015
25. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, et al: PD-1 blockade with pembrolizumab in advanced Merkel-cell carcinoma. N Engl J Med 374:2542-2552, 2016
26. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, et al: Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: A multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 17:1374-1385, 2016
27. Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P, et al: The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. Br J Cancer 91:1580-1590, 2004
28. Song H, Dicks E, Ramus SJ, et al: Contribution of germline mutations in the *RAD51B*, *RAD51C*, and *RAD51D* genes to ovarian cancer in the population. J Clin Oncol 33:2901-2907, 2015
29. Holter S, Borgida A, Dodd A, et al: Germline *BRCA* mutations in a large clinic-based cohort of patients with pancreatic adenocarcinoma. J Clin Oncol 33:3124-3129, 2015
30. Vasen H, Ibrahim I, Ponce CG, et al: Benefit of surveillance for pancreatic cancer in high-risk individuals: Outcome of long-term prospective follow-up studies from three European expert centers. J Clin Oncol 34:2010-2019, 2016
31. Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, et al: Identification of a variety of mutations in cancer predisposition genes in patients with suspected Lynch syndrome. Gastroenterology 149:604-613.e20, 2015
32. Chen AC, Martin AJ, Choy B, et al: A phase 3 randomized trial of nicotinamide for skin-cancer chemoprevention. N Engl J Med 373:1618-1626, 2015
33. National Cancer Institute: SEER stat fact sheets: Acute myeloid leukemia (AML). https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html
34. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, et al: The multi-kinase inhibitor midostaurin (M) prolongs survival compared with placebo (P) in combination with daunorubicin (D)/cytarabine (C) induction (ind), high-dose C consolidation (consol), and as maintenance (maint) therapy in newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) patients (pts) age 18-60 with FLT3 mutations (muts): An international prospective randomized (rand) P-controlled double-blind trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). Blood 126:6, 2015
35. National Cancer Institute: SEER stat fact sheets: Acute lymphocytic leukemia (ALL). https://seer.cancer.gov/statfacts/html/alyl.html
36. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, et al: Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 375:740-753, 2016
37. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, et al: Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: A single-group, multicentre, phase 2 trial. Lancet Oncol 17:234-242, 2016
38. US Food and Drug Administration: FDA approves new oral therapy to treat ALK-positive lung cancer. http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm476926.htm
39. Nokihara H, Kondo M, Kim YH, et al: Alectinib (ALC) versus crizotinib (CRZ) in ALK-inhibitor naive ALK-positive non-small cell lung cancer (ALK+ NSCLC): Primary results from the J-ALEX study. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 9008)
40. Palumbo A, Chanan-Khan AAA, Weisel K, et al: Phase III randomized controlled study of daratumumab, bortezomib, and dexamethasone (DVd) versus bortezomib and dexamethasone (Vd) in patients (pts) with relapsed or refractory multiple myeloma (RRMM): CASTOR study. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr LBA4)
41. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I: Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of

hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): Final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. Lancet Oncol 17:425-439, 2016

42. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al: PALOMA-2: Primary results from a phase III trial of palbociclib (P) with letrozole (L) compared with letrozole alone in postmenopausal women with ER+/HER2– advanced breast cancer (ABC). J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 507)
43. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al: Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. N Engl J Med 375:1738-1748, 2016
44. US Food and Drug Administration: Palbociclib (IBRANCE capsules). http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm487080.htm
45. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, et al: Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): Final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol 17:917-927, 2016
46. US Food and Drug Administration: Cabozantinib (CABOMETYX). http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm497483.htm
47. Janowitz T, Welsh SJ, Zaki K, et al: Adjuvant therapy in renal cell carcinoma-past, present, and future. Semin Oncol 40:482-491, 2013
48. Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, et al: Adjuvant sunitinib in high-risk renal-cell carcinoma after nephrectomy. N Engl J Med 375:2246-2254, 2016
49. Haas NB, Manola J, Uzzo RG, et al: Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): A double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. Lancet 387:2008-2016, 2016
50. Moore KN, Martin LP, Seward SM, et al: Preliminary single agent activity of IMGN853, a folate receptor alpha (FRα)–targeting antibody-drug conjugate (ADC), in randomized clinical trial. JAMA 314:1356-1363, 2015

platinum-resistant epithelial ovarian cancer (EOC) patients (pts): Phase I trial. J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr 5518)

51. Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, et al: Radiation plus procarbazine, CCNU, and vincristine in low-grade glioma. N Engl J Med 374:1344-1355, 2016
52. Venook AP, Niedzwiecki D, Innocenti F, et al: Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3504)
53. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, et al: Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: Retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. JAMA Oncol [epub ahead of print on October 10, 2016]
54. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, et al: Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer. JAMA Oncol [epub ahead of print on October 27, 2016]
55. Neoptolemos JP, Palmer D, Ghaneh P, et al: ESPAC-4: A multicenter, international, open-label randomized controlled phase III trial of adjuvant combination chemotherapy of gemcitabine (GEM) and capecitabine (CAP) versus monotherapy gemcitabine in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr LBA4006)
56. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al: Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 7000)
57. Fleshman J, Branda M, Sargent DJ, et al: Effect of laparoscopic-assisted resection vs open resection of stage II or III rectal cancer on pathologic outcomes: The ACOSOG Z6051 randomized clinical trial. JAMA 314:1346-1355, 2015
58. Stevenson AR, Solomon MJ, Lumley JW, et al: Effect of laparoscopic-assisted resection vs open resection on pathological outcomes in rectal cancer: The ALaCaRT
59. Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, et al: Extending aromatase-inhibitor adjuvant

therapy to 10 years. N Engl J Med 375:209-219, 2016

60. Pan H, Gray RG, Davies C, et al: Predictors of recurrence during years 5-14 in 46,138 women with ER+ breast cancer allocated 5 years only of endocrine therapy (ET). J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 505)
61. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al: The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. N Engl J Med 373:1926-1936, 2015
62. Wheler JJ, Janku F, Naing A, et al: Cancer therapy directed by comprehensive genomic profiling: A single center study. Cancer Res 76:3690-3701, 2016
63. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, et al: Targeted therapy for advanced solid tumors based on molecular profiles: Early results from MyPathway, an open-label, phase IIa umbrella basket study. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr LBA11511)
64. US Food and Drug Administration: FDA approves new pill to treat certain patients with non-small cell lung cancer. http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm472525.htm
65. US Food and Drug Administration: Cobas EGFR mutation test v2. http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm504540.htm
66. Jenkins S, Yang J, Ramalingam S, et al: 134O_PR: Plasma ctDNA analysis for detection of EGFR T790M mutation in patients (pts) with EGFR mutation-positive advanced non-small cell lung cancer (aNSCLC). J Thorac Oncol 11:S153-S154, 2016 (suppl)
67. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al: Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non–small-cell lung cancer. J Clin Oncol 34:3375-3382, 2016
68. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al: Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. JAMA Oncol 2:1014-1022, 2016
69. Wakelee HA, Gadgeel SM, Goldman JW, et al: Epidermal growth factor receptor (EGFR) genotyping of matched urine, plasma and tumor tissue from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) treated with rociletinib. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 9001)
70. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, et al: A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma. J Thorac Oncol 11:1690-1700, 2016
71. Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, et al: Assessment of EGFR mutation status in matched plasma and tumor tissue of NSCLC patients from a phase I study of rociletinib (CO-1686). Clin Cancer Res 22:2386-2395, 2016
72. Zill OA, Mortimer S, Banks KC, et al: Somatic genomic landscape of over 15,000 patients with advanced-stage cancer from clinical next-generation sequencing analysis of circulating tumor DNA. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr LBA11501)
73. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al: Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. Sci Transl Med 8:346ra92, 2016
74. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al: Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. N Engl J Med 375:2154-2164, 2016

ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΕΙΣ ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΛΑΡΥΓΓΑ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

[1] Γ.Τσινιάς, [2] Α. Μπόνας

[1] ΠΕΔΥ-ΜΥ Δραπετσώνας, Πειραιάς
[2] ΩΡΛ Κλινική-ΓΝ Αγρινίου

NEUROENDOCRINE TUMORS OF THE LARYNX- LITERATURE OVERVIEW

[1] G. Tsinias, [2] A. Bonas

[1]Primary Healthcare System-Department of Drapetsona, Piraeus
[2]ENT Clinic-General Hospital of Agrinion

ΠΕΡΙΛΗΨΗ
Οι νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα είναι σπάνια νεοπλάσματα τα οποία αποτελούν το 1% των όγκων του λάρυγγα και είναι δεύτεροι σε συχνότητα μετά το πλακώδες καρκίνωμα. Κατατάσσονται στο τυπικό και άτυπο καρκινοειδές, στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα και στο παραγαγγλίωμα. Η σωστή ταξινόμηση είναι σημαντική δεδομένης της διαφορετικής φυσικής πορείας, θεραπείας και πρόγνωσης που χαρακτηρίζει το καθένα από αυτά. Το τυπικό καρκινοειδές αντιμετωπίζεται χειρουργικά με μερική/ολική λαρυγγεκτομή, ενώ το άτυπο καρκινοειδές, που είναι πιο επιθετικό, αντιμετωπίζεται με μερική/ολική λαρυγγεκτομή και λεμφαδενικό καθαρισμό. Οι 5-ετείς επιβιώσεις για τα καρκινοειδή ανέρχονται έως 50%. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα αντιμετωπίζεται με συνδυασμό ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας και έχει δυσμενή πρόγνωση. Το παραγαγγλίωμα αντιμετωπίζεται με χειρουργική εκτομή και είναι καλόηθες.
Λέξεις κλειδιά: νευροενδοκρινής όγκος λάρυγγα, καρκινοειδές, μικροκυτταρικό καρκίνωμα, παραγαγγλίωμα

ABSTRACT
Neuroendocrine tumors of the larynx are rare neoplasms that account for 1% of laryngeal neoplasms and are the second most frequent tumor after squamous cell carcinoma. They are classified as typical and atypical carcinoid, small cell carcinoma and paraganglioma. Correct classification is important due to the different natural course, therapeutic treatment and prognosis that characterize each one of them. Typical carcinoid is treated with partial/total laryngectomy, while atypical carcinoid, that is more aggressive, is best treated with partial/total laryngectomy and neck dissection. The 5-year survivals for carcinoids nearly reach 50%. Small cell carcinoma is treated with chemoradiotherapy and has a dismal prognosis. Paraganglioma is treated with surgical excision and is of benign character.
Key words: neuroendocrine tumor of larynx, carcinoid, small cell carcinoma, paraganglioma

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περίπου το 1% των όγκων του λάρυγγα είναι νευροενδοκρινούς προέλευσης. Οι νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα (ΝΟΛ) είναι ο δεύτερος συχνότερος τύπος καρκίνου μετά το πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα το οποίο αφορά το 90% των περιπτώσεων[1-3]. Τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα είναι γενικά σπάνιοι όγκοι και προσβάλλουν συχνότερα το γαστρεντερικό σωλήνα και το βρογχοπνευμονικό δένδρο, ο λάρυγγας δε είναι το συχνότερα προσβαλλόμενο όργανο στη περιοχή κεφαλής και τραχήλου Τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα φαίνεται ότι προέρχονται από την εξαλλαγή των κυττάρων του διάχυτα εντοπισμένου στο σώμα νευροενδοκρινικού συστήματος, με εμβρυολογική προέλευση τη νευρική ακρολοφία και τα παραγάγγλια, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκκριση βιολογικά δραστικών αμινών και πεπτιδίων που ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες[3]. Στο λάρυγγα ανιχνεύουν τα επίπεδα οξυγόνωσης, ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την αναγέννηση των κυττάρων, την αγγείωση καθώς και τη λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Στο παρελθόν οι όγκοι του νευροενδοκρινικού συστήματος ταξινομούνταν υπό τον γενικό όρο ‘‘καρκινοειδή’’ ο οποίος υποδείκνυε την ενδιάμεση φύση τους μεταξύ μιας καλοήθους νεοπλασίας και ενός επιθετικού καρκινώματος. Στην πορεία χρησιμοποιήθηκε πληθώρα όρων για να τους περιγράψει οι οποίοι δημιούργησαν σύγχυση. Τα ευρήματα που έφερε στο φως η πρόοδος στον τομέα της ανοσοσοϊστοχημείας οδήγησαν στην εγκαθίδρυση του όρου νευροενδοκρινής όγκος ο οποίος έχει υιοθετηθεί από την ταξινόμηση κατά WHO των νεοπλασμάτων κεφαλής και τραχήλου[4]. Σύμφωνα με αυτή οι νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα ταξινομούνται ως εξής: α) τυπικό καρκινοειδές (καλά διαφοροποιημένο νευροενδοκρινές καρκίνωμα, Grade I), b) στον άτυπο καρκινοειδή όγκο (μέτρια διαφοροποίηση, Grade II), γ) στο μικροκύτταρο νευροενδοκρινές καρκίνωμα (χαμηλή διαφοροποίηση, Grade III) και δ) στο παραγαγγλίωμα. Οι 3 πρώτοι υπότυποι είναι κακοήθεις, ενώ το παραγαγγλίωμα είναι καλοήθες. Ο άτυπος καρκινοειδής όγκος είναι ο συχνότερος υπότυπος των ΝΟΛ (54%), ακολουθούμενος από το μικροκυτταρικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα (28%), το παραγαγγλίωμα (12%) και το τυπικό καρκινοειδές (7%). [1,5] Αξίζει να σημειωθεί ότι προτείνεται η προσθήκη ενός ακόμη νεοπεριγραφέντος υποτύπου, του μεγαλοκυτταρικού καρκινώματος το οποίο κατά την WHO ταξινόμηση του 2005 ανήκει στα άτυπα καρκινοειδή[4,6-8]. Οι άνδρες προβάλλονται 3 φορές συχνότερα σε σχέση το γυναικείο φύλο (με εξαίρεση το παραγαγγλιωμα που είναι συχνότερο στις γυναίκες), η μέση ηλικία προσβολής είναι τα 60 έτη, ενώ 70% των ασθενών έχουν ιστορικό καπνίσματος[9]. Τα παραγαγγλιώματα μπορεί να εντοπίζονται και σε άλλα όργανα, σε αυτή την περίπτωση ονομάζονται οικογενή. Η συμπτωματολογία των ΝΟΛ είναι ίδια με αυτή του καρκινώματος του λάρυγγα (βράγχος φωνής, φαρυγγοδυνία, δυσφαγία, αιμόπτυση, δύσπνοια). Η πιο συχνή περιοχή προσβολής είναι η υπεργλωττιδική μοίρα του λάρυγγα, στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα όμως φαίνεται να υπάρχει μια πιο διάχυτη προσβολή του οργάνου. Σπάνια περιγράφονται περιπτώσεις με συμπτώματα οφειλόμενα στην έκκριση ορμονών, υποδηλώνοντας τη γενικά χαμηλή ενδοκρινική τους δραστηριότητα[10]. Στο διαγνωστικό αλγόριθμο μετά την αρχική διάγνωση με βιοψία (με εξαίρεση το παραγαγγλίωμα όπου πρέπει να αποφεύγεται λόγω αιμορραγίας) καθορίζεται η έκταση της πρωτοπαθούς εστίας και η ύπαρξη μεταστάσεων με CT/MRI και σπινθηρογράφημα οκτρεοτίδης (SRS, somatostatin receptor scintigraphy), προαιρετικά μπορεί να γίνει MIBG (metaiodobenzylguanidine scan) σπινθηρογράφημα και FDG-PET. Εργαστηριακώς πέρα από τον έλεγχο ρουτίνας προσδιορίζονται τα επίπεδα ειδικών νευροπεπτιδίων [κατεχολαμίνες και οι μεταβολίτες τους, ισταμίνη, CgA (chromogranin A), NSE (neuron specific enolase), 5-HIAA (5-Hydroxyindoleacetic acid) κτλ] [1,2,10,11]

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα αποτελούν κατά βάση τυχαίο ιστοπαθολογικό εύρημα δεδομένης της σπανιότητας τους και της συντριπτικής υπεροχής του πλακώδους καρκινώματος του λάρυγγα. Η διάγνωση

τίθεται με βάση ιστοπαθολογικά, μικρομοριακά και ανοσοϊστοχημικά κριτήρια. Χαρακτηριστικά ενδεικτικά των ΝΟΛ είναι τα νευροεκκριτικά κυτταροπλασματικά κοκκία, τα κύτταρα με ποικίλο πλειομορφισμό οργανωμένα σε φωλεές, χορδές, δοκίδες, αδένια και ροζέτες, η υποβλεννογόνια εντόπιση, η παρουσία βλεννίνης (PAS+) και η θετική χρώση για ανοσοϊστοχημικούς νευροενδοκρινικούς δείκτες όπως η χρωμογρανίνη, η NSE, η συναπτοφυσίνη και τα νευρονημάτια. Το τυπικό και το άτυπο καρκινοειδές δεομένου ότι διαθέτουν παρόμοια χαρακτηριστικά διαφοροδιαγιγνώσκονται με βάση τη μικροσκοπική εικόνα (η παρουσία μιτώσεων, νεκρώσεων ή πλειομορφισμού είναι ισχυρά ενδεικτική άτυπου καρκινοειδούς). Το άτυπο καρκινοειδές επίσης διαφοροδιαγιγνώσκεται από το παραγαγγλίωμα με βάση την ανοσοϊστοχημική χρώση του για επιθηλιακούς δείκτες όπως το CEA, το επιθηλιακό μεβρανικό αντιγόνο και τις κυτταροκερατίνες. Να σημειωθεί ότι η θετικότητα για τον δείκτη S-100 δεν είναι αποκλειστική του παραγαγγλιώματος αλλά συναντάται σπάνια και στο άτυπο καρκινοειδές και σε άλλους όγκους του λάρυγγα. Η θετική χρώση για την καλσιτονίνη είναι κοινή στα ΝΟΛ, ειδικά στα καρκινοειδή, αλλά γενικά αρνητική για το παραγαγγλίωμα.[1,2,6,10,12,13]. Δεδομένης της διασταυρουμένης ανοσοδραστικότητας των ΝΟΛ είναι σημαντική η μεταξύ τους διάκριση. Κατά τη διαφορική διάγνωση θα πρέπει πρωταρχικά να αποκλειστεί το πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα, το οποίο είναι πολύ συχνό αλλά και ακτινοευαίσθητο σε αντίθεση με τα ΝΟΛ. Διαφορική διάγνωση θα γίνει και από αλλά νεοπλάσματα, όπως το αναπλαστικό καρκίνωμα, το μελάνωμα, το λέμφωμα, το αιμαγγειοπερικύττωμα, το αδενοκαρκίνωμα, το κυψελιδικό καρκίνωμα, το μυελοειδές καρκίνωμα, κ.α.[2,3].

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η θεραπευτική προσέγγιση διαφέρει στους ΝΟΛ λόγω της διαφορετικής βιολογικής συμπεριφοράς των διαφόρων ιστολογικών υποτύπων. Δεδομένης της σπανιότητας των όγκων αυτών δεν υπάρχουν απόλυτες κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπευτική αντιμετώπιση τους. Το **τυπικό καρκινοειδές του λάρυγγα** αντιμετωπίζεται χειρουργικά με υπεργλωττιδική λαρυγγεκτομη ή ολική λαρυγγγεκτομή εφόσον έχει μεγάλη επέκταση. Ο λεμφαδενικός καθαρισμός δεν ενδείκνυται λόγω της σπανιότητας των τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων, ενώ η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία είναι αναποτελεσματικές. Η κλινική πορεία του τυπικού καρκινοειδούς δεν είναι τόσο αθώα όσο πιστεύονταν παλαιοτέρα αφού πάνω από το 1/3 των ασθενών θα εμφανίσει απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η 5-ετής επιβίωση ανέρχεται σχεδόν στο 50%.[1,2,9,14]. Ο **άτυπος καρκινοειδής όγκος του λάρυγγα** αντιμετωπίζεται επίσης με υπεργλωττιδική ή ολική λαρυγγεκτομή. Επειδή μπορεί να υπάρχει περινευρική διήθηση συνίσταται η ευρεία εκτομή του όγκου. Εκλεκτικός λεμφαδενικός καθαρισμός (επίπεδα II-IV) συνίσταται λόγω της αυξημένης πιθανότητας πρώιμων τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επί προσβολής των λεμφαδένων εκτελείται θεραπευτικός λεμφαδενικός καθαρισμός. Η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία θεωρούνται αναποτελεσματικές, παρόλα αυτά όμως η χρήση τους εξατομικεύεται καθότι μπορεί να ωφελήσει κάποιους ασθενείς[15]. Περαιτέρω η ακτινοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παρηγορητική αγωγή. Σύνδρομο καρκινοειδούς μπορεί να αναπτυχθεί. Ο άτυπος καρκινοειδής όγκος έχει επιθετική πορεία και η παρουσία τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων είναι συχνή. Η 5-ετής επιβίωση κυμαίνεται 36-48%[1,2]. Το **μικροκυτταρικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα του λάρυγγα** αντιμετωπίζεται με συνδυασμένη ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία, η οποία έχει τα καλυτέρα αποτελέσματα. Συνήθεις χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είναι η κυκλοφωσφαμίδη, η δοξορουβικίνη, η βινκριστίνη, η μεθοτρεξάτη και η λομουστίνη. Η προφυλακτική ακτινοβόληση του κρανίου δεν ενδείκνυται καθώς μεταστάσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα επισυμβαίνουν στο 7.7% των ασθενών[16]. Ο ρόλος του χειρουργείου είναι περιορισμένος, αφού ο τοπικός έλεγχος επιτυγχάνεται με συνδυασμό ακτινο-, χημειοθεραπείας που διατηρούν το όργανο, ενώ δεν βελτιώνει την επιβίωση αφού οι μεταστάσεις επισυμβαίνουν αιματογενώς. Η πρόγνωση του μικροκυτταρικού καρκινώματος είναι πτωχή. Ήδη από την αρχική διάγνωση θα πρέπει να θεωρείται συστηματική νόσος. Είναι

ο πιο θανατηφόρος όγκος του λάρυγγα. Περισσότερο από το 90% των ασθενών θα εμφανίσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις, ενώ η 5-ετής επιβίωση ανέρχεται στο 5-25%[1,17]. Αυτά τα ποσοστά επιβίωσης είναι παρόμοια με αυτά του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και δεν συμβαδίζουν με το μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας, αφού υπάρχει εκσεσημασμένη αγγειακή διήθηση ακόμη και σε μικρούς όγκους[1]. Διαφορετικά παρανεοπλασματικά σύνδρομα έχουν αναφερθεί, όπως το σύνδρομο Schwartz-Bartter (απρόσφορη έκκριση ADH), το σύνδρομο Cushing και το μυασθενικό σύνδρομο Eaton-Lambert[16,18,19].

Τα παραγαγγλιώματα του λάρυγγα είναι κατά κανόνα καλοήθη και η χειρουργική εξαίρεση είναι η προτιμότερη θεραπεία καθώς επιτυγχάνει την ίαση χωρίς να παραβλαφτεί η λειτουργία του λάρυγγα. Η υπεργλωττιδική λαρυγγεκτομή αποτελεί την συνηθέστερα χρησιμοποιουμένη τεχνική. Προεγχειρητική αγγειογραφία και εμβολισμός συνήθως δεν χρειάζονται δεδομένου του σχετικά μικρού μεγέθους τους και της περιορισμένης αιματικής παροχής τους η οποία απαιτεί απλά τη διεγχειρητική απολίνωση του τροφοφόρου αγγείου. Παροδική τραχειοστομία μπορεί να χρειαστεί δεδομένου του μετεγχειρητικού οιδήματος. Συνοδή τραχηλική μάζα επί παραγαγγλιώματος συνιστά ή παραγαγγλίωμα καρωτιδικού σωματίου ή εναλλακτική διάγνωση, όπως άτυπο καρκινοειδές. Η πρόγνωση είναι εξαιρετική, ενώ δεν έχουν αναφερθεί συνοδά παρανεοπλασματικά σύνδρομα[1,5,18,20,21].

Η δυνατότητα χορήγησης ραδιενεργών νουκλιδίων (πχ ανάλογα σωματοστατίνης σημασμένα με Ύττριο 90) στα πλαίσια μιας θεραπείας υποδοχέων (Peptide Receptor Radio Therapy- PRRT) υφίσταται σήμερα ως παρηγορητική θεραπεία σε προχωρημένους νευροενδοκρινείς όγκους, ενώ η εξελισσόμενη έρευνα για νέους ανταγωνιστές υποδοχέων σωματοστατίνης και μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να προσφέρει περισσότερες θεραπευτικές επιλογές[22-27].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι του λάρυγγα συνιστούν μια ομάδα σπάνιων όγκων οι οποίοι ταξινομούνται ως τυπικό και άτυπο καρκινοειδές, μικροκυτταρικό καρκίνωμα και παραγαγγλίωμα. Η σωστή ταξινόμηση είναι σημαντική καθώς αφενός υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη όσον αφορά τα ιστοπαθολογικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά τους και αφετέρου υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην θεραπευτική αντιμετώπιση και πρόγνωση καθενός από αυτά. Το τυπικό καρκινοειδές αντιμετωπίζεται με μερική ή ολική λαρυγγεκτομή χωρίς λεμφαδενικό καθαρισμό, ενώ στο άτυπο καρκινοειδές συστήνεται μερική ή ολική λαρυγγεκτομή και λεμφαδενικός καθαρισμός. Η 5-ετής επιβίωση για τα καρκινοειδή ανέρχεται έως 50%. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα είναι πολύ επιθετικό, έχει δυσμενή πρόγνωση και αντιμετωπίζεται με συνδυασμό ακτινο-, χημειο-θεραπείας. Το παραγγλίωμα αντιμετωπίζεται με χειρουργική εκτομή και είναι καλοήθες.

REFERENCES

1. Ferlito A, Silver CE, Bradford CR, Rinaldo A. Neuroendocrine neoplasms of the larynx: an overview.Head Neck. 2009 Dec;31(12): 1634-46.
2. Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A. Neuroendocrine neoplasms of the larynx: advances in identification, understanding, and management.Oral Oncol. 2006 Sep;42 (8): 770-88. Review.
3. Lewis JS Jr, Ferlito A, Gnepp DR, Rinaldo A, Devaney KO, Silver CE, Travis WD; International Head and Neck Scientific Group.. Terminology and classification of neuroendocrine neoplasms of the larynx.Laryngoscope. 2011 Jun; 121(6): 1187-93.
4. Barnes L. Tumours of the hypopharynx, larynx, and trachea: neuroendocrine tumors. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, et al., editors. Pathology and genetics head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 135–9.
5. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Robbins KT, Thomas JR, Lesperance MM. Ch 106 Malignant tumors of the larynx

Cummings Otolaryngology 6th ed. Elsevier 2015 pp 1629

6. Wenig BM. Ch 16 Neoplasms of the larynx and trachea. In Wenig BM: Atlas of Head and Neck Pathology, 3rd ed. Elsevier 2016. pp 770-784
7. Lewis JS Jr, Spence DC, Chiosea S, Barnes EL Jr, Brandwein-Gensler M, El-Mofty SK. Large cell neuroendocrine carcinoma of the larynx: definition of an entity.Head Neck Pathol. 2010 Sep;4(3):198-207.
8. Xu B, Chetty R, Perez-Ordoñez B. Neuroendocrine neoplasms of the head and neck: some suggestions for the new WHO classification of head and neck tumors. Head Neck Pathol. 2014 Mar;8(1):24-32.
9. Soga J. Carcinoids and their variant endocrinomas. An analysis of 11842 reported cases. J Exp Clin Cancer Res. 2003 Dec;22(4):517-30. Review.
10. Procopio G, Ricotta R, Fusi A, Celio L, De Dosso S, Catena L, Ferrari L, Quattrone P, Verzoni E, Bajetta E. Neuroendocrine tumors of the larynx: a clinical report and literature review.Tumori. 2006 Jan-Feb;92(1):72-5.
11. Subedi N, Prestwich R, Chowdhury F, Patel C, Scarsbrook A.Neuroendocrine tumours of the head and neck: anatomical, functional and molecular imaging and contemporary management. Cancer Imaging. 2013; 13(3): 407–422.
12. Mills SE. Neuroectodermal neoplasms of the head and neck with emphasis on neuroendocrine carcinomas. Mod Pathol. 2002 Mar;15(3): 264-78. Review.
13. Ferlito A, Rinaldo A. The spectrum of endocrinocarcinomas of the larynx.Oral Oncol. 2005 Oct;41(9):878-83. Review.
14. Soga J, Osaka M, Yakuwa Y. Laryngeal endocrinomas (carcinoids and relevant neoplasms): analysis of 278 reported cases. J Exp Clin Cancer Res. 2002 Mar;21(1):5-13.
15. Gillenwater A, Lewin J, Roberts D, El-Naggar A. Moderately differentiated neuro-endocrine carcinoma (atypical carcinoid) of the larynx: a clinically aggressive tumor. Laryngoscope. 2005 Jul;115(7):1191-5.
16. Ferlito A, Rinaldo A. Primary and secondary small cell neuroendocrine carcinoma of the larynx: a review.Head Neck. 2008 Apr;30(4):518-24.
17. Lin HW, Bhattacharyya N. Staging and survival analysis for nonsquamous cell carcinomas of the larynx.Laryngoscope. 2008 Jun;118(6):1003-13.
18. Ferlito A, Rinaldo A. Paraneoplastic syndromes in patients with cancer of the larynx and hypopharynx. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2007 Jul;116(7):502-13. Review.
19. van der Laan TP, Plaat BE, van der Laan BF, Halmos GB. Clinical recommendations on the treatment of neuroendocrine carcinoma of the larynx: A meta-analysis of 436 reported cases.Head Neck. 2015 May;37(5): 707-15.
20. Myssiorek D, Rinaldo A, Barnes L, Ferlito A. Laryngeal paraganglioma: an updated critical review.Acta Otolaryngol. 2004 Nov;124(9): 995-9. Review.
21. Ferlito A, Lewis JS Jr, Rinaldo A. The evolving management of laryngeal neuroendocrine carcinomas.Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011 Sep;268(9):1247-8.
22. Kau R, Arnold W. Somatostatin receptor scintigraphy and therapy of neuroendocrine (APUD) tumors of the head and neck. Acta Otolaryngol. 1996 Mar;116(2):345-9.
23. Ginj M, Zhang H, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, Erchegyi J, Rivier J, Mäcke HR, Reubi JC. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors.Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 31;103(44):16436-41.
24. Pfeifer AK, Gregersen T, Grønbæk H, Hansen CP, Müller-Brand J, Herskind Bruun K, Krogh K, Kjær A, Knigge U. Peptide receptor radionuclide therapy with Y-DOTATOC and (177)Lu-DOTATOC in advanced neuro-endocrine tumors: results from a Danish cohort treated in Switzerland. Neuro-endocrinology. 2011; 93(3):189-96.
25. Bodei L, Ferone D, Grana CM, Cremonesi M, Signore A, Dierckx RA, Paganelli G. Peptide receptor therapies in neuroendocrine tumors.J Endocrinol Invest. 2009 Apr; 32(4): 360-9. Review.
26. Kulke MH, Lenz HJ, Meropol NJ, Posey J, Ryan DP, Picus J, Bergsland E, Stuart K, Tye L, Huang X, Li JZ, Baum CM, Fuchs CS. Activity of sunitinib in patients with advanced neuroendocrine tumors.J Clin Oncol. 2008 Jul 10;26(20):3403-10.

27. Kulke MH Somatostatin Analogues in Neuroendocrine Tumors J Natl Compr Canc Netw 2016;14:241-242

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΡΙΣΚΟ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

[1]Π. Γκινόπουλος, [2]Ν. Χαροκόπος, [3]Β. Αλιβιζάτος, [3]Ε. Παπαδημητρίου

[1]ΜΧΜΘ- Ογκολογικό, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»
[2]Πνευμονολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Πύργου «Ανδρέας Παπανδρέου»
[3]Χειρουργική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εξελίξεις στην τεχνολογία μας καθιστούν ικανούς να αναλύουμε πολλαπλά γονίδια που σχετίζεται με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Τα πάνελ πολλαπλών γονιδίων προσφέρουν μια πιο ολοκληρωμένη και αποτελεσματική προσέγγιση, όμως πολλά από αυτά τα γονίδια που περιλαμβάνονται στα πάνελ δεν έχουν πλήρως ερμηνευθεί στα πλαίσια του ρίσκου για καρκίνο ή στις στρατηγικές διαχείρισης. Σε πολλές περιπτώσεις, η ανάλυση ενός γονιδίου ή δεδομένου αριθμού γονιδίων παραμένει η ορθότερη επιλογή.

Η απόφαση για την επιλογή των γονιδίων που θα αναλυθούν είναι περίπλοκη ενώ είναι σημαντική η παραπομπή των ατόμων σε ειδικούς στη γενετική του καρκίνου. Επίσης, θα πρέπει να παρέχεται γενετική συμβουλευτική στα άτομα πριν και μετά την εξέταση. Σε επίπεδο μοριακής αποτύπωσης, μπορεί να ανιχνευθούν δευτερεύοντες τυχαίες γαμετικές μεταλλάξεις, γι' αυτό θα πρέπει τα άτομα να είναι πλήρως ενημερωμένα για την κλινική συσχέτιση, τα οφέλη, τα ρίσκα και τους περιορισμούς, που έχουν αυτά τα ευρήματα προτού υποβληθούν σε αυτή τη διαδικασία.

Λέξεις κλειδιά: ρίσκο καρκίνου, πολυγονιδιακό πάνελ

GENETIC EVALUATION AND CANCER RISK

[1]P. Ginopoulos, [2]N. Charokopos, [3]V. Alivizatos, [3]E. Papadimitriou

[1]Dept of Clinical Oncology, General Hospital of Patras «St Andreas»
[2]Dept. of Pulmonary, General Hospital of Pirgos «Andreas Papandreou»
[3]Surgery Clinic, General Hospital of Patras «St Andreas»

ABSTRACT

Advances in technology have resulted in the ability to test for multiple genes associated with a hereditary predisposition to cancer. Multigene panel testing can allow for a more comprehensive and efficient approach to testing, but many of the genes included in multigene panels have not been fully characterized either in terms of their cancer risks or management strategies. In many cases, single/limited gene testing remains a very appropriate testing option.

The decision to pursue single or limited gene testing is complex and referral to clinicians with expertise in cancer genetics is critical. Testing must be carried out with pre- and post-test genetic counselling. In the tumor molecular profiling setting, secondary incidental germline mutations may be detected. Individuals should be informed about the clinical relevance, benefits, risks, and limitations of such findings before they undergo tumor sequencing.

Keywords: cancer risk, multigene panel

Τις τελευταίες δεκαετίες, ενισχύθηκαν σε υψηλό βαθμό οι γνώσεις μας για την αξιολόγηση και αντιμετώπιση ασθενών με γαμετικές μεταλλάξεις σε κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα. Μελέτες έχουν ξεκάθαρα υποδείξει την δυνατότητα εφαρμογής γονιδιακών αναλύσεων και την κλινική τους χρησιμότητα. Ιδιαίτερα, μελέτες μας παρείχαν πειστικά δεδομένα ότι η εφαρμογή στρατηγικών πρόληψης σε κάποιες περιπτώσεις παρατείνει την επιβίωση σε φορείς μεταλλάξεων, για παράδειγμα, σε γυναίκες με μετάλλαξη στο BRCA1 και BRCA2, η σαλπιγγο-ωοθηκεκτομή μειώνει σημαντικά τη θνητότητα από όποια αιτία (3% vs 10% HR 0,40; 95%CI, 0,26-0,76), τη θνητότητα από καρκίνο του μαστού (2% vs 6% HR 0,44; 95%CI, 0,26-0,6) και τη θνητότητα από καρκίνο των ωοθηκών (0,4% vs 3% HR 0,21; 95%CI, 0,06-0,8) σε σύγκριση με φορείς που δεν υποβάλλονται σε σαλπιγγο-ωοθηκεκτομή[1].

Σύμφωνα με το μοντέλο Markov, μια γυναίκα 30 ετών, η οποία είναι φορέας μετάλλαξης στο BRCA1, θα αύξανε το προσδόκιμο επιβίωσής της κατά 0.2 έως 1.8 έτη από την σαλπιγγο-ωοθηκεκτομή και 0,6 έως 2,1 έτη από τη μαστεκτομή[2,3]. Βάση των δεδομένων αυτών, η γονιδιακή εξέταση για κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα υιοθετήθηκε στην στάνταρντ πρακτική.

Σύμφωνα με τις δηλώσεις πολιτικής της Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP)[4] και της American Society of Clinical Oncology (ASCO) αναφορικά με την εξέταση για γονιδιακή και γενωμική προδιάθεση στον καρκίνο[5], δεδομένα κριτήρια θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση υπαρχόντων ή νέων γονιδιακών τεστ. Τα κριτήρια αυτά περιλαμβάνουν εγκυρότητα ανάλυσης και κλινική εγκυρότητα, κλινική χρησιμότητα, και τα σχετικά ηθικά, νομικά και κοινωνικά ζητήματα. Στα πλαίσια της γονιδιακής εξέτασης, η εγκυρότητα ανάλυσης αναφέρεται στην ακρίβεια και την αναπαραγωγικότητα με την οποία η τεχνική ανιχνεύει την παρουσία ή την απουσία της μετάλλαξης.

Η κλινική εγκυρότητα επικεντρώνεται στην ακρίβεια και αναπαραγωγικότητα με την οποία το τεστ προβλέπει την κλινικά καθοριζόμενη διαταραχή. Η κλινική χρησιμότητα μπορεί να καθοριστεί ως τα αποδεικτικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία ένα γονιδιακό τεστ βελτιώνει τα αποτελέσματα τα οποία κλασικά βασίζονται σε στρατηγικές πρώιμης ανίχνευσης ή πρόληψης, καθώς και η χρησιμότητα του τεστ και η προστιθέμενη αξία του στην διαδικασία απόφασης για τη διαχείριση του ασθενή.

Στη γονιδιακή εξέταση, ιδιαίτερα στα γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας, η κλινική χρησιμότητα παραμένει το καίριο ζήτημα[5]. Το πλαίσιο που έχει θέσει η EGAPP είναι σημαντικό στην αξιολόγηση της χρησιμότητας της γονιδιακής εξέτασης στα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα. Η αποτυχία εκπλήρωσης κάποιων κριτηρίων συνιστά τη βάση πολλών ανησυχιών σχετικά με την τρέχουσα κλινική αγωγιμότητα της ταυτόχρονης εξέτασης πολλαπλών γονιδίων.

Ανάλυση ενός γονιδίου

Είναι γνωστό επί μακρόν ότι κάποιες οικογένειες έχουν μια κληρονομούμενη προδιάθεση σε διάφορες κακοήθειες. Το 1913, ο Warthen περιέγραψε μια οικογένεια, γνωστή ως Οικογένεια G, στην οποία παρατήρησε μια συσσωμάτωση καρκίνου του ενδομητρίου μαζί με γαστρικό καρκίνο και καρκίνο του παχέως εντέρου[6]. Αυτή η οικογένεια, μεταξύ άλλων, δημιούργησε τη βάση για τις αρχικές περιγραφές του κληρονομούμενου συνδρόμου μη πολυποδιακού καρκίνου του παχέως εντέρου, γνωστού πλέον ως σύνδρομο Lynch.

Ομοίως αναγνωρίστηκαν και άλλα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα όπως το Li-Fraumeni, το Cowden και ο κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών βάση του καρκινικού φαινοτύπου της οικογένειας[7-12]. Αναλύσεις και μελέτες στα μέσα της δεκαετίας του ΄90 είχαν ως αποτέλεσμα την δυνατότητα ανάδειξης μεμονωμένων γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με κάποια από αυτά τα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα[13,14].

Πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκαν τα BRCA1 και BRCA2 που σχετίζονται με το κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, τα MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 και το πιο πρόσφατο EPCAM, τα οποία σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch, το γονίδιο FAP που σχετίζεται με τη οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, και το TP53 που σχετίζεται με το σύνδρομο Li-Fraumeni.

Ωστόσο, είναι πλέον προφανές ότι πολλές οικογένειες με αξιοπρόσεκτα ιστορικά, συμβατά με σύνδρομο κληρονομούμενου παχέως εντέρου ή μαστού/ωοθηκών, δεν είναι φορείς μετάλλαξης σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch ή τα BRCA1/2. Παραδείγματος χάριν, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα μελετών, μια μετάλλαξη σε γονίδιο επιδιόρθωσης λανθασμένης σύζευξης συναντάται στο 40-80% περίπου των οικογενειών που πληρούν τα κριτήρια I του Άμστερνταμ και μόνο στο 5-50% των οικογενειών που πληρούν τα κριτήρια II του Άμστερνταμ[15]. Ομοίως, μόνο το 5-10% μη επιλεγμένων ασθενών με καρκίνο του μαστού[16] και το 20-25% των ασθενών με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού[17] είναι φορείς των μεταλλάξεων BRCA1 ή BRCA2. Επιπλέον, αναγνωρίστηκαν αρκετά άλλα γονίδια που σχετίζονται είτε με σπάνια, υψηλής διεισδυτικότητας σύνδρομα ή άλλα πιο μέτριας διεισδυτικότητας.

Βάση αυτών των ευρημάτων, δημιουργήθηκε ένα γενικό πρότυπο εξέτασης βάσει του οποίου αναλύονταν πρώτα τα πιο συνήθη γονίδια όπως τα BRCA1 και BRCA2, και σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος, ακολουθούσε ανάλυση επιπρόσθετων γονιδίων εάν ο ασθενής πληρούσε τα κριτήρια για διερεύνηση ύπαρξης άλλων συνδρόμων. Αυτή η διαδικασία έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Αναφορικά με τα πλεονεκτήματα, τα γονίδια που αναλύονται αφορούν καλά περιγραφόμενα ρίσκα για καρκίνο, για τα οποία, συνήθως, υπάρχουν θεσμοθετημένες κατευθυντήριες οδηγίες αντιμετώπισης.

Επίσης, μέσω της συμβουλευτικής διαδικασίας πριν τη διενέργεια της εξέτασης, οι ασθενείς έχουν την ευκαιρία να κατανοήσουν πλήρως τα οφέλη, τα ρίσκα και τους περιορισμούς της εξέτασης στην δική τους, προσωπική, περίπτωση. Αναφορικά με τα μειονεκτήματα, μια τέτοια γονιδιακή εξέταση, είναι λιγότερο αναλυτική συγκριτικά με την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών γονιδίων και, εάν πραγματοποιηθεί, τα ακόλουθα τεστ είναι αρκετά χρονοβόρα και δαπανηρά.

Ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών γονιδίων

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί μια τεράστια αλλαγή στο τοπίο της γονιδιακής εξέτασης κυρίως λόγω δύο βασικών παραγόντων. Ο ένας αφορά τον 2^{ης} γενιάς προσδιορισμό της αλληλουχίας, μια υψηλής παραγωγικότητας προσέγγιση στον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA, η οποία επιτρέπει τον μαζικό, ταυτόχρονο προσδιορισμό της αλληλουχίας πολλαπλών γονιδίων πιο αποτελεσματικά και σε χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τις κλασσικές μεθόδους Sanger. Ο άλλος παράγοντας αφορά απόφαση του Ανώτατου Δικαστηρίου των ΗΠΑ, το 2013, η οποία ακύρωσε πολλές πατέντες που περιόριζαν την εξέταση για BRCA1/2. Αμέσως μετά την απόφαση, πολλές εταιρείες και κάποια ακαδημαϊκά ινστιτούτα συμπεριέλαβαν την ανάλυση του BRCA στα υπάρχοντα πάνελ αναλύσεων πολλαπλών γονιδίων[18,19]. Αποτέλεσμα αυτών των δύο παραγόντων είναι οι σχετικά γρήγοροι χρόνοι ανάλυσης πολλαπλών γονιδίων σε προσιτό κόστος.

Τα πάνελ γονιδίων διαφέρουν μεταξύ των εταιριών: μπορεί να είναι εκτενή, κατά τύπο καρκίνου, να επικεντρώνονται μόνο σε γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας ή να είναι εξατομικευμένα (Πίνακας 1). Επίσης, μειώθηκε σημαντικά το κόστος, το οποίο ποικίλει μεταξύ των εργαστηρίων και διαφέρει ανάλογα με τον αριθμό των γονιδίων που περιλαμβάνονται. Στις περισσότερες περιπτώσεις το κόστος του πάνελ πολλαπλών γονιδίων δεν διαφέρει σημαντικά από το κόστος ανάλυσης ενός γονιδίου ή περιορισμένου αριθμού γονιδίων. Επίσης, το πιο πιθανό είναι το κόστος να συνεχίσει να μειώνεται με το πέρας του χρόνου. Συμπληρωματικά στην πολυπλοκότητα των επιλογών της εξέτασης είναι και το γεγονός ότι οι ασφαλιστικοί οργανισμοί έχουν διαφορετικές πολιτικές μεταξύ τους και μπορεί να καλύπτουν κάποιες και όχι όλες τις επιλογές.

Πίνακας 1. *Παραδείγματα γονιδίων που περιλαμβάνονται στα πάνελ προσδιορισμού αλληλουχίας 2ης γενιάς (2/2016)*

	Company	Test	No of genes	Genes
Comprehensive panels	Ambry Genetics	CancerNext[20]	32	*APC, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BMPR1A, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, PCAM, GREM1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, SMAD4, SMARCA4, STK11, TP53*
	GeneDx	OncoGene Dx Comprehensive Cancer Panel[21]	32	*APC, ATM, AXIN2, BARD1, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1,CDK4, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, FANCC, MLH1, MSH2, MSH6,MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D,SCG5/GREM1, SMAD4, STK11, TP53, VHL, XRCC2*
	Myriad Genetics	MyRisk[22]	25	*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, APC, MUTYH,CDKN2A, CDK4, TP53, PTEN, STK11, CDH1, BMPR1A, SMAD4, PALB2,CHEK2, ATM, NBM, BARD1, BRIP1, RAD51C, RAD51D*
	Invitae	Invitae Multi Cancer Panel[23]	79	*ALK, APC, ATM, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2,BRIP1, CASR, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A,CEBPA, CHEK2, DICER1, DIS3L2, EGFR, EPCAM, FH, FLCN, GATA2,GPC3, GREM1, HOXB13, HRAS, KIT, MAX, MEN1, MET, MITF, MLH1,MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2,PDGFRA, PHOX2B, PMS2, POLD1, POLE, PRKAR1A, PTCH1,PTEN, RAD50,RAD51C,RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RUNX1, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC,SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, STK11, SUFU, TERC,TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1*
Breast/ovarian panels	Ambry Genetic	BRCAplus[24]	6	*BRCA1, BRCA2, CDH1, PALB2, PTEN, TP53*
		BreastNext[25]	17	*ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MRE11A, MUTYH,NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, TP53*
		OvaNext[26]	23	*ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1,MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN,RAD50, RAD51C, RAD51D, SMARCA4, STK11, TP53*
	Invitae	Breast and Gynecologic Cancers Guidelines Based Panel[27]	14	*ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6,PALB2, PMS2,PTEN, STK11, TP53*
		Breast Cancer Guidelines Based Panel[28]	9	*ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53*
	Color Genomics 29	Color	19	*ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MHL1,MSH2, MSH6, NBM, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11,TP53*

	GeneDx	Breast Cancer High/Moderate Risk Panel[21]	9	*ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53*
		Breast/Ovarian Cancer Panel[21]	21	*ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, FANCC,MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2*
Gastrointestinal panels	Ambry Genetics	ColoNext[30]	17	*APC, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6,MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53*
	Invitae	Colorectal Cancer Guidelines Based Panel[31]	12	*APC, BMPR1A, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN,SMAD4, STK11, TP53*
	Myriad Genetics	COLARIS[32]	6	*MLH1, MSH2, EPCAM, MSH6, PMS2, MUTYH*
		COLARIS AP[33]	2	*APC, MUTYH*
	GeneDx	Colorectal Cancer Panel[21]	19	*APC, ATM, AXIN2, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2,MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SCG5/GREM1, SMAD4, STK11, TP53*
		Lynch/Colorectal High Risk Panel[21]	7	*APC, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2*

Μελέτες έχουν αξιολογήσει την χρησιμότητα και την επίδραση της εξέτασης πολλαπλών γονιδίων. Τα βασικά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν εγείρονται γύρω από την κλινική χρησιμότητα ή την αγωγιμότητα των ευρημάτων μια τέτοιας εξέτασης, και συγκεκριμένα α) ο αριθμός των ασθενών στους οποίους ανιχνεύεται παθογόνος μετάλλαξη σε ένα γονίδιο για το οποίο είναι γνωστό το ρίσκο για καρκίνο και για το οποίο υπάρχουν στρατηγικές αντιμετώπισης, β) ασθενείς στους οποίους ανιχνεύεται μια μετάλλαξη με αβέβαιο ρίσκο για καρκίνο και δεν υπάρχουν στρατηγικές αντιμετώπισης, γ) το ποσοστό ανίχνευσης γονιδιακών παραλλαγών αβέβαιης σημασίας. Όπως φαίνεται στους πίνακες 2 και 3, το ποσοστό των παραλλαγών αυτών κυμαίνεται μεταξύ του 3.3% έως 42%, ενώ σε πολλούς ασθενείς ανιχνεύθηκαν δύο ή περισσότερες. Σε κάποιες μελέτες, το ποσοστό αυτό είναι υψηλό αλλά αναμένεται να μειωθεί στο κοντινό μέλλον λόγω της ταχείας συσσώρευσης δεδομένων από τις αναλύσεις πάνελ πολλαπλών γονιδίων.

Δεδομένου του υψηλού ποσοστού γονιδιακών παραλλαγών αβέβαιης σημασίας και της ανίχνευσης γονιδίων για τα οποία το ρίσκο για καρκίνο δεν έχει καθοριστεί πλήρως, δημιουργήθηκαν αρχεία καταγραφής αυτών των παραλλαγών με σκοπό την ενίσχυση της γνώσης μας για την κλινική χρησιμότητά τους.

Το Prospective Registry of Multiplex Testing (PROMPT)[34] είναι ένα πολυκεντρικό online αρχείο καταγραφής, το οποίο προτρέπει τους ασθενείς να καταχωρήσουν τα αποτελέσματα των γονιδιακών τους εξετάσεων και να συμπληρώσουν ερωτηματολόγια για το προσωπικό και οικογενειακό ιατρικό ιστορικό τους.

Άλλοι που εμπλέκονται στην αναταξινόμηση των γονιδιακών παραλλαγών είναι η κοινοπραξία ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles)[35] και η ClinVar, μια βάση δεδομένων που επιχορηγείται από τα NIH (National Institutes of Health), η οποία διαθέτει ελεύθερα αρχεία αναφορών σχετικά με συσχετίσεις μεταξύ παραλλαγών και φαινοτύπων[35]. Επιστημονικές εταιρείες όπως η American Medical Association, έχουν ταχθεί υπέρ της ανταλλαγής δεδομένων.

Πίνακας 2. *Ποσοστό παθογόνων μεταλλάξεων και γονιδιακών παραλλαγών αβέβαιης σημασίας (ΠΑΣ) που αναφέρονται στη ανάλυση πολλαπλών γονιδίων σχετιζόμενες με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού*

Μελέτη	Νο συμμετε-χόντων	Πάνελ	Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο BRCA(%)	Μη BRCA μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν(%)	Ποσοστό ΠΑΣ(%)
Kapoor et al[38]	337	Ambry Genetics; αναλύθηκαν διαφορετικοί τύποι πάνελ & γονιδίων	3.6%	3.9%; οι πιο συνήθης γονιδιακές μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν είναι: PALB2, CHEK2, ATM	3.3% BRCA1/2 & 13.4% non-BRCA1/2
Slavin et al[39]	348	NA	3,4%	16,4%	42%
Tung et al[40]	2.158	Ομάδα 1: παραπέμφθηκε για διερεύνηση BRCA1/2	9,3%	4,2%	41,7%
		Ομάδα 2: προηγούμενα αρνητικά αποτελέσματα για μετάλλαξη στα BRCA1/2		3,7%	41,6%
Chong et al[41]	3.000	BRCAPlus: 6-gene panel (BRCA1, BRCA2, TP53, CDH1, PTEN, SKT11)	4,6%	1%	7,6%
Kurian et al[42]	198 (57 BRCA1/2, 141 BRCA1/2 neg)	Invitae		11,4%	2.1% ΠΑΣ/ κατά μέσο όρο ανά συμμετέχοντα
LaDuca et al[43]	2,079 (874 had breast panel)	Ambry Genetics	Όλοι είχαν προηγούμενα αρνητικά αποτελέσματα σε αλληλούχιση BRCA & BART	στο 7.4% ανιχνεύθηκαν γονιδιακές μεταλλάξεις: CHEK2 (19), ATM (18), PALB2 (15), TP53 (4), PTEN (3), RAD50(3), RAD51C(2), BRIP1(1), MRE11A(1), NBN (1)	19,8%

Πίνακας 3. *Ποσοστό παθογόνων μεταλλάξεων και γονιδιακών παραλλαγών αβέβαιης σημασίας (ΠΑΣ) που αναφέρονται στη ανάλυση πολλαπλών γονιδίων σχετιζόμενες με τον καρκίνο του παχέως εντέρου*

Μελέτη	Νο συμμετε-χόντων	Πάνελ	Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε γονίδια LS (MLH1, MSH2, MSH6,PMS2, EPCAM) (%)	Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε μη -LS γονίδια (%)	Ποσοστό ΠΑΣ(%)
LaDuca et al[43]	557	Ambry Genetics	4.5%: MSH (7), MLH1 (7),PMS2 (6), MSH (5)	4.7% (26): APC (6), CHEK2 (6), MUTYH biallelic (6), SMAD4 (4), PTEN (3), CDH1(1), STK11(1), TP53 (1)	15.1% (84)
Yurgelun et al[44]	1.260	Myriad MyRisk Hereditary Cancer	95%	3.8% (48): BRCA1/2 (15), APC biallelic MUTYH, PTEN, STK11, ATM, BARD1, BRIP1, CHEK2, NBN, PALB2, & RAD51C	44%

Ανάλυση ενός ή περιορισμένου αριθμού γονιδίων έναντι πάνελ πολλαπλών γονιδίων

Αρκετοί παράγοντες καθοδηγούν την απόφαση πραγματοποίησης εξέτασης ενός γονιδίου ή μιας δεδομένης ομάδας γονιδίων τα οποία σχετίζονται με ένα δεδομένο σύνδρομο έναντι της εξέτασης πολλαπλών γονιδίων. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν 1) το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, 2) τις προτιμήσεις του ατόμου και την ανεκτικότητα του στη πιθανότητα αμφιλεγόμενων αποτελεσμάτων, 3) θέματα ασφαλιστικής κάλυψης, και 4) το χρονικό διάστημα κατά το οποίο θα πρέπει να δοθούν τα αποτελέσματα. Μια δημοσίευση ειδικών από τις ΗΠΑ, Αγγλία, Ολλανδία, Γερμανία, Αυστραλία και Καναδά, στο New England Journal of Medicine, το 2015, αναφέρουν τα θέματα που πρέπει να επιληφθούν αναφορικά με τα πάνελ πολλαπλών γονιδίων[45]. Επίσης, η ASCO, σε ανταπόκριση των εξελίξεων στον τομέα, δημοσίευσε μια δήλωση πολιτικής για τη γονιδιακή και γενωμική εξέταση στη διερεύνηση της προδιάθεσης για καρκίνο[5].

Η ανάλυση ενός γονιδίου ή περιορισμένου αριθμού γονιδίων παραμένει μια εξαίρετη επιλογή όταν τα κλινικά χαρακτηριστικά, π.χ. προσωπικό και οικογενειακό ιστορικό, είναι ιδιαίτερα ενδεικτικά ενός δεδομένου συνδρόμου που σχετίζεται με ένα γονίδιο ή μια δεδομένη ομάδα γονιδίων. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει επικεντρωμένη και εκτενή αξιολόγηση (πριν την πραγματοποίηση του τεστ), κατά την οποία τα άτομα έχουν την ευκαιρία για μια πιο ολοκληρωμένη σκέψη αναφορικά με την επίδραση της εξέτασης. Επιπλέον, τέτοιου είδους εξέταση ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ανίχνευσης γονιδιακών παραλλαγών ή παθογόνων μεταλλάξεων σε κάποιο γονίδιο για το οποίο υπάρχουν περιορισμένες κλινικές πληροφορίες.

Το πάνελ πολλαπλών γονιδίων είναι μια κατάλληλη επιλογή όταν ο οικογενειακός φαινότυπος δεν είναι ενδεικτικός μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης και δεν είναι ξεκάθαρο εάν εμπλέκονται ένα ή περισσότερα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα. Επιπλέον, το πάνελ συνήθως λαμβάνεται υπόψη όταν η αρχική, επικεντρωμένη, εξέταση είναι αρνητική π.χ. εξέταση για BRCA1/2 ακολουθούμενο από πάνελ πολλαπλών γονιδίων για μαστό/ωοθήκες. Το πάνελ πολλαπλών γονιδίων έχει αρκετά πλεονεκτήματα και δυνητικά μειονεκτήματα (Πίνακας 4). Τα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν οφέλη στα πλαίσια του κόστους και του χρόνου. Τέτοια εξέταση επίσης επιφέρει μια πιο ολοκληρωμένη αξιολόγηση των γονιδίων τα οποία θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψη για τον καρκινικό φαινότυπο της οικογένειας. Τέλος, δεν είναι ξεκάθαρο εάν κάποιος μπορεί να έχει ασφαλιστική κάλυψη για επανάληψη των εξετάσεων στην περίπτωση που τα αρχικά, περιορισμένα, αποτελέσματα είναι αρνητικά.

Πίνακας 4. *Πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ανάλυσης ενός/ περιορισμένου αριθμού γονιδίων έναντι πάνελ πολλαπλών γονιδίων*

	Ανάλυση ενός/ περιορισμένου αριθμού γονιδίων	***Πάνελ πολλαπλών γονιδίων***
Πλεονεκτήματα	- Διενέργεια εξέτασης κατευθυνόμενη από τον φαινότυπο - Συνήθως υπάρχουν καθιερωμένες επιλογές διαχείρισης και αναγνώρισης ρίσκου για καρκίνο - Χαμηλότερη πιθανότητα ανίχνευσης γονιδιακών παραλλαγών αβέβαιης σημασίας - Πιο γρήγορα αποτελέσματα	-Χαμηλότερο κόστος ανά γονίδιο - Μειωμένος κόπος για ασθενείς και παρόχους - Αποτελεσματική χρήση ενός δείγματος - Υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων, μεμονωμένα σπάνια γονίδια όμως συλλογικά σημαντικά
Μειονεκτήματα	- Υψηλότερο ρίσκο να χαθεί ο ασθενής κατά την αναμονή της ακόλουθης ανάλυσης πολλαπλών γονιδίων - Λιγότερο περιεκτικό	- Αυξημένη επίπτωση γονιδιακών παραλλαγών αβέβαιης σημασίας - Μη καλά καθορισμένο ρίσκο για καρκίνο και αντίστοιχες επιλογές διαχείρισης, ιδιαίτερα για κάποια γονίδια μεσαίας και χαμηλής διεισδυτικότητας - Απρόσμενα ευρήματα -Μεγαλύτερος χρόνος αναμονής αποτελεσμάτων - Τα πάνελ μπορεί να περιλαμβάνουν γονίδια για τα οποία οι ασθενείς δεν θέλουν ανάλυση

Αναφορικά με τα μειονεκτήματα, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει υψηλό ποσοστό ανίχνευσης γονιδιακών παραλλαγών. Τα άτομα που υποβάλλονται σε τέτοια εξέταση θα πρέπει να είναι πλήρως ενημερωμένα για αυτή την πιθανότητα. Είναι σημαντικό το άτομο να αντιληφθεί την πιθανότητα ανίχνευσης μετάλλαξης υψηλής διεισδυτικότητας σε ένα μη σύνηθες ή σπάνιο γονίδιο, ακόμα και σε απουσία σχετικού συνδρόμου. Κατ' επέκταση μπορεί να προταθούν επιθετικές παρεμβάσεις όπως προφυλακτική γαστρεκτομή σε περίπτωση ανίχνευσης μετάλλαξης στο CDH1, ακόμα και σε απουσία γαστρικού καρκίνου στην οικογένεια. Προς το παρόν, δεν είναι ξεκάθαρο εάν το ρίσκο για καρκίνο, το οποίο αναγνωρίσθηκε μέσω του πάνελ χωρίς την ύπαρξη χαρακτηριστικών του σχετιζόμενου συνδρόμου, είναι το ίδιο με αυτό που αναφέρεται στην βιβλιογραφία λόγω διαπίστωσης στατιστικών λαθών (bias). Επίσης, τα εργαστήρια έχουν διαφορετικές μεθόδους μέσω των οποίων εξασφαλίζουν την αναλυτική και κλινική εγκυρότητα, και την κλινική χρησιμότητα των γονιδιακών παραλλαγών που αναφέρουν. Για την εξασφάλιση της ακριβούς ερμηνείας της κλινικής σημασίας των ευρημάτων απαιτούνται ειδικοί στον τομέα, οι οποίοι, επίσης, είναι σημαντικοί για την καθοδήγηση της επιλογής του τεστ και του εργαστηρίου. Τέτοιους είδους ζητήματα υπογραμμίζουν τη σημασία της γενετικής συμβουλευτικής πριν και μετά την εξέταση από ειδικούς, όπως επιδοκιμάζεται και από την ASCO και το National Comprehensive Cancer Network (NCCN)[46]

Γαμετικά ευρήματα στην μοριακή αποτύπωση των όγκων

Μια σημαντική πρόκληση στην εφαρμογή ευρείας κλίμακας προσδιορισμού αλληλουχίας είναι η δυνατότητα ανίχνευσης τυχαίων ευρημάτων, τα οποία ορίζονται ως απροσδόκητα θετικά ευρήματα. Στο πλαίσιο αυτό, αναφέρονται στην ανίχνευση παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων εξαλλαγών σε γονίδια τα οποία έχουν κλινική σημασία και δεν έχουν ένδειξη για πραγματοποίηση τεστ προσδιορισμού αλληλουχίας. Ουσιαστικά, αυτά τα ευρήματα είναι γαμετικές μεταλλάξεις. Ως τέτοια, ο μόνος δρόμος για τον πραγματικό προσδιορισμό τους ως σωματικά ή κληρονομούμενα είναι η ταυτόχρονη ανάλυση του όγκου και φυσιολογικού DNA. Η ανάλυση

προσδιορίζει ποιες παραλλαγές είναι μοναδικές στον καρκίνο (π.χ σωματικές) και ποιες είναι γαμετικές. Ο προσδιορισμός του που ανήκουν και ποια τυχαία ευρήματα επιστρέφουν στον ασθενή, είναι ένα σημαντικό και αμφιλεγόμενο θέμα. Το American College of Medical Genetics and Genomics δημοσίευσε τη δήλωση πολιτικής του σχετικά με την κλινική αλληλουχία η οποία συμπεριλαμβάνει εξομική και γενωμική αλληλούχιση[47]. Στη δήλωση προτείνουν την ανάλυση των βασικών μεταλλάξεων από ένα πάνελ 56 γονιδίων, τα αποτελέσματα της οποίας θα αποστέλλονται στον θεράποντα ιατρό, ανεξάρτητα από την ένδειξη για την οποία ζητήθηκε η κλινική αλληλούχιση (Πίνακας 5). Τα γονίδια αυτά επιλέχθηκαν διότι σχετίζονται με διαταραχές για τις οποίες υπάρχουν προληπτικές στρατηγικές ή/και θεραπείες. Τα μισά περίπου γονίδια σχετίζονται με σύνδρομα που αυξάνουν το ρίσκο για καρκίνο, τα δε υπόλοιπα σχετίζονται κυρίως με διάφορες καρδιακές νόσους. Το American College of Medical Genetics and Genomics δηλώνει επίσης ότι ο ιατρός που ζήτησε την ανάλυση είναι υπεύθυνος για την ολοκληρωμένη συμβουλευτική του ασθενούς πριν και μετά την εξέταση.

Πίνακας 5. *Καταστάσεις_ και γονίδια που συνιστώνται από το American College of Medical Genetics and Genomics*[47]

Φαινότυπος	**Γονίδια**
Hereditary breast and ovarian cancer	BRCA1, BRCA2
Li-Fraumeni syndrome	TP53
Peutz-Jeghers syndrome	STK11
Lynch syndrome	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
Familial adenomatous polyposis	APC
MYH-associated polyposis; adenomas; multiple colorectal cancers; familial amyloid polyneuropathy type 2; colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive, with pilomatricomas	MUTYH
Von Hippel-Lindau syndrome	VHL
Multiple endocrine neoplasia type 1	MEN1
Multiple endocrine neoplasia type 2	RET
Familial medullary thyroid cancer	RET
PTEN hamartoma tumor syndrome	PTEN
Retinoblastoma	RB1
Hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome	SDHD, SDHAF2, SDHC, SDHB
Tuberous sclerosis complex	TSC1, TSC2
WT1-related Wilm syndrome	WT1
Neurofibromatosis type 2	NF2
Ehlers-Danlos syndrome (vascular type)	COL3A1
Marfan syndrome, Loeys-Dietz syndrome, familial thoracic aortic aneurysms and dissections	FBN1, TGFBR1, TGFBR2, SMAD3, ACTA2, MYLK, MYH11
Hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy	MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, TPM1, MYL3, ACTC1, PRKAG2, GLA, MYL2, LMNA
Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	RYR2
Arrhythmogenic right-ventricular cardiomyopathy	PKP2, DSP, DSC2, TMEM43, DSG2
Romano-Ward Long QT syndrome types 1, 2, and 3; Brugada syndrome	KCNQ1, KCNH2, SCN5A
Familial hypercholesterolemia	LDLR, APOB, PCSK9
Malignant hyperthermia susceptibility	RYR1, CACNA1S

Σε αυτή τη διαδικασία υπάρχουν πολλές προκλήσεις, οι οποίες κυμαίνονται από ζητήματα ανάλυσης (π.χ. εάν η παραλλαγή είναι γαμετική, και αν ναι, εάν είναι παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα, ή καλοήθης πολυμορφισμός) έως πρακτικά ζητήματα όπως υπογραφή εντύπου συγκατάθεσης, γενετική συμβουλευτική πριν και μετά την εξέταση. Η ASCO πρόσφατα δημοσίευσε δήλωση πολιτικής για τη γονιδιακή και γενωμική εξέταση για προδιάθεση στον καρκίνο, η οποία περιλαμβάνει γαμετικές εμπλοκές στην αποτύπωση σωματικών μεταλλάξεων[5]. Επίσης, αναγνωρίζει ότι η στάνταρντ συμβουλευτική πριν και μετά την εξέταση μπορεί να μην είναι εφικτή για όλους τους ασθενείς. Προτείνει να συζητείται με όλους τους ασθενείς, πριν αυτοί προχωρήσουν σε προσδιορισμό αλληλουχίας, η πιθανότητα αναγνώρισης τυχαίων γαμετικών ευρημάτων καθώς και η κλινική τους συσχέτιση, τα οφέλη και τα ρίσκα, και οι περιορισμοί τέτοιων ευρημάτων. Η ASCO, επίσης, υποστηρίζει ότι οι θεράποντες θα πρέπει να αποδέχονται την απόφαση των ασθενών να μην ενημερώνονται για τέτοια τυχαία ευρήματα.

Συνοπτικά

Ο προσδιορισμός αλληλούχισης δεύτερης γενιάς εισήγαγε ουσιαστική πολυπλοκότητα και προοπτικές στον τομέα της αξιολόγησης του ρίσκου για καρκίνου. Παρότι τα πάνελ πολλαπλών γονιδίων παρέχουν μια πιο ολοκληρωμένη και αποτελεσματική προσέγγιση στην διερεύνηση της προδιάθεσης για καρκίνο ενός ατόμου, οι πληροφορίες που αποκομίζονται μπορεί να είναι δύσκολες στην ερμηνεία τους. Επίσης, πολλά από τα γονίδια που περιλαμβάνονται σε αυτά τα πάνελ δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί πλήρως στα πλαίσια του ρίσκου για καρκίνο ή των στρατηγικών διαχείρισής τους. Σε πολλές περιπτώσεις, η ανάλυση ενός γονιδίου ή περιορισμένου αριθμού γονιδίων παραμένει μια πολύ κατάλληλη επιλογή. Βρισκόμαστε σε μια εποχή όπου οι τεχνικές δυνατότητες έχουν ξεπεράσει την ιατρική γνώση. Είναι σημαντική, λοιπόν, οι δυνατή και συνεχή συνεργασία μεταξύ γιατρών, ειδημόνων στη γενετική και εργαστηριακών γενετιστών.

Αναφορικά με την ανίχνευση τυχαίων ευρημάτων, σαφέστατα και χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση ούτως ώστε να ξεκαθαριστεί η καλύτερη προσέγγιση τους. Όπως αναφέρεται από την ASCO, είναι πολύ σημαντικό τα άτομα που θα προχωρήσουν σε προσδιορισμό της αλληλουχίας να είναι πλήρως ενημερωμένα για την πιθανότητα, τα οφέλη, τα ρίσκα και τους περιορισμούς, που έχει αυτή η διαδικασία να ανιχνεύει απρόβλεπτες μεταλλάξεις σε γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο.

REFERENCES

1. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. JAMA. 2010;304:967-975.
2. Schrag D, Kuntz KM, Garber JE, et al. Benefit of prophylactic mastectomy for women with BRCA1 or BRCA2 mutations. JAMA. 2000;283:3070-3072.
3. Grann VR, Jacobson JS, Thomason D, et al. Effect of prevention strategies on survival and quality-adjusted survival of women with BRCA1/2 mutations: an updated decision analysis. J Clin Oncol. 2002;20:2520-2529.
4. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, et al; EGAPP Working Group. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) initiative: methods of the EGAPP working group. Genet Med. 2009;11:3-14.
5. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, et al. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. J Clin Oncol. 2015;33:3660-3667.
6. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma. Arch Intern Med (Chic). 1913;12:546-555.
7. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? Ann Intern Med. 1969;71:747-752.
8. Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. J Natl Cancer Inst. 1969;43:1365-1373.

9.Lloyd KM II, Dennis M. Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. Ann Intern Med. 1963;58:136-142.
10.Le Dran H. Mémoire avec un précis de plusieurs observations sur le cancer. Mem Acad Chir (Paris). 1757;3:1-54.
11.Smithers DW. Family histories of 459 patients with cancer of the breast. Br J Cancer. 1948;2:163-167.
12.Broca PP. Traité des tumeurs. Paris: P. Asselin; 1866.
13.Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science. 1990;250:1684-1689.
14.Nakamura Y, Lathrop M, Leppert M, et al. Localization of the genetic defect in familial adenomatous polyposis within a small region of chromosome 5. Am J Hum Genet. 1988;43:638-644.
15.Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348:919-932.
16.Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet. 2003;72:1117-1130.
17.Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med. 2001;7:552-556.
18.Azvolinsky A. Supreme Court ruling broadens BRCA testing options. J Natl Cancer Inst. 2013;105:1671-1672.
19.Cook-Deegan R, Niehaus A. After Myriad: genetic testing in the wake of recent Supreme Court decisions about gene panels. Curr Genet Med Rep. 2014;2:223-241.
20.Ambry Genetics. CancerNext. http://www.ambrygen.com/tests/cancernext. Accessed February 2, 2016.
21.Ambry Genetics. GeneDx Oncology Genetics. http://www.genedx.com/oncology-genetics/. Accessed February 2, 2016.
22.Myriad Pro. MyRisk FAQ. https://www.myriadpro.com/myrisk/frequently-asked-questions/. Accessed February 2, 2016.
23.Invitae Multi-Cancer Panel. https://www.invitae.com/en/physician/tests/0110. Accessed February 2, 2016.
24.Ambry Genetics. BRCAPlus. http://www.ambrygen.com/tests/brcaplus. Accessed February 2, 2016.
25.Ambry Genetics. BRCANext. http://www.ambrygen.com/tests/breastnext. Accessed February 2, 2016.
26.Ambry Genetics. OvaNext. http://www.ambrygen.com/tests/ovanext. Accessed February 2, 2016.
27.Invitae. Breast and Gyn Cancers Guidelines-Based Panel. https://www.invitae.com/en/physician/tests/01204/. Accessed February 2 ,2016.
28.Invitae Breast Cancers Guidelines-Based Panel. https://www.invitae.com/en/physician/tests/01206/. Accessed February 2, 2016.
29.Color Genomics. Get Color. https://getcolor.com/learn/the-science#gene-panel. Accessed February 2, 2016.
30.Ambry Genetics. ColoNext. http://www.ambrygen. com/tests/colonext. Accessed February 2, 2016.
31.Invitae. Colorectal Cancer Guidelines Based Panel. https://www.invitae.com/en/physician/tests/01252/. Accessed February 2, 2016.
32.Myriad Pro. COLARIS FAQ. https://www.myriadpro.com/hereditary-cancer-testing/hereditary-colon-and-gynecologic-cancers/lynch-syndrome-hnpcc/colaris-faq/. Accessed February 2, 2016.
33.Myriad Pro. COLARIS AP FAQ. https://www.myriadpro.com/hereditary-cancer-testing/hereditary-colon-and-gynecologic-cancers/polyposis-syndromes-fap-afap-map/colaris-ap-faq/. Accessed February 2, 2016.
34.PROMPT. Prospective Registry of Multiplex Testing. http://www.promptstudy.org. Accessed February 22, 2016.
35.ENIGMA. Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles. http://www.enigmaconsortium.org. Accessed February 22, 2016.
36.Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. Nucleic Acids Res. 2014;42:D980-D985.
37.American Medical Association. Support of Public Access to Genetic Data.

http://www.ama-assn.org/ama/pub/news/news/2013/2013-06-18-new-ama-policies-annual-meeting.page. Accessed February 2, 2016.

38.Kapoor NS, Curcio LD, Blakemore CA, et al. Multigene panel testing detects equal rates of pathogenic BRCA1/2 mutations and has a higher diagnostic yield compared to limited BRCA1/2 analysis alone in patients at risk for hereditary breast cancer. Ann Surg Oncol. 2015;22:3282-3288.

39.Slavin TP, Niell-Swiller M, Solomon I, et al. Clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and cancer risk management. Front Oncol. 2015;5:208.

40.Tung N, Battelli C, Allen B, et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. Cancer. 2015;121:25-33.

41.Chong HK, Wang T, Lu HM, et al. The validation and clinical implementation of BRCAplus: a comprehensive high-risk breast cancer diagnostic assay. PLoS One. 2014;9:e97408.

42.Kurian AW, Hare EE, Mills MA, et al. Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. J Clin Oncol. 2014;32:2001-2009.

43.LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. Genet Med. 2014;16:830-837.

44.Yurgelun MB, Allen B, Kaldate R, et al. Multigene panel testing in patients suspected to have Lynch syndrome. J Clin Oncol. 2014;32:5s(suppl; abstr 1509).

45.Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. N Engl J Med. 2015;372:2243-2257.

46.Hall MJ, Forman AD, Pilarski R, et al. Gene panel testing for inherited cancer risk. J Natl Compr Canc Netw. 2014;12:1339-1346.

47.Green RC, Berg JS, Grody WW, et al; American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. Genet Med. 2013;15:565-574.

Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΓΝΩΣΙΑΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΣΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Αλ. Μουσούρος

Κλινικός Ψυχολόγος – Ψυχοθεραπευτής

THE APPLICATION OF COGNITIVE BEHAVIORAL THERAPY IN CANCER PATIENTS: AN EMPIRICAL REVIEW

Al. Mousouros

Clinical Psychologist – Psychotherapist

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ΓΣΘ ως μία ψυχοθεραπευτική προσέγγιση απευθυνόμενη σε ένα μεγάλο εύρος προβλημάτων και ψυχοπαθολογίας, και απευθυνόμενη σε διαφορετικά άτομα. Η ΓΣΘ εφαρμόζεται με σημείο αναφοράς τις βασικές της αρχές που παρουσιάζονται εν συνεχεία. Επίσης, η ΓΣΘ έχει λάβει μεγάλη αναγνώριση, αναφορικά με την εμπειρική τεκμηρίωση μέσω πλήθους ερευνών. **Σκοπός:** Ο σκοπός της παρούσης βιβλιογραφικής ανασκόπησης, ήταν να παρουσιάσω την εφαρμογή της ΓΣΘ σε ασθενείς με καρκίνο, μέσω μίας σύντομης περιγραφής του ΓΣΘ μοντέλου στην εν λόγω διαγνωστική κατηγορία. Ακόμη, παρουσιάστηκαν εν συντομία ερευνητικά δεδομένα, που υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της ΓΣΘ εφαρμοσμένη σε ασθενείς με καρκίνο. **Συμπεράσματα:** Βάσει ερευνητικών δεδομένων (εμπειρική έρευνα και μέτα-αναλύσεις) με σημείο έναρξης τη δεκαετία του 1980, η ΓΣΘ είναι η πλέον αποτελεσματική ψυχοθεραπευτική παρέμβαση για ασθενείς με καρκίνο.

Λέξεις Κλειδιά: Γνωσιακή Συμπεριφοριστική Θεραπεία (ΓΣΘ), Καρκίνος, Προσαρμογή, Αρχές, Στόχοι

ABSTRACT

Introduction: CBT as a psychotherapeutic approach, with reference to a broad range of problems and psychopathology, and its' application to different people. The application of CBT is based on its' basic principles, presented below. Also, there is a broad recognition of CBT, with a great body of research as a point of reference. **Aim:** The purpose of the current empirical review was to present the application of CBT in cancer patients, through a short description of the Cognitive Behavioral model on this diagnostic category. Furthermore, research findings supporting the effectiveness of CBT applied to cancer patients, presented. **Conclusions:** According to research findings (empirical review and meta-analyses) with starting point the 1980s, CBT is the most effective psychotherapeutic modality for cancer patients.

Keywords: Cognitive Behavioral Therapy (CBT), Cancer, Adjustment, Principles, Goals

1. Εισαγωγή

1.1 ΓΣΘ Γενικά

Η Γνωσιακή Συμπεριφοριστική Θεραπεία (ΓΣΘ), είναι μία ψυχοθεραπευτική προσέγγιση η οποία απευθύνεται σε ένα μεγάλο εύρος ψυχολογικών προβλημάτων και ψυχικών ασθενειών. Επίσης, απευθύνεται σε όλες τις ηλικίες, σε ανθρώπους διαφορετικών νοητικών ικανοτήτων και δεξιοτήτων, σε διαφορετικές κουλτούρες και γλώσσες, και σε διαφορετικά πλαίσια (ιδιωτικό γραφείο, νοσοκομείο, κλινικό περιβάλλον, σχολείο, κ.α.)[1]. Η ΓΣΘ είναι μία σχετικά *βραχείας διάρκειας ψυχοθεραπευτική προσέγγιση εστιασμένη στο/στα πρόβλημα-τα του παρόντος*, χωρίς όμως να απαξιώνει και να αφήνει έξω από τη θεραπεία προβλήματα και θέματα του παρελθόντος[2]. Η ειδοποιός διαφορά της Γνωσιακής Συμπεριφοριστικής Θεραπείας συγκριτικά με άλλες παλαιότερες παρεμβάσεις όσον αφορά στην αντιμετώπιση και προσέγγιση του παρόντος και του παρελθόντος, είναι ότι η ΓΣΘ αναλύει καταστάσεις και προβλήματα του παρελθόντος αν και εφόσον αυτά τα προβλήματα και οι καταστάσεις σχετίζονται άμεσα με το παρόν ή παρόντα πρόβλημα-τα, συντηρώντας το/τα ή/και ενισχύοντας το/τα[2]. Βασικό στοιχείο της ΓΣΘ, είναι *η δημιουργία μίας καλής θεραπευτικής σχέσης* μεταξύ θεραπευτή και θεραπευόμενου. Η θεραπευτική σχέση στη ΓΣΘ λειτουργεί ως το ασφαλές ψυχοθεραπευτικό πλαίσιο, στο οποίο ο θεραπευόμενος μπορεί να μοιραστεί θέματα και προβλήματα του, εισπράττοντας κατανόηση, ενδιαφέρον και ενσυναίσθηση από τον θεραπευτή[3]. Ένα ακόμη βασικό στοιχείο της ΓΣΘ είναι *ο συνεργατικός εμπειρισμός*, όπου θεραπευτής με θεραπευόμενο θέτουν από κοινού στόχους και δουλεύουν μαζί ως προς την επίτευξή τους. Επίσης από κοινού (συνεργατικά), γίνεται και ο έλεγχος της ρεαλιστικότητας των αντιλήψεων του θεραπευόμενου μετατρέποντάς τες σε υποθέσεις, ελέγχοντας την εγκυρότητά τους με τη συλλογή εμπειρικών δεδομένων από την καθημερινότητα (εμπειρισμός). Τέλος, *ο ρόλος του θεραπευόμενου στη ΓΣΘ είναι ενεργός*, πάντα υπό την καθοδήγηση και τις υποδείξεις του Γνωσιακού Συμπεριφοριστικού Ψυχοθεραπευτή[3].

1.2 Η Αρχή της ΓΣΘ

Η Γνωσιακή Συμπεριφοριστική Θεραπεία βασίζεται *στη γνωσιακή αρχή*, κατά την οποία δεν είναι οι καταστάσεις καθεαυτού «προβληματικές», αλλά ο τρόπος που προσεγγίζει το άτομο την εκάστοτε κατάσταση και η νοηματοδότηση που της αποδίδει καθιστούν την κατάσταση προβληματική ή μη. Κατ' επέκτασιν, το γνωσιακό επίπεδο (επίπεδο σκέψης), επηρεάζει το συναισθηματικό επίπεδο (συναισθήματα), όπου στη συνέχεια υπάρχει αντίκτυπο στην έκδηλη συμπεριφορά του ατόμου. Η έκδηλη συμπεριφορά κατ' επέκτασιν συνακολουθείται από συνέπειες, οι οποίες καταλήγουν πάλι στο γνωσιακό επίπεδο (επίπεδο σκέψης). Με αυτή τη σειρά (σκέψεις → συναισθήματα → συμπεριφορά → συνέπειες → σκέψεις) και αλληλεπιδρώντας με την ιδιοσυγκρασία του ατόμου, δημιουργούνται και παγιώνονται οι φαύλοι κύκλοι. Ο σκοπός της ΓΣΘ βάσει της γνωσιακής αρχής, είναι να εντοπιστούν οι φαύλοι κύκλοι κάθε ατομικής περίπτωσης με απώτερο σκοπό τη γνωσιακή αναδόμηση. Δηλαδή, αφού ο θεραπευόμενος εντοπίσει τους δυσλειτουργικούς τρόπους σκέψης του υπό την καθοδήγηση του Γνωσιακού Συμπεριφοριστικού Ψυχοθεραπευτή, με τη χρήση γνωσιακών και συμπεριφορικών τεχνικών να τους αμφισβητίσει και να τους αντικαταστήσει με νέους πιο λειτουργικούς τρόπους σκέψης. Υπό αυτή τη διαδικασία όπου επέρχεται αλλαγή σε γνωσιακό επίπεδο (επίπεδο σκέψης), επέρχεται αλλαγή και σε συναισθηματικό και συμπεριφορικό επίπεδο στην πορεία, λόγω του ότι αυτά τα τρια βασικά επίπεδα είναι αλληλένδετα και επηρεάζουν άμεσα το ένα το άλλο[4].

1.3 Εμπειρική Τεκμηρίωση και Εφαρμογή της ΓΣΘ

Η ΓΣΘ είναι μία ψυχοθεραπευτική προσέγγιση *επιστημονικά τεκμηριωμένη και εμπεριστατωμένη*. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες τουλάχιστον, στην παγκόσμια βιβλιογραφία υπάρχει μία πληθώρα από βιβλία για το ευρύ κοινό, επιστημονικά συγγράμματα και επιστημονικά άρθρα (εμπειρική έρευνα και μετα-αναλύσεις), τα οποία υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της Γνωσιακής Συμπεριφοριστικής Θεραπείας, εφαρμοσμένη σε διαφορετικές μορφές προβλημάτων και

ψυχοπαθολογίας. Παραδείγματα διαγνωστικών κατηγοριών που εφαρμόζεται η ΓΣΘ είναι, οι διαταραχές της διάθεσης, οι αγχώδεις διαταραχές, οι διαταραχές πρόσληψης τροφής, οι ψυχώσεις, οι χρόνιες σωματικές ασθένειες, ο καρκίνος, κ.α.[3]. Άξιο επισήμανσης είναι το γεγονός, ότι η έρευνα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της ΓΣΘ συνεχώς αυξάνεται αλλά και ανανεώνεται σε παγκόσμιο επίπεδο (Ευρώπη, Βόρεια Αμερική, Αυστραλία, κ.α.)[5]. Επίσης και τα προγράμματα που χρησιμοποιούν τη ΓΣΘ ως ψυχοθεραπευτική παρέμβαση προτίμησης αυξάνονται, με γνωστό το παράδειγμα του Εθνικού Συστήματος Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS). Το NHS χρηματοδοτεί και παρέχει ΓΣΘ στους ασφαλιζομένους που αξιολογούνται και κρίνονται από τον Γενικό Ιατρό ότι χρήζουν ψυχολογικής υποστήριξης – ψυχοθεραπείας[6].

2. Η Εφαρμογή της ΓΣΘ σε Ασθενείς με Καρκίνο

2.1 Η Λογική της ΓΣΘ σε Ασθενείς με Καρκίνο

Η εφαρμογή της Γνωσιακής Συμπεριφοριστικής Θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο, έχει ως *σημείο αναφοράς τη γνωσιακή αρχή*. Όπου βασίζεται στην παραδοχή, ότι τα συμπτώματα της ασθένειας και οι συνέπειες της θεραπείας δεν επηρεάζουν αυτούσια το συναίσθημα και τη συμπεριφορά του ασθενούς, αλλά οι ερμηνείες και τις αιτιολογήσεις που κάνει ο ασθενής για τη νόσο είναι άμεσα συνδεδεμένες με το συναίσθημα και τη συμπεριφορά του. Δεν είναι η διάγνωση του καρκίνου καθεαυτού, αλλά ο τρόπος που θα αντιμετωπίσει το άτομο τη διάγνωσή του επηρεάζει άμεσα και την πορεία προσαρμογής του στη νόσο[7]. Σαφώς, μία διάγνωση καρκίνου κλονίζει τις πεποιθήσεις του ατόμου για τον εαυτό του, τη ζωή, τον κόσμο και τις σχέσεις. Η αρχική φάση όπου ανακοινώνεται η διάγνωση, συνήθως προκαλεί στο άτομο μπέρδεμα και χαοτικές εναλλαγές σκέψεων και συναισθημάτων[8]. Τις επόμενες εβδομάδες ή μήνες, ο πάσχων καλείται να αντιμετωπίσει τα εξείς ερωτήματα αναφορικά με την ασθένεια: (i) ποιό είναι το μέγεθος της απειλής; (ii) Τι μπορεί να γίνει γι' αυτό; (iii) Ποιά είναι η πρόγνωση; Η απειλή που ακολουθεί μία διάγνωση καρκίνου μπορεί να εκληφθεί από το άτομο είτε ως πρόκληση, είτε ως μέγιστη απειλή, είτε ως απώλεια - ζημειά ή ήττα, είτε ως άρνηση. Κατά τους Lazarus και Folkman, τα γνωσιακά (σκέψεις), συναισθηματικά, και συμπεριφορικά πρότυπα, συσχετιζόμενα με την αξιολόγηση που έχει δώσει το άτομο στη διάγνωση του καρκίνου (πρόκληση, απειλή, κ.α.), αντικατοπτρίζουν το στυλ προσαρμογής του ατόμου στη νόσο[7]. Πιο συγκεκριμένα, αν η βασική πεποίθηση του ασθενούς ως προς τη διάγνωση είναι η απώλεια, τότε το άτομο θα νοιώσει καταθλιπτικά. Αν ο καρκίνος για τον πάσχοντα αντιπροσωπεύει μία πιθανή απειλή για την υγεία, την ασφάλεια, ή τη ζωή του, τότε η συναισθηματική του αντίδραση θα είναι το άγχος. Ωστόσο, αν το άτομο βλέπει την ασθένεια ως μία εισβολή και μία άδικη παραβίαση του κόσμου του, τότε η συναισθηματική αντίδραση του θα είναι ο θυμός. Η προσαρμογή του ασθενούς συμπεριλαμβάνει την ερμηνεία του τύπου του στρες που προκαλεί ο καρκίνος, και την αξιολόγηση του πόσο καλά αυτό το στρες μπορεί να αντιμετωπιστεί και να κινητοποιηθούν οι συμπεριφορές αντιμετώπισης[9].

Οι Greer και Watson[10], έχουν εντοπίσει πέντε κοινά στυλ προσαρμογής. (i) το αγωνιστικό πνεύμα, (ii) την αποφυγή ή την άρνηση, (iii) την μοιρολατρεία, (iv) την ανικανότητα και απελπισία, (v) την αγχώδη έγνοια. Συνοπτικά, ο πάσχων με στυλ προσαρμογής το (i) αγωνιστικό πνεύμα, βλέπει τη νόσο ως μία πρόκληση και λαμβάνοντας θετική στάση ως προς το αποτέλεσμα. Ακολούθως, αυτή η θετική στάση κινητοποιεί το άτομο ώστε να ενημερωθεί για την ασθένειά του, να λάβει έναν ενεργό ρόλο στην ανάρρωσή του, και να προσπαθήσει να ζήσει όσο το δυνατόν μία φυσιολογική ζωή. Αντιμετωπίζοντας τη διάγνωση ως πρόκληση, το άτομο μπορεί να έχει ένα βαθμό ελέγχου στο άγχος του, ώστε η πρόγνωσή του να φαίνεται αισιόδοξη. Ο πάσχων με στυλ προσαρμογής την (ii) αποφυγή ή άρνηση, αρνείται το αντίκτυπο της ασθένειας, όπου η απειλή της διάγνωσης ελαχιστοποιείται, κατά συνέπεια το θέμα του ελέγχου καθίσταται άσχετο και η πρόγνωση φαίνεται καλή. Αντίστοιχα, ο πάσχων με στυλ προσαρμογής τη (iii) μοιρολατρεία, βλέπει τη διάγνωση ως κάτι στο οποίο δεν έχει τον έλεγχο λαμβάνοντας τη στάση της παθητικής αποδοχής. Ο πάσχων με στυλ προσαρμογής την (iv) ανικανότητα και απελπισία, έχει εγλοβιστεί στη βασική πεποίθηση της τεράστιας απειλής

του καρκίνου για εκείνον, όπου έλεγχος σχετικά με την κατάσταση δεν υπάρχει και η πρόγνωση φαίνεται κακή. Ενεργές στρατηγικές αντιμετώπισης του καρκίνου δεν υπάρχουν, και είναι πιθανόν το άτομο να αποσυρθεί και από άλλες καθημερινές δραστηριότητες. Τέλος, ο πάσχων με στυλ προσαρμογής την (v) αγχώδη έγνοια, λόγω του έντονου άγχους που είναι βασικό χαρακτηριστικό σε αυτό το στυλ προσαρμογής, αναζητά παρορμητικά διαβεβαιώσεις για τη διάγνωση, τα συμπτώματα, εναλλακτικές θεραπείες, κ.α.. Η διάγνωση αντιπροσωπεύει μία μεγάλη απειλή για το άτομο, όπου διακατέχεται από αβεβαιότητα σχετικά με τον έλεγχο της κατάστασης και το μέλλον φαίνεται απρόβλεπτο[10].

2.2 Παράμετροι και Στόχοι της ΓΣΘ σε Ασθενείς με Καρκίνο

Η εφαρμογή της Γνωσιακής Συμπεριφοριστικής Θεραπείας ως ψυχοθεραπευτική παρέμβαση στον καρκίνο, αποσκοπεί στην καλύτερη προσαρμογή του ασθενούς στη νέα πραγματικότητα και περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Συγκεκριμένα, η ΓΣΘ εφαρμόζεται στην αντιμετώπιση του πόνου, του άγχους, της κατάθλιψης, καθώς και στην αντιμετώπιση προβλημάτων της καθημερινότητας, στην ανάκτηση ελέγχου στη ζωή του ασθενούς, στην προσπάθεια διαμόρφωσης μιας θετικότερης στάσης και συνακόλουθης μείωσης του αρνητικού συναισθήματος, στην επίλυση προβλημάτων στα πλαίσια του ζεύγους, καθώς και στη συμμόρφωση του καρκινοπαθούς στη θεραπεία[9].

Οι βασικότεροι παράμετροι που διαμορφώνουν την πραγματικότητα του ασθενούς είναι[9]:

(i) Η βαλλόμενη αυτοεκτίμηση και αυτοεικόνα του ατόμου που απορρέει από την αμφισβήτηση του ρόλου του μέσα στο οικογενειακό ή εργασιακό πλαίσιο, θέτοντας την ανάγκη επαναδιατύπωσης ενός πιο ρεαλιστικού ρόλου για τον πάσχοντα.

(ii) Η απώλεια της αίσθησης του προσωπικού ελέγχου.

(iii) Οι ρεαλιστικοί σωματικοί περιορισμοί που μπορεί να επιφέρει η ασθένεια, όπου απαιτούν έναν προγραμματισμό δραστηριοτήτων αναδεικνύοντας το διαθέσιμο δυναμικό και όχι τα ελλείμματα του ατόμου.

(iv) Ο πόνος και η ανάγκη διαχείρισής του.

(v) Η στάση του ασθενούς απέναντι στη θεραπεία.

(vi) Η συχνά περιορισμένη δυναμική του ατόμου, αναφορικά με τους μηχανισμούς διαχείρισης εναλλακτικών στρατηγικών αντιμετώπισης.

Βάσει των προαναφερθέντων παραμέτρων, οι βασικοί στόχοι της ΓΣΘ σε ασθενείς με καρκίνο είναι[9]:

(i) Η ανοιχτή έκφραση των αρνητικών συναισθημάτων και του θυμού μέσα σε ένα ασφαλές ψυχοθεραπευτικό πλαίσιο.

(ii) Η νοητική προσαρμογή του ατόμου στην ασθένεια, ενισχύοντας ένα θετικό και αγωνιστικό πνεύμα.

(iii) Η ενίσχυση του συναισθήματος ελέγχου στη ζωή του ασθενούς, και η ενεργός συμμετοχή στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου.

(iv) Η ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών αντιμετώπισης.

(v) Η βελτίωση της επικοινωνίας στο ζευγάρι.

2.3 Βασικές Αρχές της ΓΣΘ σε Ασθενείς με Καρκίνο

Η Γνωσιακή Συμπεριφοριστική Θεραπεία εφαρμοσμένη σε ασθενείς με καρκίνο, ακολουθεί όπως προαναφέρθηκε τις βασικές αρχές της ΓΣΘ. Συγκεκριμένα, αποτελεί μια σχετικά *βραχείας διάρκειας ψυχοθεραπευτική παρέμβαση* (6-12 εβδομάδες), *εστιασμένη στο πρόβλημα* του ασθενούς. Ο ασθενής αρχικά εκτίθεται στο γνωσιακό συμπεριφοριστικό μοντέλο, προκειμένου να κατανοήσει τη σύνδεση ανάμεσα στις σκέψεις και τα συναισθήματά του. Η συναισθηματική έκφραση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση πριν την εφαρμογή γνωσιακών και συμπεριφορικών τεχνικών, καθώς είναι συχνά δύσκολη η έκφραση αρνητικών συναισθημάτων (θυμός, άρνηση) από τους ασθενείς. Εν συνεχεία, εφαρμόζονται συμπεριφορικές τεχνικές παρόμοιες με αυτές που εφαρμόζονται στην αντιμετώπιση του άγχους και της κατάθλιψης, ενώ οι γνωσιακές τεχνικές εξυπηρετούν την αναγνώριση και αποδόμηση αρνητικών σκέψεων του ασθενούς[9,11,3].

Εξίσου σημαντική είναι η δημιουργία μίας *καλής θεραπευτικής σχέσης*, η οποία αποτελεί το ασφαλές πλαίσιο εναπόθεσης της εμπειρίας του ασθενούς, σε ένα άτομο το οποίο

ενδιαφέρεται, κατανοεί και συναισθάνεται. Επίσης, πολύ βασικό στοιχείο είναι ο *συνεργατικός εμπειρισμός*, όπου από κοινού τίθενται στόχοι, και μετατρέπονται οι αντιλήψεις του ασθενούς σε υποθέσεις, όπου ελέγχεται η εγκυρότητά τους συλλέγοντας εμπειρικά δεδομένα από την καθημερινότητα. Η εφαρμογή της ΓΣΘ σε ασθενείς με καρκίνο, ενέχει επίσης τον *ενεργό ρόλο του θερα-πευόμενου* στη θεραπεία. Η ατζέντα των θεμάτων προς συζήτηση είναι πολύ σημαντική, δεδομένης της μικρή διάρκειας της θεραπείας. Ωστόσο, είναι πολύ πιο ευέλικτη αφήνοντας περιθώρια απόκλισης, λόγω της ανάγκης του ασθενούς για συναισθηματική έκφραση στη διάρκεια της θεραπείας. Οι περιλήψεις είναι σημαντικές, αφενός για να επιβεβαιωθεί ότι θεραπευτής και θεραπευόμενος βρίσκονται στο ίδιο μήκος κύματος, αλλά και για να νοιώσει ο ασθενής ότι επανακτά τον έλεγχο, εφόσον αυτός αναλαμβάνει να κάνει την περίληψη, αλλά και τι έχει κατανοήσει μέσα στη συνεδρία[9,11,3].

2.4 Φάσεις της ΓΣΘ σε Ασθενείς με Καρκίνο

Λόγω της ιδιαιτερότητας που μπορεί να παρουσιάζουν οι ασθενείς με καρκίνο, η Γνωσιακή Συμπεριφοριστική Θεραπεία εφαρμόζεται με ευελιξία. Δηλαδή, οι στόχοι και οι τεχνικές αλλάζουν και εξελίσσονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας, βάσει των αναγκών του ασθενούς. Ωστόσο, είναι βοηθητικό να κατηγοριοποιήσουμε τη θεραπεία σε 3 γενικές φάσεις, *την αρχική φάση*, *τη μεσαία φάση* και *την τελική φάση*. Αυτές οι φάσεις συνήθως έχουν λίγο διαφορετικούς σκοπούς, και ως αποτέλεσμα εφαρμόζονται διαφορετικές τεχνικές[9].

Η αρχική φάση[9]

Η διάρκεια της αρχικής φάσης της θεραπείας είναι μεταξύ 2-4 συνεδρίες. Ωστόσο, η ακριβής διάρκεια θα εξαρτηθεί από την ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία.

Οι στόχοι της αρχικής φάσης είναι:

(i) Η ανακούφιση του συμπτώματος.

(ii) Η κανονικοποίηση της καθημερινής ζωής.

(iii) Η εκπαίδευση στο γνωστικό μοντέλο.

(iv) Η ενθάρρυνση στην έκφραση του συναισθήματος.

Η μεσαία φάση[9]

Έως το τέλος της αρχικής φάσης, κατά ένα βαθμό η συναισθηματική φόρτιση του ασθενούς θα έχει ανακουφιστεί, και θα έχει αποκτήσει εξοικείωση στο ΓΣΘ μοντέλο. Στη μεσαία φάση της θεραπείας συνεχίζεται η ίδια δουλειά, σε ένα όμως πιο σύνθετο γνωσιακό πλαίσιο. Η διάρκεια της μεσαίας φάσης είναι 3-6 συνεδρίες και οι στόχοι σε αυτή τη φάση είναι:

(i) Η εκπαίδευση του ασθενούς στον εντοπισμό και τη διαχείριση των μη βοηθητικών αρνητικών τρόπων σκέψης.

(ii) Η άσκηση στη διαδικασία επίλυσης προβλημάτων.

(iii) Η βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς, συνακόλουθα με το συμπεριφορικό και σε γνωσιακό επίπεδο.

Η τελική φάση[9]

Έως τη λήξη της μεσαίας φάσης, ασθενής και σύντροφος έχουν μάθει νέους τρόπους αντιμετώπισης της καθημερινότητας και αντιπαράθεσης των αρνητικών σκέψεων. Όλα τα προβλήματα μπορεί να μην έχουν επιλυθεί εντελώς, αλλά το ζευγάρι έχει τα μέσα να συνεχίσει τη διαδικασία και εκτός θεραπείας. Η τελική φάση διαρκεί 1-3 συνεδρίες, με τους ακόλουθους στόχους:

(i) Πρόληψη της υποτροπής – συζήτηση μηχανισμών διαχείρισης για την αντιμετώπιση πιθανών δυσκολιών.

(ii) Σχέδια για το μέλλον δεδομένης της καλής πρόγνωσης.

(iii) Η κατανόηση βαθύτερων πεποιθήσεων – σε πολλές περιπτώσεις με αφορμή την ασθένεια, τα άτομα επιθυμούν να κάνουν αλλαγές στη ζωή τους.

2.5 Θέματα Κατά την Εφαρμογή της ΓΣΘ σε Ασθενείς με Καρκίνο

Πιθανές απειλές στα πλαίσια της θεραπείας, σχετίζονται με πιθανές γνωσιακές διαστρεβλώσεις-παραποιήσεις του ατόμου αναφορικά με την ασθένειά του. Παραδείγματα γνωσιακών διαστρεβλώσεων-παραποιήσεων είναι, *η θετική προκατάληψη*, που αφορά στη μη ρεαλιστική αισιοδοξία του ασθενούς. *Η απο-φυγή,* όταν ένας ασθενής μπλοκάρει ηθελημένα ή αυτόματα σκέψεις και εικόνες που μπορεί να προκαλέσουν δυσφορικό συναίσθημα. *Ο μηχανισμός αποστασιοποίησης,* που εκφράζεται με απουσία συναισθηματικής αντίδρασης στην περιγραφή επώδυνων συναισθημάτων και σχετίζεται με σωματικά

συμπτώματα, όπως πονοκεφάλους και ζαλάδες[9,11].

Πολύ σημαντική θέση στην πορεία της θεραπείας κατέχει η έκφραση του συναισθήματος, η οποία προηγείται των γνωσιακών και συμπεριφορικών παρεμβάσεων. Η εκτόνωση του συναισθήματος θεωρείται αναγκαία σε περιπτώσεις που άπτονται της ανακοίνωσης μιας διάγνωσης και υποτροπής. Απαραίτητα ωστόσο, συνοδεύεται από την αναδόμηση της κατάστασης και τη διαμόρφωση νέων πιο λειτουργικών τρόπων διαχείρισης του στρες. Η εκτόνωση του συναισθήματος δεν ενθαρρύνεται σε περιπτώσεις που συνυπάρχει έντονο καταθλιπτικό συναίσθημα, άγχος, γνωσιακές διαστρεβλώσεις-παραποιήσεις, συμπεριφορικά ελλείμματα και αποφυγές, όπου προτιμώνται τεχνικές επίλυσης προβλημάτων[9,11].

Στα πλαίσια της παρέμβασης, συχνές συναισθηματικές αντιδράσεις αποτελούν η άρνηση και ο θυμός. Αρχικά ο θεραπευτής καλείται να μην αντιπαρατεθεί στην άρνηση του ασθενούς, καθώς αυτή μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό διαχείρισης. Ωστόσο, στην περίπτωση που η άρνηση αποτρέπει τον ασθενή στη συμμόρφωση με τη θεραπεία, συνυπάρχει με άγχος και κατάθλιψη, ή εμποδίζει την αποτελεσματική επίλυση προβλημάτων, τότε πρέπει να αντιμετωπίζεται[9,11].

Από την άλλη, ο θυμός που συνδέεται με την αίσθηση αδικίας που μπορεί να αισθάνεται ο θεραπευόμενος συχνά δεν εκφράζεται, καθώς θεωρείται ηθικά ανεπίτρεπτο συναίσθημα, ή μπορεί να μην αναγνωρίζεται από τον ασθενή στις περιπτώσεις αποφυγής και άρνησης. Η ίδια η εκτόνωση του θυμού είναι θεραπευτική και αναγκαία, καθώς παρέχει μια ανακούφιση και συνακόλουθα αφήνει χώρο στην γνωσιακή εξέταση της λογικής του θυμού και των εναλλακτικών διαχείρισής του. Επιπλέον λύσεις διοχέτευσης του θυμού αποτελούν η άσκηση σε δραστηριότητες (π.χ. περίπατος), καθώς και στη διεκδικητική συμπεριφορά[9,11].

3. Αποτελεσματικότητα

Ήδη από τη δεκαετία του 1980, υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη αποτελεσματικότητα της Γνωσιακής Συμπεριφοριστικής Θεραπείας εφαρμοσμένη σε ασθενείς με καρκίνο. Επί σειρά ετών, οι ψυχολόγοι μελετούν τις αρνητικές επιπτώσεις σε συναισθηματικό, συμπεριφορικό και κοινωνικό επίπεδο που βιώνουν ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο[9]. Παρόλο που σε περιπτώσεις όπως η διάγνωση καρκίνου του μαστού μπορεί να είναι μια έντονα στρεσογόνος κατάσταση, μελέτες δείχνουν ότι με την αποτελεσματική αντιμετώπιση των κρίσεων κατά τη πορεία της νόσου, οι ασθενείς μπορεί να έχουν θετικά ψυχολογικά αποτελέσματα[12]. Βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, ασθενείς αναφέρουν πως η εμπειρία του να έχουν καρκίνο τους ισχυροποίησε τα αποθεματικά χειρισμού του εαυτού τους καθώς και τις δεξιότητες τους[13,14]. Επίσης, όσοι αντιμετώπιζαν λειτουργικά τον καρκίνο και τις αρνητικές επιπτώσεις που είχε η νόσος στη ζωή τους, αναφέρουν ότι η διαδικασία αυτή τους οδήγησε στο να έχουν θετικές συνέπειες και σε άλλους τομείς για το υπόλοιπο της ζωής τους[15].

Η αποτελεσματικότητα της Γνωσιακής Συμπεριφορικής Θεραπείας εφαρμοσμένη σε ασθενής με καρκίνο, έχει αποδειχτεί τόσο σε ατομικό όσο και σε ομαδικό επίπεδο. Επίσης, η ΓΣΘ αποτελεί την πλέον αποτελεσματικότερη ψυχοθεραπευτική παρέμβαση σε ασθενείς με καρκίνο. Πλήθος ερευνών υποστηρίζει την αποτελεσματικότητα της ΓΣΘ στην προαναφερθείσα διαγνωστική κατηγορία, που συνεχώς αυξάνεται. Ενδεικτικά, παραθέτω μερικές από τις σχετικές έρευνες που έχουν δημοσιευτεί: Greer, και συν. (1992)[11]; Golden και Gersh (1990)[16]; Greer (1995)[17]; Moorey, και συν. (1994)[18]; McGregor και συν. (2004)[19]; Osborn, Demoncada και Feuerstein (2006)[20]; Tatrow και Montgomery (2006)[21]; Gielissen, Verhagen και Bleijenberg (2007)[22]; Moorey, και συν. (2008)[23]; Fors, και συν. (2010)[24]; Goedendorp, και συν. (2010)[25]; Greer, και συν. (2012)[26]; Gudenkauf και συν. (2015)[27].

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα της ΓΣΘ σε ασθενείς με καρκίνο, οι Greer, και συν.[11] συνέκριναν την ποιότητα ζωής 156 ασθενών με καρκίνο που έλαβαν ΓΣΘ για 8 εβδομάδες, με ασθενείς με καρκίνο που δεν έλαβαν καθόλου υποστήριξη. Το συγκεκριμένο γνωσιακό – συμπεριφοριστικό πρωτόκολλο βραχείας παρέμβασης ήταν δομημένο για τους συγκεκριμένους ασθενείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν ΓΣΘ, ανέφεραν χαμηλότερα επίπεδα στο αίσθημα

αβοηθητότητας, την αγχώδη προδιάθεση, την κατάθλιψη, και το αίσθημα του θανάτου, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν έλαβαν παρέμβαση, ενώ σημείωναν σημαντικά υψηλότερες τιμές στη διάθεση να αγωνιστούν (αγωνιστικό πνεύμα). Τέσσερις μήνες αργότερα (follow-up) η βελτίωση αυτή ήταν σταθερή.

Επίσης, οι Moorey και συν.[18] σε μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη, εξέτασαν την αποτελεσματικότητα της ΓΣΘ στο επίπεδο ψυχολογικής δυσφορίας, σε 174 ασθενείς με καρκίνο. 1 έτος μετά τη λήξη της θεραπείας, οι ασθενείς της ερευνητικής ομάδας που έλαβαν ΓΣΘ παρουσίασαν μειωμένη ψυχολογική δυσφορία, όπου ήταν μικρότερη από την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, υπήρχε μία τάση της ερευνητικής ομάδας (ΓΣΘ), για μεγαλύτερη αλλαγή στις μετρήσεις της αβοηθητότητας και του άγχους. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα μακροπρόθεσμα τα οφέλη της ΓΣΘ στο άγχος και στην κατάθλιψη είναι εμφανή. Η εν λόγω έρευνα έδειξε, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της ερευνητικής ομάδας που έλαβε ΓΣΘ, 1 χρόνο μετά τη λήξη της θεραπείας δε λαμβάνει διάγνωση σχετιζόμενη με άγχος, ή κατάθλιψη.

Ακόμα, οι McGregor και συν.[19] εξέτασαν την αποτελεσματικότητα της ΓΣΘ στη διαχείριση του στρες, συγκρίνοντας την συναισθηματική ευεξία και την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, σε ομάδα γυναικών σε αρχικό στάδιο καρκίνου του μαστού. Η συνολική διάρκεια της παρέμβασης ήταν 10 εβδομάδες, όπου κατά τη λήξη οι γυναίκες της πειραματικής ομάδας που έλαβαν ΓΣΘ, ανέφεραν μεγαλύτερη αίσθηση οφέλους από τη νόσο, εν συγκρίσει με τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Ακολούθησε μια εξέταση της ομάδας των γυναικών που είχαν λάβει ΓΣΘ 3 μήνες μετά, και παρατηρήθηκε πως είχαν βελτίωση στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, γεγονός που αποδεικνύει την καλύτερη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τέλος, οι Gielissen, Verhagen και Bleijenberg[22] σε μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη, εξέτασαν τις μακροχρόνιες επιδράσεις της ΓΣΘ στο μέγεθος κόπωσης, στο επίπεδο λειτουργικότητας, και στην ψυχολογική δυσφορία, σε επιζώντες από καρκίνο με υψηλό επίπεδο κόπωσης. Οι μετρήσεις έγιναν σε 4 φάσεις, όπου η 1η φάση ήταν πριν τη θεραπεία, η 2η φάση στο τέλος της θεραπείας, η 3η φάση μετά από 2 έτη (short-term follow-up), και η 4η φάση μετά από 4 έτη (long-term follow-up). Αξιοσημείωτο είναι, ότι οι θετικές επιδράσεις της ΓΣΘ στο μέγεθος κόπωσης, στο επίπεδο λειτουργικότητας, και στην ψυχολογική δυσφορία, παρέμειναν σταθερές ακόμη και 4 έτη μετά το πέρας της θεραπείας. Συμπερασματικά, η ΓΣΘ απευθυνόμενη σε επιζώντες από καρκίνο με υψηλό επίπεδο κόπωσης, διατηρεί τα θετικά αποτελέσματα για μεγάλο χρονικό διάστημα από τη λήξη της θεραπείας.

REFERENCES

1. Spiegler MD, Guevremont DC: Contemporary behavior therapy (5th ed.). Belmond, CA: Wadsworth. 2010
2. Westbrook D, Kennerly H, Kirk J: An introduction to cognitive behaviour therapy: skills and applications. London: Sage Publications. 2007
3. Beck J: Cognitive behavior therapy (2nd ed.). New York: The Guilford Press. 2011
4. Beck AT: Cognitive Therapy and the Emotional Disorders. New York: International Universities Press. 1976
5. Butler AC, Chapman JE, Forman EM, et al: The empirical status of cognitive-behavioral therapy: A review of meta-analyses. Clinical Psychology Review 26:17-31, 2006
6. NHS: Cognitive behavioural therapy – when it is used. Retrieved from http://www.nhs.uk/Conditions/Cognitive-behavioural-therapy/Pages/What-is-it-used-for.aspx 2012
7. Lazarus RS, Folkman S: Stress, Appraisal and Coping. New York: Springer. 1984
8. Greer S: Cancer: Psychiatric Aspects. In Granville Grossman K. (ed.) *Recent Advances in Clinical Psychiatry*. Edinburgh: Churchill-Livingstone. 1985
9. Moorey S, Greer S: Cognitive behaviour therapy for people with cancer. Oxford: Oxford University Press. 2002
10. Greer S, Watson M: Mental adjustment to cancer: Its measurement and prognostic

importance. Cancer Surveys 6:439-453, 1987
11. Greer S, Moorey S, Baruch JDR, et al: Adjuvant psychological therapy for patients with cancer. BMJ 304:675-80, 1992
12. Stanton AL, Snider PR: Coping with a breast cancer diagnosis. Health Psychol 12:16-23, 1993
13. Dow KH, Ferrel BR, Leigh S, et al: An evaluation of the quality of life among long-term survivors of breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment 39:261-273, 1996
14. Taylor SE, Kemeny ME, Reed GM, et al: Psychological resources, positive illusions, and health. American Psychologist 55:99-109, 2000
15. Tedeschi RG, Calhoun LG: Trauma and transformation: Growing in the aftermath of suffering. Thousand Oaks. CA. Sage. 1995
16. Golden WL, Gersh WD: Cognitive-behavior therapy in the treatment of cancer patients. Journal of Rational-Emotive & Cognitive-Behavior Therapy 8, 1990
17. Greer S: Improving quality of life: Adjuvant psychological therapy for patients with cancer Support Care Cancer 3:248-251, 1995
18. Moorey S, Greer S, Watson M, et al: Adjuvant psychological therapy for patients with cancer: Outcome at one year. PSYCHO-ONCOLOGY 3:39-46, 1994
19. McGregor BA, Antoni MH, Boyers A, et al: Cognitive–behavioral stress management increases benefit finding and immune function among women with early-stage breast cancer. Journal of Psychosomatic Research 56:1-8, 2004
20. Osborn RL, Demoncada AC, Feuerstein M: Psychosocial interventions for depression, anxiety, and quality of life in cancer survivors: Meta-analyses. INT'L. J. PSYCHIATRY IN MEDICINE 36:13-34, 2006
21. Tatrow K, Montgomery GH: Cognitive behavioral therapy techniques for distress and pain in breast cancer patients: A Meta-Analysis. Journal of Behavioral Medicine 29, 2006
22. Gielissen MFM, Verhagen CAHHVM, Bleijenberg G: Cognitive behaviour therapy for fatigued cancer survivors: Long-term follow-up. British Journal of Cancer 97:612-618, 2007
23. Moorey S, Cort E, Kapari M, et al: A cluster randomized controlled trial of cognitive behaviour therapy for common mental disorders in patients with advanced cancer. Psychological Medicine 1-11, 2008
24. Fors EA, Bertheussen GF, Thune I, et al: Psychosocial interventions as part of breast cancer rehabilitation programs? Results from a systematic review. Psycho-Oncology, 2010
25. Goedendorp MM, Peters MEWJ, Gielissen MFM, et al: Is increasing physical activity necessary to diminish fatigue during cancer treatment? Comparing cognitive behavior therapy and a brief nursing intervention with usual care in a multicenter randomized controlled trial. The Oncologist 15:1122-1132, 2010
26. Greer JA, Traeger L, Bemis H, et al: A pilot randomized controlled trial of brief cognitive-behavioral therapy for anxiety in patients with terminal cancer. The Oncologist 17:1337-1345, 2012
27. Gudenkauf LM, Antoni MH, Stagl JM, et al: Brief cognitive-behavioral and relaxation training interventions for breast cancer: A randomized controlled trial. J Consult Clin Psychol 83:677-688, 2015

ΨΕΥΔΟΜΥΞΩΜΑ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ

[1]Π. Καραϊσκάκης, [1]Α. Πέτσα, [2]Τ. Κοκκινόπουλος

[1]Μαιευτικό – Γυναικολογικό Τμήμα Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα»
[2]Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Σόφιας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το ψευδομύξωμα περιτοναίου αποτελεί σπάνια νόσο, άγνωστης αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποσότητα βλεννώδους ασκίτη και περιτοναϊκές εμφυτεύσεις. Ιστολογικά, υπάρχουν δύο τύποι (διάχυτη περιτοναϊκή βλεννοαδένωση και περιτοναϊκή βλεννώδης καρκινωμάτωση). Συνήθως, διαγιγνώσκεται τυχαία σε λαπαροτομίες για άλλες ενδείξεις. Εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες (75%), με μέση ηλικία τα 53 έτη. Η συχνότητά της είναι 2 περιπτώσεις/10.000 επεμβάσεις. Επικρατέστερες θέσεις προέλευσης είναι η σκωληκοειδής απόφυση και οι ωοθήκες.

Σκοπός: Είναι η παρουσίαση του τρόπου διαχείρισης ενός περιστατικού που προσήλθε στο νοσοκομείο μας.

Υλικό – Μέθοδος: Μία 74χρονη γυναίκα (GIV,PIII) προσήλθε λόγω αναφερόμενης καταβολής, απώλειας σωματικού βάρους και οσφυοϊσχιαλγίας από 3μήνου.

Αποτελέσματα: Η ασθενής υποβλήθηκε σε απεικονιστικό έλεγχο, όπου αναδείχτηκαν ευμεγέθης χωροκατακτητική εξεργασία (πιθανώς από τις ωοθήκες) και ασκιτική συλλογή στους περιτοναϊκούς χώρους (εικόνα περιτοναϊκών διηθήσεων). Διεγχειρητικά, διαπιστώθηκε ελεύθερο υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα (αρνητική κυτταρολογική εξέταση) και πολλαπλά κυστικά μορφώματα με βλεννώδες περιεχόμενο (στερεά συμφυόμενα με τις γύρω περιοχές). Η ιστολογική εξέταση ανέδειξε ψευδομύξωμα περιτοναίου.

PSEUDOMYXOMA PERITONEI: CASE REPORT

Petsa A.[1], Karaiskakis P.[1], Kokkinopoulos T.[2]

[1]Department of Obstetrics – Gynecology, "Alexandra" Hospital
[2]Medical School, University of Sofia

ABSTRACT

Introduction: Pseudomyxoma peritonei is a rare clinical condition of unknown etiology. It is characterized by a large amount of mucin or gelatinous ascites and peritoneal implants. Histologically, there are two types (disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis). This disease is often discovered during surgery for other conditions. It is more common in women (75%). The median age at presentation is typically about 53 years old. The overall incidence is 2 cases/10.000 operations. This disease is most commonly caused by an appendiceal primary cancer or by mucinous tumors of the ovary.

Objective: Presentation of the management of a woman, who referred to our hospital, with this kind of tumor.

Material and Methods: A 74 – year old woman (GIV, PIII) was admitted to our hospital claiming that she suffered from weakness, weight loss and lumbar pain for the last 3 months. **Results**: The patient underwent imaging evaluation, which revealed a sizable mass lesion (probably originating from the ovaries) and a significant amount of intraperitoneal ascites (revealing an image of peritoneal implants). The patient underwent an exploratory laparotomy (the cytologic examination of the intraperitoneal fluid was negative for malignant cells) and multiple cystic formations with mucinous content and extended adhesions with the surrounding areas.

Ακολούθησε κοιλιακή ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων, ολική επιπλεκτομή και ογκομείωση. Παρουσιάστηκε εκσεσημασμένη αιμορραγία στον προϊερό χώρο και έγιναν πολλαπλές προσπάθειες αιμόστασης. Η ασθενής, αφού σταθεροποιήθηκε, διακομίστηκε λόγω απόφραξης της λαγονο-μηριαίας αρτηρίας. Αλλαχού, υποβλήθηκε σε ακρωτηριασμό δεξιού κάτω άκρου, κολοστομία και νεφρεκτομή. Μετά από περίπου 1 μήνα, η ασθενής κατέληξε.

Συμπέρασμα: Η νόσος παρουσιάζει ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, αναλόγως της εντόπισής της. Οι σημαντικότερες επιπλοκές είναι: θάνατος, εκσεσημασμένη αιμορραγία, λοίμωξη αναπνευστικού, περιτονίτιδα και διάτρηση εντέρου. Πιστεύεται ότι η ριζική κυτταρομειωτική επέμβαση και η σκωληκοειδεκτομή αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας (λόγω ακαθόριστης πρόγνωσης και συχνών υποτροπών). Η θεραπεία εκλογής είναι αμφισβητούμενη. Ο ρόλος της ενδοπεριτοναϊκής, διεγχειρητικής χημειοθεραπείας διερευνάται. Η τελική έκβαση ποικίλει αναλόγως του ιστολογικού τύπου και της θεραπείας.

Λέξεις – κλειδιά: Ψευδομύξωμα περιτοναίου, βλεννώδης ασκίτης, διάχυτη περιτοναϊκή βλεννοαδένωση, περιτοναϊκή βλεννώδης καρκινωμάτωση, πρόγνωση, θεραπεία.

Biopsy revealed pseudomyxoma peritonei. She was submitted to hysterectomy with bilateral salpingoophorectomy, omentectomy, and maximal surgical reduction of the tumor. She presented massive intra-operative bleeding in the pre-sacral area and multiple attempts for hemostasis were made. Once the patient was stabilized, she was transferred to another hospital due to an obstruction of the ilio-femoral artery. There, she was submitted to an amputation of the right lower limb, to a colostomy, and to a nephrectomy. About after a month, the patient passed away.

Conclusions: This disease presents a wide range of clinical manifestations, depending on the localization. Major complications are: death, massive bleeding, respiratory infection, peritonitis, and intestinal perforation. It is considered that maximal surgical reduction of the tumor and appendectomy are the gold standards of the treatment (due to undetermined prognosis and frequent relapses). The treatment of choice is controversial. The role of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) remains under investigation. The final outcome depends on the histological type and the treatment.

Key words: pseudomyxoma peritonei, mucinous ascites, disseminated peritoneal adenomucinosis, peritoneal mucinous carcinomatosis, prognosis, treatment

Εισαγωγή

Το ψευδομύξωμα περιτοναίου αποτελεί σπάνια νόσο, άγνωστης αιτιολογίας. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλης ποσότητας βλεννώδους ασκίτη και περιτοναϊκών εμφυτεύσεων, που σταδιακά καταλαμβάνουν την περιτοναϊκή κοιλότητα.

Είναι ασυνήθες κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την αργή συσσώρευση περιτοναϊκών εμφυτεύσεων και από βλεννώδη ασκίτη, ο οποίος είναι ενδεικτικός παραμελημένης νόσου. Θεωρείται αποτέλεσμα της διασποράς εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας νεοπλασματικών βλεννοεκκριτικών κυττάρων με χαμηλού βαθμού δυσπλασία, προερχόμενα από τη ρήξη βλεννωδών όγκων ωοθηκών ή σκωληκοειδούς. Ιστολογικά, έχουν περιγραφεί δύο τύποι: η διάχυτη περιτοναϊκή βλεννοαδένωση και η περιτοναϊκή βλεννώδης καρκινωμάτωση.

Συνήθως, διαγιγνώσκεται τυχαία σε λαπαροτομικές επεμβάσεις για άλλες ενδείξεις. Εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες (75%), με μέση ηλικία τα 53 έτη. Η συχνότητά της είναι 2 περιπτώσεις/10.000 επεμβάσεις. Δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη η θέση προέλευσης της νόσου. Επικρατέστερες είναι η σκωληκοειδής απόφυση και οι ωοθήκες.

Περιγραφή περιστατικού

Μία 74χρονη γυναίκα (GIV,PIII) προσήλθε στο νοσοκομείο μας λόγω αναφερόμενης καταβολής, απώλειας σωματικού βάρους και οσφυοϊσχιαλγίας από 3μήνου. Από το **ατομικό**

της αναμνηστικό, ανέφερε αρτηριακή υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη υπό φαρμακευτική αγωγή. Κατά την **κλινική εξέταση**, ανευρέθηκαν: διόγκωση της κοιλίας, καθώς και παρουσία ασκιτικού υγρού και ευμεγέθους πυελικής μάζας. Από τον **εργαστηριακό έλεγχο**, δεν ανευρέθηκαν παθολογικές τιμές.

Στον **απεικονιστικό έλεγχο**, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με αξονική και μαγνητική τομογραφία, αναδείχτηκαν ευμεγέθης χωροκατακτητική εξεργασία, πιθανώς από τις ωοθήκες, και ασκιτική συλλογή σε όλους τους περιτοναϊκούς χώρους, με εικόνα περιτοναϊκών διηθήσεων. ***(Εικόνα 1)***

Διεγχειρητικά, διαπιστώθηκε ελεύθερο υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα (εστάλη για κυτταρολογική εξέταση, το αποτέλεσμα της οποίας ήταν αρνητικό για κακοήθεια) και πολλαπλά κυστικά μορφώματα με βλεννώδες περιεχόμενο, τα οποία εμφάνιζαν στερεές συμφύσεις με το λεπτό και το παχύ έντερο, τη σκωληκοειδή απόφυση, το δουγλάσσειο, τον προϊερό χώρο, τα κοιλιακά τοιχώματα, τη μήτρα και τα εξαρτήματα, χωρίς να αναγνωρίζεται σαφώς η προέλευσή τους.

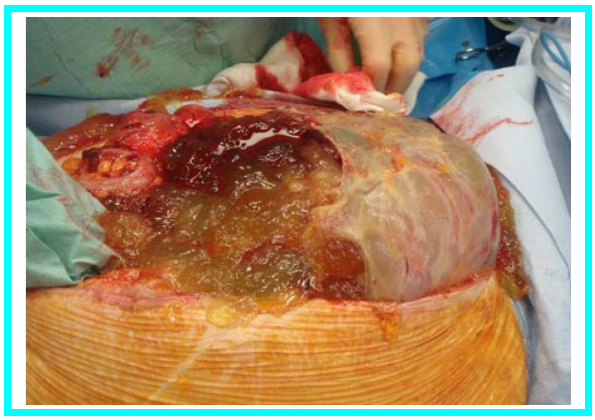
Η ιστολογική εξέταση ανέδειξε ψευδομύξωμα περιτοναίου. Ακολούθησε κοιλιακή ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων άμφω, τμηματική επιπλεκτομή και ογκομείωση.

Εικόνα 1. Προεγχειρητική απεικόνιση, που αναδεικνύει διάχυτη νόσο στο περιτόναιο με παρουσία βλεννώδους ασκίτη.

Διαπιστώθηκε εκσεσημασμένη αιμορραγία από τον προϊερό χώρο, για την οποία έγιναν ανεπιτυχώς πολλαπλές προσπάθειες αιμόστασης. Η ασθενής, εφόσον σταθεροποιήθηκε, διακομίστηκε λόγω απόφραξης της λαγονο-μηριαίας αρτηρίας. Αλλαχού, υποβλήθηκε σε ακρωτηριασμό δεξιού κάτω άκρου, κολοστομία και νεφρεκτομή. Μετά από 1 μήνα, η ασθενής κατέληξε.

Συζήτηση

Το Pseudomyxoma peritonei είναι μία σχετικά σπάνια διεργασία (1/1.00.000 το χρόνο). Εξορμάται συνήθως από διαρρηχθείσα βλεννοκήλη σκωληκοειδούς απόφυσης και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων βλεννώδους υλικού, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ζελατινώδους κοιλίας (jelly belly). ***(Εικόνα 2)***



Εικόνα 2. Εικόνα ζελατινώδους κοιλίας (jelly belly).

Τα συμπτώματα των ασθενών είναι άτυπα και μπορεί να διαφέρουν από αμβληχρά έως συμπτώματα εντερικής απόφραξης. Γενικά, μπορεί να εκδηλωθεί τόσο με νευροπάθειες, όπως οσφυοϊσχιαλγία, όσο και με συμπτωματολογία εντερικής απόφραξης. Οι επιπλοκές της νόσου είναι: θάνατος, σημαντική απώλεια αίματος, λοίμωξη αναπνευστικού, περιτονίτιδα, διάτρηση εντέρου, απόφραξη εντέρου και διαπύηση της χειρουργικής τομής.

Η προεγχειρητική διάγνωση είναι δύσκολη αλλά απαραίτητη για τον καθορισμό της βέλτιστης χειρουργικής αντιμετώπισης. Η φυσική ιστορία της νόσου άλλαξε μετά την εισαγωγή της εκτομής του περιτοναίου από τον Sugarbaker, δηλαδή της πλήρους εκτομής του όγκου και των εμφυτεύσεών του από την περιτοναϊκή κοιλότητα, ακολουθούμενο από υπερθερμική ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία (HIPEC). Το ψευδομύξωμα περιτοναίου σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και

θνητότητα, με 10ετή επιβίωση μικρότερη από 50%.

Συμπεράσματα

Η κλινική εικόνα της νόσου παρουσιάζει ευρύ φάσμα, ανάλογα με την εντόπιση της νόσου. Οι σημαντικότερες επιπλοκές της νόσου είναι: θάνατος, εκσεσημασμένη αιμορραγία, λοίμωξη αναπνευστικού, περιτονίτιδα και διάτρηση εντέρου. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν στο ότι η ριζική κυτταρομειωτική επέμβαση και η σκωληκοειδεκτομή αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της νόσου, λόγω της ακαθόριστης πρόγνωσης και των συχνών υποτροπών.

Η θεραπεία εκλογής παραμένει υπό αμφισβήτηση. Ο ρόλος της ενδοπεριτοναϊκής, διεγχειρητικής χημειοθεραπείας είναι υπό διερεύνηση. Μέχρι στιγμής, είναι βέβαιο ότι η προεγχειρητική σταδιοποίηση είναι απαραίτητη, ενώ φαίνεται ότι η τεχνική Sugarbaker, σε συνδυασμό με την εφαρμογή HIPEC, είναι η καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση.

Η έκβαση της νόσου ποικίλει ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο, την έκταση της νόσου και το μέγεθος των προηγούμενων χειρουργικών παρεμβάσεων στη νόσο.

REFERENCES

1. Γαλάνη Ε. Ψευδομύξωμα περιτοναίου. Βήμα Κλινικής Ογκολογίας, Τόμος 2, Τεύχος 2, Απρίλιος – Ιούνιος 2002.
2. Hirano M., Yonemura Y., Canbay E., Ichinose M., Togawa T., Matsuda T., Takao N., Mizumoto A. Laparoscopic Diagnosis and Laparoscopic Hyperthermic Intraoperative Intraperitoneal Chemotherapy for Pseudomyxoma Peritonei Detected by CT Examination. Gastroenterol Res Pract. 2012; 2012: 741202.
3. Miner T., Shia J., Jaques D., Klimstra D., Brennan M., Coit D. Long-term Survival Following Treatment of Pseudomyxoma Peritonei: An Analysis of Surgical Therapy. Ann Surg. 2005 February; 241(2): 300–308.
4. Galani E., Marx GM., Steer CB., Culora G., Harper PG. Pseudomyxoma periotonei: “the controversial” disease. Int J Gynecol Cancer 2003, 13, 413 – 418.
5. Φαλίδας Ε., Τούμπης Σ., Χριστόπουλος Γ., Παυλάκη Α., Βλάχος Κ., Βίλλιας Κ. Ψευδομύξωμα περιτοναίου οριακής κακοήθειας: Παρουσίαση περιστατικού, Απεικονιστικά και διεγχειρητικά ευρήματα.
6. Φύλλος Α., Τσιακμάκης Σ., Καλογρίτσας Ν., Τσαγκούλης Ν., Μπουρονίκου Ά., Κοτόπουλος Γ., Παπαευαγγέλου Β., Γαντζούλας Σ. Ψευδομύξωμα περιτοναίου ως «τυχαίο» εύρημα σε προγραμματισμένη λαπαροσκοπική επέμβαση.
7. National Institute for Health and Clinical Excellence. Complete cytoreduction for pseudomyxoma peritonei (Sugarbaker Technique). April 2004.
8. Mirnezami A., Moran B., Cecil T. Sugarbaker procedure for Pseudomyxoma peritonei. Tech Coloproctol (2009), 13: 373 – 374.

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΙΚΗΣ

[1]Θ. Κουρέλης, [2]Κ. Κουρέλης , [3]Δ. Μπασιούκα, [4]Μ. Κουτρούλη, [1]Π. Κουτσιαρά, [1]Ε. Γκαμούλου, [5]Στ. Γιώτης, [6]Α. Ακτύπη, [7]Σ. Ξυνόγαλος και [8]Π. Γκινόπουλος

[1]Μονάδα Παθολογικής Ογκολογίας, «Ολύμπιον Θεραπευτήριον» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.
[2]ΩτοΡινοΛαρυγγολογική Κλινική, «Καραμανδάνειο» Νοσοκομείο Παίδων Πατρών
[3]Νευρολογική Κλινική, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών
[4]Τομέας Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»
[5]Αιματολογική Κλινική, «Ολύμπιον Θεραπευτήριον» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.
[6]Φαρμακείο, «Ολύμπιον Θεραπευτήριον» Γενική Κλινική Πατρών Α.Ε.
[7]Ειδικό Αντικαρινικό Νοσοκομείο Πειραιά «Μεταξά», Τομέας Παθολογικής Ογκολογίας
[8]ΜΧΜΘ- Ογκολογικό, Γενικό Νοσοκομείο Πατρών «Ο Άγιος Ανδρέας»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρωτεΐνωμική ορίζεται ως η μεγάλης κλίμακας ανάλυση σύνθετων πρωτεϊνικών μειγμάτων, η οποία περιλαμβάνει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών, τον προσδιορισμό πρωτεϊνικών τροποποιήσεων, αλληλεπιδρά-σεων, δραστηριοτήτων και λειτουργιών. Μια πρωτεομική ανάλυση αποτελείται από πολλά επιμέρους πειραματικά στάδια, αλλά και από το στάδιο της μετα-ανάλυσης κατά το οποίο η γνώση που προέρχεται από την πρωτεομική εμπλουτίζεται από πληροφορία που βρίσκεται σε βάσεις δεδομένων, οντολογίες αλλά και την βιβλιογραφία. Συνεπώς, οι ερευνητές έρχονται αντιμέτωποι με μια πληθώρα ασύνδετων πρωτεομικών χαρακτηριστικών τα οποία καλούνται να οργανώσουν, συσχετίσουν και κατηγοριοποιήσουν ώστε να εντοπίσουν ενδια-φέροντα ευρήματα που σχετίζονται με τον βιολογικό σκοπό μιας μελέτης.

Λέξεις κλειδιά: οργανολογία, πρωτεΐνωμική, μικροσυστοιχίες, φασματομετρία μάζας, υβριδοποίηση, ανάλυση και επεξεργασία εικόνας

ORGANOLOGY IN PROTEOMICS ANALYSIS

[1]Th. Kourelis, [2]K. Kourelis, [3]D. Basiouka, [4]M. Koutrouli, [1]P. Koutsiara, [1]E. Gamoulou, [5]St Giotis, [6]A. Aktypi, [7]S.Xynogalos and [8]P. Ginopoulos

[1]Medical Oncology Unit, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.
[2]ENT Clinic, «Karamandaneio» Children Hospital of Patras
[3]Neurology Clinic, Peripheral University Hospital of Patras
[4]Section of Cell Genetic Biology and Development, Biology Dept., University of Patras "St Andreas"
[5]Clinical Hematology Clinic, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.
[6]Pharmacy, «Olympion» General Clinic of Patras A.E.
[7]Special AnticancerHospital Peiraus "Metaxa", Dept. of Medical Oncology
[8]Dept of Clinical Oncology, General Hospital of Patras «St Andreas»

ABSTRACT

Proteomics aims to elucidate the entire content of proteins in cells, organs or organisms, including protein abundances, protein modifications and protein-protein interactions. Challenges arise from the overall protein content that differs between organs or cell types, and it changes over time and in response to physiological conditions. Specific proteins exist in multiple splice variants, vary in abundance, and almost all proteins carry post-translational modifications (PTMs). The rapid development of new instrumentation and data analysis tools have made mass spectrometry (MS)-based proteomics the currently best-suited technology to study complex molecular and cellular processes in cells and organisms.

Keywords: organology, proteomics, microarrays, mass-sprctrometry, hybridization, Image analysis and processing.

Πρωτεϊνωμική (proteomics) είναι η μελέτη του πρωτεϊνώματος (proteome). Πρωτεΐνωμα είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα. Ο όρος πρωτεΐνωμα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996 από τον Wilkins προκειμένου να περιγράψει σε αντιστοιχία με το γονιδίωμα (genome) το συνολικό πρωτεϊνικό συμπλήρωμα του γονιδιώματος ενός οργανιδίου, κυττάρου, ιστού ή/και ολόκληρου οργανισμού (proteome=the **prot**ein complement of a gen**ome**). Τα πρωτεϊνώματα αποτελούν το αποτέλεσμα της γονιδιακής έκφρασης, επηρεάζουν τον φαινότυπο του κυττάρου και εμφανίζουν ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές κατά την παθολογική διεργασία. Αρχικά η πρωτεϊνωμική ορίστηκε ως η μελέτη της λειτουργίας όλων των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Ωστόσο σύμφωνα με ένα αναλυτικότερο ορισμό από τον Stanley Fields το 2001 ο όρος πρωτεϊνωμική συμπεριλαμβάνει όχι μόνο την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, αλλά και τον προσδιορισμό της εντόπισής τους, τις τροποποιήσεις, αλληλεπιδράσεις, δραστικότητες και τελικά τη λειτουργία τους[1].

Σήμερα ο όρος πρωτεϊνωμική περιλαμβάνει τη μελέτη όχι μόνο του συνόλου των πρωτεϊνών οποιουδήποτε κυττάρου, αλλά και το σύνολο όλων των ισομορφών και των παραλλαγών τους, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, τη δομική περιγραφή των πρωτεϊνών και των συμπλεγμάτων τους και ως εκ τούτου ο,τιδήποτε «μεταγονιδιωματικό». Η πρωτεϊνωμική είναι μια επιστήμη πολλών όψεων για τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών και της μέτα-μεταφραστικής τροποποίησής τους, των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών, της οργάνωσης και της λειτουργίας τους σε ένα ολιστικό επίπεδο. Ο όρος πρωτεϊνωμική μπορεί να προκαλέσει σύγχυση, διότι αναφέρεται στη μελέτη πολλών, ίσως και χιλιάδων πρωτεϊνών ταυτόχρονα.

Γενικά μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την πρωτεϊνωμική, που βασίζεται στην ποσότητα έκφρασης (expression proteomics) και την πρωτεϊνωμική, που βασίζεται στη λειτουργία των πρωτεϊνών (functional proteomics). Η πρώτη βασίζεται στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε διαφορετικά δείγματα με την ελπίδα ότι θα αναγνωρισθούν πρωτεΐνες με αυξημένη ή ελαττωμένη έκφραση σε συγκεκριμένη κατάσταση, όπως σε ένα νόσημα σε σχέση με τη φυσιολογική κατάσταση. Η μελέτη αυτή ενδέχεται να οδηγήσει στην εύρεση στόχων για νοσήματα ή θεραπεία. Στη λειτουργική πρωτεϊνωμική ο σκοπός είναι η έκφραση πρωτεϊνών σε πειράματα υψηλής απόδοσης και η μελέτη της λειτουργίας τους. Η ελπίδα εδώ είναι να βρεθούν πρωτεΐνες, που προκαλούν μια φυσιολογική κατάσταση να οδηγηθεί σε νόσο (όπως ένα φυσιολογικό κύτταρο να γίνει καρκινικό) ή να δημιουργηθούν βάσεις δεδομένων περί των χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών (όπως η εντόπιση πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο και η κατηγοριοποίηση της ενζυμικής τους δραστικότητας). Αναφέρεται τέλος και η δομική πρωτεϊνωμική (structural proteomics), που έχει στόχο την καταγραφή της δομής όλων των πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, που υπάρχουν σε συγκεκριμένο κυτταρικό οργανίδιο και την ενσωμάτωση των μεταξύ τους σχέσεων σε ολοκληρωμένο λειτουργικό πρότυπο (proteomics map)[2].

Για όλα τα παραπάνω απαιτούνται νέα και βελτιωμένα τεχνολογικά συστήματα. Για την παραγωγή και μελέτη μιάς πρωτεΐνης η πλήρης αλληλουχία κωδικοποίησης της πρωτεΐνης πρέπει να είναι γνωστή και πρέπει να είναι διαθέσιμο ένα κλωνοποιημένο αντίγραφο DNA. Έχοντας διαθέσιμη την αλληλουχία του γονιδιώματος, η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του mRNA όλων σχεδόν των γονιδίων αναμένεται να ολοκληρωθεί τα επόμενα λίγα χρόνια. Ένα βασικό βήμα στη συνέχεια θα είναι η συναρμολόγηση μιάς πλήρους φυσικής συλλογής κλώνων DNA, που αντιπροσωπεύουν το πρωτεΐνωμα, έτσι ώστε να μπορούν να παραχθούν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες και να μελετηθεί η λειτουργία τους. Χρησιμοποιώντας εργαλεία κλωνοποίησης, που επιτρέπουν την ταχεία μεταφορά γονιδίων από πλασμίδιο σε πλασμίδιο, είναι δυνατόν να διεξαχθούν πειράματα μεγάλης κλίμακας για την ταυτόχρονη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών. Αυτό θα οδηγήσει σε βάσεις δεδομένων, από τις οποίες θα αντλούνται πληροφορίες για τη συμπεριφορά πρωτεϊνών και την επίδρασή τους στην αιτιολογία νοσημάτων. Στη συνέχεια αυτές οι ομάδες δεδομένων θα συνδυαστούν ενδεχομένως σε πληροφοριακά συστήματα

προτύπων (μοντέλων), στην ουσία «ηλεκτρονικών κυττάρων», που επιτρέπουν στους χρήστες να προβλέπουν την έκβαση ενός κυτάρου, αν τροποποιηθεί κατά συγκεκριμένο τρόπο. Έτσι η νέα πρόκληση στη μεταγονιδιωματική βιολογία θα είναι η διευκρίνιση της λειτουργίας κάθε πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα[1].

Η πρωτεϊνωμική δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τα προηγηθέντα επιτεύγματα της γονιδιωματικής, η οποία εξασφάλισε τις πληροφορίες για τα πιθανά προϊόντα των γονιδίων, τα οποία αποτελούν το κεντρικό στοιχείο των μελετών της πρωτεϊνωμικής. Όμως, ενώ η γονιδιωματική ωφελήθηκε τα μέγιστα από τις τεχνολογίες PCR και Sequencing που οδήγησαν σχετικά εύκολα στην ολοκλήρωση του Human Genome Project, η μελέτη του πρωτεϊνώματος δεν ήταν εξ ίσου εύκολη γιατί έχει να αντιμετωπίσει ορισμένα αναπόφευκτα προβλήματα. Τέτοια προβλήματα είναι η μεγάλη ποικιλία των δειγμάτων, η μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης σε ένα υλικό (η πρωτεΐνη δεν πολλαπλασιάζεται, όπως το DNA, με PCR), η εύκολη αποδόμηση του δείγματος, το τεράστιο δυναμικό εύρος, η πληθώρα των μεταγραφικών (alternative splicing) και μετα-μεταφραστικών (π.χ. γλυκοζυλίωση) τροποποιήσεων, το μεγάλο φάσμα των ιστών, το μέγεθος των ιστών, η ειδικότητα ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης και την ηλικία του οργανισμού, οι συνθήκες της συγκεκριμένης στιγμής, π.χ. επίδραση του stress, επίδραση φαρμάκων, μεταβολές κατά τη διάρκεια της νόσου, κ.α. Επίσης οι πρωτεΐνες έχουν μεγάλο φάσμα βιοχημικών ιδιοτήτων, περίπλοκη στερεοχημική δομή, είναι ασταθή μόρια, έχουν ευρύ φάσμα τιμών ισοηλεκτρικού σημείου, πολλές φορές είναι συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη και πρέπει να προσδιορισθούν στην αρχική τους συγκέντρωση και στην φυσική (native) στερεοδιαμόρφωσή τους μέσα σε πολύπλοκα δείγματα, χωρίς την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν με τεχνική αντίστοιχη της PCR. Έτσι, πολλές φορές, ενώ η πρωτεϊνωμική αναμένεται εξ ορισμού να περιγράψει και να διευκρινίσει τα διάφορα βιολογικά δρώμενα, όλες οι προαναφερθείσες δυσκολίες αποτελούν ανασχετικούς παράγοντες και συχνά οι πληροφορίες είναι περιορισμένες. Προκειμένου να περιγράψει το πρότυπο έκφρασης (expression profile) κάθε πρωτεΐνης, η πρωτεϊνωμική χρησιμοποιεί πολλαπλές αναλυτικές προσεγγίσεις (multiple analytical approaches) οι οποίες ποικίλουν από ειδικές για την πρωτεΐνη (Protein-specific analysis) σε σφαιρικές ή ενιαίες (Global analysis) και περιλαμβάνει τα εξής στάδια: λήψη δείγματος, καθαρισμός και απομόνωση των πρωτεϊνών, αναλυτικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων, σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με αλληλουχίες άλλων πρωτεϊνών και ταυτοποίησή τους[3].

Η λήψη του δείγματος (κύτταρα, βιολογικά υγρά, ορό, ούρα, ιστούς) ποικίλει από πολύ εύκολη ως εξαιρετικά δύσκολη. Ο καθαρισμός και η απομόνωση των κυτταρικών πρωτεϊνών από άλλα βιολογικά μόρια όπως υδατάνθρακες, λιπίδια και νουκλεϊνικά οξέα επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση απορρυπαντικών, αποδιατακτικών παραγόντων και ενζύμων (νουκλεασών) και με την εφαρμογή πρωτοκόλλων καθαρισμού τα οποία περιλαμβάνουν ανοσοϊστοχημεία, ανοσοκαθίζηση και καθαρισμό των προϊόντων λύσης των κυττάρων μέσω πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας αντίστροφης φάσεως (Reverse phase cell lysate arrays).

Ο αναλυτικός διαχωρισμός των πολύπλοκων πρωτεϊνικών μιγμάτων στα απλούστερα επιμέρους συστατικά τους, επιτυγχάνεται με μία ποικιλία τεχνικών όπως: α) ηλεκτροφόρηση μιάς διάστασης σε πήκτωμα αγαρόζης βασιζόμενη στο μοριακό βάρος, β) ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πήκτωμα αγαρόζης που συμπεριλαμβάνει αρχικό διαχωρισμό βάσει ισοηλεκτρικού σημείου και στη συνέχεια βάσει μεγέθους και αποτέλεσε αρχικά τη βασική μεθοδολογία διαχωρισμού στα proteomics, γ) υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), δ) διάφορους τύπους χρωματογραφίας υψηλής συγγένειας[1].

Η ισχυρότερη τεχνική περιλαμβάνει την ενσωμάτωση των διαφορετικών μεθόδων διαχωρισμού πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε πολυδιάστατους συνδυασμούς. Ο πρώτος συνδυασμός μεθόδων, που ήταν αυτός μεταξύ της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων και της φασματομετρίας μάζας, έκανε εφικτό τον ταχύ αναλυτικό διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό χιλιάδων πρωτεϊνών σε ένα απλό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ικανότητα αυτού του συνδυασμού μεθόδων, να διαχωρίζει χιλιάδες

πρωτεϊνών μιάς ειδικής κυτταρικής σειράς ή ενός ιστού, συμπεριλαμβανομένων και των μετα-μεταφραστικών τροποποιημένων μορφών τους, προήγαγε τον συνδυασμό αυτό ως την μείζονα τεχνική διαχωρισμού στην αναλυτική πρωτεϊνωμική. Συνεπώς ο προαναφερόμενος συνδυασμός μεθόδων αποτελεί την πλέον κατάλληλη μέθοδο για την σφαιρική και ενιαία (global) ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε ένα οργανισμό.

Στη συνέχεια ο συνδυασμός αυτός της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων με την φασματομετρία μάζας επεκτάθηκε περαιτέρω με την αρωγή των σύγχρονα αναπτυχθέντων μεθόδων χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών οι οποίες βασίζονται στον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας και στοχεύουν σε διαφορετικές τάξεις πρωτεϊνών. Αυτό είχε σαν τελικό αποτέλεσμα να έχει γίνει πλέον εφικτή η μελέτη των λειτουργιών διαφορετικών πρωτεϊνών και ο αναλυτικός διαχωρισμός τους με βάση τις διαφορετικές ενζυμικές τους δραστηριότητες. Εν τούτοις, η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων έχει κάποια δεδομένα μειονεκτήματα, όπως η περιορισμένη παραγωγή και έξοδος (limited throughput) των πρωτεϊνών που «τρέχουν» στο πήκτωμα, το περιορισμένο εύρος δυναμικής ανίχνευσης, η πτωχή ικανότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων, η χαμηλή ευαισθησία, καθώς και η δυσκολία στην ανάλυση υδρόφοβων, χαμηλού μοριακού βάρους, πολύ όξινων, ή πολύ βασικών πρωτεϊνών[3].

Οι σταθερά αυξανόμενες βελτιώσεις και καινοτομίες στην τεχνολογία της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων όπως η εφαρμογή ευαίσθητων υλικών και μεθόδων χρωστικής, η χρησιμοποίηση πηκτωμάτων υψηλής αναλυτικής ικανότητας, καθώς και η κλασματοποίηση των δειγμάτων πρό της εισαγωγής τους στο πήκτωμα, οδήγησαν στην ύφεση των παραπάνω δεδομένων μειονεκτημάτων, αλλά όχι στην πλήρη εξαφάνισή τους. Πρόσφατες προσεγγίσεις αποτέλεσαν επίσης η διαφορική ηλεκτροφόρηση (differential gel electrophoresis – DIGE) και η πολλαπλή πρωτεϊνωμική προσέγγιση (multiplexed proteomics approach – MP approach). Ο πλέον σύγχρονος συνδυασμός αναλυτικών μεθόδων στην πρωτεϊνωμική, εισήχθει από τους Yates και συν., και είναι η πολυδιάστατη τεχνολογία ταυτοποίησης πρωτεϊνών (Multidimensional protein identification technology – MudPIT). Η MudPIT ενσωματώνει και τη φασματομετρία μάζας (mass spectrometry – MS), δηλαδή τη βασική τεχνολογία ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, και είναι αυτοματοποιημένη.

Στην τεχνική της MudPIT πολλαπλοί διαφορετικοί τύποι στηλών ανάλυσης συζεύγνυνται προκειμένου να διαχωρίσουν διαφορετικές πρωτεΐνες, και ο διαχωρισμός αυτός δεν βασίζεται μόνο σε διαφορές ανάμεσα στα μοριακά βάρη ή στα ηλεκτρικά φορτία, αλλά και σε πολύπλοκες, ιδιαίτερες και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών αυτών, οι οποίες γίνονται αντιληπτές από τις πολλαπλές αναλυτικές στήλες. Η τεχνική της MudPIT έχει επεκτείνει το αναλυτικό εύρος της πρωτεϊνωμικής σε πρωτεΐνες πολύ υψηλού ή πολύ χαμηλού μοριακού βάρους, σε πρωτεΐνες πολύ χαμηλής συγκέντρωσης (low-abundance proteins), καθώς και σε αδιάλυτες (insoluble) πρωτεΐνες. Η MudPIT παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία με όριο ανίχνευσης τα 10 fmol για την ταυτοποίηση συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα μπορεί να συμπεριλάβει κατάλληλες στήλες χρωματογραφίας συγγένειας προκειμένου να επιτύχει την επιλεκτική ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών. Η χρησιμοποίηση των ραδιενεργών ισοτόπων έχει επίσης προσφέρει σημαντική βοήθεια στους πολυδιάστατους συνδυασμούς αναλυτικού διαχωρισμού πρωτεϊνικών μιγμάτων και διάφορες τεχνικές της πρωτεϊνωμικής βασίζονται πλέον στη χρήση ραδιοϊσοτόπων[3].

Η τεχνική της ραδιοϊσοτοπικά – κωδικοποιημένης σήμανσης συγγένειας (isotope-coded affinity tagging – ICAT™ approach) είναι από τις περισσότερο διαδεδομένες. Η τεχνική ICAT εφαρμόζει την σήμανση με ένα σταθερό ισότοπο προκειμένου να επιτύχει την ποσοτική ανάλυση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων και στη συνέχεια τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών των πρωτεϊνικών μιγμάτων με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας. Η πλεόν πρόσφατη εκδοχή της ICAT είναι η βασισμένη σε πήκτωμα ICAT (gel-based ICAT). Η ICAT μέθοδος είναι ικανή να απλοποιήσει την ανάλυση και τον διαχωρισμό μιγμάτων

πρωτεϊνωμικής κατά δύο τάξεις μεγέθους, βασιζόμενη στην παρουσία καταλοίπων κυστεΐνης στις πρωτεΐνες (1.7%). Ωστόσο, η στρατηγική ICAT περιορίζεται στην ιχνηθέτηση γνωστών πρωτεϊνών οι οποίες υποχρεωτικά πρέπει να έχουν κατάλοιπα κυστεΐνης, ενώ παράλληλα η τεχνική ICAT βασίζεται στην μη-ειδική δέσμευση από αντιδραστήρια τύπου CAT[1].

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων των πολυπεπτιδικών αλύσων αρχικά επιτυγχάνετο με σήμανση του αμινοτελικού αμινοξέως με Dabsyl χλωρύδιο, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε η αυτοματοποιημένη μέθοδος αποδόμησης Edman μετά από PTH-σήμανση. Στις μέρες μας ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων και συνεπώς η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στηρίζεται στην αρχή της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry – MS). Η φασματομετρία μάζας αποτελεί πλέον την κύρια μέθοδο υψηλής παραγωγής και απόδοσης (high-throughput) για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς αλληλουχίας και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που παραλαμβάνονται μέσα από τεχνικές διαχωρισμού όπως 2D-GE, ICAT, κλπ. Η ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας (MS) επετεύχθει χάρις στην ανάπτυξη ευαίσθητων οργάνων, όπως το φασματόμετρο μάζας, ικανών να αναλύουν μεγάλα βιολογικά μόρια όπως οι πρωτεΐνες. Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται τυπικά από τρία συστατικά : πηγή ιονισμού, αναλυτή μαζών και ανιχνευτή. Η πηγή ιονισμού παράγει ιόντα από το προς ανάλυση δείγμα. Ο αναλυτής διαχωρίζει τα ιόντα βάσει του λόγου μάζα προς φορτίο (m/z). Ο ανιχνευτής προσδιορίζει τη μάζα των ιόντων. Ο ιονισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων γίνεται με ήπιο τρόπο («soft» ionization techniques). Συνηθέστερες πηγές ιονισμού είναι οι MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), SELDI (surface-enhanced laser desorption/ ionization), ESI (electrospray ionization). Παραδείγματα αναλυτών μάζας συμπεριλαμβάνουν ion trap, quadropoles, time-of-flight (TOF), και Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)[1].

Ειδικότερα η τεχνική SELDI-TOF είναι μία τεχνολογία βασισμένη στην φασματομετρία μάζας και χρησιμεύει στην ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνικών μιγμάτων. Η τεχνική SELDI-TOF χρησιμοποιεί υποστηρικτικές επιφάνειες από αλουμίνιο ή από ανοξείδωτο ατσάλι καθώς και μικροσκοπικά πλακίδια (chips), τα οποία κατασκευάζονται σε συνέχεια με επιφάνειες οι οποίες φέρουν χημικές ή βιολογικές παγίδες (δολώματα). Επάνω στις παγίδες αυτές λαμβάνει χώρα η διαφορική σύλληψη (δέσμευση) των πρωτεϊνών βασισμένη στις διαφορετικές ενδογενείς φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Ακολουθεί η απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν προσκολληθεί μη-ειδικά, και στη συνέχεια οι παραμένουσες ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες υποβάλλονται σε προσρόφηση με την χρήση ακτίνων laser και επακόλουθο ιονισμό προκείμενου να αναλυθούν με φασματομετρία μάζας. Η φασματομετρία μάζας προσδιορίζει τη μάζα του μικρότερου μορίου με πολύ υψηλή ακρίβεια. Παράλληλα οι τεχνολογικές βελτιώσεις των μεθόδων ιονισμού («soft» ionization techniques) που προκαλούν τον ιονισμό μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων χωρίς να τα διασπούν και χωρίς να επηρεάζουν την στερεοδιαμόρφωσή τους, έχουν ενισχύσει την ικανότητα ανάλυσης πολύπλοκων βιολογικών μορίων με MS. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την τεχνική της φασματομετρίας μάζας συμπληρώνουν την γνώση που προέρχεται από ευρέως αποδεκτές μεθόδους της δομικής βιολογίας όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), βοηθώντας έτσι στον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Το τελικό συστατικό που παρείχε την ικανότητα διεξαγωγής πρωτεϊνωμικών μελετών είναι η ανάπτυξη τραπεζών δεδομένων μεταφρασμένων γονιδίων και λογισμικών εξειδικευμένων αλγορίθμων που ελέγχουν ταχέως δεδομένα MS σε σχέση με γνωστές ή προβλεπόμενες πρωτεΐνες στις βάσεις δεδομένων[3].

Γενικά η μέτρηση κατατμημένων πεπτιδικών μαζών με MS είναι ακριβέστερη από τον προσδιορισμό ανέπαφης πρωτεΐνης. Η ικανότητα προσδιορισμού της μάζας ενός πεπτιδίου, προερχόμενου από μια πρωτεΐνη, με ακρίβεια επιτρέπει και τον προσδιορισμό ολόκληρης της πρωτεΐνης, λόγω των ελάχιστων πιθανοτήτων να βρίσκεται ένα αμινοξύ στην ίδια θέση ενός άλλου πεπτιδίου. Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός αλληλουχιών αλληλεπικαλυπτόμενων ή μακρύτερων πεπτιδίων, που

ταιριάζουν με συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρέχει ακόμη μεγαλύτερο βαθμό βεβαιότητας. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων που προσδιορίζονται, συγκρίνονται με τις αλληλουχίες πρωτεϊνών από διάφορες βάσεις δεδομένων, ώστε τελικά να προκύψει ταυτοποίηση των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Οι συνηθέστερες στρατηγικές ταυτοποίησης πρωτεϊνών είναι το peptide mass fingerprinting (PMF) και η tandem mass spectrometry (MS/MS)[3].

Οι τεχνολογίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, αν και χαρακτηρίζονται ως μέτριας προς υψηλής απόδοσης (moderate to high throughput) με παράλληλη την δυνατότητα αυτοματοποίησης (automation capability), δεν είναι κατάλληλες για ευρείας κλίμακας εφαρμογές απαιτούμενες στην πρωτεϊνωμική έρευνα (large-scale proteomic studies).

Οι πρωτεϊνωμικές βιο-μικροσυστοιχίες (bio-microarrays-biochips) εμφανίζονται ως νέα, πρωτοποριακά, πολλά υποσχόμενα, παράλληλα, σμικρυμένα πρωτεϊνωμικά εργαλεία τα οποία επιτρέπουν τον παράλληλο χαρακτηρισμό χιλιάδων πρωτεϊνών σε ένα μόνο πείραμα. Η μεθοδολογία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών έχει επεκταθεί λόγω της ανάπτυξης τεχνολογιών όπως η ηλεκτροφόρηση συνδυαζόμενη με την φασματομετρία μάζας και διαχωρίζεται σε δύο τάξεις ανάλογα με το μόριο το οποίο τίθεται στην συστοιχία. Εάν δηλαδή πρόκειται μόνο για πρωτεΐνη ή για συνδεόμενο με πρωτεΐνη DNA, RNA, αντίσωμα ή άλλο συνδέτη. Η πρώτη κατηγορία διερευνά την λειτουργικότητα των πρωτεϊνών και η δεύτερη ανιχνεύει την παρουσία των πρωτεϊνών. Οι πρωτεϊνωμικές βιο-μικροσυστοιχίες είναι μέθοδοι υψηλής απόδοσης και ευρείας κλίμακας για: α) προσδιορισμό επιπέδων έκφρασης πολλών πρωτεϊνών ταυτόχρονα και σε απόλυτες ποσότητες, β) προσδιορισμό βιοχημικής και ενζυμικής δραστικότητας πολλών πρωτεϊνών παράλληλα, γ) ποσοτικοποίηση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-βιομορίου, δ) έλεγχο χημικών τροποποιήσεων πολλών πρωτεϊνών παράλληλα, και ε) έλεγχο ενώσεων για φαρμακευτικές εφαρμογές.

Οι πρωτεϊνωμικές μικροσυστοιχίες, αν και ανάλογες των DNA μικροσυστοιχιών, παρουσιάζουν μεγαλύτερα προβλήματα λόγω και μόνο του γεγονότος ότι στα 30.000-40.000 ανθρώπινα γονίδια αντιστοιχούν λόγω μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων περισσότερα από 500.000 πρωτεϊνικά προϊόντα. Μετά τη μετάφραση του mRNA, κατά την οποία ήδη ο αριθμός των πρωτεϊνών που προκύπτουν είναι > 6-7 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των γονιδίων ακολουθούν βιοχημικές μεταβολές, όπως φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακυλίωση κ.λ.π. Ακολουθεί ο σχηματισμός της δευτεροταγούς, τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών από συνδυασμούς διαφορετικών μεταξύ τους πρωτεϊνικών μορίων, σχηματίζοντας ολιγομερή. Επομένως, ένα τεράστιο έργο παραγωγής και εκτίμησης τεράστιου αριθμού πρωτεϊνικών στόχων, αντίστοιχων συνδετών, ζευγών μοριακής σύνδεσης πρέπει να προχωρήσει πριν επιτευχθεί η ανάπτυξη πρωτεϊνικών biochips για ολόκληρο το ανθρώπινο πρωτεΐνωμα[2].

Ιδιαίτερη σημασία έχει η ανάγκη πολύ μικρού δείγματος για την ανάλυση με μικροσυστοιχίες. Εξ άλλου μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών πρέπει να παραχθεί και να ακινητοποιηθεί διατηρώντας τη λειτουργική τους κατάσταση για μακρό χρονικό διάστημα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως πρωτεΐνες αναγνώρισης αντιγόνων. Συμπεριλαμβάνονται: α) αντισώματα σε μικροσυστοιχίες για την ανίχνευση αντιγόνων από ομογενοποιημένα κύτταρα, βιολογικά υγρά, υπερκείμενα καλλιεργειών, β) εκχυλίσματα ιστών ή καθαρισμένα αντιγόνα για την ανίχνευση αντισωμάτων, γ) ακινητοποιημένες πρωτεΐνες για την ανίχνευση πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, προκειμένου να γίνουν μελέτες ταυτοποίησης οδών μεταβίβασης σήματος, δ) προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμων ακινητοποιημένων στο chip, και ε) πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες πρωτεϊνώματος ευρείας κλίμακας ολόκληρων κωδικοποιημένων βιβλιοθηκών έκφρασης με πρωτεΐνες σύντηξης ως ακινητοποιημένους ανιχνευτές[2].

Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών μιμούνται αυτές του DNA, αλλά υπάρχουν τεράστιες διαφορές. Οι τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών είναι πολύ ευαίσθητες σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και απαιτούν ειδικές συνθήκες πρόσδεσης στη στερεά φάση, που επίσης ποικίλουν πολύ μεταξύ των πρωτεϊνικών ειδών. Πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός των κλασσικών μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων, μικρότερα τμήματα αντισωμάτων, όπως

Fabs, scFvs από βιβλιοθήκες φάγων, καθώς και απταμερή (aptamers) βασιζόμενα σε DNA χρησιμοποιούνται στα biochips[3].

Είναι εντυπωσιακός ο αριθμός, εκατοντάδες ίσως και χιλιάδες, των παραγόντων πρόσδεσης, που μπορούν να εκτεθούν στη στερεά επιφάνεια ενός chip, για να αντιδράσουν με δείγματα που εν δυνάμει περιέχουν τον ίδιο αριθμό αναλυτών και πολύ μεγαλύτερο αριθμό παρεμβατικών ουσιών. Η πρόσδεση μπορεί να γίνει με χημική προσκόλληση, χημική διασύνδεση, βιομοριακή πρόσδεση μέσω χημικής συγγένειας (π.χ. με χρήση βιοτίνης), ανάλογα με το είδος του δείγματος και θα προκληθεί ποικίλη απόδοση ακινητοποίησης και μοριακής δυναμικής στην επαφή μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης. Περίπου 100.000 πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν σε επιφάνεια 50μm^2.

Η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης πρόσδεσης απαιτεί όργανα υψηλής ευαισθησίας ικανά να προσδιορίζουν τις σημάνσεις (π.χ. φθορισμό, χημειοφωταύγεια, ραδιενέργεια) καθώς και άλλες φυσικές ιδιότητες, όπως μεταβολές των επιφανειακών plasmons, δείκτες ανάκλασης, ή μέτρηση μάζας και πάχυνσης. Συνηθέστερη μέθοδος είναι ο φθορισμός και φυσικά μπορεί να συνδυασθεί με φασματομετρία μάζας.

Με τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες υπάρχει η δυνατότητα δεκάδων χιλιάδων παράλληλων μοριακών αντιδράσεων πάνω σε ένα πορώδες υλικό μεγέθους μίας αντικειμενοφόρου πλάκας. Δεκάδες χιλιάδες δείγματα μπορούν να ακινητοποιηθούν σε ένα πορώδες υλικό και μπορούν να συνδεθούν με διαφορετικούς προσδέτες. Περισσότεροι προσδέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα, για παράδειγμα για τη σύγκριση έκφρασης, με τη χρήση σημάνσεων διαφορετικού χρώματος. Υπάρχουν πολλά είδη πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών, αλλά η βασική αρχή είναι μία: η μελέτη του πρωτεϊνικού υλικού ενός δείγματος σε σχέση με ένα πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορίων προσδετών. Υπάρχουν ειδικά λογισμικά που επεξεργάζονται τα δεδομένα αυτόματα. Με τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες πιθανά να υπάρξει στο μέλλον η δυνατότητα σάρωσης όλου του πρωτεϊνώματος και μελέτης της σχέσης γονοτύπου – γονιδιώματος – μεταγραφήματος – πρωτεϊνώματος – φαινοτύπου. Η τεχνολογία τους βέβαια είναι ακόμα πολύ ακριβή, εξειδικευμένη, μονοπωλείται από μόλις δύο φαρμακευτικές βιομηχανίες σε παγκόσμιο επίπεδο, και τα δεδομένα που παρέχονται αμφιλεγόμενα. Παρά την, πολλά υποσχόμενη, συμβολή της στο πεδίο της βιοϊατρικής έρευνας, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών έχει και κάποια μειονεκτήματα από οργανολογικής απόψεως, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι στις μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται πρωτεϊνικά δείγματα τα οποία συνδέονται με μόρια προσδέτη ακινητοποιημένα σε ένα chip. Η ένταση της κηλίδας σχετίζεται με το επίπεδο της πρωτεΐνης. Αλλά κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετική χημική συγγένεια για τον προσδέτη, άρα και διαφορετική ικανότητα σύνδεσης με τον προσδέτη και συνεπώς η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών μπορεί να είναι διφορούμενη και δύσκολη. Επίσης οι μικροσυστοιχίες είναι κλειστό σχετικά σύστημα και ως εκ τούτου μπορούν να δώσουν πληροφορίες μόνο για τους προσδέτες – πρωτεΐνες που έχουν εκ των προτέρων ακινητοποιηθεί στο chip. Επιπλέον, αφού η ένταση π.χ. του φθορισμού που εκπέμπεται από μια κηλίδα μετράται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού (Arbitrary Fluorescent Units – AFU's), δεν μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την απόλυτη τιμή έκφρασης των πρωτεϊνών, αλλά μόνο για σχετικές τιμές έκφρασης[2].

Έχει αναπτυχθεί μία ποικιλία από μικροσυστοιχίες ανάλογα με τους συνδυασμούς των παρακάτω παραμέτρων που χρησιμοποιούνται : α) το υλικό ακινητοποίησης (νάιλον, μεμβράνη, γυαλί, κλπ), β) τους ανιχνευτές (DNA, cDNA, ολιγονουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, μικρά μόρια, κλπ), γ) τον τρόπο κατασκευής (με σύνθεση in situ, με ρομποτική εναπόθεση), δ) τους στόχους (DNA, mRNA, πρωτεΐνες, ένζυμα, μικρά μόρια), ε) τη μέθοδο (υβριδισμό, ηλεκτροφόρηση, κυτταρομετρία ροής, ELISA, TaqMan), στ) την ανίχνευση του σήματος (φθορισμό, χημειοφωταύγεια, φασματομετρία μάζας, ηλεκτροχημεία), ζ) την ανάλυση της εικόνας (λογισμικό για την ανάλυση εικόνας), και η) την πληροφορική (σύστημα διαχείρισης βάσεων δεδομένων, σύγκριση δεδομένων και απεικόνιση, ερμηνεία της βιολογικής σημασίας)[2].

Ειδικοί σαρωτές εικόνας με τη βοήθεια πολύπλοκων υπολογιστικών προγραμμάτων

αναλύουν την εικόνα που προκύπτει από την χημική αλληλεπίδραση πρωτεΐνης – προσδέτη, υπολογίζοντας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης καθενός από τα πρωτεϊνικά μόρια στον υπό εξέταση πληθυσμό πρωτεϊνών. Στη συνέχεια με τη βοήθεια άλλων υπολογιστικών προγραμμάτων, συγκρίνονται τα επίπεδα έκφρασης καθενός από τα πρωτεϊνικά μόρια μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων (υγιείς και καρκινικοί ιστοί, υπό την επίδραση ή όχι φαρμάκων κοκ)[2].

Αναλυτικότερα, η διεξαγωγή ενός πειράματος μικροσυστοιχιών απαιτεί την οργανολογική διάταξη ενός συστήματος ιατρικών μετρήσεων. Αποτελείται λοιπόν από μία εξωτερική (in vitro) πηγή σήματος, έναν μετατροπέα εισόδου ή μεταλλάκτη (Transducer), έναν επεξεργαστή σήματος, μία έκθεση εξόδου και μία αντιληπτή έξοδο. Ο σκοπός της οργανολογικής αυτής διάταξης ενός πειράματος μικροσυστοιχιών είναι η μέτρηση, δηλαδή η ποσοτική εκτίμηση ενός μεγέθους το οποίο αναφέρεται ως μετρητέα. Η μέτρηση στην προκειμένη περίπτωση είναι η «αντίληψη» του «σήματος» από τον ερευνητή μέσω της αισθήσεως της όρασης. Το σήμα είναι η πληροφορία ενώ η μετρητέα είναι το άθροισμα «σήματος + θορύβου». Η πηγή σήματος είναι το πλακίδιο της μικροσυστοιχίας και το εκπεμπόμενο άθροισμα «σήματος + θορύβου» είναι η μετρητέα. Η ενεργειακή μορφή της μετρητέας είναι συνήθως φθορισμός. Η εκπομπή φθορίζουσας ακτινοβολίας γίνεται κατόπιν επιβολής εξωτερικής ενέργειας επί της μετρητέας. Η εξωτερική ενέργεια πού επιβάλλεται στην προκειμένη περίπτωση είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία πολωμένης δέσμης φωτός τύπου laser. Η επιβολή δέσμης laser επί του πλακιδίου της μικροσυστοιχίας έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φθορίζουσας ακτινοβολίας από το πλακίδιο. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση φθοριζόντων φωτοευαίσθητων χημικών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές απορροφούν την ενέργεια της δέσμης ακτίνων laser και διεγείρονται. Στην συνέχεια μεταπίπτουν και πάλι από την διεγερμένη στην θεμελιώδη (βασική) ενεργειακή κατάσταση[2].

Η επαναφορά από την διεγερμένη στην θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση γίνεται με ταυτόχρονη αποβολή της ενέργειας που απορρόφησαν από την δέσμη laser. Η ενέργεια αυτή αποβάλλεται με την μορφή εκπεμπόμενης φθορίζουσας ακτινοβολίας την οποία και ανιχνεύει ένας αισθητήρας φθορισμού (fluorescence sensor). Τέτοιες φωτοευαίσθητες φθορίζουσες χημικές ενώσεις είναι η Cyanine3 (Cy3) και η Cyanine5 (Cy5). Η Cy3 απορροφά laser μήκους κύμματος 550nm, διεγείρεται και εκπέμπει κόκκινου χρώματος φθορισμό, ενώ η Cy5 απορροφά laser μήκους κύμματος 650nm, διεγείρεται και εκπέμπει πράσινου χρώματος φθορισμό. Η επιλογή των Cy3 και Cy5 έγινε γιατί έχουν σχετικά υψηλές ικανότητες ενσωμάτωσης τόσο σε νουκλεοτίδια με την αντίστροφη μεταγραφάση, όσο και σε πεπτίδια. Επιπλέον οι Cy3 και Cy5 έχουν καλή σταθερότητα και απόδοση, διαχωρίζονται εύκολα κατά τον ερεθισμό τους, ενώ παράλληλα το φάσμα εκπομπής τους επιτρέπει υψηλής διακριτικότητας οπτικό φιλτράρισμα. Επί της μικροσυστοιχίας επωάζονται πάντοτε δύο δείγματα. Το ένα δείγμα σηματοδοτείται με Cy3 και το άλλο δείγμα σηματοδοτείται με Cy5. Το ένα δείγμα είναι το δείγμα-στόχος, ενώ το άλλο δείγμα είναι το δείγμα αναφοράς. Ακολουθεί επώαση του μίγματος των δύο σημασμένων δειγμάτων επί του πλακιδίου της μικροσυστοιχίας και υβριδοποίηση με τα συμπληρωματικά μόρια-ιχνηθέτες (probes) που έχουν εμφυτευθεί επί του πλακιδίου (biochip) της μικροσυστοιχίας. Στην συνέχεια επιβάλλεται επί του biochip δέσμη laser, αρχικά μήκους κύμματος 550nm και στη συνέχεια μήκους κύμματος 650nm. Διεγείρονται έτσι αρχικά τα μόρια Cy3 και στη συνέχεια τα μόρια Cy5. Με αυτό τον τρόπο εκπέμπεται φθορίζουσα ακτινοβολία αρχικά κόκκινου και στη συνέχεια πράσινου χρώματος[3].

Αυτή την φθορίζουσα ακτινοβολία που εκπέμπεται από το πλακίδιο μικροσυστοιχίας την συλλαμβάνει ο μετατροπέας εισόδου και την μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Εδώ αξίζει να αναφερθούμε στην λειτουργική αρχή της ομοεστιακής laser σάρωσης (Confocal Laser Scanner). Η ακτίνα laser περνάει αρχικά μέσα από x και y scanning mirrors, εστιάζει μέσω μιάς αντικειμενοφόρου υάλου (objective) και τέλος επιβάλλεται μέσω μιάς focal plane υάλου, επί της μικροσυστοιχίας. Η εκπεμπό-μενη από την μικροσυστοιχία φθορίζουσα ακτινοβολία περνάει διαμέσου της focal plane υάλου αρχικά και της objective υάλου στη συνέχεια, για να καταλήξει επί των καθρεπτών σάρωσης x και y (x and y scanning mirrors). Οι x και y διαστάσεις επί των καθρεπτών σάρωσης αντιστοιχούν στις

x και y διαστάσεις (μήκος και πλάτος) της μικροσυστοιχίας. Η φθορίζουσα ακτινοβολία στη συνέχεια αντανακλά επί ενός dichroic mirror και αλλάζει κατεύθυνση προς ένα άλλο αντικειμενοφόρο φίλτρο. Περνώντας μέσα από αυτό το αντικειμενοφόρο φίλτρο ομοεστιάζεται συγκεντρωτικά προς μία pinhole. Μετά την pinhole περνάει μέσα από ένα φίλτρο εκπομπής (emission filter) και οδηγείται στον ανιχνευτή (detector) ή αισθητήρα (sensor) του μετατροπέα εισόδου. Ο μετατροπέας εισόδου, ο οποίος αναφέρεται και ως μεταλλάκτης, αποτελείται από τον αισθητήρα (Sensor) και τον μετατροπέα μεταβλητής (Converter). Η μετρητέα παραλαμβάνεται από τον αισθητήρα και μεταφέρεται στον μετατροπέα μεταβλητής. Ο αισθητήρας επιτελεί βαθμονόμηση της μετρητέας. Ο μετατροπέας μεταβλητής μετατρέπει την ενεργειακή μορφή της μετρητέας από φθορίζουσα ακτινοβολία σε ηλεκτρικό σήμα[1,2].

Πρόκειται λοιπόν για, κβαντικού τύπου, μεταλλάκτη ακτινοβολίας ο οποίος παραλαμβάνει φωτόνια και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Είναι μεταλλάκτης εκπομής φωτονίων και χρησιμοποιεί την αρχή της φωτομετρίας εκπομπής. Η πρόσκρουση των φωτονίων της φθορίζουσας ακτινοβολίας επί της φωτοκαθόδου του μεταλλάκτη έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ρεύματος ηλεκτρονίων από την φωτοκάθοδο προς την φωτοάνοδο. Αυτό το ρεύμα ηλεκτρονίων (ηλεκτρικό ρεύμα) μετράται. Η ένταση του ρεύματος των ηλεκτρονίων είναι ανάλογη του μεγέθους της ροής των φωτονίων που προσκρούουν επί της φωτοκαθόδου. Η διάταξη αυτή έχει μικρή ευαισθησία και χρειάζεται την βοήθεια του σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή (PhotoMultiplier Tube ή PMT) για να ενισχυθεί η ένταση του σήματος ηλεκτρονίων και να αυξηθεί η ευσισθησία της μεθόδου. Δηλαδή μεταξύ της φωτοκαθόδου και της φωτοανόδου παρεμβάλλεται η διάταξη του φωτοπολλαπλασιαστή. Η ενίσχυση που επιτυγχάνεται με την παρεμβολή του φωτοπολλαπλασιαστή είναι εκθετική συνάρτηση του αριθμού των δυνόδων από τις οποίες αποτελείται ο φωτοπολλαπλασιαστής. Δηλαδή ενίσχυση = f^{κ} όπου κ είναι το πλήθος των δυνόδων. Η χρονική απόκριση υπολογίζεται σε r = 10^{-8} sec, δηλαδή ξεχωρίζει σήματα με συχνότητα $1/10^{-8}$ φωτόνια/sec. Ο ιδανικός μεταλλάκτης είναι ευαίσθητος μόνο στη μετρητέα (δηλαδή έχει υψηλή ειδικότητα), εκμεταλλεύεται το μέγιστο ποσοστό σήματος (δηλαδή έχει υψηλή ευαισθησία) και απορροφά ελάχιστη ισχύ χωρίς παράλληλα να διαταράσσει την σταθερότητα της μετρητέας (δηλαδή έχει μεγάλη σταθερότητα). Οι βασικές παράμετροι ενός μεταλλάκτη είναι η περιοχή κλίμακας, η απόκριση συχνότητας, η ευαισθησία ($\Delta M_{εξ}$ / $\Delta M_{εις}$ x 100%), η διακριτική ικανότητα, η επαναληψιμότητα ($\Delta M_{εξ}$ / $M_{εξ}$ x 100%) και η γραμμικότητα ($M_{εξ}$ = α $M_{εις}$). Η απόκριση συχνότητας δίδεται από την σχέση μεταξύ ενίσχυσης μετρητέας, από την είσοδο στην έξοδο, και εύρους συχνοτήτων f_2-f_1. Διακρίνεται σε ιδανική απόκριση συχνότητας και σε απόκριση συχνότητας του πραγματικού οργάνου. Όλες οι προαναφερόμενες παράμετροι πρέπει να υπολογιστούν εκ των προτέρων προκειμένου ο μεταλλάκτης να επιτελέσει, κατά τον ιδανικότερο τρόπο και με το μικρότερο δυνατό σφάλμα, την ενεργειακή μετατροπή της φθορίζουσας ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρικό σήμα μεταφέρεται, στη συνέχεια, από τον μετατροπέα μεταβλητής του μεταλλάκτη στον επεξεργαστή σήματος. Ο επεξεργαστής σήματος παραλαμβάνει το ηλεκτρικό σήμα, το ενισχύει, το φιλτράρει, το προσαρμόζει, το κωδικοποιεί, το μετατρέπει σε ψηφιακό και το αποθηκεύει. Η ψηφιοποίηση του σήματος από τον επεξεργαστή μπορεί να είναι μικρή, κανονική ή περιτή. Επιθυμητή είναι η κανονική ψηφιοποίηση. Υπάρχουν δυσκολίες στην ψηφιοποίηση του σήματος που προκύπτουν από ενδογενείς περιορισμούς στις πρωτεϊνικές μετρήσεις, όπως οι χαμηλές περιοχές μεγεθών, ο μεγάλος θόρυβος, οι μηχανικοί περιορισμοί και η βιοσυμβατότητα. Οι τρόποι λειτουργίας του επεξεργαστή σήματος προκειμένου να επιτελέσει την ψηφιοποίηση σήματος είναι άμεσοι-έμμεσοι, δειγματοληπτικοί-συνεχείς, γεννητικοί-διαμορφωτικοί, αναλογικοί-ψηφιακοί και πραγματικού χρόνου-καθυστέρησης. Μεταξύ μεταλλάκτη και επεξεργαστή παρεμβάλλεται βήμα αποθήκευσης και μετάδοσης πληροφοριών, δηλαδή επιτελείται τροφοδοσία σήματος. Η έκθεση εξόδου παραλαμβάνει με τη σειρά της το αποθηκευμένο σήμα από τον επεξεργαστή και το παρουσιάζει με τέτοιο τρόπο ώστε να γίνεται αντιληπτό από τις αισθήσεις του ιατρού ή του ερευνητή. Μεταξύ επεξεργαστή σήματος και

έκθεσης εξόδου παρεμβάλλεται επίσης βήμα αποθήκευσης και μετάδοσης πληροφοριών. Η έκθεση εξόδου μεταφέρει το σήμα στην αντιληπτή έξοδο. Η αντιληπτή έξοδος είναι το τελικό όργανο της διάταξης και παρουσιάζει τα δεδομένα στον ερευνητή. Μεταξύ της έκθεσης εξόδου και της αντιληπτής εξόδου παρεμβάλλεται βήμα ελέγχου και ανάδρασης του σήματος με τον μετατροπέα εισόδου (Transducer) και τη μετρητέα[2].

Συνοπτικά, στην οργανολογία των πειραμάτων μικροσυστοιχιών, επιτελείται ουσιαστικά μία έμμεση μέτρηση όπου κωδικοποιείται η μετρητέα σε μορφή διαφορετική από την αρχική (από φθορίζουσα ακτινοβολία σε ηλεκτρική και στη συνέχεια ψηφιοποιείται και παρουσιάζεται σε οπτική μορφή για να αναλυθεί με διαδικασία ανάλυσης εικόνας). Δύο εικόνες μετρητέας έχουν παραληφθεί. Η μία εικόνα είναι σε κόκκινη απόχρωση προερχόμενη από την σάρωση επί του Cy3, ενώ η δεύτερη εικόνα είναι σε πράσινη απόχρωση προερχόμενη από την σάρωση επί του Cy5. Ακολουθεί πρώτα συνένωση των δύο εικόνων και κανονικοποίηση (normalization) και τέλος η ανάλυση εικόνας (image analysis). Ο έλεγχος της ποιότητας της αναλυθείσας εικόνας είναι ένα μεταγενέστερο βήμα στην όλη διαδικασία. Αποφασιστικής σημασίας παράμετροι είναι η ένταση φθορισμού Cy3 και Cy5, ο λόγος Cy3/Cy5 και ο λογάριθμος $\log_2$ (Cy5/Cy3)[1,2].

Συνεπώς η οργανολογική διάταξη ενός πειράματος μικροσυστοιχιών είναι μία μετρητική διάταξη όπου υπάρχει μία τιμή εισόδου X_i και μία τιμή εξόδου Y_i της μετρητέας. Η ευαισθησία της οργανολογικής διάταξης ορίζεται ως ΔΥ / ΔΧ, ενώ η ενίσχυση δίδεται από τον τύπο $Y_i = k X_i$. Ως διακριτική ικανότητα ορίζεται η ελάχιστη ποσότητα της μετρητέας που μπορεί να μετρήσει το όργανο με σχετική βεβαιότητα. Η έξοδος της μετρητέας μπορεί να γίνεται είτε με αναλογικό είτε με ψηφιακό τρόπο. Η ακρίβεια της οργανολογικής διάταξης δίδεται από τον τύπο (1- [M-T]/M)100%. Η μετρητική διάταξη ενός πειράματος μικροσυστοιχιών ενέχει, όπως είναι φυσικό, και σφάλμα μέτρησης. Υπάρχει ανιχνευτής ή εκτιμητής σφάλματος ο οποίος έχει δύο εισόδους. Η μία είσοδος είναι για την μετρητέα Μα και η άλλη είσοδος είναι για ένα πρότυπο αναφοράς Πα. Ο ανιχνευτής σφάλματος μετράει την διαφορά Δα = Μα-Πα. Η μετρηθείσα τιμή είναι Τ = Δα + Πα. Το σφάλμα μέτρησης δίδεται από τον τύπο σ = 100 ([M-T]/M%). Η επαναληψιμότητα αυξάνει με τις N μετρήσεις και αυξάνει την ακρίβεια του υπολογισμού της μετρηθείσας τιμής, της διακύμανσης, της σταθερής απόκλισης και του συντελεστή διακύμανσης. Τα σφάλματα ενός πειράματος μικροσυστοιχιών είναι δύο ειδών: α) τα συστηματικά σφάλματα και β) τα στοχαστικά σφάλματα. Τα συστηματικά σφάλματα έχουν παρόμοια επίδραση σε πολλές μετρήσεις και η διόρθωσή τους μπορεί να εκτιμηθεί από τα δεδομένα μέσω βαθμονόμησης και κανονικοποίησης. Τα στοχαστικά σφάλματα έχουν τυχαία επίδραση η οποία δεν μπορεί να περιγραφεί σαφώς αναλυτικά και χαρακτηρίζονται από τον «θόρυβο». Τα στοχαστικά σφάλματα διορθώνονται με μοντελοποίηση του θορύβου[2].

Ένα πείραμα μικροσυστοιχιών αποτελείται από διακριτά βήματα. Αρχικά ορίζεται η αναζητούμενη βιολογική ερώτηση, και στη συνέχεια πραγματοποιείται ο σχεδιασμός του πειράματος. Υπάρχουν πολλά είδη αναζητούμενης βιολογικής ερώτησης όπως για παράδειγμα σε ποιά κατηγορία ανήκει ένας μη-κατηγοριοποιημένος ιστός;, από ποιά πρωτεΐνη ρυθμίζεται η πρωτεΐνη Χ;, ποιών γονιδίων ή πρωτεϊνών η έκφραση εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης Χ;, υπάρχουν υποκατηγορίες της ασθένειας Χ που διακρίνονται με βάση την πρωτεϊνική έκφραση των ιστών;, ποιές πρωτεΐνες διαχωρίζουν καλύτερα δύο γνωστές ομάδες πρωτεϊνών;, ποιά θα μπορούσε να είναι η λειτουργία της πρωτεΐνης Χ;, κατά πόσο διαφέρουν η λειτουργία και η παρουσία της πρωτεΐνης Χ από αυτές που έχουν άλλες πρωτεΐνες; και τέλος, ποιές μη-κατηγοριοποιημένες πρωτεΐνες έχουν παρόμοια παρουσία (έκφραση) και λειτουργία με πρωτεΐνες των οποίων γνωρίζουμε την κατηγορία;

Η ανάλυση των δεδομένων που θα λάβουμε από το πείραμα της μικροσυστοιχίας γίνεται σε τρία επίπεδα ανάλογα με τον βαθμό πολυπλοκότητας της αναζητούμενης βιολογικής ερώτησης.

Στο επίπεδο 1 αναλύονται δεδομένα ερωτήσεων όπως, ποιών πρωτεϊνών η παρουσία ενεργοποιείται ή καταστέλλεται;. Η ανάλυση εδώ γίνεται με 2-fold rule και με κλασσικά στατιστικά τεστ. Εάν υπάρχει

αυξημένος αριθμός μεταβλητών δεν επαρκούν τα κλασσικά στατιστικά τεστ και η ανάλυση γίνεται με Bayesian στατιστικά τεστ και με μεθόδους υπολογιστικής νοημοσύνης. Η μορφή παρουσίασης των δεδομένων είναι για μη-επιβλεπόμενη μάθηση.

Στο επίπεδο 2 αναλύονται δεδομένα ερωτήσεων όπως ποιές πρωτεΐνες συνρυθμίζονται;, καθώς και ερωτήσεων σχετικών με την εύρεση της λειτουργίας πρωτεϊνών. Η ανάλυση εδώ γίνεται με αλγόριθμους ομαδοποίησης και κατηγοριοποίησης. Η μορφή παρουσίασης των δεδομένων είναι για επιβλεπόμενη μάθηση.

Στο επίπεδο 3 αναλύονται δεδομένα ερωτήσεων όπως πως αλληλορυθμίζονται οι πρωτεΐνες και επιχειρείται η εύρεση ρυθμιστικού πρωτεϊνικού δικτύου. Η ανάλυση γίνεται με Bayesian Δίκτυα και Recurrent Νευρωνικά Δίκτυα. Επιχειρείται ο καθορισμός προτύπου πρωτεϊνικής έκφρασης. Οι πρωτεΐνες που προσδιορίζονται από τα διάφορα πειράματα αποτελούν σημεία στο χώρο. Η ομοιότητα τους καθορίζεται από τη μεταξύ τους απόσταση και υπολογίζεται είτε ως Euclidean απόσταση, είτε ως Manhartan απόσταση[2].

Οι εφαρμογές των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών στην βασική μοριακή βιολογία έχουν ως στόχο την κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται support vector machines, εφαρμόζεται το θεώρημα του Cover για τον γραμμικό διαχωρισμό σε πολυδιάστατο χώρο και χαρτογραφούνται τα δεδομένα (mapping of data). Χρησιμοποιείται η αρχή του κοντινότερου γείτονα (nearest neighbor) για δεδομένη συνάρτηση απόστασης, κατηγορία ίδια με την κατηγορία του πιο κοντινού γείτονα, ή, κατηγορία ίδια με την κατηγορία των περισσότερων κοντινότερων γειτόνων. Ζητείται η ομαδοποίηση ομάδων πρωτεϊνών βάση της ομοιότητας της λειτουργίας τους ή του επιπέδου έκφρασής τους. Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών, δηλαδή η ανακάλυψη των ομάδων πρωτεϊνών μπορεί να γίνει είτε με K-means ομαδοποίηση, είτε με ιεραρχική ομαδοποίηση. Στην μέθοδο της K-means ομαδοποίησης επιλέγονται στην τύχη K κέντρα. Καταχωρείται η κάθε πρωτεΐνη στην ομάδα που έχει το κοντινότερο με αυτή κέντρο. Προσαρμόζονται τα K κέντρα και παρατηρείται εάν υπάρχει αλλαγή στις ομάδες. Εάν υπάρχει, επιλέγονται νέα διαφορετικά K κέντρα. Εάν δεν υπάρχει ολοκληρώνεται η διαδικασία. Δημιουργείται self-organizing map ανάλογα με τις θέσεις των K κέντρων. Στην μέθοδο της ιεραρχικής ομαδοποίησης γίνεται συνεχής ένωση κοντινότερων ομάδων χρησιμοποιώντας είτε την μικρότερη απόσταση (single linkage), είτε την μεγαλύτερη απόσταση (complete linkage), είτε την μέση απόσταση (average linkage). Η επίδραση των μετρικών απόστασης είναι αυτή που καθορίζει την ομαδοποίηση. Άλλη μέθοδος είναι η Principal Component Analysis (PCA). Η βασική ιδέα της PCA είναι η μείωση της διάστασης των δεδομένων, μετασχηματίζοντας τα δεδομένα σε ένα νέο γραμμικό υποχώρο διάστασης k όπου το k είναι συνήθως πολύ μικρότερο από την αρχική διάσταση των δεδομένων (Βρίσκει τις κατευθύνσεις της μεγαλύτερης διασποράς απεικονίζει τα δεδομένα πάνω σε αυτές τις κατευθύνσεις). Η πλέον εξελιγμένη μορφή κατηγοριοποίησης πρωτεϊνών είναι το Supervised Network Self-Organizing Map (sNet-SOM). Το sNet-SOM βασίζεται στην αρχή των SOMs, αλλά: α) προσδιορίζει αυτόματα τον αριθμό των πρωτεϊνών, β) ομαδοποιεί και κατηγοριοποιεί πρωτεΐνες, γ) μπορεί να κατηγοριοποιήσει μία πρωτεΐνη σε περισσότερες της μίας κλάσεις και δ) συνδυάζει μη-επιβλεπόμενη και επιβλεπόμενη μάθηση[1,2].

Οι εφαρμογές των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών στην μοριακή ιατρική έχουν ως στόχο την ανακάλυψη νέων ασθενειών, την πρόβλεψη γνωστών ασθενειών, την πρόβλεψη της απόκρισης σε φάρμακα, την κατηγοριοποίηση πειραμάτων, τον σχεδιασμό δένδρων απόφασης που θα βοηθήσουν στην ταξινόμηση των εξεταζόμενων δειγμάτων ή πρωτεϊνών, την εκμάθηση δικτύου πρωτεϊνών, την εκμάθηση δικτύου πρωτεϊνικής ρύθμισης, την λειτουργική πρωτεϊνωμική και την Systems Biology. Στις περιπτώσεις αυτές είναι απαραίτητη η εκμάθηση μοντέλου (π.χ. Bayesian Network, Boolean Network) το οποίο να εξηγεί τον τρόπο αλληλοεπηρεασμού των πρωτεϊνών[3].

Κάθε πείραμα πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών ξεκινάει με την επιλογή των μορίων προσδέτη ή ιχνηθέτη (probe) θα τυπωθούν και θα ακινητοποιηθούν στις μικροσυστοιχίες.

Στην περίπτωση των DNA μικροσυστοιχιών η απόφαση αυτή είναι σχετικά απλή, αφού οι ιχνηθέτες (probes) που θα τυπωθούν και θα ακινητοποιηθούν επί του πλακιδίου της

μικροσυστοιχίας θα είναι είτε μόρια cDNA, είτε ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-80 bp. Αναλυτικότερα, μια μικροσυστοιχία DNA μπορεί να περιέχει πολλά μονόκλωνα κομμάτια DNA ή cDNA που αντιπροσωπεύουν χιλιάδες διαφορετικά γονίδια. Στην περίπτωση που απαιτείται η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε κυτταρικούς πληθυσμούς π.χ. μετά από κάποια θεραπεία, η επεξεργασία του δείγματος περιλαμβάνει την εκχύλιση mRNA από τους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς πριν και μετά την θεραπεία. Το mRNA αποτελεί το δείγμα – στόχο (target sample). Το mRNA που προέρχεται από τον κυτταρικό πληθυσμό προ της θεραπείας αποτελεί το δείγμα – στόχο ελέγχου (control target sample), ενώ το mRNA που προέρχεται από τον κυτταρικό πληθυσμό μετά τη θεραπεία, αποτελεί το δείγμα – στόχο υπό εξέταση (test target sample). Στη συνέχεια γίνεται αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA και σήμανση του cDNA με φθορίζουσες ουσίες που δίνουν χρώμα, πράσινο στο cDNA από τον πληθυσμό των κυττάρων πριν από τη θεραπεία και κόκκινο στο cDNA από τα κύτταρα μετά από τη θεραπεία. Η σήμανση με Cy3 μόριο (Cy3-labeled cDNA) δίνει κόκκινο χρώμα, ενώ η σήμανση με Cy5 μόριο (Cy5-labeled cDNA) δίνει πράσινο χρώμα. Ακολουθεί ανάμιξη των δύο πληθυσμών σημασμένου cDNA και δημιουργία pooled labeled – cDNA. Στη συνέχεια υβριδοποιείται ο, ακινητοποιημένος επί του πλακιδίου της μικροσυστοιχίας, μονόκλωνος πληθυσμός ιχνηθετών (probes) cDNA ή ολιγονουκλεοτιδίων, με το σημασμένο πληθυσμό pooled labeled - cDNA (labeled - control target sample και labeled - test target sample). Η υβριδοποίηση αυτή είναι συγκριτική (comparative hybridization) και γίνεται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων, δηλαδή συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων μεταξύ probe και target sample συνδέονται ή αλλιώς υβριδοποιούνται με δεσμούς Watson – Crick. Η υβριδοποίηση ενός γονιδίου σημαίνει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται στον κυτταρικό πληθυσμό από όπου προήλθε. Μετά την υβριδοποίηση, ακολουθεί σάρωση της εικόνας μέσω σαρωτή – ανιχνευτή (Scanner), ανάλυση εικόνας (Image Processing), επεξεργασία δεδομένων (Data Management), και τέλος ερμηνεία των αποτελεσμάτων τα οποία προήλθαν από την επεξεργασία των δεδομένων (Data Mining)[3].

Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών, δεν υπάρχει το πλεονέκτημα της υβριδοποίησης μεταξύ προσδέτη - ιχνηθέτη (probe) και πρωτεϊνικού δείγματος - στόχου (target sample) με δεσμούς Watson – Crick, αφού οι πρωτεΐνες είναι μόρια με μοναδική και περίπλοκη στερεοχημική δομή που δεν υπακούουν σε τόσο «απλοϊκούς» και «γενικούς» κανόνες συμπληρωματικότητας, όσο δύο συμπληρωματικά μόρια νουκλεϊνικών οξέων. Συνεπώς, για να επιτευχθεί η σύνδεση μεταξύ προσδέτη - ιχνηθέτη (probe) και πρωτεϊνικού δείγματος - στόχου (target sample) στις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες, θα πρέπει να λάβει χώρα μία εξειδικευμένη, μοναδική και διαφορετική για κάθε είδος πρωτεΐνης χημική αντίδραση μεταξύ πρωτεϊνικού μορίου δείγματος - στόχου και μορίου ιχνηθέτη - προσδέτη. Δηλαδή το μόριο πρωτεΐνης και το αντίστοιχο για την πρωτεΐνη μόριο προσδέτης θα πρέπει να συνδέονται με μια μοναδική μεταξύ τους χημική σχέση, ή αλλιώς το μόριο πρωτεΐνης και το αντίστοιχο για την πρωτεΐνη μόριο προσδέτη θα πρέπει να μοιράζονται την ίδια συμπληρωματική χημική ιδιότητα. Η πληθώρα των χημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών απαιτεί το σχεδιασμό και τη σύνθεση αναρίθμητων, διαφορετικών και εξειδικευμένων μορίων ιχνηθετών - προσδετών, προκειμένου να επιτευχθεί η λειτουργία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Οι Panicker και συν. στο άρθρο ανασκόπησης «Advanced analytical tools in proteomics» μας δίνουν μια περιγραφή της ποικιλίας των ζευγών πρωτεΐνης - προσδέτη τα οποία έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα στην ερευνητική μέθοδο των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών.

Οι πρώτες προσπάθειες δημιουργίας πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών είχαν εστιαστεί κυρίως στην χρήση πεπτιδικών βιβλιοθηκών οι οποίες κατασκευάστηκαν in situ χρησιμοποιώντας συνθετικές μεθόδους όπως η SPOT™ synthesis, καθώς και η φωτο-κατευθυνόμενη παράλληλη σύνθεση με τη χρήση φωτολιθογραφικών μεθόδων κ.ο.κ. Το έτος 2000 οι MacBeath και Schreiber δημοσίευσαν ένα άρθρο – ορόσημο όπου και υποστήριξαν για πρώτη φορά την δυνατότητα της χρήσης τεχνολογίας μικροσυστοιχιών για, υψηλής απόδοσης και ευρείας κλίμακας, αναλυτικές μεθόδους στην πρωτεϊνωμική. Από

τότε, μέχρι στις ημέρες μας, έχουν αναπτυχθεί πολλά και διαφορετικά εργαλεία μικροσυστοιχιών πρωτεϊνωμικής τα οποία επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάδειξη πολλαπλών και διαφορετικών πρωτεϊνών με βάση τις διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες αυτών των πρωτεϊνών (π.χ. επίπεδο έκφρασης, ενζυμική ενεργότητα, αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες κ.ο.κ.). Όπως και στην περίπτωση των DNA μικροσυστοιχιών, η γοητεία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών έγκειται στο γεγονός ότι καθιστούν δυνατή την ταυτόχρονη ανίχνευση χιλιάδων διαφορετικών πρωτεϊνών σε μία μόνο πειραματική διάταξη και με την χρήση ελάχιστης στοιχειώδους ποσότητας δείγματος στόχου (minute amount of target sample).

Οι περισσότερες από τις μεθόδους πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών που είχαν αναπτυχθεί μέχρι πρόσφατα, βασίζονταν στην ανίχνευση των πρωτεϊνικών λειτουργιών μέσω εικονικής παρατήρησης της δημιουργίας μη-ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ της πρωτεΐνης και του συνδέτη (ligand) αυτής, περιορίζοντας, ως εκ τούτου, την σάρωση (screening) σε διαντιδράσεις (interactions) μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-συνδέτη, και αντιγόνου-αντισώματος. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα οι προαναφερόμενες προσεγγίσεις να αποκλείουν ουσιαστικά την σάρωση (screening) ενζύμων τα οποία έχουν ζωτική σημασία σε όλες τις κυτταρικές διαδικασίες και τις μεταβολικές εξαλλαγές. Παραδοσιακά, μέχρι πρόσφατα, οι ενζυμικοί προσδιορισμοί ελάμβαναν χώρα σε κατασκευές μικροδισκίων (microplate format) όπως π.χ. στην μέθοδο ELISA όπου κάθε ένζυμο αναμειγνύεται με το υπόστρωμά του μέσα σε ξεχωριστό και απομονωμένο διαμέρισμα-πηγάδι (compartment-well) το οποίο εξασφαλίζει ότι το ζεύγος ενζύμου – υποστρώματος δεν θα έλθει σε επαφή με άλλα ένζυμα ούτε με άλλα υποστρώματα, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τις δια-σταυρούμενες επιμολύνσεις (cross-contaminations) από γειτονικές ενζυμικές αντιδράσεις.

Εν τούτοις η πρόοδος της τεχνολογίας των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών επέτρεψε πρόσφατα την περαιτέρω σμίκρυνση των ενζυμικών προσδιορισμών, έτσι ώστε να είναι πλέον δυνατή η ανάλυση πολλαπλών ενζυμικών ενεργοτήτων σε κατασκευές μικροσυστοιχιών, τόσο αναπαραγωγικά όσο και ποσοτικά. Οι ενζυμικοί προσδιορισμοί επιτρέπουν τόσο την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενζύμων, όσο και την κατάταξη των ενζύμων με βάση την υποστρωματική τους προτίμηση και την επακόλουθη δημιουργία «δακτυλικών αποτυπωμάτων» (fingerprint profile) μοναδικών και χαρακτηριστικών για κάθε ένζυμο. Τέτοιου είδους αναλυτικές προσεγγίσεις αναδεικνύουν τον τύπο των χημικών ενώσεων που γίνονται αποδεκτές από το ένζυμο ως δυνητικά υποστρώματα, συμβάλλοντας ως εκ τούτου στην καλύτερη κατανόηση των καταλυτικών μηχανισμών και ιδιοτήτων. Με ανάλογο τρόπο, το μοναδικό πρότυπο, σχέδιο ή υπόδειγμα (pattern) το οποίο αναδεικνύεται για ένα άγνωστο ένζυμο χρησιμοποιώντας μία ομάδα γνωστών υποστρωμάτων, μπορεί να μας οδηγήσει στην ταυτοποίηση του ενζύμου αυτού. Στις ημέρες μας, οι ενζυμικοί προσδιορισμοί μπορούν να λάβουν χώρα επάνω σε microchips χρησιμοποιώντας οποιοδήποτε από τα παρακάτω τρία διαφορετικά είδη της τεχνολογίας πλατφόρμας των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Τα τρία αυτά διαφορετικά είδη των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών διακρίνονται μεταξύ τους με βάση το είδος των βιομορίων τα οποία εμφυτεύονται και ακινητοποιούνται επάνω στην πλατφόρμα της μικροσυστοιχίας και είναι: α) πρωτεϊνικές συστοιχίες, β) πεπτιδικές συστοιχίες, και γ) συστοιχίες μικρών μορίων, ανάλογα με το εάν το ακινητοποιούμενο βιομόριο είναι πρωτεΐνη, ολιγοπεπτίδιο, ή μικρό μόριο αντίστοιχα. Η διαδικασία της εμφύτευσης και της ακινητοποίησης των βιομορίων αυτών επάνω στην στερεά πλατφόρμα του microchip είναι διαδικασία ιδιαίτερα δύσκολη τεχνολογικά, ενώ παράλληλα αποτελεί και ζωτικής σημασίας βήμα στην δημιουργία της πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας, αφού είναι απαραίτητο να παραμείνει ανεπηρέαστη η ενζυμική ενεργότητα πρίν και μετά την εμφύτευση.

Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται σε μεθόδους ενζυμικού προσδιορισμού με σκοπό την αναγνώριση και ταυτοποίηση ενζύμων, την καταγραφή της ενζυμικής ενεργότητας, καθώς και την ανάλυση και περιγραφή της ενζυμικής κινητικής των χημικών αντιδράσεων που καταλύονται από αυτά τα ένζυμα. Τα τρία διαφορετικά είδη μικροσυστοιχιών (πρωτεϊνικές, ολιγοπεπτιδικές,

και μικρών βιομορίων) που χρησιμοποιούνται στους ενζυμικούς προσδιορισμούς έχουν ως κοινό παρονομαστή τις ίδιες βασικές και ευρέως αποδεκτές μεθόδους ανίχνευσης δηλαδή τον φθορισμό, την ραδιενέργεια και την χημειοφωταύγεια. Οι μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται στον φθορισμό είναι οι πλέον κατάλληλες γιατί χαρακτηρίζονται από λειτουργική απλότητα στη χρήση τους (operational simplicity), υψηλή αξιοπιστία, και μεγάλη ευαισθησία όσον αφορά την ανίχνευση ενζύμων σε χημικές αντιδράσεις με χαμηλό ρυθμό ενζυμικής ανακύκλωσης (low enzyme turnover reactions)[1,2,3].

Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών όπου το εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο βιομόριο είναι πρωτεΐνη, ουσιαστικά είναι το υπό μελέτη ένζυμο η πρωτεΐνη η οποία εμφυτεύεται και ακινητοποιείται στην στερεά πλατφόρμα της μικροσυστοιχίας. Με την επίτευξη της εμφύτευσης και ακινητοποίησης του ενζύμου στην στερεά πλατφόρμα της μικροσυστοιχίας, προκειμένου να λάβουν χώρα οι ενζυμικοί προσδιορισμοί υψηλής απόδοσης και ευρείας κλίμακας, το πλέον κριτικό σημείο ήταν η ανάπτυξη στρατηγικών μεθόδων που να επιτρέπουν την ταυτόχρονη εκτίμηση της ενεργότητας ξεχωριστών και διαφορετικών πρωτεϊνών-ενζύμων ενώ παράλληλα να εμποδίζουν την διασταυρούμενη επιμόλυνση από γειτονικές πρωτεΐνες - ένζυμα ακινητοποιημένα επάνω στην ίδια επιφάνεια-πλατφόρμα. Επάνω όμως στην επιφάνεια-πλατφόρμα της μικροσυστοιχίας δεν υπάρχουν τα ξεχωριστά, και μεταξύ τους απομονωμένα, πηγάδια-διαμερίσματα των μικροδισκίων της ELISA, τα οποία περιορίζουν και απομονώνουν την κάθε ενζυμική αντίδραση, εξασφαλίζοντας έτσι την ανυπαρξία διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Στην απλή επίπεδη επιφάνεια-πλατφόρμα του microchip της μικροσυστοιχίας βρίσκονται εμφυτευμένα και ακινητοποιημένα χιλιάδες πρωτεϊνικά-ενζυμικά στίγματα (spots) μεταξύ των οποίων δεν υπάρχουν φυσικοί φραγμοί. Η έλλειψη αυτή οποιουδήποτε φυσικού φραγμού, ο οποίος θα εμπόδιζε την ελέυθερη διάχυση των αντιδραστηρίων και των υποστρωμάτων κατά μήκος της επιφάνειας της μικροσυστοιχίας, έχει σαν αποτέλεσμα την διασταυρούμενη επιμόλυνση, την αύξηση του θορύβου σήματος και την μείωση της ευαισθησίας. Συνεπώς η έλλειψη αυτή οποιουδήποτε φυσικού φραγμού κάνει δύσκολη, αν όχι αδύνατη, την άμεση μεταφορά των ενζυμικών προσδιορισμών από τα απομονωμένα πηγάδια-διαμερίσματα των μικροδισκίων της ELISA στα ελεύθερα επικοινωνούντα στίγματα (spots) επιφάνειας της μικροσυστοιχίας.

Για να εξαλειφθεί η πιθανότητα της διασταυρούμενης επιμόλυνσης και να διευθετηθεί το πρόβλημα αυτό, αναπτύχθηκε πρόσφατα μία καινούρια στρατηγική τεχνική, που βασίζεται στην ενζυμική ενεργότητα, και η οποία επιτρέπει, με υψηλή ευαισθησία, την ανίχνευση ενζύμων εμφυτευμένων και ακινητοποιημένων επάνω στην πρωτεϊνική μικροσυστοιχία. Η καινούρια αυτή τεχνική δεν επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση των υποστρωμάτων και εμποδίζει την διασταυρωτή επιμόλυνση γιατί χρησιμοποιεί ως υποστρώματα χημικές ενώσεις οι οποίες συνδέονται ειδικά, ομοιοπολικά και μη-αντιστρεπτά με το αντίστοιχο εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο ένζυμο. Μια τόσο ισχυρή και εξειδικευμένη, από χημικής απόψεως, σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος δεν επιτρέπει την αποσύνδεση, μετακίνηση και ελεύθερη διάχυση του υποστρώματος εξαλείφοντας έτσι την πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Συνεπώς το μυστικό είναι στην χημική φύση και στο σχεδιασμό του υποστρώματος. Το υπόστρωμα εδώ είναι ένας συνθετικός αναστολέας-αυτοκτονίας του ενζύμου ο οποίος συνδέεται εξειδικευμένα, ομοιοπολικά, και μη-αντιστρεπτά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Ο σχεδιασμός των αναστολέων αυτοκτονίας βασίζεται στην προηγηθείσα χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου και στην προϋπάρχουσα γνώση της κινητικής που ακολουθεί το υπό διερεύνηση, εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο, ένζυμο. Οι αναστολείς αυτοκτονίας είναι μικρού μοριακού βάρους χημικά μόρια, των οποίων το ένα άκρο, δηλαδή αυτό το άκρο που συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, προσομοιάζει, ή καλύτερα είναι παρεμφερές αλλά όχι πανομοιότυπο, με το φυσιολογικό υπόστρωμα. Έτσι για παράδειγμα, προκειμένου να ανιχνεύσουμε την παρουσία, επί της μικροσυστοιχίας, ακινητοποιημένων ενζύμων με δράση, π.χ. φωσφατάσης, υδρολάσης της σερίνης, ή πρωτεάσης της κυστεΐνης,

χρησιμοποιούμε αναστολείς αυτοκτονίας των οποίων το ένα άκρο, δηλαδή το άκρο το οποίο «κλειδώνει» στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, έχει χημική δομή προσομοιάζουσα με φωσφορική ομάδα, με σερίνη, ή με κυστεΐνη, αντίστοιχα.

Το άλλο άκρο του χημικού μορίου του αναστολέα-αυτοκτονίας χρησιμεύει ως ιχνηθέτης ή ανιχνευτής (probe), καθώς είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με χημική ένωση σήμανσης. Οι πλέον συχνά χρησιμοποιούμενες για σήμανση χημικές ενώσεις είναι οι φθορίζουσες Cyanine3 (Cy3) και Cyanine5 (Cy5). Η μετατροπή, κατ'ουσίαν, του μη-ανιχνεύσιμου εμφυτευμένου επί του microchip ενζύμου σε ανιχνεύσιμο, οφείλεται στη σύνδεση του ενζύμου με τον προ-σημασμένο ανιχνεύσιμο ιχνηθέτη-αναστολέα. Συμπερασματικά, οι προ-σημασμένοι με Cy3 και Cy5 ιχνηθέτες αναστολείς-αυτοκτονίας επωάζονται, επί της μικροσυστοιχίας, με τα ένζυμα και τροποποιούν μη-αντιστρεπτά και ομοιοπολικά με υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τα ενεργά κέντρα των εμφυτευμένων και ακινητοποιημένων ενζύμων-στόχων, επιτρέποντας έτσι την εύκολη αναγνώριση ή/και κάθαρση των πρωτεϊνών-ενζύμων από πολύπλοκα πρωτεϊνώματα, καθώς και τον προσδιορισμό του βαθμού της ενζυμικής ενεργότητας ή ενζυμικής αναστολής[3].

Στην προηγηθείσα παράγραφο, έγινε περιγραφή της οργανολογίας των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών, στις οποίες το εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο, επί του στερεού υποστρώματος της πλατφόρμας του microchip, βιομόριο είναι πρωτεΐνη-ένζυμο. Η αντίστροφη οργανολογική διάταξη εφαρμόζεται όταν το εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο, επί του στερεού υποστρώματος της πλατφόρμας του microchip, βιομόριο είναι ολιγοπεπτίδιο ή μικρού μεγέθους χημικό μόριο. Δηλαδή, στην δεύτερη περίπτωση εμφυτευμένα και ακινητοποιημένα επί της μικροσυστοιχίας είναι τα ενζυμικά υποστρώματα (ολιγοπεπτίδια ή μικρού μεγέθους χημικά μόρια) και προστίθενται τα ένζυμα (δείγμα-στόχος) προκειμένου να γίνει η επώαση. Τέτοιου είδους συστοιχίες ολιγοπεπτιδίων και μικρών βιομορίων χρησιμοποιούνται για να αναγνωρίσουν την ενζυμική ενεργότητα διαφόρων τύπων ενζύμων όπως πρωτεασών, κινασών, άλλου είδους υδρολασών, καθώς και ενζύμων τροποποιητικών της χημικής δομής των υδατανθράκων.Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα με πολύ υψηλό βαθμό εξειδίκευσης για την πεπτιδική αλληλουχία-υπόστρωμα της οποίας θα επιφέρουν την υδρολυτική διάσπαση.

Οι αναλυτικές προσεγγίσεις που έχουν μέχρι πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για τον ενζυμικό προσδιορισμό και την ανάλυση της υποστρωματικής εξειδίκευσης πρωτεασών (π.χ. FRET πεπτίδια, υποστρώματα προερχόμενα από βιβλιοθήκες φάγων, βιβλιοθήκες σάρωσης θέσεως, βιβλιοθήκες βασισμένες στην ανάμιξη και προσανατολισμένες σε πεπτίδια) δεν κατέχουν τον υψηλό βαθμό απόδοσης ούτε την ευρύτητα κλίμακας που παρέχεται από τις μικροσυστοιχίες ολιγοπεπτιδίων ή μικρού μεγέθους χημικών μορίων. Συνεπώς, η πλήρης, εκτενής και λεπτομερής καταγραφή της εξειδίκευσης μιάς πρωτεάσης, καθώς και η κινητική εκτίμηση όλων των δυνητικών υποστρωμάτων της είναι πολύ δύσκολες διαδικασίες, οι οποίες μπορούν να διεκπεραιωθούν μόνο με την βοήθεια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών εμφυτευμένων ολιγοπεπτιδίων και μικρού μεγέθους χημικών μορίων. Χρησιμοποιώντας ως στερεό υπόστρωμα τριών διαστάσεων υπερμοριακό υδροπήκτωμα, οι Kiyonaka και συν. παγίδευσαν, εμφύτευσαν και ακινητοποίησαν επάνω σε αυτό φθορίζοντα ολιγοπεπτίδια-υποστρώματα και με αυτό τον τρόπο μελέτησαν την ενζυμική ενεργότητα πρωτεασών.

Πρόσφατα ανακοινώθηκε από τους Gosalia και Diamond η σύνθεση υγρής φάσεως μικροσυστοιχιών η οποία απαιτεί μόλις νανόλιτρα όγκου δείγματος για την ανάλυση και τον προσδιορισμό πρωτεασών. Οι μικροσυστοιχίες υγρής φάσεως εμφανίζουν το πλεονέκτημα της εφαρμογής των, καταλληλότερων και διαφορετικών κάθε φορά, συνθηκών αντιδράσεως σε κάθε ξεχωριστή θέση επάνω στην κλίμακα της υγρής στήλης της μικροσυστοιχίας. Μία ανάλογη μέθοδος προσδιορισμού υδρολασών βασισμένη στην ανίχνευση χρωμογόνου έχει περιγραφεί από τους Park και Clark. Στην μέθοδο αυτή οι υδρολάσες τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό μικροσφαιριδίων υγρού πηκτώματος και έτσι δημιουργήθηκε μία διαλυτή φάση μικροσυστοιχίας ενζύμων. Ο βαθμός της υδρόλυσης εκτιμήθηκε από την αλλαγή χρώματος που παρουσίασε ο δείκτης χρωμογόνου κυανούν της βρωμοθυμόλης. Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες εμφυ-

τευμένων υποστρωμάτων (ολιγοπεπτιδίων και μικρού μεγέθους βιομορίων) μπορούν επίσης να ανιχνεύσουν το βαθμό ενζυμικής ειδικότητας και αναστολής χρησιμοποιώντας μία σειρά διαφορετικών ολιγοπεπτιδικών υποστρωμάτων. Οι Ellman και συν. πρόσφατα ανέπτυξαν μία αρκετά γοητευτική προσέγγιση για τον, υψηλής απόδοσης, ενζυμικό προσδιορισμό πρωτεασών σε επιφάνεια μικρο-συστοιχίας. Πιό συγκεκριμένα, δημιούργησαν συνδυαστικές βιβλιοθήκες από παράγωγα πεπτίδυλο-κουμαρίνης εμφυτευμένα και ακινητοποιημένα σε ειδικές θέσεις επάνω σε στερεά πλατφόρμα μικροσυστοιχίας κατά-σκευάζοντας έτσι ολιγοπεπτιδικές μικρο-συστοιχίες.

Το μόριο ανίχνευσης ήταν η 7-άμινο-4-καρβαμόϋλομέθυλο-κουμαρίνη, το οποίο από-τέλεσε και το φθορίζον μόριο αναφοράς. Ανάλογη τεχνική αναπτύχθηκε και από τους Panicker και συν. για την, υψηλής παραγωγής (high-throughput), αναγνώριση και ταυτο-ποίηση υδρολυτικών ενζύμων όπως εστερα-σών, λιπασών, πρωτεασών, φωσφατασών και υδρολασών των εποξειδίων. Στην μέθοδο των Panicker και συν. ένα φθορίζον παράγωγο κουμαρίνης τροποποιήθηκε κατάλληλα έτσι ώστε να δημιουργηθούν σειρές ενζυμικών υποστρωμάτων τα οποία στη συνέχεια εμφυτεύθηκαν και ακινητοποιήθηκαν επάνω σε στερεά υάλινη πλατφόρμα προκειμένου να κατασκευαστούν συστοιχίες μικρών βιομορίων. Δηλαδή, το εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο, μικρού μεγέθους χημικό μόριο που αποτελεί και το ενζυμικό υπόστρωμα, είναι ένα φθορίζον παράγωγο κουμαρίνης. Όμως, από χημικής απόψεως, το συγκεκριμένο κουμαρινικό παράγωγο που χρησιμοποιήθηκε από τους Panicker και συν. εμφανίζει μια πολύ χρήσιμη ιδιότητα, η οποία σχετίζεται με την δομή του.

Η χημική δομή αυτού του κουμαρινικού παραγώγου – υποστρώματος αποτελείται από δύο τμήματα. Το ένα τμήμα είναι η κεφαλή και το άλλο τμήμα είναι ο κορμός του μορίου. Το υπόστρωμα έχει εμφυτευθεί και ακινητο-ποιηθεί στην στερεά πλατφόρμα με το ένα άκρο του κορμού του, ενώ το άλλο άκρο του κορμού του συνδέεται ομοιοπολικά με την κεφαλή η οποία και προεξέχει. Η κεφαλή λοιπόν συνδέεται ομοιοπολικά με τον κορμό του μορίου και το συνολικό ακέραιο και αρτιμελές μόριο (κεφαλή/κορμός) αποτελεί και το ενζυμικό υπόστρωμα. Τα υπό μελέτη ένζυμα αναγνωρίζουν στο ενεργό τους κέντρο την κεφαλή και διασπούν υδρολυτικά τον ομοιοπολικό δεσμό που συνδέει την κεφαλή με τον κορμό. Το αποτέλεσμα της ενζυμικής αυτής διάσπασης είναι ο «αποκεφαλισμός» του μορίου. Με τον ˝αποκεφαλισμό˝ του μορίου απομακρύνεται η κεφαλή και απομένει ο «αποκεφαλισμένος» κορμός ο οποίος και παραμένει εμφυτευμένος στην στερεά πλατφόρμα. Το αρτιμελές μόριο (κεφαλή/ κορμός) δεν εμφανίζει φθορίζουσα ιδιότητα. Φθορίζουσα ιδιότητα έχει μόνο ο κορμός. Η ύπαρξη της κεφαλής καλύπτει την φθορίζουσα ιδιότητα του κορμού και δεν επιτρέπει την ανίχνευσή της. Η απομάκρυνση λοιπόν, με την ενζυμική υδρόλυση, της κεφαλής έχει σαν αποτέλεσμα την αποκάλυψη και ανίχνευση πλέον της προϋπάρχουσας φθορίζουσας ιδιότητας του αποκεφαλισμένου» κορμού. Τελικά, η επώαση της μικροσυστοιχίας με το υδρολυτικό ένζυμο μετατρέπει, με τον προαναφερόμενο μηχανισμό, την ενζυμική δραστηριότητα σε μονάδες μέτρησης φθορισμού.

Η χρησιμοποίηση φθοριζόντων συνδετών συγγένειας (fluorescently tagged affinity ligands) σαν μέσο για τον ποσοτικό προσδιο-ρισμό της σύνδεσης, επάνω σε microchip, αντιστρεπτών και μη-αντιστρεπτών αναστο-λέων των πρωτεασών έχει επιπλέον αναφερθεί από τους Miyake και συν. Οι μικροσυστοιχίες εμφυτευμένων ολιγοπεπτιδίων και μικρών βιομορίων έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται και για τον χαρακτηρισμό κινασών. Οι πρώτες απόπειρες χαρακτηρισμού των κινασών, δηλαδή οι πρώτες προσπάθειες καταγραφής του ενζυμικού profile των κινασών έγιναν αρχικά με τεχνικές όπως η ανάδειξη πεπτιδίων από φάγους (peptide phage display), η χρήση σφαιριδιακών βιβλιοθηκών πεπτιδίων (on-bead peptide libraries), και η SPOT™ τεχνολογία. Η πρώτη απόπειρα προσδιορισμού της ενζυμικής δράσης κινασών χρησιμοποιώντας διάταξη μικροσυστοιχίας έγινε από τους Schreiber και συν με το υπόδειγμα Kemptide φωσφορυ-λίωσης καταλυόμενης από cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Σε μια επακόλουθη εκτενέστερη μελέτη οι Zhu και συν. ερεύνησαν την ενζυμική δράση 119 διαφορετικών κινασών ζύμης έναντι 17 διαφορετικών πρωτεϊνών-υποστρωμάτων που είχαν ακινητοποιηθεί σε

διάταξη νανοπηγαδίων (nanowell format). Όμως η πρώτη επιτυχημένη απόπειρα χρησιμοποίησης ολιγοπεπτιδίων σαν υποστρώματα κινασών έγινε από τους Falsey και συν. οι οποίοι και ανέδειξαν την ενσωμάτωση ^{33}P μέσα σε ένα ακινητοποιημένο ολιγοπεπτίδιο-υπόστρωμα μετά από ενζυμική προσβολή του ολιγοπεπτιδίου από την $p60^{c\text{-}src}$ τυροσινική κινάση. Εναλλακτικά, οι Houseman και συν. ανέπτυξαν μικροσυστοιχίες ολιγοπεπτιδίων, βασισμένες σε αυτό-συναρμολογούμενες μονοστοιβάδες, για την ταχεία και ποσοτική εκτίμηση της δραστικότητας κινασών.

Μία πρόσφατη ερευνητική προσθήκη στην ταυτοποίηση ολιγοπεπτιδικών υποστρωμάτων κινασών είναι η ανακάλυψη και εφαρμογή των συστοιχιών συλλογής θέσεων φωσφορυλίωσης («phospho-site» collection arrays) οι οποίες αποτελούνται από ολιγοπεπτιδικές βιβλιοθήκες προερχόμενες από ήδη ονοματισμένες και σχολιασμένες θέσεις φωσφορυλίωσης σε ανθρώπινες πρωτεΐνες. Οι μέθοδοι ανίχνευσης, που χρησιμοποιούνται στις προαναφερόμενες μικροσυστοιχίες εμφυτευμένων ολιγοπεπτιδικών υποστρωμάτων κινασών, είναι βασισμένες στην εκπομπή ραδιενέργειας. Οι Panicker και συν. στην προσπάθειά τους να ξεπεράσουν τα «ενδογενή» και «φυσικά» μειονεκτήματα των ραδιενεργών μεθόδων, χωρίς παράλληλα να μειωθεί η ευαισθησία της μεθόδου, ανέπτυξαν μία εναλλακτική μέθοδο ανίχνευσης βασισμένη στη χρήση αντι-φωσφοαμινικών αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσα χημική ένωση.

Στην μέθοδο αυτή των Panicker και συν. αρχικά εμφυτεύονται και ακινητοποιούνται ολιγοπεπτιδικά υποστρώματα κινασών επάνω στην στερεά πλατφόρμα της μικροσυστοιχίας. Στην συνέχεια γίνεται επώαση της μικροσυστοιχίας με το ένζυμο κινάση και το έτερο υπόστρωμα PO_4 της ενζυμικής αντίδρασης. Η επώαση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του εμφυτευμένου ολιγοπεπτιδικού υποστρώματος. Η μικροσυστοιχία με τα, φωσφορυλιωμένα πλέον, εμφυτευμένα και ακινητοποιημένα ολιγοπεπτιδικά υποστρώματα επωάζεται εκ νέου με το ειδικό αντι-φωσφοαμινικό μονοκλωνικό αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό συνδέεται ειδικά και μόνο με το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο αμινοξέως του εμφυτευμένου ολιγοπεπτιδίου. Στο Fc τμήμα του αντισώματος είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά μία φθορίζουσα χημική ένωση, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση του μονοκλωνικού αντισώματος. Μετά την δεύτερη επώαση ακολουθεί πλύση της μικροσυστοιχίας και απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Έτσι τελικά, μετά την πλύση, ανιχνεύονται οι θέσεις επάνω στην μικροσυστοιχία που αντιστοιχούν στα εμφυτευμένα και ακινητοποιημένα ολιγοπεπτίδια που έχουν φωσφορυλιωθεί. Τα τελευταία χρόνια οι Chai και συν. παράλληλα με τους Weng και συν. εισήγαγαν στο εμπόριο μία φθορίζουσα μέθοδο ανίχνευσης φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων και πρωτεϊνών η οποία κάνει χρήση της χρωστικής ProQ Diamond™.

Οι Panicker και συν. στην προσπάθειά τους να εξερευνήσουν και να επεκτείνουν περαιτέρω τις δυνατότητες της οργανολογίας των μικροσυστοιχιών, όσον αφορά την ανίχνευση, τον καθορισμό, και την περιγραφή της εξειδίκευσης των διαφόρων υποστρωμάτων κινασών, ανέπτυξαν μία συνδυαστική (combinatorial) μέθοδο χαρακτηρισμού των υποστρωμάτων κινασών. Η συνδυαστική αυτή μέθοδος έχει ως σκοπό να αυξήσει την δυνατότητα παραγωγής (throughput) των αποτελεσμάτων που εκπορεύονται από την διάταξη των μικροσυστοιχιών, προετοιμάζοντας έτσι σιγά-σιγά το έδαφος για τον ερχομό, στο μέλλον, της δεύτερης και νεώτερης γενιάς μικροσυστοιχιών. Παραδοσιακά, οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες μικροσυστοιχίες, δηλαδή οι μικροσυστοιχίες πρώτης γενιάς, κατέχουν την κλασσική προσέγγιση «ενός στίγματος, μίας σύνθεσης» («one-spot, one-compound») με σκοπό την άμεση ανίχνευση θετικών χτυπημάτων (positive hits). Ωστόσο, η κλασσική αυτή προσέγγιση, περιορίζει τον αριθμό των ολιγοπεπτιδικών συνθέσεων (compounds) που μπορούν να μελετηθούν σε μία μικροσυστοιχία, στον περιορισμένο αριθμό αυτών των συνθέσεων που επιτρέπεται να «χωρέσουν» να συντεθούν και να τοποθετηθούν επάνω στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας, περιορίζοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή εξόδου (throughput) της μικροσυστοιχίας. Προκειμένου λοιπόν, να καταστεί δυνατή η ταχεία και αποδοτική μελέτη συνθέσεων (compounds) μεγαλύτερης ετερογένειας, είναι επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης και εφαρμογής εναλλακτικών στρατηγικών σύνθεσης μικροσυστοιχιών. Μία τέτοια εναλλακτική στρατηγική σύνθεσης, είναι η

σύνθεση μικροσυστοιχιών αποτελούμενων, όχι από ένα μόνο είδος ολιγοπεπτιδίων, αλλά από συνδυασμούς διαφορετικών ολιγοπεπτιδίων (combinatorial peptide synthesis). Η συνδυαστική σύνθεση ολιγοπεπτιδίων μπορεί να εφαρμοστεί κατάλληλα και μαζί με μεθόδους βασισμένες στην τεχνολογία των συστοιχιών προκειμένου να βοηθήσει στην ανάπτυξη της επόμενης γενιάς ολιγοπεπτιδικών μικροσυστοιχιών.

Οι Panicker και συν. έδειξαν ότι, στιγματίζοντας πλατφόρμες πλακιδίων με βιβλιοθήκες ποικίλων συνδυασμών ολιγοπεπτιδικών αλληλουχιών, δημιούργησαν συνδυαστικές ολιγοπεπτιδικές μικροσυστοιχίες, μέσα από τις οποίες εξήγαγαν συμπεράσματα σχετικά με θετικά χτυπήματα (positive hits) ή σχετικά με ειδικότητα υποστρώματος. Τα συμπεράσματα αυτά τα εξήγαγαν μέσα από ένα μόνο πλακίδιο συνδυαστικής μικροσυστοιχίας, χωρίς να δημιουργηθεί η ανάγκη να συνθέσουν ξεχωριστά μεγάλους αριθμούς διαφορετικών ολιγοπεπτιδικών αλληλουχιών σε διαφορετικά πλακίδια μικροσυστοιχίας. Οι Panicker και συν. μελέτησαν την κατανομή έντασης του φθορισμού (fluorescence intensity profile) και την ανάλυση εικόνας που απέκτησαν από ένα πλακίδιο συνδυαστικής μικροσυστοιχίας ολιγοπεπτιδίων. Στο πλακίδιο αυτής της μικροσυστοιχίας είχαν εμφυτεύσει και ακινητοποιήσει 25 διαφορετικές συνδυαστικές βιβλιοθήκες ολιγοπεπτιδίων.

Επρόκειτο για 25 διαφορετικά ολιγοπεπτιδικά υποστρώματα της $p60^{c\text{-}src}$ κινάσης. Οι βιβλιοθήκες 1-6 ήταν βιβλιοθήκες εξάλειψης, οι βιβλιοθήκες 7-13 ήταν βιβλιοθήκες ανίχνευσης αλανίνης, οι βιβλιοθήκες 16-25 ήταν βιβλιοθήκες θετικής ανίχνευσης, η βιβλιοθήκη 14 ήταν συνδυαστική βιβλιοθήκη πλήρους μείγματος ολιγοπεπτιδίων, και η βιβλιοθήκη 15 ήταν βιβλιοθήκη αποτελούμενη από το θεωρούμενο αρχικό και γνήσιο ολιγοπεπτιδικό υπόστρωμα (original putative substrate). Όλα τα ολιγοπεπτιδικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν συντεθεί με ένα συνδετικό μόριο (linker) CGG στο άμινο-τελικό άκρο τους και είχαν εμφυτευθεί και ακινητοποιηθεί επάνω σε θειοεστερικά πεγκυλιωμένα πλακίδια μικροσυστοιχίας. Μετά από επώαση της συνδυαστικής ολιγοπεπτιδικής μικροσυστοιχίας με την $p60^{c\text{-}src}$ κινάση, οι Panicker και συν. κατέγραψαν την κατανομή έντασης φθορισμού του συνόλου των 25 διαφορετικών ολιγοπεπτιδικών βιβλιοθηκών σε αυθαίρετες μονάδες έντασης φθορισμού (arbitrary fluorescent units)[1,3].

Ένα μείζον εμπόδιο στην γλυκοβιολογία υπήρξε παραδοσιακά, η έλλειψη εύκολων και αποτελεσματικών τεχνικών για την σύνθεση και ανάλυση των πολύπλοκων και δομικά ποικίλων χημικών μορφών των υδατανθρακών. Όμως, τα τελευταία χρόνια σημειώθηκαν σημαντικές πρόοδοι όσον αφορά τις διαθέσιμες χημικές και ενζυμικές μεθόδους σύνθεσης πολύπλοκων υδατανθρακών σε στερεά φάση. Οι πρόοδοι αυτές διευκόλυναν την ανάπτυξη μεθοδολογίας και τεχνικών ικανών να εξερευνήσουν νέους ορίζοντες στην βιολογία των υδατανθρακών. Στην πρώτη γραμμή της τεχνολογίας βρίσκονται, όπως είναι φυσικό και οι προσπάθειες ανάπτυξης υδατανθρακικών μικροσυστοιχιών. Η χρησιμότητα των μικροσυστοιχιών εμφυτευμένων υδατανθράκων έχει ήδη αναδειχθεί σε μελέτες ενζυμικής λειτουργίας. Οι Houseman και Mrksich ανέφεραν την κατασκευή υδατανθρακικής μικροσυστοιχίας στην οποία τα υδατανθρακικά μόρια εμφυτεύθηκαν και ακινητοποιήθηκαν επί της στερεάς πλατφόρμας του πλακιδίου με χημική αντίδραση Diels-Alder. Στην συνέχεια, οι ίδιοι ερευνητές, χρησιμοποίησαν αυτό το υδατανθρακικό chip («carbochip») για να καταγράψουν την κατανομή των δεσμευτικών ειδικοτήτων, ανάμεσα σε, σημασμένες με μόρια ροδαμίνης, λεκτίνες και σε πολλά διαφορετικά μόρια μονοσακχαριτών. Επιπλέον, επέτυχαν τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση της υποστρωματικής εξειδίκευσης του ενζύμου β-1,4-γαλακτόσυλο-τρανσφεράση καθώς και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανασταλτικής συγκέντρωσης της α-μέθυλο-μαννόζης για την κονκαναβαλίνη Α σε μελέτες συναγωνιστικής ενζυμικής αναστολής.

Σε μία άλλη παρεμφερή μελέτη, η ίδια ομάδα ερευνητών, κατέγραψε την εικόνα κατανομής (profile) της δεσμευτικής ειδικότητας λεκτινών έναντι μιάς μικροσυστοιχίας μονοσακχαριτών συζευγμένων με θειόλη, οι οποίοι είχαν εμφυτευθεί και ακινητοποιηθεί επάνω σε μία αυτό-συγκροτούμενη μονοστοιβάδα που είχε, με τη σειρά της, παραχθεί από χημικές ομάδες μαλεϊμίδιου. Οι Park και συν. ανέφεραν την επινόηση και κατασκευή υδατανθρακικών μικροσυστοιχιών στις οποίες τα υδατανθρακικά

μόρια εμφυτεύθηκαν και ακινητοποιήθηκαν επί στερεάς πλατφόρμας υάλου επικαλυμμένης με μόρια θειόλης, μέσω μαλεϊμιδίων, τα οποία είχαν συνδεθεί με το υδατανθρακικό μόριο στο εμφυτευτικό άκρο αυτού. Χρησιμοποιώντας αυτές τις υδατανθρακικές μικροσυστοιχίες, οι ερευνητές, προσδιόρισαν ποσοτικά και ποιοτικά την δέσμευση λεκτινών σε α-, β- και N-συνδεδεμένους υδατάνθρακες[2].

Εκτός από τις μικροσυστοιχίες εμφυτευμένων πρωτεϊνών, ολιγοπεπτιδίων, μικρών μορίων και υδατανθρακών, έχουν πρόσφατα αναπτυχθεί και πιο σύνθετες πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες όπου το εμφυτευμένο μόριο είναι σύνθετο μόριο αποτελούμενο από πεπτίδιο ομοιοπολικά συνδεδεμένο με νουκλεϊκό οξύ (Peptide Nucleic Acid tagged ή PNA tagged). Οι Schultz και συν. ανέφεραν την δημιουργία μιάς τέτοιας συστοιχίας μικρών μορίων στην οποία τα εμφυτευμένα και ακινητοποιημένα μικρά μόρια ήταν πεπτίδια σημασμένα με νουκλεϊκά οξέα. Οι ίδιοι ερευνητές χρησιμοποίησαν αυτή τη σύνθετη πρωτεϊνική-γονιδιακή μικροσυστοιχία σε συνδυασμό με την τεχνολογία της κλασσικής DNA μικροσυστοιχίας, προκειμένου να μετρήσουν τα επίπεδα και τις ενεργότητες ενζύμων σε μία κλίμακα πρωτεϊνωμικής. Χρησιμοποιώντας την συνδυαστική μέθοδο διαχωρισμού δεξαμενών συνέθεσαν μία βιβλιοθήκη μικρών μορίων. Ο σχεδιασμός των μορίων της βιβλιοθήκης αυτής έγινε με βάση γνωστά δεδομένα ενζυμικής αναστολής προκειμένου να συντεθούν μικρά μόρια-αναστολείς των πρωτεασών της κυστεΐνης. Κάθε μέλος της βιβλιοθήκης αυτής, δηλαδή κάθε εμφυτευμένο και ακινητοποιημένο χημικό μόριο-αναστολέας, είχε ομοιοπολικά συνδεδεμένη επάνω του μία ετικέτα πεπτιδίου-νουκλεϊκού οξέως (Peptide Nucleic Acid tag ή PNA tag). Οι ετικέτες PNA (PNA tags) δεν επηρεάζουν την ενεργότητα ούτε την επιλεκτική ικανότητα αυτών των μικρών χημικών μορίων-αναστολέων, ενώ παράλληλα χρησιμεύουν σαν μοριακοί κωδικοί (molecular «barcodes») οι οποίοι στη συνέχεια, υβριδοποιούμενοι με κατάλληλη DNA μικροσυστοιχία, μπορεί να αποκωδικοποιήσουν την αρχική βιβλιοθήκη. Εναλλακτικά, η χρησιμότητα αυτής της μεθόδου, στην παρακολούθηση των ενζυμικών δραστηριοτήτων μιάς κλίμακας πρωτεϊνωμικής, έχει αναδειχθεί από την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της caspase-3 σε ακατέργαστα πρωτογενή εκχυλίσματα κυττάρων που είχαν υποβληθεί σε απόπτωση πυροδοτούμενη από Granzyme B. Εφόσον η ενζυμική δραστηριότητα και ενεργότητα επηρεάζουν και καθορίζουν τον βαθμό σύνδεσης του μικρού μορίου-αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, η προαναφερόμενη προσέγγιση μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί για να καθοδηγήσει τον σχεδιασμό φαρμάκων έναντι νοσούντων φαινοτύπων.

Αυτό το νέο πεδίο έρευνας χαρακτηρίζεται ως «ευρεία γονιδιωματική ταυτοποίηση των ενζυμικών δραστηριοτήτων με τη χρήση τεχνολογίας DNA μικροσυστοιχιών» («genome-wide identification of enzyme activities using the DNA microarray technology»). Επάνω σε αυτό το νέο πεδίο έρευνας, οι Panicker και συν. ανέπτυξαν την τεχνική της «απεικόνισης έκφρασης» («expression display») η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα τριών διαφορετικών τεχνικών, δηλαδή της τεχνικής της ριβοσωμικής απεικόνισης, της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών και της τεχνικής του προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην μέθοδο της «απεικόνισης έκφρασης», ένα μίγμα διαφορετικών πρωτεϊνών-ενζύμων εκφράζεται μέσα σε ένα μόνο απλό δοχείο (eppendorf). Σαν αφετηρία, για την έκφραση του μίγματος των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο μίγμα cDNAs που ελήφθει από τις cDNA βιβλιοθήκες. Έστω λοιπόν, ότι από τις c-DNA βιβλιοθήκες παραλαμβάνεται ένα μίγμα διαφορετικών cDNAs που κωδικοποιούν τις διαφορετικές πρωτεΐνες-ένζυμα. Το μίγμα cDNAs τοποθετείται μέσα στο eppendorf όπου και ακολουθεί in vitro μεταγραφή και σύνθεση των αντιστοίχων mRNAs. Στη συνέχεια το μίγμα των mRNAs απομονώνεται σε ένα άλλο eppendorf όπου και ακολουθεί in vitro μετάφραση με την προσθήκη ριβοσωμάτων.

Η προσθήκη των ριβοσωμάτων στο μίγμα των mRNAs επιτελεί την πρωτεϊνοσύνθεση και διασφαλίζει ότι κάθε νεοσυντιθέμενο πρωτεϊνικό μόριο θα είναι συνδεδεμένο με την, αντίστοιχη προς αυτό το μόριο, μεταφρασμένη mRNA κωδικοποιητική αλληλουχία, μέσω του σταθερού τεταρτοταγούς μεταφραστικού συμπλέγματος mRNA-ριβοσώματος-πρωτεϊνικού μορίου. Δηλαδή το mRNA, το ριβόσωμα και το συντιθέμενο πρωτεϊνικό μόριο συνδέονται

μεταξύ τους με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς δημιουργώντας ένα σταθερό τεταρτοταγές μεταφραστικό σύμπλεγμα. Στη συνέχεια, ακολουθούν λειτουργικές επιλογές με τη χρήση μικρού μεγέθους μοριακού ανιχνευτή, ο σχεδιασμός του οποίου βασίστηκε στην ενζυμική δραστηριότητα (activity-based small molecule probe).

Οι λειτουργικές αυτές επιλογές έχουν σαν αποτέλεσμα την απομόνωση, από το σύνολο του μίγματος των μεταφραστικών συμπλεγμάτων mRNA-ριβοσώματος-πρωτεϊνικού μορίου, μόνο εκείνων των μεταφραστικών συμπλεγμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη με την επιθυμητή ενζυμική δραστηριότητα. Έτσι λοιπόν, στο επόμενο βήμα της ερευνητικής διαδικασίας, παραλαμβάνουμε, απομονωμένο, το υποσύνολο των μεταφραστικών συμπλεγμάτων στα οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες με την επιθυμητή ενζυμική δράση. Οι Panicker και συν. εφάρμοσαν την τεχνική αυτή, προκειμένου να παραλάβουν σε καθαρή και απομονωμένη μορφή, από το αρχικό σύνολο των μεταφραστικών συμπλεγμάτων του μίγματος, μόνο το υποσύνολο των μεταφραστικών συμπλεγμάτων που φέρουν πρωτεΐνες με δράση φωσφατάσης της τυροσίνης. Για τον σκοπό αυτό, επώασαν το συνολικό αρχικό μίγμα των μεταφραστικών συμπλεγμάτων επάνω σε πλακίδια μικροσυστοιχίας στα οποία είχαν εμφυτεύσει και ακινητοποιήσει ενζυμικά υποστρώματα που αποτελούσαν τους ενζυμικούς ανιχνευτές (activity-based small molecular probes). Οι ανιχνευτές της συγκεκριμένης μικροσυστοιχίας είχαν στο ελεύθερο άκρο τους (δηλαδή στο άκρο που προεξέχει ή αλλιώς στην κεφαλή του μορίου) τη χημική δομή του ενζυμικού υποστρώματος, δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση την χημική δομή φωσφορυλιωμένης τυροσίνης, ενώ στο άλλο άκρο τους, δηλαδή στο εμφυτευμένο άκρο τους, είχαν σημανθεί με μόριο βιοτίνης. Έτσι οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές δέσμευσαν, από το συνολικό αρχικό μίγμα των μεταφραστικών συμπλεγμάτων, μόνο το υποσύνολο εκείνο των μεταφραστικών συμπλεγμάτων που περιείχαν τυροσινικές φωσφατάσες. Όμως, και το υποσύνολο των φωσφατασών της τυροσίνης είναι, με τη σειρά του, μιά μεγάλη και ανομοιογενής ομάδα πρωτεϊνικών μορίων που, ενώ μοιράζονται την ίδια δομή στο ενεργό κέντρο, διαφέρουν μεταξύ τους στην υπόλοιπη αλληλουχία όπως π.χ. σε διαφορετικές ισομορφές των ενζύμων.

Συνεπώς, στο πλακίδιο της μικροσυστοιχίας, με τους εμφυτευμένους activity-based small molecular probes χημικής δομής φωσφορυλιωμένης τυροσίνης, οι Panicker και συν. δέσμευσαν όλα τα μεταφραστικά συμπλέγματα ισοενζύμων φωσφατάσης της τυροσίνης. Πως λοιπόν αποκωδικοποίησαν στη συνέχεια τις διάφορες ισομορφές τυροσινικής φωσφατάσης; Αυτό έγινε με τη χρήση μιάς αποκωδικοποιητικής DNA μικροσυστοιχίας. Αναλυτικότερα, οι ερευνητές έχοντας ήδη λάβει, ως τώρα, απομονωμένο και καθαρό, επί του πλακιδίου, το υποσύνολο των μεταφραστικών συμπλεγμάτων που φέρουν μόνο τις ισομορφές φωσφατάσης της τυροσίνης, εφάρμοσαν στη συνέχεια κατάλληλη επεξεργασία απομόνωσης του συνόλου των διαφορετικών mRNAs των ισομορφών τυροσινικής φωσφατάσης από τα μεταφραστικά συμπλέγματα mRNA-ριβοσώματος - ισοενζύμου. Δηλαδή, διέσπασαν τα μεταφραστικά συμπλέγματα στα επιμέρους στοιχεία τους (mRNA, ριβόσωμα, πρωτεΐνη) και απομόνωσαν σε καθαρή μορφή το μίγμα των mRNAs.

Το μίγμα mRNAs των ισοενζύμων τυροσινικής φωσφατάσης με τη διενέργεια Reverse-Transcriptase PCR έδωσε, στο επόμενο βήμα της διαδικασίας, το αντίστοιχο μίγμα cDNAs αντίστροφων μεταγραφημάτων των ισοενζύμων. Αυτά τα cDNAs αντίστροφα μεταγραφήματα σημάνθηκαν με Cyanine3 (Cy3) και επωάστηκαν με τη σειρά τους επάνω σε μιά αποκωδικοποιητική DNA μικροσυστοιχία. Στην αποκωδικοποιητική αυτή μικροσυστοιχία οι ερευνητές είχαν εμφυτεύσει και ακινητοποιήσει, ως probes, μεγάλο αριθμό ORFs ζύμης. Η υβριδοποίηση των Cy3 σημασμένων cDNAs, μέσω δεσμών υδρογόνου, με τα ORFs ζύμης έδωσε θετικά απεικονιστικά χτυπήματα (positive hits). Θετικά απεικονιστικά χτυπήματα επί διαφορετικών θέσεων στο επίπεδο της αποκωδικοποιητικής DNA μικροσυστοιχίας αντιστοιχούν σε διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου. Με την, παραπάνω αναφερόμενη, ˝expression display˝ μέθοδο οι ερευνητές οδηγήθηκαν στην αποκωδικοποίηση των διαφορετικών ισομορφών τυροσινικής φωσφατάσης. Η «expression display» αποτελεί υψηλής απόδοσης (high throughput) τεχνική η οποία μπορεί, σε ένα μόνο πείραμα, να απομονώσει

και να ταυτοποιήσει αντιπροσωπευτικές ισομορφές ενός ενζύμου, μέσα από ένα αρχικό μίγμα πολλών διαφορετικών ισομορφών, όχι ενός μόνο ενζύμου, αλλά πολλών διαφορετικών ενζύμων[2].

Με βάση τα όσα προαναφέραμε, οι ερευνητές αποφασίζουν τι είδους μόρια προσδέτη ή ιχνηθέτη (probe) θα εμφυτευθούν και θα ακινητοποιηθούν επάνω στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών, ποιές πηγές πρωτεϊνικών μορίων - στόχων θα διασταυρωθούν σε αυτές τις συστοιχίες, καθώς και πόσες συστοιχίες θα χρησιμοποιηθούν για την επανάληψη του πειράματος.

Εν συνεχεία, μετά τη σύνδεση πρωτεΐνης - προσδέτη, ακολουθεί μια σειρά βημάτων που έχουν σκοπό τον καθαρισμό των δεδομένων, ή αλλιώς «ανάλυση χαμηλού επιπέδου» των δεδομένων που συλλέγονται από το πείραμα. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων είναι πολύ σημαντική, καθώς το μέγεθός τους είναι απαγορευτικό. Μέσω διαφόρων μεθόδων στατιστικής ανάλυσης ανακαλύπτονται οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Τέλος, για την εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων και ανάλογα με το σκοπό του πειράματος εφαρμόζονται συνήθως μέθοδοι εξόρυξης δεδομένων (data mining). Στη συνέχεια, θα περιγράψουμε τα βήματα ανάλυσης που ακολουθούνται συνήθως στην περίπτωση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών.

Η αφετηρία της μεθόδου είναι ο σχεδιασμός του πειράματος. Πριν από την εκτέλεση του πειράματος είναι απαραίτητο να καθοριστεί ο αριθμός των συστοιχιών που θα χρησιμοποιηθούν καθώς και τα δείγματα πρωτεϊνών που θα διασταυρωθούν σε κάθε συστοιχία. Ακόμη, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να αποφασιστεί αν οι πρωτεΐνες από διαφορετικούς οργανισμούς θα συνδυαστούν ή θα αντιμετωπιστούν ξεχωριστά, καθώς και αν η προσθήκη φθορισμού (fluorescent labeling) θα γίνει ξεχωριστά για κάθε συστοιχία ή συνολικά για ένα σύνολο δειγμάτων πρωτεϊνών. Οι αποφάσεις αυτές είναι αρκετά σημαντικές και συμβάλλουν στην ποιότητα των αποτελεσμάτων. Σκοπός, είναι να γίνει η καλύτερη δυνατή χρήση των πόρων, να αποφευχθούν οι στατιστικές αποκλίσεις και να μπορεί να απαντηθεί η αναζητούμενη βιολογική ερώτηση.

Για τον κύριο σχεδιασμό του πειράματος εφαρμόζονται απλές αρχές στατιστικής πειραματικής ανάλυσης. Στην απλή περίπτωση όπου ο βασικός στόχος είναι η σύγκριση δύο πρωτεϊνικών δειγμάτων, Α και Β, είναι συνήθως πιο αποτελεσματική η άμεση σύγκριση των Α και Β μέσω της διασταύρωσής τους στις ίδιες συστοιχίες, παρά η έμμεση σύγκρισή τους μέσω ενός δείγματος αναφοράς. Αντιθέτως, σε ένα πείραμα όπου στόχος είναι η σύγκριση πολλών μεταλλαγμένων τύπων πρωτεϊνών με ένα φυσικό τύπο, τότε είναι προφανής η επιλογή του φυσικού τύπου πρωτεΐνης ως το δείγμα αναφοράς. Μερικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο κατά τον σχεδιασμό του πειράματος είναι το σχετικό κόστος και η διαθεσιμότητα του δείγματος αναφοράς καθώς και το κόστος των ίδιων των συστοιχιών. Στις άμεσες συγκρίσεις είναι απαραίτητη η εναλλαγή χρωμάτων που χρησιμοποιείται στους ιχνηθέτες - προσδέτες ή στα πρωτεϊνικά μόρια δειγμάτων - στόχων (dye swap pairs), καθώς πολλά μόρια πρωτεΐνης και πολλά μόρια προσδέτη εμφανίζουν «προτίμηση» σε ένα από τα φθοριούχα χρώματα. Με την εναλλαγή αυτή μειώνεται στατιστικά αυτή η «προτίμηση».

Η επιλογή του κατάλληλου σχεδιασμού του πειράματος εξαρτάται όχι μόνο από τον αριθμό των προς σύγκριση δειγμάτων, αλλά και από τον σκοπό του πειράματος. Για παράδειγμα, αν ο κύριος στόχος του πειράματος είναι η εύρεση των διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών μεταξύ κανονικών ιστών και ιστών με όγκο, τότε η καλύτερη προσέγγιση είναι η άμεση σύγκριση των ιστών αυτών στις ίδιες συστοιχίες. Αν όμως ο στόχος της ανάλυσης είναι η κατηγοριοποίηση ή ομαδοποίηση διαφόρων τύπων όγκων, τότε η χρήση ενός δείγματος αναφοράς πρωτεϊνών - στόχων ή μορίων ιχνηθετών – προσδετών θεωρείται καλύτερη.

Η ανάλυση εικόνας (Image processing) είναι η διαδικασία που ακολουθεί. Τα πρώτα ακατέργαστα δεδομένα ενός πειράματος μικροσυστοιχιών είναι οι εικόνες που προκύπτουν από την σάρωση των συστοιχιών. Το πρώτο βήμα της ανάλυσης είναι η εξαγωγή αριθμητικών τιμών που αντιστοιχούν στην ένταση του χρώματος που οφείλεται στο υλικό της συστοιχίας (background intensity) και στην ένταση του χρώματος που οφείλεται στην διασταύρωση των πρωτεϊνικών μορίων με τα αντίστοιχα μόρια - προσδέτη (foreground

intensity). Οι τιμές αυτές υπολογίζονται και για τα δύο κανάλια (κόκκινο και πράσινο) και για κάθε στίγμα (spot). Οι τιμές της έντασης του χρώματος που οφείλονται στο υλικό, χρησιμοποιούνται για να διορθώσουν την ένταση του χρώματος, που οφείλεται στην διασταύρωση των πρωτεϊνικών μορίων με τα αντίστοιχα μόρια - προσδέτη που μπορεί να παρουσιάζει τοπικές αποκλίσεις στην επιφάνεια της συστοιχίας, σε μια επεξεργασία γνωστή ως background correction. Για την επεξεργασία αυτή πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία, όπως αναλύονται από τους Yang και συν. Οι τιμές που προκύπτουν αποτελούν τα κύρια δεδομένα για την περαιτέρω ανάλυση. Ένας δευτερεύον στόχος του βήματος της ανάλυσης εικόνας είναι η συλλογή μετρικών ποιότητας για κάθε στίγμα. Οι μετρικές αυτές χρησιμοποιούνται για να εντοπιστούν τα ανακριβή στίγματα ή οι προβληματικές συστοιχίες και να εκτιμηθεί η ικανότητα αναπαραγωγής του κάθε στίγματος[1,2].

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την διαδικασία της γραφικής αναπαράστασης των δεδομένων. Είναι σημαντική η χρήση διάφορων εξερευνητικών γραφικών παραστάσεων για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων ενός πειράματος μικροσυστοιχιών. Οι γραφικές παραστάσεις αποδεικνύουν την επιτυχία του πειράματος, βοηθούν στην επιλογή των περαιτέρω εργαλείων ανάλυσης και μπορούν να φανερώσουν συγκεκριμένα προβλήματα στα δεδομένα.

Μια πρώτη διαγνωστική γραφική παράσταση είναι η γνωστή εικόνα (image) στην οποία οι σαρωμένες εικόνες των δύο καναλιών (Cy3 και Cy5) παρουσιάζονται ως κόκκινα και πράσινα σημεία, ενώ το κίτρινο αναπαριστά την ίση ποσότητα των εντάσεων. Η επικάλυψη των δύο καναλιών προσφέρει μια απλή οπτικοποίηση του πειράματος που αποκαλύπτει πληροφορίες για την ισορροπία ανάμεσα στα δύο χρώματα, την ομοιομορφία της διασταύρωσης, την ομοιομορφία ανάμεσα στα στίγματα, και τις πιθανές αλλοιώσεις που οφείλονται σε σκόνη ή σε αμυχές. Αυτή η γραφική παράσταση δίνει και μια πρώτη εικόνα για τον αριθμό των πρωτεϊνικών μορίων που έχουν διαφορετική ποσότητα έκφρασης ανάμεσα στα δύο δείγματα[1,3].

Μια άλλη διαγνωστική γραφική παράσταση που χρησιμοποιείται απεικονίζει τις αριθμητικές τιμές των εντάσεων των χρωμάτων των δύο καναλιών. Οι τιμές αυτές έχουν μετασχηματιστεί λογαριθμικά έτσι ώστε να έχουν μεγαλύτερη εμβέλεια στη γραφική παράσταση και να είναι ευκολότερη η ερμηνεία τους. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι λογάριθμοι μετασχηματίζουν το κλάσμα των εντάσεων των δύο καναλιών R / G σε διαφορά M = logR – logG, όπου R = Red (κόκκινο) και G = Green (πράσινο). Αρνητικές τιμές εντάσεων δεν περιλαμβάνονται στην ανάλυση.

Η γραφική παράσταση που χρησιμοποιείται κυρίως στην βιβλιογραφία είναι το διάγραμμα διασποράς (scatter plot) μεταξύ των εντάσεων των καναλιών $\log_2 R$ και $\log_2 G$. Παρόλο που μια τέτοια γραφική παράσταση θεωρείται απλή, η πολύ μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των εντάσεων των δύο καναλιών κυριαρχεί στην γραφική παράσταση με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ερμηνεία της. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις αποκλίσεις των σημείων από την διαγώνιο καθώς τα σημεία αυτά αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες με αρκετή διαφορετικότητα στην ποσότητα έκφρασης. Επομένως θεωρείται αποτελεσματικότερη η περιστροφή της γραφικής αυτής παράστασης κατά 45 μοίρες και αλλαγή των αξόνων έτσι ώστε στον κάθετο άξονα να υπάρχει η τιμή $M = \log_2 R / G$, ή αλλιώς $M = \log_2 R - \log_2 G$, ενώ στον οριζόντιο άξονα η τιμή $A = ½ (\log_2 R + \log_2 G)$. Αυτή η γραφική παράσταση (MA – plot) θεωρείται πολύ δυνατό εργαλείο κατά την ανάλυση δεδομένων που προκύπτουν από πειράματα μικροσυστοιχιών. Χρησιμοποιείται για τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες όπου οι εντάσεις των δύο καναλιών αντικαθίστανται με τις αντίστοιχες τιμές των δύο συστοιχιών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν οι ερευνητές να έχουν μια πρώτη εικόνα για την ύπαρξη πρωτεϊνών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις[2].

Το επόμενο βήμα είναι η διαδικασία της κανονικοποίησης (Normalisation). Ο σκοπός του βήματος αυτού είναι η ρύθμιση οποιασδήποτε απόκλισης που παρουσιάζουν τα δεδομένα που οφείλεται στην τεχνολογία που χρησιμοποιείται και όχι σε βιολογικές διαφορές των δειγμάτων πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζουν θόρυβο που οφείλεται είτε σε διαφορές των χρωμάτων, είτε στις διαφορετικές ρυθμίσεις του σαρωτή, ή σε διαφορές μεταξύ

διαφορετικών συστοιχιών. Είναι απαραίτητη λοιπόν η απομάκρυνση του συστηματικού σφάλματος από τα δεδομένα πριν την περαιτέρω ανάλυση. Στην βιβλιογραφία έχουν προταθεί διαφορετικές μέθοδοι κανονικοποίησης είτε στις τιμές που συλλέγονται από μια συστοιχία είτε μεταξύ διαφορετικών συστοιχιών, όπως αναλύονται από τους Smith και συν.[2]

Στη συνέχεια ακολουθεί επιλογή των πρωτεϊνών με διαφορετικό επίπεδο έκφρασης. Ένας από τους κύριους στόχους της ανάλυσης δεδομένων που συλλέγονται από πειράματα μικροσυστοιχιών είναι ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών που στατιστικά αποδεικνύουν ότι έχουν διαφορετική ποσότητα έκφρασης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο διακριτά βήματα. Αρχικά επιλέγεται μια μετρική στατιστικής η οποία υπολογίζεται για κάθε πρωτεΐνη και σύμφωνα με την οποία οι πρωτεΐνες κατατάσσονται ανάλογα με την διαφορετικότητά τους στην ποσότητα έκφρασης. Στην βιβλιογραφία παρουσιάζονται διάφορες μετρικές στατιστικής που έχουν χρησιμοποιηθεί όπως η t-στατιστική, η Bayes ή παραλλαγές τους όπως η B-στατιστική. Το δεύτερο βήμα είναι η επιλογή μιας τιμής κατωφλίου για την μετρική στατιστικής έτσι ώστε οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερη τιμή από αυτή να θεωρούνται ότι έχουν διαφορετική ποσότητα έκφρασης. Αυτό μπορεί να γίνει εμπειρικά παρατηρώντας τις γραφικές παραστάσεις των δεδομένων και κοιτώντας ποια σημεία που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες βρίσκονται απομακρυσμένα από την πλειοψηφία. Υποθέτουμε ότι σε ένα πείραμα μικροσυστοιχιών οι περισσότερες πρωτεΐνες εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Έχουν προταθεί όμως και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στον πολλαπλό έλεγχο (multiple testing)[2].

Η ανωτέρω ανάλυση δεν είναι αρκετή στην περίπτωση που ο στόχος του πειράματος είναι η μελέτη των σχέσεων μεταξύ πρωτεϊνών, ιστών ή θεραπειών ή ο προσδιορισμός πρωτεϊνών ή δειγμάτων που ανήκουν στην ίδια λειτουργική οικογένεια. Στις περιπτώσεις αυτές απαιτείται να γίνει κατηγοριοποίηση και ομαδοποίηση (Classification and Clustering). Για τον σκοπό αυτό εφαρμόζονται μέθοδοι οι οποίες παράγουν πρότυπα γονιδιακής έκφρασης για (i) τον διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών γνωστών τύπων κυττάρων ή καταστάσεων, όπως για παράδειγμα μεταξύ νεοπλασματικών και φυσιολογικών ιστών, και (ii) τον προσδιορισμό τύπων κυττάρων ή καταστάσεων που ήταν άγνωστα προηγουμένως, όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός νέων υποτύπων όγκων που ανήκουν σε μια υπάρχουσα κατηγορία.

Αυτές οι δύο μέθοδοι ονομάστηκαν από τον Golub και συν. ως πρόβλεψη κατηγορίας ή ανακάλυψη κατηγορίας. Βασίζονται σε στατιστικές διαδικασίες πολλών μεταβλητών, οι οποίες ξεκινώντας από ένα σύνολο δεδομένων επιχειρούν να το οργανώσουν σε ομάδες ομοειδών στοιχείων. Οι μεταβλητές στην περίπτωση των δεδομένων μικροσυστοιχιών είναι οι τιμές έκφρασης των πρωτεϊνών σε διαφορετικές συστοιχίες. Στην βιβλιογραφία του τομέα της εκμάθησης μηχανής (machine learning) οι μέθοδοι αυτές είναι γνωστές ως επιβλεπόμενη και μη επιβλεπόμενη μάθηση (supervised and unsupervised learning). Με τον όρο μάθηση εννοούμε την διαδικασία ανάθεσης των μονάδων, στην συγκεκριμένη περίπτωση των πρωτεϊνών ή των δειγμάτων σε κατηγορίες. Στην περίπτωση που οι κατηγορίες είναι εκ των προτέρων γνωστές η διαδικασία ονομάζεται επιβλεπόμενη καθώς «επιβλέπεται» από την γνώση, η οποία χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση της μη επιβλεπόμενης μάθησης οι συστάδες δεν είναι γνωστές, αλλά προκύπτουν δυναμικά. Στην επιστήμη της στατιστικής οι δύο μέθοδοι ονομάζονται κατηγοριοποίηση, ταξινόμηση ή διάκριση (classification or discrimination) και ομαδοποίηση ή ανάλυση συστάδων (clustering) αντίστοιχα[1].

Για την εφαρμογή της κατηγοριοποίησης όπου οι συστάδες είναι ήδη γνωστές έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι όπως είναι οι ταξινομητές κοντινότερου γείτονα, τα δέντρα ταξινόμησης, τα νευρωνικά δίκτυα, οι πιθανοτικοί Bayes ταξινομητές και οι μηχανές υποστήριξης διανύσματος. Η κάθε τεχνική έχει διαφορετική απόδοση και αποτελεσματικότητα που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο αριθμός των πρωτεϊνών. Συνήθως μια διαδικασία ταξινόμησης ξεκινά με δεδομένα για τα οποία είναι γνωστές οι κατηγορίες στις οποίες ανήκουν. Τα δεδομένα αυτά καλούνται σύνολο εκπαίδευσης. Για την εκτίμηση της απόδοσης και ποιότητας ενός ταξινομητή

χρησιμοποιούνται δεδομένα γνωστά ως δεδομένα ελέγχου. Η ταξινόμηση είναι περισσότερο αποτελεσματική στην περίπτωση που έχει προηγηθεί κάποια προεπεξεργασία στα δεδομένα, όπως το φιλτράρισμα των πρωτεϊνών έτσι ώστε να μην συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση πρωτεΐνες οι οποίες παρουσιάζουν μικρή απόκλιση στις τιμές έκφρασης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων[2,3].

Για την ανάλυση των δεδομένων μικροσυστοιχιών η μέθοδος της ανάλυσης συστάδων χρησιμοποιείται συχνότερα σε σχέση με την ταξινόμηση. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (i) τεχνικές ιεραρχικής ομαδοποίησης (hierarchical clustering), οι οποίες παρέχουν μια ιεραρχία από παραγόμενες συστάδες συνήθως σε μορφή δενδροδιαγράμματος (Σε ένα παράδειγμα δεδομένων πρωτεϊνικής έκφρασης εφαρμόζοντας ιεραρχική ομαδοποίηση ως μέθοδο μη επιβλεπόμενης μάθησης το δενδροδιάγραμμα παρουσιάζει τις συστάδες των δειγμάτων που έχουν σχηματισθεί. Κάθε στήλη της μικροσυστοιχίας αντιστοιχεί π.χ. σε ένα δείγμα όγκου, ενώ κάθε γραμμή της μικροσυστοιχίας σε μια πρωτεΐνη. Ένα σημείο σε μια συγκεκριμένη γραμμή και στήλη παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα όταν η αντίστοιχη πρωτεΐνη υπερεκφράζεται στο αντίστοιχο δείγμα και με πράσινο όταν έχει χαμηλό επίπεδο έκφρασης), και (ii) τεχνικές διαμέρισης (partitioning clustering), οι οποίες παρέχουν ένα σύνολο από διαμερίσεις – ομάδες του αρχικού συνόλου δεδομένων, όπως για παράδειγμα ο αλγόριθμος k-means[2].

Η χρήση μετρικών ομοιότητας είναι απαραίτητη για τη μελέτη της ομοιότητας ή της διαφοράς του συνόλου δεδομένων. Τα δεδομένα όπως προαναφέραμε είναι τιμές έκφρασης που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες. Κάθε μία τέτοια τιμή αντιστοιχεί σε ένα σημείο ενός πολυδιάστατου χώρου. Η ομοιότητα μεταξύ τους εκτιμάται συνήθως από την τιμή μιας μετρικής απόστασης μεταξύ τους, όπως για παράδειγμα η Ευκλείδια απόσταση.

Ανάλογα με τον στόχο του πειράματος χρησιμοποιείται η αντίστοιχη μέθοδος πρόβλεψης ή ανακάλυψης κατηγορίας. Στην βιβλιογραφία έχουν προταθεί όμως και μέθοδοι οι οποίες αποτελούν ένα συνδυασμό των μεθόδων αυτών. Αρχικά μπορεί να εφαρμοστεί μια τεχνική μη επιβλεπόμενης μάθησης και αφού προκύψουν οι νέες κατηγορίες δυναμικά, να χρησιμοποιηθούν για την ανάθεση νέων δεδομένων σε αυτές πραγματοποιώντας επιβλεπόμενη μάθηση. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική και μπορεί να οδηγήσει σε νέα κλινικά ευρήματα[1].

Συμπεραίνουμε από την ανωτέρω ανάλυση ότι είναι απαραίτητη η προσεχτική στατιστική ανάλυση, σε κάθε βήμα της ανάλυσης δεδομένων έτσι ώστε να γίνεται η καλύτερη δυνατή εκμετάλλευση των υπαρχόντων δεδομένων, να αποφεύγονται τα συστηματικά σφάλματα που οφείλονται σε διάφορες αιτίες και να εξάγονται αξιόπιστα αποτελέσματα.

Όλα τα στάδια (συλλογή υλικού, κατασκευή μικροσυστοιχίας, βιοπληροφορική ανάλυση και βιολογική επιβεβαίωση) δεν μπορούν να εκτελεσθούν από επιστήμονες μίας μόνο ειδικότητας. Τα πειράματα με μικροσυστοιχίες προσφέρουν τεράστιες ποσότητες στοιχείων. Για να ανακαλύψουμε όλη την πληροφορία που μας παρέχουν δεν αρκούν οι απλές μέθοδοι ανάλυσης, αλλά απαιτείται η ανάλυση με προηγμένες τεχνικές της Βιοπληροφορικής. Δεν υπάρχει ένας μοναδικός σωστός τρόπος ανάλυσης, αλλά ο τρόπος που θα επιλέξουμε εξαρτάται κάθε φορά από το ερώτημα στο οποίο θέλουμε να απαντήσουμε με την ανάλυση. Ακόμη και για το ίδιο ακριβώς ερώτημα όμως υπάρχουν πολλοί τρόποι ανάλυσης. Στην περίπτωση αυτή διεξάγουμε την ανάλυση με όλους τους διαφορετικούς δυνατούς τρόπους και συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των διαφορετικών αναλύσεων.

Παρά την τεράστια πρόοδο στην κατανόηση της μοριακής βάσης των νοσημάτων, όπως ο καρκίνος, παραμένουν μεγάλα κενά στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για την πρώϊμη διάγνωση και τη θεραπεία. Το ενδιαφέρον σήμερα στην πρωτεϊνωμική οφείλεται εν μέρει στην προοπτική ότι η προσέγγιση της πρωτεϊνωμικής θα υπερπηδήσει ορισμένους από τους περιορισμούς άλλων προσεγγίσεων. Περιοχές έρευνας με ιδιαίτερες προοπτικές περιλαμβάνουν :

α) εκτίμηση τροποποιημένης έκφρασης πρωτεϊνών, όχι μόνο σε επίπεδο ολόκληρου κυττάρου ή ιστού, αλλά και σε υποκυτταρικές δομές, σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα, και σε

βιολογικά υγρά, β) ανάπτυξη νέων βιοδεικτών για διάγνωση και πρώϊμη ανίχνευση νόσου, και γ) ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων και δυνατότητα επιτάχυνσης της ανάπτυξης φαρμάκων μέσω πιο αποτελεσματικών στρατηγικών[3].

Η δυναμική φύση του πρωτεϊνώματος ενός κυττάρου ή ιστού επιτρέπει τη μελέτη της έκφρασης γονιδίου σε νόσο άμεσα σε επίπεδο πρωτεϊνωμικής. Παραμένουν φυσικά τα τεχνολογικά προβλήματα. Η εφαρμογή της τεχνολογίας των πρωτεϊνωμικών μικροσυστοιχιών στη μελέτη νοσημάτων έχει αρχίσει να δίνει χρήσιμες πληροφορίες. Χρησιμοποιώντας μικροανατομές με laser (laser capture microdissection) με προσέγγιση μέσω μικροσυστοιχιών αντισωμάτων για πρωτεϊνωμική ανάλυση υψηλής απόδοσης μελετήθηκε η έκφραση πρωτεϊνών του καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας από τους Knezevic και συν. Βρέθηκε ότι ποσοτικές και δυνητικά ποιοτικές μεταβολές πολλαπλών πρωτεϊνών των επιθηλιακών κυττάρων συσχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Επειδή η διαφορική έκφραση πρωτεϊνών παρατηρήθηκε και στα γειτονικά κύτταρα του στρώματος και επειδή οι περισσότερες πρωτεΐνες, που ταυτοποιήθηκαν, ανήκαν στις οδούς μετάδοσης μηνυμάτων, οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι εκτεταμένη μοριακή επικοινωνία μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και κυττάρων του στρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας. Έχει αναπτυχθεί επίσης πρωτεϊνική μικροσυστοιχία αντίστροφης φάσης, που ακινητοποιεί το πλήρες ρεπερτόριο των πρωτεϊνών ενός ιστού.

Με υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και γραμμικότητα μελετήθηκε έτσι ποσοτικά η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών μετάδοσης μηνυμάτων. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση φυσιολογικού επιθηλιακού ιστού προστάτου με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία προστάτου και με διηθητικό καρκίνο προστάτου. Στη μεταβατική φάση από ιστολογικά φυσιολογικό επιθήλιο σε ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία παρατηρήθηκε από τους Paweletz στατιστικά σημαντική αύξηση φωσφορυλιωμένης κινάσης σερίνης/θρεονίνης Akt καθώς και καταστολή των οδών απόπτωσης, που προηγείται της εξέλιξης σε διηθητικό καρκίνωμα. Πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες εξ άλλου έχουν χρησιμοποιηθεί στη μελέτη αυτοανόσων νοσημάτων. Γίνεται προσπάθεια να δημιουργούνται μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών, που έχουν απομονωθεί άμεσα από κύτταρα και ιστούς μετά από τεχνικές κατάτμησης πρωτεϊνών προκειμένου να μελετηθούν οι πρωτεΐνες στην τροποποιημένη μορφή τους. Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες διαφόρων τύπων αναμένεται να διατεθούν στο εμπόριο και πιθανά να ανταγωνισθούν τις μικροσυστοιχίες DNA για εφαρμογή στο κλινικό εργαστήριο[1,2].

Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες έχουν επίσης αρχίσει να χρησιμοποιούνται στη λειτουργική πρωτεϊνωμική για τη μελέτη των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης – πρωτεΐνης σε διάφορα νοσήματα. Μέχρι σήμερα οι τεχνικές αυτές έχουν περιορισμένη χρήση. Ως παράδειγμα αναφέρεται η μελέτη της πρωτεϊνικής κινάσης C του μυοκαρδίου (PKC), που βρέθηκε ότι συσχετίζεται με τουλάχιστον 36 άλλες πρωτεΐνες με ποικιλία λειτουργιών. Η προστασία της καρδιάς μέσω ενεργοποίησης της PKC βρέθηκε ότι συνδέεται με δυναμική τροποποίηση και στρατολόγηση των PKC – σχετιζόμενων πρωτεϊνών. Παρομοίως υπάρχει περιορισμένη εφαρμογή στη διερεύνηση νοσημάτων της πρωτεϊνωμικής, που βασίζεται στη δραστικότητα. Η δυνατότητα συνεισφοράς της τεχνικής αυτής στον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής λειτουργίας αντικατοπτρίζεται από τη στρατηγική χημικής πρωτεϊνωμικής ώστε να συγκριθούν ποσοτικά οι ενζυμικές δραστικότητες σε φυσιολογικό και νοσούντα ιστό. Συνολική ανάλυση της δραστικότητας, υποκυττάριας κατανομής και κατάστασης γλυκοζυλίωσης της υπεροικογένειας των υδρολασών της σερίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και μελανώματος κατέληξε στην ταυτοποίηση ομάδας πρωτεασών, λιπασών και εστερασών που διακρίνουν τις κυτταρικές σειρές με βάση τον ιστό προέλευσης[3].

Τέλος αναπτύσσονται τεχνικές, που επιτρέπουν άμεσο χειρισμό των πρωτεϊνών πέρα από τη μείωση ή αύξηση του συνόλου των πρωτεϊνών. Πλεονέκτημα των τεχνικών αυτών είναι η ικανότητα της απενεργοποίησης συγκεκριμένου πρωτεϊνικού τόπου με εξαρτώμενο από το χρόνο και περιορισμένο σε συγκεκριμένη εντόπιση τρόπο, όπως με την απενεργοποίηση μέσω laser με τη βοήθεια χρωμοφόρου (chromophore – assisted laser inactivation –

CALI). Έχει παρουσιασθεί απενεργοποίηση των πρωτεϊνικών στόχων, που συμμετέχουν σε ποικίλες οδούς μετάδοσης μηνυμάτων στον καρκίνο με χρήση CALI[3].

Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται ότι αποκτά η εφαρμογή των πρωτεϊνωμικών μικροσυστοιχιών στην διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Υπάρχει σήμερα σημαντικό ενδιαφέρον για την πρωτεϊνωμική από μέρους της φαρμακευτικής βιομηχανίας, όπως αποδεικνύεται από την εφαρμογή των πρωτεϊνωμικών προγραμμάτων από τις περισσότερες μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες. Υπό τον όρο ότι διατίθενται κατάλληλες τεχνολογικές πλατφόρμες, η χρήση της πρωτεϊνωμικής ίσως να εισβάλει σε πολυάριθμους τομείς ανάπτυξης φαρμάκων, ταυτοποιώντας νέους στόχους και διευκολύνοντας την εκτίμηση της δράσης των φαρμάκων και της τοξικότητας τόσο σε προκλινική όσο και σε κλινική φάση[3].

Σε μελέτη ανίχνευσης πρωτεασών ιδιαίτερα κατάλληλων για στόχευση φαρμάκων, τροποποιήθηκε αυτοματοποιημένη διαδικασία πλακών μικροτιτλοδότησης για να επιτρέψει ανίχνευση των τεσσάρων κυρίων τάξεων πρωτεασών σε δείγματα ιστών (μεταλοπρωτεασών, καθεψινών, θρυπτάσης, χυμάσης). Μελετήθηκαν οι μεταβολές της έκφρασης των πρωτεασών σε βιοψίες καρκίνου του παχέος εντέρου, που αφορούν τον πρωτογενή όγκο, το γειτονικό φυσιολογικό ιστό και τις μεταστάσεις στο ήπαρ. Παρόμοιες μελέτες παρέχουν τη βάση για την επιλογή στόχων στην ανάπτυξη αναστολέων ειδικών πρωτεασών. Η χρήση πρωτεϊνικών βιο-μικροσυστοιχιών θα διευκόλυνε την προσέγγιση αυτή[1].

Οι πρωτεϊνωμικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν παραπάνω αφορούν κυρίως ενζυμικούς προσδιορισμούς οι οποίοι λαμβάνουν χώρα είτε σε καθαρισμένα και ομοιογενή διαλύματα πρωτεϊνών, είτε σε διαλύματα πρωτογενών προϊόντων κυτταρολύσεως. Δηλαδή, οι μελέτες πρωτεϊνωμικής, έως και μέχρι πρόσφατα, πραγματοποιούνταν μόνο μέσα σε διαλύματα και όχι στις φυσικές ενδοκυττάριες συνθήκες όπου φυσιολογικά «διαβιούν και συνομιλούν μεταξύ τους» («pass their lives and crosstalk») οι πρωτεΐνες. Πολύ βαθύτερο νόημα έχει η πρωτεϊνωμική και πολύ περισσότερες πληροφορίες παρέχει όταν χρησιμοποιούνται τεχνικές προσδιορισμού και μελέτης της ενζυμικής πρωτεΐνης-στόχου κάτω από τις δικές της ΄΄φυσικές΄΄ (native) ενδοκυττάριες συνθήκες. Συνεπώς η ιδεατή πρωτεϊνωμική είναι αυτή που διαδραματίζεται εντός του ενδοκυττάριου περιβάλλοντος. Με την ευρύτερη έννοια, αναλυτικές τεχνικές οι οποίες επιτρέπουν την οπτική παρακολούθηση και την ποσοτικοποίηση των διαφόρων μορφών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των ενζύμων, μέσα σε ζώντα κύτταρα, είναι πολύ χρήσιμες για την μελέτη της δομής και των λειτουργιών των πρωτεϊνών εντός του βιολογικού τους περιβάλλοντος. Πρόκειται για τις βιοαπεικονιστικές αναλυτικές τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των πρωτεϊνών μέσα σε ζώντα κύτταρα.

Η ανακάλυψη των φθοριζόντων πρωτεϊνών και των αντιδραστηρίων φωτοσήμανσης βοήθησε τους βιολόγους κυττάρου και τους χημικούς πρωτεϊνών να αποκτήσουν καλύτερη εικόνα και βαθύτερη γνώση των ενδοκυττάριων πρωτεϊνών, των μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών σχέσεων (crosstalking), καθώς και των υποκυττάριων γεγονότων. Οι πρόοδοι στην μικροσκοπία φθορισμού και στην ομοεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser, οδήγησαν στην τρισδιάστατη (3D) απεικόνιση, σε αληθινό χρόνο και σε ζώντα κύτταρα, των κυτταρικών συμβαμάτων και της δυναμικής των κυτταρικών πρωτεϊνών. Εν τούτοις, παραμένουν ακόμη τα ενδογενή μειονεκτήματα των GFP-πρωτεϊνών στα οποία περιλαμβάνονται το μεγάλο μέγεθος των πρωτεϊνών αυτών, ο υποχρεωτικός όλιγο- ή πόλυ-μερισμός τους, καθώς και η, μερικές φορές, βραδεία ή/και ατελής διαδικασία ωρίμανσής τους. Η ιδανική στρατηγική πρωτεϊνικής σήμανσης θα πρέπει να ικανοποιεί τα παρακάτω κριτήρια: α) να χαρακτηρίζεται από υψηλό λόγο σήματος / θορύβου, δηλαδή θα πρέπει να έχει υψηλού βαθμού εξειδίκευση για την πρωτεΐνη-στόχο που πρόκειται να σημανθεί, β) η σημασμένη πρωτεΐνη θα πρέπει να διατηρεί την δομική και λειτουργική ακεραιότητά της, γ) δεν θα πρέπει να παρεμβαίνει και να διαταράσσει τις βιοχημικές λειτουργίες ή την υποκυττάρια εντόπιση της σημασμένης πρωτεΐνης, και δ) θα πρέπει να επιφέρει την ελάχιστη δυνατή διαταραχή στις λοιπές φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες. Πολλά από τα κριτήρια αυτά μπορούν να ικανοποιηθούν με την εφαρμογή στρατηγικών

σήμανσης που χρησιμοποιούν μικρού μεγέθους μόρια φωτοσήμανσης.

Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι στην σύνθεση μικρού μοριακού βάρους φθοριζόντων χρωστικών και αντιδραστηρίων φωτοσήμανσης. Επιπλέον έχουν σημειωθεί και άλματα στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών βιοσύζευξης οι οποίες επιτρέπουν την, αποδοτική και με υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, ενσωμάτωση των μοριακών ιχνηθετών φωτοσήμανσης σε πρωτεΐνες εκφραζόμενες σε ζώντα κύτταρα. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των καινοτομιών είναι η ευρεία εφαρμογή στρατηγικών σήμανσης, με την χρήση μικρών μορίων ιχνηθετών ως αντιδραστήρια φωτοσήμανσης, σε πειράματα βιοαπεικονιστικής. Αφού λοιπόν, οι νέοι ιχνηθέτες φωτοσήμανσης (photo-labeling probes), που χρησιμοποιούνται στις στρατηγικές σήμανσης, είναι μικρά μόρια, είναι πολύ πιθανό να μην διαταράσσουν την λειτουργία των σημασμένων πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα να ικανοποιούν τα προαναφερόμενα κριτήρια ιδανικών στρατηγικών φωτοσήμανσης. Συνεπώς οι βασιζόμενες σε μικρά μόρια στρατηγικές φωτοσήμανσης υπερτερούν συγκριτικά με τις FP-βασιζόμενες στρατηγικές. Στις ακόλουθες παραγράφους θα αναφέρουμε περιληπτικά μερικές από τις νεώτερες τεχνικές σήμανσης πρωτεϊνών με την χρήση μικρών μοριακών ιχνηθετών. Πρόκειται για τις, πολλά υποσχόμενες στο μέλλον, τεχνικές οι οποίες αναμένεται να επιτρέψουν την, υψηλής παραγωγής και απόδοσης (high throughput), πρωτεϊνική ανάλυση σε ζώντα κύτταρα[1,2].

Λίγες ερευνητικές ομάδες, μεταξύ των οποίων και οι Panicker και συν., έχουν αναπτύξει νέες στρατηγικές για την εξειδικευμένη σήμανση πρωτεϊνών, εντός ζώντων κυττάρων, με μικρούς μοριακούς ιχνηθέτες. Οι διάφορες αναφερόμενες στρατηγικές είναι βασισμένες επάνω σε μοναδικές χημικές αντιδράσεις και βιολογικές σχέσεις. Οι διαφορετικοί μικροί μοριακοί ιχνηθέτες φωτοσήμανσης που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια όπως, να έχουν την μέγιστη κυτταρική διαπερατότητα, την ελάχιστη δυνατή κυτταροτοξικότητα, την υψηλότερη εξειδίκευση αντίδρασης καθώς και πολύ καλές ιδιότητες φθορισμού. Η πρώτη επαναστατική μέθοδος για την φωτοσήμανση, εντός ζωντανών κυττάρων, ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε ειδική θέση αυτής, με την χρήση μικρών οργανικών μορίων σήμανσης, παρουσιάστηκε από τους Tsien και συν. Η μέθοδος των Tsien και συν. εκμεταλλεύεται την γνωστή ειδικότητα που εμφανίζουν οι οργανικές ενώσεις του αρσενικού για τα ζεύγη θειόλης.

Οι ερευνητές συνέθεσαν αρχικά το DNA που κωδικοποιεί ένα συνθετικό ολιγοπεπτίδιο τύπου CCXXCC (όπου C είναι κυστεΐνη και X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ πλην της κυστεΐνης). Στη συνέχεια με τεχνικές γενετικής μηχανικής προκάλεσαν σύντηξη του ολιγοπεπτιδικού DNA με το DNA του γονιδίου της πρωτεΐνης-στόχου την οποία θέλουμε να μελετήσουμε. Έτσι δημιουργήθηκε ένα υβριδικό μόριο DNA που προήλθε από την ομοιοπολική ένωση του ολιγοπεπτιδικού DNA με το DNA της πρωτεΐνης-στόχου. Η μεταγραφή, εντός του ζωντανού κυττάρου, του υβριδικού μορίου DNA οδήγησε στην σύνθεση του αντίστοιχου υβριδικού μορίου mRNA. Η μετάφραση του υβριδικού mRNA, εντός του ζωντανού κυττάρου, οδήγησε στην σύνθεση ενός υβριδικού μορίου πρωτεΐνης το οποίο προήλθε από την ομοιοπολική ένωση της πρωτεΐνης-στόχου με το CCXXCC ολιγοπεπτίδιο. Το επόμενο βήμα ήταν να γίνει σήμανση του υβριδικού μορίου πρωτεΐνης, προκειμένου να καταστεί δυνατή η παρακολούθηση της πρωτεΐνης-στόχου εντός του ζωντανού κυττάρου. Ένα παράγωγο φλουορεσκεΐνης, γνωστό ως F1AsH, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, χρησιμοποιήθηκε από τους ερευνητές για την αναγνώριση και σήμανση της CCXXCC ολιγοπεπτιδικής ακολουθίας. Το αντιδραστήριο F1AsH όταν είναι ελεύθερο, δηλαδή όταν δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με άλλο μόριο, δεν φθορίζει. Ωστόσο όμως το F1AsH αποκτά έντονο και λαμπρό φθορισμό όταν συνδέεται ομοιοπολικά με την CCXXCC ολιγοπεπτιδική ακολουθία που έχει υβριδοποιηθεί με την πρωτεΐνη στόχο. Το F1AsH είναι οργανικό παράγωγο αρσενικού το οποίο συνδέεται ομοιοπολικά με αλληλουχία τετρακυστεΐνης και προκαλεί ειδικής-θέσεως φωτοσήμανση (site-specific labeling). Η πρωτεΐνη-στόχος, η οποία επελέγει από τους Tsien και συν. ως πρωτεΐνη-πρότυπο, ήταν η ECFP (enhanced cyan fluorescent protein).

Η γενετική σύντηξη της ECFP με την CCXXCC ολιγοπεπτιδική αλληλουχία πραγματοποιήθηκε μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης του άμινο-τελικού άκρου της CCXXCC αλληλουχίας με το καρβόξυ-τελικό άκρο της ECFP. Οι Tsien και συν. επέτυχαν αρχικά την παροδική έκφραση της υβριδικής πρωτεΐνης ECFP-CCXXCC σε καλλιέργεια κυττάρων HeLa. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση της HeLa κυτταροκαλλιέργειας με διάλυμα F1AsH. Η επώαση αυτή είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία, εντός των ζωντανών κυττάρων, ενδοκυττάριων συμπλεγμάτων υβριδικής πρωτεΐνης-F1AsH, δηλαδή συμλεγμάτων του τύπου ECFP-CCXXCC-F1AsH, όπου το As του F1AsH συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό με την αλληλουχία τετρακυστεΐνης επί του CCXXCC. Οι ερευνητές πιστοποίησαν την επιτυχία της σήμανσης, μετρώντας την μεταφορά φθορίζουσας ενέργειας συντονισμού από την ECFP-CCXXCC στο F1AsH, με την τεχνική FRET (fluorescence resonance energy transfer)[3].

Η ηλικία και ο χρόνος ζωής των πρωτεϊνικών μορίων θα μπορούσε να μελετηθεί με εξακολουθητική σήμανση χρησιμοποιώντας διαφορετικά βίο-αρσενικά αντιδραστήρια φωτοσήμανσης, τα οποία να εκπέμπουν σε διαφορετικό χρώμα. Οι Gaietta και συν., εφαρμόζοντας την στρατηγική αυτή, επέτυχαν να παρακολουθήσουν την διαμετάθεση της connexin μέσα και έξω από τις χασματοσυνδέσεις[1].

Μία άλλη, διαφορετική μέθοδος, σήμανσης πρωτεϊνικών μορίων, παρουσιάστηκε πρόσφατα από τους Kepplar και συν. Στην μέθοδο αυτή, οι ερευνητές επέτυχαν αρχικά την σύντηξη και υβριδοποίηση της πρωτεΐνης-στόχου με το ένζυμο επιδιόρθωσης του ανθρώπινου DNA O^6-αλκυλογουανίνη-DNA-αλκυλοτρανσφεράση, ή hAGT. Έτσι δημιουργήθηκε το υβρίδιο πρωτεΐνης-hAGT. Ακολούθησε η ειδική ομοιοπολική σήμανση του υβριδίου πρωτεΐνης-hAGT με ένα μικρό αντιδραστήριο φωτοσήμανσης. Αυτή η ειδική ομοιοπολική σήμανση επετεύχθει μέσω μιάς ενζυμικής αντίδρασης υψηλής εξειδίκευσης ανάμεσα στην hAGT και στο μικρό μόριο φωτοσήμανσης. Ο φυσικός ενζυμικός ρόλος της hAGT είναι να μεταφέρει μη-αντιστρεπτά την αλκυλομάδα από την O^6-αλκυλογουανίνη-DNA σε ένα από τα δραστικά κατάλοιπα κυστεΐνης που υπάρχουν στο ενεργό καταλυτικό κέντρο της hAGT. Με τον τρόπο αυτό η hAGT επιτυγχάνει την επιδιόρθωση των αλκυλιωμένων βάσεων γουανίνης στο ανθρώπινο DNA. Οι Kepplar και συν. σχεδίασαν, συνέθεσαν και χρησιμοποίησαν ως πρόδρομο μόριο σηματοδότησης O^6-αλκυλογουανίνη στην οποία η O^6 αλκυλομάδα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με χημικό μόριο φωτοσήμανσης (BG παράγωγο). Με την έξυπνη αυτή επινόηση οι ερευνητές εκμεταλλεύτηκαν την ενζυμική ειδικότητα της hAGT προσφέροντας στο ένζυμο φωτοσημασμένη O^6-αλκυλογουανίνη ως υπόστρωμα. Η ενζυμική αντίδραση οδήγησε σε ομοιοπολική σύνδεση της θειόλης του καταλοίπου κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της hAGT με την φωτοσημασμένη αλκυλομάδα και σε απελευθέρωση της γουανίνης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η φωτοσήμανση του υβριδίου πρωτεΐνης-hAGT. Η φωτοσήμανση επιτρέπει την επακόλουθη παρακολούθηση της πρωτεΐνης-στόχου σε ζώντα κύτταρα θηλαστικών[1].

Οι Panicker και συν. ανέπτυξαν μία άλλη στρατηγική για την, ειδικής θέσεως (site-specific), ομοιοπολική σήμανση πρωτεϊνών in vivo. Στην στρατηγική αυτή η πρωτεΐνη-στόχος, που πρόκειται να σηματοδοτηθεί, υποβάλλεται αρχικά σε μέτα-μεταφραστικό μάτισμα (post-translational splicing). Οι ερευνητές επεδίωξαν η πρωτεΐνη-στόχος να φέρει κυστεΐνη ως άμινο-τελικό αμινοξύ. Για να το επιτύχουν αυτό έπρεπε να τροποποιήσουν κατάλληλα την πρωτεΐνη-στόχο. Η τροποποίηση αυτή επετεύχθει με μέτα-μεταφραστικό μάτισμα. Μέσα στο ζωντανό κύτταρο το μέτα-μεταφραστικό μάτισμα διενεργήθηκε με την χρησιμοποίηση μιάς εμβόλιμης πολυπεπτιδικής αλληλουχίας (intein) η οποία αφαιρέθηκε με το μάτισμα. Δηλαδή η τροποποίηση της πρωτεΐνης-στόχου, ώστε να φέρει κυστεΐνη ως άμινο-τελικό αμινοξύ, έγινε μέσω intein διαμεσολαβούμενου πρωτεϊνικού ματίσματος (intein-mediated protein splicing).

Οι Panicker και συν. επέλεξαν, για τον σκοπό αυτό, την 17kDa Ssp DnaB mini intein πολυπεπτιδική αλληλουχία, της οποίας την δραστηριότητα ματίσματος (splicing activity) είχαν τροποποιήσει με τεχνικές γενετικής μηχανικής. Ως αποτέλεσμα αυτών των τεχνικών γενετικής μηχανικής, η δραστηριότητα ματίσματος (splicing activity), της 17kDa Ssp DnaB mini intein, είχε τροποποιηθεί έτσι ώστε

να λειτουργεί αποδοτικά κάτω από φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες και να οδηγεί στην γένεση μίας άμινο-τελικής κυστεΐνης στην πρωτεΐνη-στόχο. Αφού λοιπόν οι ερευνητές κατόρθωσαν να συνδέσουν ομοιοπολικά μέσω πεπτιδικού δεσμού μία άμινο-τελική κυστεΐνη στην υπόλοιπη αλληλουχία της πρωτεΐνης-στόχου, στην συνέχεια προσπάθησαν, σε ένα επόμενο βήμα, να εκμεταλλευτούν αυτή την άμινο-τελική κυστεΐνη, προκειμένου να σημάνουν την πρωτεΐνη-στόχο. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποίησαν ιχνηθέτη σήμανσης σχεδιασμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε το ένα ελεύθερο άκρο του να καταλήγει σε αρωματικό θειοεστέρα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να επιτευχθεί μία, χημειοεπιλεκτικά φυσική, χημική αντίδραση ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ του θειοεστερικού ιχνηθέτη σήμανσης και της θειόλης της άμινο-τελικής κυστεΐνης της πρωτεΐνης στόχου. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η εξειδικευμένη σήμανση της πρωτεΐνης-στόχου κάτω από φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες μέσα στο ζωντανό κύτταρο.

Η στρατηγική αυτή των Panicker και συν. παρέχει έναν απλό και αποδοτικό τρόπο για να επιτευχθεί ειδικής-θέσεως σήμανση (site-specifically labeling) πρωτεϊνών εντός ζωντανών κυττάρων. Η μεγάλη επιτυχία της μεθόδου αυτής έγκειται στο ότι δεν απαιτεί μεγάλη τροποποίηση της αρχικής πρωτεΐνης-στόχου, εκτός από την προσθήκη ολίγων επιπρόσθετων άμινο-τελικών αμινοξέων. Οι ερευνητές τεκμηρίωσαν με επιτυχία την χρησιμότητα αυτής της μεθόδου για την ειδική ομοιοπολική σήμανση πρωτεϊνών τόσο σε βακτήρια, όσο και σε κύτταρα θηλαστικών. Μία πιό πρόσφατη καινοτομία της ίδιας ερευνητικής ομάδας στην πρωτεϊνωμική μεθοδολογία, αφορά στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών-ενζύμων τύπου caspase καθώς και των συσχετιζόμενων με τις caspase πρωτεϊνών, σε ζωντανά κύτταρα τα οποία εισέρχονται στην αποπτωτική διαδικασία. Οι Panicker και συν. ανέπτυξαν μέθοδο in vivo σήμανσης των πρωτεϊνών τύπου caspase που εκφράζονται μέσα σε αποπτωτικά κύτταρα τύπου HeLa. Η σήμανση αυτή επετεύχθει με την χρησιμοποίηση μικρών μοριακών ιχνηθετών οι οποίοι περιείχαν φθόριο-μέθυλο-κετόνη ως σηματοδοτικό μόριο. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των ιχνηθετών αυτών βασίστηκε στην στερεοδιαμόρφωση και στην χημεία των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που απαρτίζουν το ενεργό καταλυτικό κέντρο των ενζύμων τύπου caspase[3].

Οι Vogel και συν. ανέπτυξαν πρόσφατα και εισήγαγαν στο εμπόριο μέθοδο για την, επιλεκτικής θέσεως, αντιστρεπτή σήμανση (site-selective reversible labeling) μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες περιέχουν αλληλουχία πόλυ-ιστιδίνης. Η σήμανση αυτή επετεύχθει επί ζώντων κυττάρων με τη χρήση μικρών μοριακών ιχνηθετών. Ο ιχνηθέτης που σχεδιάστηκε από τους ερευνητές αποτελείται από χρωμοφόρες ομάδες και από ιόν Νικελίου χηλικά συνδεόμενο σε μόριο τριακετοξικού αζώτου. Η μέθοδος σήμανσης βασίστηκε σε μία γνωστή διαντίδραση ανάμεσα στην όλιγο-ιστιδινική αλληλουχία της πρωτεΐνης-στόχου και στο μόριο τριακετοξικού αζώτου του ιχνηθέτη φωτοσήμανσης. Εφαρμόζοντας αυτή την ερευνητική προσέγγιση οι Vogel και συν. κατόρθωσαν να εξερευνήσουν την στερεοχημική διαμόρφωση και καταγράψουν την μεμβρανική κατανομή του ιοντοτρόπου υποδοχέα σεροτονίνης ($5HT_3R$)[1].

Μία άλλη ξεχωριστή μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Tsien και συν. εκμεταλλεύεται την πολύ υψηλή συγγένεια της αβιδίνης για την βιοτίνη. Η βιοτίνη είναι ένας, μικρού μοριακού βάρους, πολύ ισχυρός (10^{-15} M) προσδέτης της αβιδίνης. Στην προσέγγιση των Tsien και συν. η αβιδίνη παίζει τον ρόλο της γενετικά κωδικοποιημένης «ετικέτας», ενώ η παραγωγίσιμη βιοτίνη παίζει τον ρόλο του «σήματος» πού «κολλάει» επάνω στην «ετικέτα». Με την μέθοδο αυτή οι ερευνητές κατόρθωσαν να προσδιορίσουν το ενδοαυλικό pH διαφόρων κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Σε ένα πρώτο βήμα προκάλεσαν σύντηξη και ένωση μίας εκ των πρωτεϊνών του οργανιδίου με αβιδίνη δημιουργώντας έτσι ένα υβρίδιο οργανιδίου-αβιδίνης. Σε ένα δεύτερο βήμα συνέδεσαν την υβριδοποιημένη αβιδίνη με ένα παράγωγο βιοτίνης το οποίο μπορούσε εύκολα να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το παράγωγο αυτό βιοτίνης ήταν σημασμένο με φλουορεσκεΐνη και παρουσίαζε ευαισθησία στις μεταβολές του pH[2].

Οι Verkman και συν. εφάρμοσαν μία άλλη στρατηγική, η οποία βασίζεται στην επιλεκτική σύνδεση την οποία παρουσιάζει ένας χημικός προσδέτης προς έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα,

χρησιμοποιώντας ως προσδέτη μία απτίνη και ως πρωτεϊνικό υποδοχέα ένα αντίσωμα. Η απτίνη που σχεδίασαν οι ερευνητές ήταν ένα μέμβρανο-διαπερατό μόριο φαίνυλο-οξαζολινόνης συζευγμένο με μία, εξαρτώμενη από το pH, φθορίζουσα χρωστική. Η μέμβρανο-διαπερατή απτίνη παγιδεύτηκε από ένα ειδικό προς αυτή αντίσωμα μονής αλύσου. Το αντίσωμα αυτό, οι ερευνητές, είχαν επιτύχει να το εκφράσουν στον αυλό των οργανιδίων των οποίων ήθελαν να μετρήσουν το ενδοαυλικό pH. Δηλαδή, το αντίσωμα αυτό είχε συντηχθεί και υβριδοποιηθεί με πρωτεΐνες που επενδύουν τον αυλό των οργανιδίων. Με την μέθοδο αυτή οι ερευνητές κατόρθωσαν να μετρήσουν τις μεταβολές του pH κατά μήκος της εκκριτικής οδού του κυττάρου[3].

Η μη-ομοιοπολική διασυνδετική αντίδραση πού λαμβάνει χώρα ανάμεσα στην αναγωγάση του διυδροφολικού (DHFR) και στα παράγωγα μικρών μορίων πού περιέχουν μεθοτρεξάτη (Mtx), αποτελεί πολύ καλή εναλλακτική στρατηγική έναντι των διαντιδράσεων αβιδίνης-βιοτίνης και απτίνης-αντισώματος. Οι Cornish και συν. πολύ πρόσφατα εκμεταλλεύτηκαν την σύνδεση μεταξύ DHFR και Mtx εισάγοντας στο εμπόριο μία μέθοδο για την in vivo σήμανση πρωτεϊνών. Οι ερευνητές σχεδίασαν φθορίζοντες μικρούς μοριακούς ιχνηθέτες συζευγμένους με Mtx, έναντι πρωτεϊνών-στόχων τις οποίες είχαν υβριδοποιήσει με DHFR. Με τον τρόπο αυτό επέτυχαν την σήμανση DHFR-υβριδοποιημένων πρωτεϊνών-στόχων του πυρήνα και της κυτταρο-πλασματικής μεμβράνης σε DHFR-ελλειμματικά (DHFR-deficient) CHO κύτταρα θηλαστικών[3].

Όπως, προαναφέραμε, οι inteins είναι πολυπεπτιδικές αλληλουχίες τοποθετημένες στο εσωτερικό της αλληλουχίας του πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου. Οι inteins υφίστανται μέτα-μεταφραστική αφαίρεση από το πρόδρομο πρωτεϊνικό μόριο, μέσω μιάς αυτό-καταλυόμενης αντίδρασης πρωτεϊνικού ματίσματος (self-catalyzed protein-splicing reaction). Το αποτέλεσμα αυτής της αφαίρεσης είναι η ταυτόχρονη συρραφή (ομοιοπολική πεπτιδική σύνδεση) των δύο αμφίπλευρων πεπτιδικών αλληλουχιών που προϋπήρχαν εκατέρωθεν της intein, καθώς και ο επακόλουθος σχηματισμός του ώριμου και λειτουργικού πρωτεϊνικού μορίου. Τα τελευταία χρόνια, μέθοδοι σήμανσης βασισμένες σε inteins, έχουν αρχίσει να αποτελούν σπουδαίες τεχνικές της μηχανικής των πρωτεϊνών. Πρόσφατα, οι Muir και συν. επινόησαν μία επαναστατική στρατηγική ειδικής ενσωμάτωσης ενός συνθετικού μορίου σε μια πρωτεΐνη, κάτω από in vivo συνθήκες σε ζωντανά κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό, οι ερευνητές, χρησιμοποίησαν inteins ετερό-πλευρου ματίσματος (trans-splicing inteins). Οι trans-splicing inteins διαχωρίζονται σε δύο τμήματα και ο διαχωρισμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα να χάνουν την αυτό-καταλυόμενη ικανότητα πρωτεϊνικού ματίσματος (self-catalyzed protein-splicing activity). Η ικανότητά τους αυτή ανακτάται με την επανένωση των δύο τμημάτων τους που είχαν διαχωριστεί. Εξερευνώντας την τεχνική αυτή, οι Moir και συν. επέτυχαν να σημάνουν GFP με FLAG επίτοπο μέσα σε ζώντα CHO κύτταρα θηλαστικών[2].

Οι Schultz και συν. ήταν οι πρώτοι οι οποίοι χρησιμοποίησαν την τεχνολογία της καταστολής του tRNA (suppressor tRNA technology). Επρόκειτο για μία ευφυή και πολλά υποσχόμενη τεχνική μέσω της οποίας επιτυγχάνετο η ενσωμάτωση μη-φυσικών αμινοξέων σε πρωτεΐνες κατά την διάρκεια in vitro μεταγραφικών και μεταφραστικών αντιδράσεων. Με την σειρά τους οι Zhang και συν. σχεδίασαν και χρησιμοποίησαν ένα ορθογώνιο ζευγάρι tRNA-TyrRS το οποίο επιλεκτικά και αποδοτικά ενσωμάτωνε το μη-φυσικό αμινοξύ, m-acetyl-(L)-phenylalanine μέσα σε μία πρωτεΐνη-στόχο πού υπερεκφράζετο στο εσωτερικό κυττάρων E.coli. Η ενσωμάτωση αυτή εφοδίαζε την πρωτεΐνη-στόχο με μία «κετονική λαβή» («ketone handle»). Στην συνέχεια, οι ερευνητές, υπέβαλλαν την πρωτεΐνη-στόχο σε χημική τροποποίηση, εντός ζώντων κυττάρων, προσθέτοντας μικρά μόρια ιχνηθέτες τα οποία περιείχαν υδραζίδιο. Οι ερευνητές εκμεταλλεύτηκαν την χημεία ανάμεσα στην κετόνη και το υδραζίδιο επιδεικνύοντας έτσι, για πρώτη φορά, την δυνητική χρήση της tRNA τεχνολογίας στην βιοαπεικόνιση ζωντανών κυττάρων. Η αντίδραση σήμανσης ήταν επιλεκτική και με καλό ποσοστό απόδοσης προϊόντων (π.χ. > 75% προϊόν σύνδεσης)[1,3].

Καθώς αναδύονται νέοι ρόλοι για τα ένζυμα, είναι φανερό ότι ολοένα και περισσότερες καινούριες εφαρμογές, που θα στοχεύουν στην

μελέτη των ενζυμικών προσδιορισμών, θα οραματίζονται από τους ερευνητές. Η ταχεία ανάπτυξη της μεθοδολογίας των ενζυμικών προσδιορισμών θα συνεχίσει να τροφοδοτείται από την αναγνώριση και ταυτοποίηση νέων ενζύμων. Η ολοένα αυξανόμενη αναγνώριση και ταυτοποίηση νέων ενζύμων τροφοδοτείται, με την σειρά της, από την ανάπτυξη και επέκταση της γενωμικής πληροφορίας η οποία παρέχει ένα πλαίσιο ερμηνείας δεδομένων που βασίζεται στην νουκλεοτιδιτική αλληλουχία (sequence-based framework for data mining). Καθώς οι νέες αναλυτικές τεχνικές για την, ευρείας κλίμακας (large scale) υψηλής παραγωγής και απόδοσης (high throughput), πρωτεϊνική ανάλυση γίνονται ευρέως διαθέσιμες, είναι πολύ πιθανό ότι, στα επόμενα χρόνια, οι ερευνητές θα μπορούν να καταγράφουν τα ένζυμα συλλήβδην μέσα στο ενδοκυττάριο περιβάλλον τους. Ο ιδανικός στόχος και ο απώτερος σκοπός είναι να προσδιοριστούν το είδος και η ποσότητα των πρωτεϊνών που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρου ενός οργανισμού, σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή και κάτω από καθορισμένες συνθήκες[1].

Είναι φανερό ότι η πρωτεϊνωμική με τη βοήθεια περίπλοκης τεχνολογίας, θα δώσει στο μέλλον πρακτικές λύσεις σε πολλά και σοβαρά προβλήματα, κυρίως προβλήματα υγείας. Οι πρωτεϊνωματικές μεταβολές στη νόσο μπορούν να συμβούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους μη προβλεπόμενους από τη γενωμική ανάλυση και είναι σαφές ότι καλύτερη κατανόηση των μεταβολών αυτών θα έχει σημαντική επίδραση στην ιατρική. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν διαθέσιμες ποικιλία τεχνολογιών, αν και περαιτέρω τεχνολογικές ανακαλύψεις θα παρείχαν καλύτερη ευαισθησία, μείωση του απαιτούμενου όγκου δείγματος, αύξηση της απόδοσης και θα αποκάλυπταν πιο αποτελεσματικά τις πρωτεϊνικές τροποποιήσεις.

Η χρήση αυτών των τεχνολογιών πιθανόν να επεκταθεί σημαντικά, ιδιαίτερα για να αντιμετωπίσει την ανάγκη για καλύτερη διαγνωστική προσέγγιση και να φέρει πλησιέστερα την ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας. Ωστόσο, είναι σαφές ότι το πεδίο εφαρμογών της πρωτεϊνωμικής στη νόσο είναι ακόμη σε νηπιακή ηλικία. Η γνώση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος παρείχε το πλαίσιο για τις προσεγγίσεις της γενωμικής για την αποκάλυψη των παθογενετικών διαδικασιών. Σήμερα λείπει παρόμοια γνώση του ανθρώπινου πρωτεϊνώματος. Μια τέτοια γνώση θα περιλάμβανε γνώση όλων των πρωτεϊνών του ανθρώπου, από την αλληλουχία τους μέχρι τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, την κυτταρική και υποκυτταρική κατανομή τους και την περιστασιακή έκφρασή τους. Αν και δεν πρόκειται να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο στο άμεσο μέλλον, πιο ταπεινοί στόχοι μπορεί να είναι δυνατόν να προσεγγισθούν.

Για το σκοπό αυτό έχει ιδρυθεί η Οργάνωση του Ανθρώπινου Πρωτεϊνώματος (Human Proteome Organisation – HUPO) για να ομαδοποιήσει επιστήμονες του δημόσιου και ιδιωτικού τομέα, που ασχολούνται σε όλο τον κόσμο με διάφορους τομείς της πρωτεϊνωμικής. Οι πρωτοβουλίες σε πιλοτική φάση σήμερα συμπεριλαμβάνουν διεθνείς προσπάθειες ταυτοποίησης των πρωτεϊνών στο φυσιολογικό ορό και πλάσμα και την κλίμακα των μεταβολών τους με την ηλικία, εθνικότητα και φυσιολογική κατάσταση, καθώς και μελέτη του πρωτεϊνώματος του ήπατος[2,3].

Η ανάπτυξη της πρωτεϊνωμικής όμως, θέτει ευλόγως και διάφορα ερωτήματα, όπως: ποιος έχει το δικαίωμα να έχει πρόσβαση σε πληροφορίες σχετικά με το πρωτεΐνωμα του καθενός μας, πως μπορεί κανείς να είναι βέβαιος ότι τα πρωτεϊνωμικά tests χρησιμοποιούνται και εκτελούνται καταλλήλως, ότι υπάρχουν αρχές ηθικής και δεοντολογίας στην έρευνα επί του πρωτεϊνώματος, ότι υπάρχει ειδική νομοθεσία, ειδική εκπαίδευση και ενημέρωση των επιστημόνων σχετικά με την αξιολόγηση των πληροφοριών της πρωτεϊνωμικής. Είναι σίγουρο ότι ιατρική, γονιδιωματική, πρωτεϊνωμική, ηλεκτρονικοί υπολογιστές, λογισμικά τεχνητής νοημοσύνης, ρομποτική, νομική/νομοθεσία, αρχές ηθικής και δεοντολογίας, αλλά και η συμμετοχή του απλού πολίτη, θα διαμορφώσουν την Επιστήμη του 21ου αιώνα και ας ελπίσουμε με ευχάριστες εκπλήξεις.

REFERENCES

1. Panicker RC, Chattopadhaya S, Yao QS. ΄Advanced analytical tools in proteomics. A Review΄. Analytica Chimica Acta 556 (2006) 69-79.
2. Μπεζεριάνος Α. Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής Πανεπιστημίου Πατρών. ΄Σημειώσεις για το μάθημα της Οργανολογίας΄. Μάρτιος 2004.
3. Παπαστεριάδη Χ, Γαροφαλάκη Μ, Ψαρρά Α, Γιαννουλάτου Ε, Ροντογιάννη Δ. ΄Γονιδιωματική, Πρωτεϊνωμική, Μικροσυστοιχίες΄. Πρακτικά 9ου Ετήσιου Σεμιναρίου Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης Νοσοκομείου ΄Ο Ευαγγελισμός΄. Αθήνα 10-12 Φεβρουαρίου 2005. Νοσοκομειακά Χρονικά, τόμος 67, συμπληρωματικό τεύχος 2, σελ. 243-271, Εκδότης Αλεξόπουλος ΚΓ, τριμηνιαία έκδοση της Ενώσεως Επιστημονικού Προσωπικού Νοσοκομείου ΄Ο Ευαγγελισμός΄.

Φιλόξενος, Κλαύδιος ο Αλεξανδρεύς

Philoxenos, Claudius of Alexandria

Μ. Παναγιωτοπούλου

Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας

M. Panagiotopoulou

Hellenic Society of Preventive Oncology

μενον. Δύο δὲ καρκινωμάτων εἰσὶν αἱ [2]ἀνώτατοι διαφοραί· τὰ μὲν γὰρ αὐτῶν [3]ἀνέλκωτα γίνεται, τὰ δὲ [4]ἡλκωμένα. Τὰ μὲν οὖν [5]ἀνέλκωτα καρκινώματα κρυπτὰ ὠνόμασαν οἱ πλεῖστοι τῶν ἀρχαίων· ὁ δὲ Φιλόξενος ἰδίως κρυπτὸν ὠνόμασε καρκίνωμα τὸ ἐν μήτρᾳ ἢ τοῖς ἐντέροις γινόμενον. [6]Ἀνελκώτου μὲν [7]ὄντος καρκίνου

Άσκησε το ιατρικό επάγγελμα στην Αλεξάνδρεια (63π.Χ. – 14μ.Χ.). Ασχολήθηκε με διάφορους τομείς της χειρουργικής, π.χ. οφθαλμών, τραυμάτων. Περιέγραψε τους πολύποδες της μήτρας και την χειρουργική αφαίρεσή τους. Ο Γαληνός τον αναφέρει συχνά ως «χειρουργόν» και ο Κέλσος μνημονεύει το σύγγραμμά του «Χειρουργικά», από το οποίο σώζονται μόνο αποσπάσματα. Ο Γαληνός επίσης αναφέρει συνταγές φαρμάκων του Φιλόξενου, σχετικών με τη χειρουργική, που έγιναν γνωστά ως «Φιλοξένεια»: κατά πολυπόδων, αιμορροΐδων, οφθαλμικών παθήσεων, πληγών, έμπλαστρο για εσχαρώσεις και θραύσεις οστών, κ.ά. Επίσης, τον αναφέρουν οι: Παύλος Αιγινήτης, Σωρανός, Πλίνιος.

Ασχολήθηκε συστηματικά με τον καρκίνο. Στο σύγγραμμα του «Γυναικεία», από το οποίο σώζονται αποσπάσματα, ασχολείται με τα καρκινώματα της μήτρας και των εντέρων.

REFERENCES

1. Κ. Γεωργακόπουλος, Αρχαίοι Έλληνες Ιατροί. Αθήναι, 1998
2. Friderici Reinholdi Dietz. Sorani Ephesii de Arte obstetricia morbisque mulierum, quae supersunt, ex apographo, primum edita. Regimontii Prussorum: Apud Graefium et Unzerum, 1838.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

Είδη εργασιών

Στο «Καρκίνου Πρόληψις - Cancer Prevention» γίνονται δεκτές εργασίες με θέματα ογκολογικού ενδιαφέροντος υπό την εξής μορφή:

Πρωτότυπων εργασιών βασικής ή κλινικής έρευνας, ή επιδημιολογικού χαρακτήρα. Οι εργασίες δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τις 4.000 λέξεις κυρίως κειμένου.

Ανασκοπήσεων σε έκταση που να μη ξεπερνά τις 6.000 λέξεις κυρίως κειμένου.

Ενδιαφερόντων περιστατικών για σύντομη (1-3 σελίδες) παρουσίαση σπάνιας νόσου, εκδήλωσης, ασυνήθους κλινικής πορείας ή περιπτώσεων με ενδιαφέρον από άποψη διαγνωστικής προσπέλασης.

Ειδικά θέματα γενικού ογκολογικού ενδιαφέροντος, εργασίες που δεν κατατάσσονται σε άλλη κατηγορία εργασιών, έκτασης μέχρι 5.000 λέξεις κυρίως κειμένου.

Γράμματα αναγνωστών έκτασης 500 λέξεων, με κρίσεις για δημοσιευμένη εργασία ή γενικότερες γνώμες, σύντομες παρατηρήσεις, πρόδρομα αποτελέσματα σε συντομία, κ.λ.π.

Πρακτικά σεμιναρίων, συμποσίων, στρογγυλών τραπεζιών, κατά την κρίση της Σύνταξης.

Η Συντακτική Επιτροπή αποδέχεται και μεταδημοσιεύσεις εργασιών υπό τη μορφή σύντομων αναφορών, έκτασης έως 2.500 λέξεων κυρίως κειμένου, με την ανάλογη δομή. Στη περίπτωση αυτή, αναφέρεται υποχρεωτικώς, στη σελίδα του τίτλου, το περιοδικό που πρωτοδημοσιεύτηκε η πρωτότυπη εργασία.

Υποβολή εργασίας

Οι εργασίες υποβάλλονται ηλεκτρονικά με e-mail σε αρχείο Word στην ηλεκτρονική διεύθυνση: drginop@otenet.gr. Σε συνοδευτική σελίδα, αναγράφεται ο υπεύθυνος της αλληλογραφίας και τα πλήρη στοιχεία του (δ/νση, τηλέφωνο, φαξ, email). Η υποβολή εργασίας δεν συνεπάγεται και δημοσίευσή της. Τα πλήρη στοιχεία επικοινωνίας για οποιαδήποτε ενημέρωση είναι: Ελληνική Εταιρεία Προληπτικής Ογκολογίας, Ηρώων Πολυτεχνείου 104 & Τερτσέτη, Πάτρα, ΤΚ 26442, τηλ/φαξ: 2610-431465, www.cancerprevention.gr

Δομή εργασίας

Η γλώσσα των εργασιών είναι η Ελληνική, η Αγγλική και η Ιταλική. Το κείμενο της εργασίας θα πρέπει να είναι γραμμένο με γραμματοσειρά Times New Roman σε μέγεθος χαρακτήρων 12pt, σε διπλό διάστημα με αρίθμηση σελίδων.

Το χειρόγραφο πρέπει να έχει:

1. ***Σελίδα τίτλου***, η οποία περιλαμβάνει τον τίτλο της εργασίας, τα ονόματα των συγγραφέων (το αρχικό γράμμα του ονόματος ακολουθούμενο από το επώνυμο) και την ιδιότητά τους, το τμήμα από το οποίο προέρχεται η εργασία (Τμήμα/κλινική/ εργαστήριο, νοσοκομείο/ ίδρυμα, πόλη, χώρα), και ένα βραχύ τίτλο της εργασίας. Αν πρόκειται για περισσότερα του ενός τμήματα, σημειώνεται, με αριθμητικές ενδείξεις, σε ποιο από αυτά ανήκει ο κάθε συγγραφέας. Οι πληροφορίες γράφονται στα ελληνικά και στα αγγλικά.
2. ***Περίληψη και λέξεις κλειδιά*** (keywords). Σύντομη παρουσίαση της εργασίας έως 250 λέξεις δομημένη σε διακριτά μέρη ανάλογα με το είδος της εργασίας. Στο τέλος της περίληψης θα πρέπει να αναγράφονται 3-7 λέξεις-κλειδιά. Οι πληροφορίες γράφονται στα ελληνικά και στα αγγλικά.
3. ***Κυρίως κείμενο***, ανάλογα με τον τύπο της εργασίας: πρωτότυπη εργασία: εισαγωγή, σκοπό, υλικό-μέθοδο, αποτελέσματα, συζήτηση-συμπεράσματα, ενδιαφέρον περιστατικό: εισαγωγή, περιγραφή περιστατικού και συζήτηση. Σε περίπτωση ανασκόπησης, η εργασία θα χωρίζεται σε κεφάλαια με αντίστοιχους τίτλους ανάλογα με το θέμα και κατά την κρίση των συγγραφέων.
4. ***Βιβλιογραφίες***, οι οποίες μέσα στο κείμενο αναγράφονται με διαδοχική σειρά με αραβική αρίθμηση υπό μορφή εκθέτη. Ο κατάλογος των βιβλιογραφιών συντάσσεται με αριθμητική σειρά σύμφωνα με τη σειρά εμφάνισής τους στο κείμενο. Για άρθρα περιοδικών αναγράφονται τα επώνυμα των συγγραφέων ακολουθούμενα από τα αρχικά των ονομάτων χωρίς τελείες (Byrne TA), ο τίτλος του άρθρου, το περιοδικό (αναγραφή σύντμησης με βάση το Index Medicus), η χρονολογία, ο αριθμός τόμου και οι σελίδες του άρθρου. Αναγράφονται όλοι συγγραφείς όταν είναι τρεις ή λιγότεροι. Σε αντίθετη περίπτωση, αναγράφονται οι τρεις πρώτοι ακολουθούμενοι από τις λέξεις «et al» ή «και συν».
5. ***Πίνακες και εικόνες***, τα οποία αναγράφονται σε ξεχωριστή σελίδα το καθένα. Οι πίνακες αριθμούνται διαδοχικά με αραβικούς αριθμούς και έχουν βραχύ επεξηγηματικό τίτλο του περιεχομένου τους στο άνω μέρος. Όλα τα διαγράμματα, σχήματα, κ.λ.π. φέρονται στις εργασίες ως εικόνες και αριθμούνται διαδοχικά με αραβικούς αριθμούς. Όλες οι εικόνες πρέπει να έχουν βραχύ τίτλο και τις απαραίτητες επεξηγήσεις. Το μέγεθος των εικόνων στη τελική εκτύπωση ανήκει στην κρίση του υπεύθυνου έκδοσης.

Άλλες πληροφορίες

- Η Σύνταξη του περιοδικού θεωρεί δεδομένο, ότι η εργασία είναι σε γνώση και έχει την έγκριση όλων των συγγραφέων και του διευθυντού του τμήματος από το οποίο προέρχεται
- Οι προς δημοσίευση εργασίες υποβάλλονται σε κρίση από δύο κριτές.
- Οι εργασίες που δημοσιεύονται στο περιοδικό, αποτελούν πνευματική ιδιοκτησία του συγγραφέα και του περιοδικού. Η αναδημοσίευση, μερική ή ολική, επιτρέπεται μόνον ύστερα από έγγραφη άδεια της Συντακτικής Επιτροπής. Η δημοσίευση μιας εργασίας δεν συνεπάγεται αποδοχή των απόψεων των συγγραφέων από πλευράς της ΕΕΠΟ, η οποία δεν ευθύνεται για το περιεχόμενο των δημοσιευμένων άρθρων.