

Γ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Ογκολογία Θώρακα: Σύγχρονη Κλινικοεργαστηριακή Προσέγγιση και Έρευνα»

"Μικροδορυφορική γενετική αστάθεια και αντιμετώπιση συμπαγών όγκων με τη βοήθεια νανοσωματιδίων αντιγόνων"

Αικατερίνη Παπαβασιλείου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Στραβοπόδης Δημήτριος - Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΜΕΛΟΣ: Ραμφίδης Βασίλειος - Πανεπιστημιακός Συνεργάτης, ΕΚΠΑ

ΜΕΛΟΣ: Ηλίας Κοττέας – Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Γενικές πληροφορίες για το MSI και τη χρήση των νανοσωματιδίων.....	6
1.2 MMR - MSI – προκαρυωτικοί.....	7
1.3 MMR – MSI – ευκαρυωτικοί.....	9
1.4 MSI – ορθοκολικό καρκίνωμα.....	11
1.5 MSI and gastric cancer.....	12
1.6 Νανοσωματίδια.....	13
1.7 Γενικές αρχές σύνθεσης των νανοσωματιδίων.....	21
1.8 Τρόποι σύνθεσης νανοσωματιδίων.....	23
1.9 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων.....	23
1.10 Ιδιότητες των Nps.....	26
1.11 Τεχνικές χαρακτηρισμού Nps.....	26
1.12 Τρόποι πρόσληψης των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα.....	27
1.13 Σύνδεση νανοσωματιδίου-αντιγόνου και απορρόφηση από το κύτταρο.....	33
1.14 Ανοσοενισχυτικά.....	35
1.15 Τρόποι στόχευσης πάσχοντα ιστό.....	36
1.16 Μικροπεριβάλλον του όγκου.....	40
1.17 Ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια αντιγόνου.....	41
2. Μέθοδοι.....	45
3. Αποτελέσματα.....	46
4. Συμπεράσματα.....	78
5. Βιβλιογραφία.....	79
6. Εκτεταμένη σύνοψη.....	93

Περίληψη

Οι μικροδορυφόροι παρατηρούνται σε αρκετούς καρκίνους με πιο συχνούς τον καρκίνο του κολοορθικού και τον καρκίνο του στομάχου. Οι μικροδορυφόροι είναι διάσπαρτα επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA μέσα στο γονιδίωμα τα οποία δημιουργούνται λόγω μη διόρθωσης αναντιστοιχιών κατά την αντιγραφή του. Ο χαρακτηρισμός του όγκου με βάση την μικροδορυφορική γενετική αστάθεια είναι σημαντικός για την πρόγνωση των ασθενών, για την αξιολόγηση της κακοήθειας και για την ανταπόκριση των ασθενών στην ανοσοθεραπεία και στην χημειοθεραπεία. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε ασθενείς με MSI που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία και χημειοθεραπεία και τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δείχνουν πως η 5-FU χημειοθεραπεία θα μπορούσε να αποτελέσει μια επιλογή θεραπείας σε ασθενείς CRC MSI-H σταδίου III. Το όφελος της ανοσοενισχυτικής χημειοθεραπείας με βάση την οξαλιπλατίνη αυξάνεται σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου II έως III. Μία νέα θεραπευτική στρατηγική η οποία βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο είναι η χρήση των νανοσωματιδίων αντιγόνων. Τα νανοσωματίδια λόγω των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών τους θεωρούνται ιδανικοί να μεταφορέουν φαρμάκων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων. Το πλεονέκτημα της χρήσης των νανοσωματιδίων είναι πως δεν προκαλούν φλεγμονές, δεν είναι τοξικά και συσσωρεύονται στους όγκους. Προς το παρόν η χρήση των νανοσωματιδίων αντιγόνου έχει πραγματοποιηθεί σε ποντίκια με μελάνωμα στα οποία ακτινοβολείται ο όγκος, στη συνέχεια χορηγούνται νανοσωματίδια τα οποία δεσμεύουν τα αντιγόνα του όγκου. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν πως σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν νανοσωματίδια PLGA και Mal AC-NPs η διάσταση του όγκου είχε την μικρότερη αύξηση σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά τον εμβολιασμό συγκριτικά με όλες τις ομάδες. Ακόμη παρατηρήθηκε πως σε δευτερογενείς όγκους η χορήγηση μόνο RT και RT σε συνδυασμό με aPD-1 δεν είχαν κανένα όφελος. Η μέθοδος αυτή είναι πολλά υποσχόμενη αν και βρίσκεται ακόμα σε πειραματικά στάδια.

Abstract

Microsatellites are found in several cancers, the most common being colorectal cancer and stomach cancer. Microsatellites are duplicate strands of DNA in the genome that are created due to non-correction of mismatches during replication. Tumor characterization based on microsatellite genetic instability is important for the prognosis of patients, for the evaluation of malignancy, and for the response of patients to immunotherapy and chemotherapy. Studies have been performed in MSI patients receiving immunotherapy and chemotherapy, and the results of these studies suggest that 5-FU chemotherapy could be a treatment option in stage III MSI-H CRC patients. The benefit of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy is increased in patients with stage II to III colon cancer. A new therapeutic strategy that is still in the experimental stage is the use of antigen nanoparticles. Nanoparticles due to their properties and characteristics are considered ideal nanotransmitters of drugs, proteins and nucleotides. The advantage of using nanoparticles is that they do not cause inflammation, are non-toxic and accumulate in tumors. At present the antigen nanoparticles have been used in melanoma mice in which the tumor is irradiated, then nanoparticles are administered which bind the tumor antigens. The results of these studies showed that in mice treated with PLGA and Mal AC-NPs nanoparticles, the tumor dimension had the smallest increase with time after vaccination compared to all groups. It was also observed that in secondary tumors administration of only RT and RT in combination with aPD-1 had no benefit. This method is very promising although it is still in experimental stages.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικές πληροφορίες για το MSI και τη χρήση των νανοσωματιδίων

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου συσχετίζεται με γενετικές μεταλλάξεις συχνότερες εκ των οποίων είναι οι μεταλλάξεις ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων συνδυασμένες με μεταλλαγές άλλων γονιδίων (π.χ. επιδιορθωτικών). Μία σχετικά πρόσφατη γενετική αλλαγή, η μικροδορυφορική γενετική αστάθεια (Microsatellite instability - MSI), έχει αναφερθεί σε ποικίλους καρκίνους όπως: καρκίνο του παχέος εντέρου, του τραχήλου, του ενδομητρίου, του στομάχου, των ωοθηκών, του μελανώματος, του προστάτη, του δέρματος, του θυρεοειδούς, του πνεύμονα και του ηπατοκυτταρικού (Loeb, 1994; Noster, 1994). Οι μικροδορυφόροι είναι επαναλαμβανόμενα μοτίβα DNA μήκους 1 – 6 νουκλεοτίδια (Vaksman and Garner, 2015) τα οποία είναι διάσπαρτα μέσα στο γονιδίωμα. Κατά την MSI τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την επιδιόρθωση παράταιρων βάσεων μεταλλάσσονται με αποτέλεσμα την μη επιδιόρθωση λαθών ολίσθησης κατά την αντιγραφή του DNA και τη δημιουργία γενωμικής αστάθειας (Loeb, 1994; Noster, 1994). Ένας όγκος διακρίνεται ως προς τη μικροδορυφορική αστάθεια σε:

- MSI-H: υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας
- MSI-L: χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας
- MSS: μικροδορυφορικής σταθερότητας

Οι περισσότερες μελέτες αποκαλύπτουν πως ασθενείς με MSI-H εμφανίζουν καλύτερη αντικαρκινική ανοσοαπόκριση, ικανότητα αναστολής ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων και καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με ασθενείς με MSI-L και MSS (Choi et al., 2014; Kim et al., 2016; Marrelli et al., 2016; Mohan et al., 2016; Smyrk et al., 2001). Έτσι ο χαρακτηρισμός ενός καρκινικού όγκου ως προς τη μικροδορυφορική αστάθειά του είναι χρήσιμος για :

- Την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο
- Την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία
- Την ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία
- Την αξιολόγηση του βαθμού κακοήθειας

Ένα από τα βασικά προβλήματα που αντιμετωπίζει η θεραπευτική διαδικασία αφορά την μεταφορά των φαρμακευτικών σκευασμάτων μέσα στον οργανισμό προκειμένου να φτάσουν οι ακριβείς ποσότητες που χορηγούνται στον στόχο-όγκο. Μέρος της χορηγούμενης ουσίας δεν φτάνει στον τελικό προορισμό μιας που έχει μεταβολιστεί ή έχει αποβληθεί άμεσα από τον οργανισμό. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε υπερχορήγηση σκευάσματος στον οργανισμό με σκοπό να φτάσει η επιθυμητή ποσότητα σε συγκεκριμένο στόχο-όγκο. Το προαναφερθέν συμβάν δημιουργεί τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες στον οργανισμό (Nanotechnology, 2015). Το πρόβλημα αυτό βρίσκει λύση από την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας η οποία οδήγησε στην παρασκευή και στην χορήγηση νανομεταφορέων οι οποίοι αποτελούν το καταλληλότερο μέσο για την μεταφορά των θεραπευτικών ουσιών. Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των νανομεταφορέων είναι πως αναγνωρίζουν συγκεκριμένους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου. Τέτοιοι νανομεταφορείς είναι τα νανοσωματίδια. Η κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς, των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων ανοίγει νέους δρόμους σε νέους τρόπους αντιμετώπισης ασθενειών όπως ο καρκίνος (Kiparissides et al., 2008).

1.2 MMR - MSI – προκαρυωτικοί

Τα ένζυμα που πολυμερίζουν (συνθέτουν) το DNA, αποκαλούνται DNAπολυμεράσες. Τα λάθη που εντοπίζονται κατά την αντιγραφή του DNA είναι ένα λάθος για κάθε 105 νουκλεοτίδια (Kunkel, 2009; Bebenek and ZuiziaGraczyk, 2018) και αυτό συνεπάγεται με

περίπου 100,000 σφάλματα σε κάθε κυτταρική φάση S. Η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι αυτών των λαθών είναι η πολυμεράση και πιο συγκεκριμένα η πολυμεράση β στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και η pol III στους προκαρυωτικούς. Λάθη τα οποία διαφεύγουν από αυτόν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης πρέπει να επιδιορθωθούν από μια δεύτερη γραμμή άμυνας το σύστημα ενζύμων επιδιόρθωσης παράταιρων ζευγών βάσεων DNA (Mismatch Repair-MMR).

Το MMR είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και την επιδιόρθωση συγκεκριμένων κατηγοριών σφαλμάτων όπως μη συμπληρωματικό εσφαλμένο ζευγάρι βάσεων και ύπαρξη μονόκλωνων βρόγχων (loops) στην έλικα που προκύπτουν ύστερα από προσθήκη ή αφαίρεση 1-4 νουκλεοτιδίων σε έναν από τους κλώνους DNA. Η δράση του συστήματος είναι συντηρητική και οι πρωτεΐνες του MMR εμφανίζουν ομοιότητες σε βακτήρια και ανθρώπους (Kunkel, 2009; Jiricny, 2013). Το σύστημα MMR αρχικά ανακαλύφθηκε στο *Escherichia coli* (Modrich, 2016) και τα γονίδια που εμπλέκονται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι τα MutS, MutL, MutH και *uvrD* (Hanaoka and Sugasawa, 2016; Modrich, 2016).

Τα τρία βασικά βήματα στο MMR είναι η αναγνώριση, εκτομή αλυσίδας, απομάκρυνση των βάσεων γύρω από την εσφαλμένη περιοχή και επανασύνθεση της σωστής αλληλουχίας DNA. Πιο αναλυτικά, ο προϋπάρχων κλώνος διακρίνεται από τον νεοσυντιθέμενο μέσω της φυσιολογικά μεθυλιωμένης αλληλουχίας dGATC (υπάρχει στον προϋπάρχοντα κλώνο). Οι λάθος ζευγαρωμένες βάσεις εντοπίζονται από το ομοδιμερές MutS (Bjornson, 2003; Sameer et al., 2004), στη συνέχεια το MutS στρατολογεί το ομοδιμερές MutL και MutH, σχηματίζοντας το σύμπλοκο MutS-MutL-MutH, η πρωτεΐνη MutH αναγνωρίζει τον προϋπάρχων κλώνο και τέμνει τον νέο κλώνο στην αμεθυλίωτη θέση dGATC (Sameer et al., 2004) και με την βοήθεια της DNA εξωνουκλεάσης και της DNA λιγάσης απομακρύνεται το τμήμα του κλώνου του DNA που περιείχε την αναντιστοιχία. Τέλος, το κενό που δημιουργείται συμπληρώνεται από την DNA πολυμεράση και την λιγάση.

1.3 MMR – MSI – ευκαρυωτικοί

Το σύστημα MMR σε ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς παρουσιάζει διαφορές. Μία από αυτές είναι πως οι πρωτεΐνες στο σύστημα MMR για τους ευκαρυωτικούς εκπληρώνουν τις λειτουργίες τους ως ετεροδιμερή. Τα ονόματά τους παρουσιάζουν ομοιότητα με εκείνων του συστήματος E. Coli. Πιο συγκεκριμένα, η MSH προέρχεται από την MutS Homolog και η MLS από την MutL Homolog της E. Coli , ενώ στα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν εκφράζεται πρωτεΐνη ανάλογη με την MutH της E. coli. Η λειτουργία το συστήματος MMR των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι ίδια και περιλαμβάνει την αναγνώριση της βλάβης, επιδιόρθωση, εκτομή βλάβης και ανασύνθεση DNA (Liu et al., 2017; Huang and Li, 2018).

Το MMR στον ανθρώπινο οργανισμό περιλαμβάνει 8 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τα συστατικά του. Αυτά είναι τα h MSH2, h MSH3, h MSH5, h MSH6 (ομόλογα του γονιδίου MutS της E. coli), h MLH1, h PMS1, (h MLH2), h MLH3, h PMS2 (h MLH4) (ομόλογα του γονιδίου MutL της E. Coli) (Lipkin et al., 2000; Clark et al., 2013; Amaral-Silva et al., 2017). Μελέτες αποδεικνύουν δέσμευση ATP και η υδρόλυση είναι ζωτικής σημασίας για την ρύθμιση του συστήματος (Ban et al., 1999; Spampinato et al., 2000; Lamers et al., 2003). Τα διαφορετικά σύμπλοκα αναγνωρίζουν διαφορετικούς τύπους λανθασμένου ζευγαρώματος και βρόγχων νουκλεοτιδίων. Ο λανθασμένος συνδυασμός βάσεων αναγνωρίζεται από τα ομόλογα MutS ένζυμα τα οποία είναι η πρωτεΐνη MSH2 και η MSH6. Η τελευταία πρωτεΐνη είναι ασταθής μέχρι να δημιουργήσει σύμπλεγμα αναγνώρισης με ετεροδιμερισμό με την πρωτεΐνη MSH2 (Jiricny, 2013; Fishel, 2015). Ύστερα από μελέτες ομολογίας αλληλουχίας μεταξύ αμινοξέων αποκάλυψε πως η πρωτεΐνη MSH6 είναι ίδια με την πρωτεΐνη p160, η οποία είναι μία πρωτεΐνη δέσμευσης G / T (GTBP) (Edelbrock et al., 2013). Ένα άλλο ομόλογο του MutS το MSH3 μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να υποκαταστήσει το GTBP. Το ετεροδιμερές MSH2 / MSH6 (MutSa) συνδέεται κυρίως σε περιοχές του κλώνου όπου παρατηρείται αναντιστοιχία μονής βάσης, παρεμβολή ή

διαγραφής έως 3 νουκλεοτίδια, ενώ το ετεροδιμερές MSH2 / MSH3 (MutSb) αναγνωρίζει μεγαλύτερους βρόγχους εισαγωγής ή διαγραφής μήκους έως 13 νουκλεοτίδια (Harfe et al., 2000; Li, 2003; McCulloch et al., 2003; Jiricny, 2013). Κατά το δεύτερο στάδιο το οποίο αφορά το βήμα της εκτομής πραγματοποιείται δέσμευση του πρώτου ετεροδιμερούς και πρόσδεση άλλων μορίων όπως το πολλαπλασιαστικό πυρηνικό αντιγόνο κυττάρων (PCNA), τον συντελεστή αντιγραφής C (RFC), το MutLa (ετεροδιμερές MLH1 – PMS2) και η εξωνουκλεάση 1 (Exo 1). Έτσι σχηματίζεται ένα τετραμερές σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από το MutSa – MutLa ή MutSb – MutLa, με το MutLa να αποτελεί το ετεροδιμερές MLH1 / PMS2, MLH1/ PMS1 (Plotz et al., 2006; Plotz et al., 2002; Plotz et al., 2003), οδηγώντας στην τελική αποσύνδεση της αναντιστοιχίας (Liu et al., 2017). Μερικές μελέτες υποστηρίζουν πως τα MutS και MutL γλιστρούν με συντονισμένο τρόπο, ενώ άλλες πως το MutS παραμένει συνδεδεμένο με την αναντιστοιχία στον κλώνο και το MutL ολισθαίνει μακριά από την αναντιστοιχία (Goellner et al., 2015). Στο επόμενο στάδιο η MSH2 ή/ και η MLH1 ενεργοποιούν την εξωνουκλεάση 1 (EXO 1) η οποία αποκόπτει τμήμα DNA, στη συνέχεια η DNA πολυμεράση δ ($\rho\alpha\iota\ \delta$) επανασυνθέτει το τμήμα DNA και ενώνεται μέσω της DNA λιγάσης (Nielsen et al., 2004; Tran et al., 2004; Longley et al., 1997). Όλες οι προαναφερθέντες πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν απώλεια της λειτουργίας τους μέσω μεταλλάξεων ή μέσω απώλειας μετάφρασης και έτσι να δημιουργηθεί γονιδιωματική αστάθεια και κατά συνέπεια ανάπτυξη όγκο (Clark et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο MLH1 προκαλούν το σύνδρομο Lynch, αλλαγές στο γονίδιο MSH3 προκαλούν καρκίνο του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης και του ενδομητρίου (Kawakami et al., 2004; Yamamoto and Iami, 2015) και τέλος καρκίνου του κόλον, του ορθού, του ενδομητρίου και σύνδρομο Lynch μπορεί να προκληθούν και από αλλαγές του γονιδίου MSH6 (Poulogiannis et al., 2010; Rosenthal et al., 2020).

1.4 MSI – ορθοκολικό καρκίνωμα

Το ορθοκολικό καρκίνωμα (CRC) είναι ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας που προκαλεί 70.000 θανάτους κάθε χρόνο παγκοσμίως. Είναι ο δεύτερος πιο κοινός κακοήθης όγκος για τους άνδρες και ο τρίτος πιο κοινός για τις γυναίκες (Chang et al., 2017). Το 15% των ασθενών που πάσχουν από CRC εμφανίζουν ανεπάρκεια του συστήματος DNA MMR με MSI-H (Lynch and de la Chapelle, 2003), η πλειοψηφία των οποίων είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης του γονιδίου MLH1 ή του MSH2 (Bonadona et al., 2011) ή υπερμεθυλίωσης του MLH1 promoter (Torre et al., 2015).

Μελέτες αποκάλυψαν πως CRC ασθενείς με MSI-H εμφάνιζαν μειωμένη διεισδυτική ικανότητα συγκριτικά με εκείνους με MSI-L (Wade S. Samowitz et al., 2015; Lynch et al., 2015). Η πιο συχνή κληρονομική μορφή CRC είναι το σύνδρομο Lynch (LS) το οποίο προκαλείται ύστερα από μετάλλαξη απενεργοποίησης ενός από τα γονίδια του συστήματος DNA MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) (Barbolini et al., 2016). Οι πρωτοπαθείς όγκοι στο συγκεκριμένο σύνδρομο εμφανίζονται στο ορθοκολικό και ενδομήτριο, ενώ υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης εξωκολικών καρκίνων όπως στο στομάχι, λεπτό έντερο, χολική οδός, νεφρική λεκάνη, ουρητήρα και ωοθήκες. Η ομάδα δεικτών MSI αποτελείται από τα μονονουκλεοτίδια (BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 και NR27) και χαρακτηρίζεται από έναν σταθερό αριθμό επαναλήψεων νουκλεοτιδίων και έχουν το ίδιο μέγεθος μεταξύ απόμων (Umar et al., 2004). Οι πρωτεΐνες PMS2 και MSH6 συνεργάζονται με τα MLH1 και τα MSH2 και η έκφραση τους είναι στενά συνδεδεμένες. Η απώλεια έκφρασης του MSH2 συνδέεται με την απώλεια έκφρασης του MSH6 και η απώλεια έκφρασης του MLH1 συνδέεται με την απώλεια της έκφρασης του PMS2 και αυτό οφείλεται σε μετάλλαξη MLH1 ή υπερμεθυλίωσή του (Lynch et al., 2009).

Από κλινικής άποψη, οι MSI-H CRC διαγιγνώσκονται σε άτομα νεότερης ηλικίας και κατά κύριο λόγο στο δεξιό κόλον (Rault et al., 2004; Ward et al., 2001), ενώ το MSI-L και το MSI-S CRC παρατηρούνται σε γυναίκες ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας και καπνίστριες

(Poynter et al., 2008; Thibodeau et al., 1998; Slattery et al., 2000). Ασθενείς με CRC σταδίου I/II με MSI-H έχουν μικρότερο κίνδυνο για λεμφαδενική ή απομακρυσμένη μετάσταση και βελτιωμένη επιβίωση (Mohan et al., 2016). Οι προαναφερθέντες ασθενείς έχουν καλύτερη κλινική πρόγνωση, ενώ συχνά παρατηρείται τοπική υποτροπή και περιτοναϊκή μετάσταση (Kim et al., 2016).

Η καλύτερη πρόγνωση τέτοιων ασθενών ίσως οφείλεται στην ισχυρή αντικαρκινική ανοσοαπόκριση, η οποία αιτιολογείται από την υψηλή διήθηση των λεμφοκυττάρων στις περιοχές της βλάβης. Τα διηθητικά αυτά λεμφοκύτταρα αποτελούνται από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) αυξάνοντας μία πιο εξειδικευμένη αντικαρκινική απάντηση, αναστέλλοντας την εισβολή και τη διείσδυση του MSI-H CRC. Με αυτό τον τρόπο βελτιώνεται η αποτελεσματικότητα και η πρόγνωση (Yang et al., 2019; Badalamenti et al., 2018; Smyrk et al., 2001). Τέλος, ο αριθμός των λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο είναι χρήσιμος για την πρόβλεψη των υποτύπων MSI (Yang et al., 2019).

1.5 MSI and gastric cancer

Ο καρκίνος του στομάχου (GC) είναι ένας από τους πιο κακοήθεις όγκους και η τρίτη κύρια αιτία θανάτου που σχετίζεται με καρκίνο παγκοσμίως. Ο GC είναι μία ετερογενής ασθένεια που αποτελείται από διαφορετικούς υποτύπους μία εκ των οποίων είναι η μικροδορυφορική γενετική αστάθεια. Μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης GC παρατηρούνται σε ασιατικούς πληθυσμούς (Siegel et al., 2017).

Σε ασθενείς με GC MSI-H παρατηρείται αυξημένος ρυθμός μετάλλαξης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτείνες οι οποίες εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια ογκογέννεσης (Ratti et al., 2018). Η πρόγνωση των ασθενών με GC έχει πολύ σημαντική συσχέτιση με την ηλικία (Polom et al., 2017), όμως επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως οι υπότυποι MSI, το στάδιο της νόσου, την ηλικία και τη χημειοθεραπεία (An et al., 2012). Ο MSI-H GC

παρατηρείται κυρίως σε γυναίκες ηλικίας > 65 ετών με πολλαπλούς σύγχρονους καρκίνους στομάχου από ότι σε εκείνες με ένα όγκο (Nakashima et al., 1995). Όταν το γονίδιο h MLH1 ή ο προαγωγέας του μεθυλιωθεί σταματάει να εκφράζεται γεγονός που σχετίζεται με τη γήρανση (Nakajima et al., 2001). Η κύρια αιτία δημιουργίας της μικροδορυφορικής γενετικής αστάθειας στον σποραδικό GC είναι η μεθυλίωση, πράγμα που εξηγεί τη σχέση μεταξύ MSI-H GC και γήρανσης (Corso et al., 2011; Leite et al., 2011).

Ασθενείς με GC MSI-H σταδίου II και III δεν επωφελούνται από την επικουρική χημειοθεραπεία με βάση 5-φθοροουρακίλη συγκριτικά με ασθενής με MSS (An et al., 2012; Fang et al., 2012; Kim et al., 2015). Μελέτες αποκαλύπτουν πως τα μονοκλωνικά αντισώματα αποτελούν μία υποσχόμενη θεραπεία για διάφορους όγκους (Le et al., 2017; Le et al., 2015; Farkona et al., 2016).

Το 2017 εγκρίθηκε από τον FDA το Pembrolizumab ως προθεραπεία σε ασθενείς με μεταστασικό GC στους οποίους παρατηρείται έκφραση PDL-1 (U.S. Department of Health and Human Services, 2017).

1.6 Νανοσωματίδια

Είναι στερεά, σταθερά, οργανικά ή ανόργανα σωματίδια με μέγεθος της τάξεως 10-1000nm. Το μέγεθός τους καθορίζουν την in vivo κατανομή, την βιολογική συμπεριφορά, την τοξικότητα, την σταθερότητα και την απομάκρυνση τους από τον οργανισμό. Μελέτες καταλήγουν πως το συγκεκριμένο μέγεθος είναι τέτοιων διαστάσεων ώστε να μοιάζει με τα παθογόνα, να αναγνωρίζονται εύκολα και να προσλαμβάνονται αποτελεσματικά από τα APCs για την έναρξη της ανοσολογικής απάντησης.

Τα νανοσωματίδια είναι σημαντικοί νανομεταφορείς φαρμάκων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων τα οποία προσροφόνται στην επιφάνεια τους ή εγκλείονται σε αυτά. Τα νανοσωματίδια θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες ιδιότητες που τα καθιστά ικανά ως νανομεταφορείς βιομορίων. Αναλυτικότερα, θα πρέπει να είναι σταθερά στο αίμα,

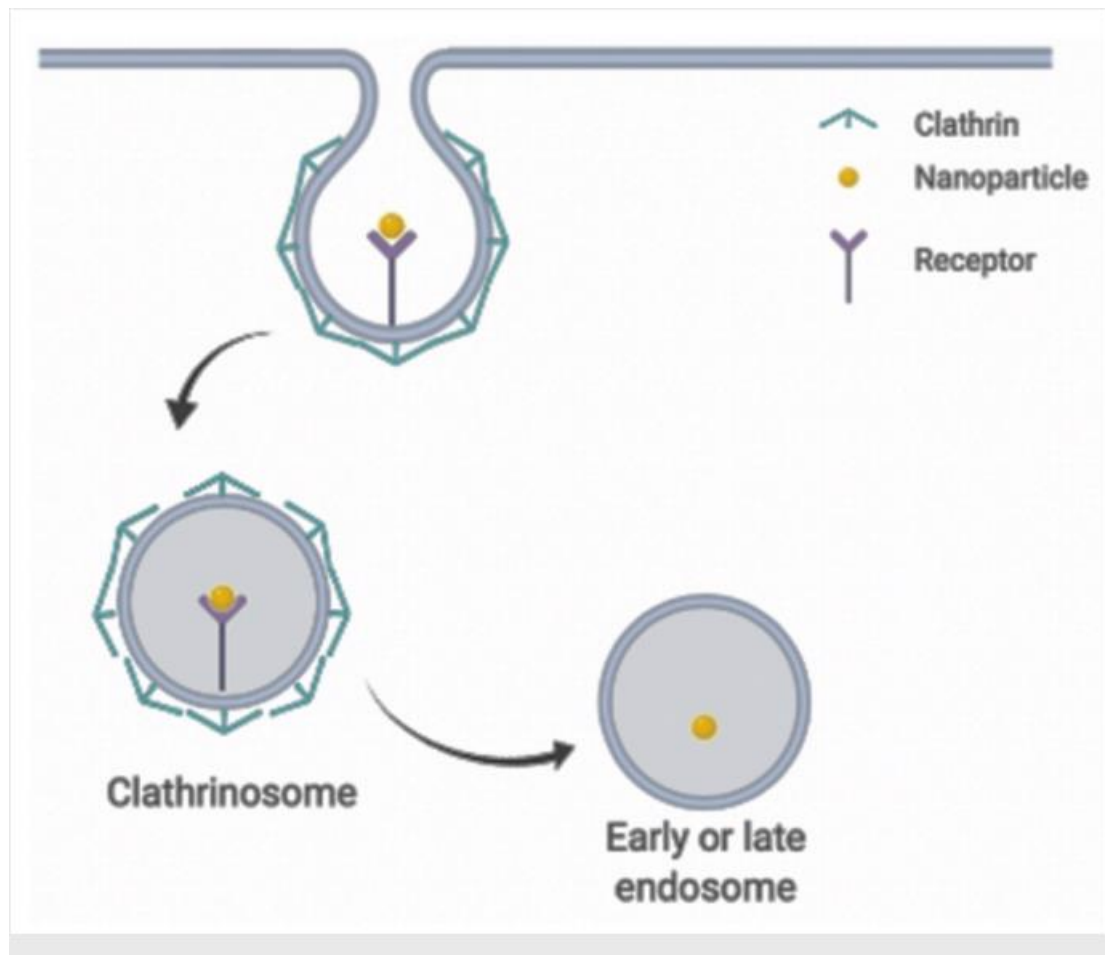
να μην είναι τοξικά, να μην προκαλούν θρομβώσεις και φλεγμονές, να είναι βιοδιασπώμενα και να μην ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκά αιμοσφαίρια του ανοσοποιητικού συστήματος (Mohanraj et al., 2006). Τα νανοσωματίδια έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται στους καρκινικούς όγκους ή σε περιοχές όπου παρατηρείται μόλυνση και φλεγμονή (Kirarrisides et al., 2013). Μια από τις χρήσεις των νανοσωματιδίων είναι στην θεραπεία του καρκίνου ως νανομεταφορείς φαρμακευτικών ουσιών. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων τα οποία δρουν ως νανομεταφορείς είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς θα πρέπει να μεγάλο ώστε να μπορεί να μένει για αρκετό χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία του αίματος αλλά και αρκετά μικρό ώστε να αποφεύγει τους μηχανισμούς πρόσληψης από τα μακροφάγα του ενδοθηλιακού συστήματος στο ήπαρ και στον σπλήνα (Cho et al., 2008).

Οι παράγοντες που καθορίζουν την αλληλεπίδραση του νανοσωματιδίου με τα APCs είναι τρεις: το σχήμα του νανοσωματιδίου, η υδροφοβικότητα του και το επιφανειακό του φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, νανοσωματίδια σχήματος οφιοειδούς φαγοκυτταρώνονται ελάχιστα συγκριτικά με εκείνα που είναι σφαιρικά και νανοσωματίδια μεγάλου μεγέθους (>1μm). Η υδροφοβικότητα τους καθορίζει την πρόσληψη αντιγόνου, έτσι τα υδρόφοβα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοσολογική απόκριση σε σχέση με τα υδρόφιλα.

Τέλος όσον αφορά το επιφανειακό φορτίο, τα κατιόντα έχουν 2.5 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη από τα μακροφάγα συγκριτικά με τα ουδέτερα και 25 φορές μεγαλύτερη από τα ανιόντα λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τις ανιοντικές κυτταρικές μεμβράνες (Karlsson et al., 1999). Τα κατιονικά νανοσωματίδια μεταφέρονται εντός του κυττάρου μέσω ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης, (**Εικόνα 1**) ενώ τα ανιονικά μέσω παρακυτταρικής οδού caveolar (**Εικόνα 2**) (Lin et al., 2012; Donahue et al., 2019). Σύμφωνα με μελέτες των Harush-Frenkel et al., 2018 τα ανιονικά PLA NPs μέσα στο κύτταρο αποδομούνται από τα λυσοσώματα αλλά δεν δέχονται περαιτέρω διακυττάρωση. Τα ανιονικά NPs έχουν πιο αργό ρυθμό πρόσληψης λόγω αποστικών δυνάμεων (Zhao et al., 2014). Στα υψηλά αρνητικά φορτισμένα NPs παρατηρείται καλή σταθερότητα καθώς οι

απωστικές δυνάμεις Coulombic που προκύπτουν από την επιφάνεια τους μπορούν να υπερνικήσουν τις ελκτικές δυνάμεις Van de Waals μεταξύ αποτρέποντας την συσσώρευση (Muthu et al., 2008).

Οι επιφανειακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι εκείνες που καθορίζουν τον χρόνο κυκλοφορίας τους μέσα στον οργανισμό. Αυτό που είναι σημαντικό να έχουν τα νανοσωματίδια είναι η επιστρωμένη επιφάνεια από ένα υδρόφιλο πολυμερές όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) το οποίο τα προστατεύει από την οψωνοποίηση απωθώντας τις πρωτεΐνες του πλάσματος με αποτέλεσμα να διαφεύγουν από τα μακροφάγα (Khanna, 2012).



Εικόνα 1. Τα NP χρησιμοποιούν ενδοκυττάρωση που εξαρτάται από την κλαθρίνη για να αποκτήσουν είσοδο σε ένα κύτταρο (πηγή: Donahue et al., 2019).

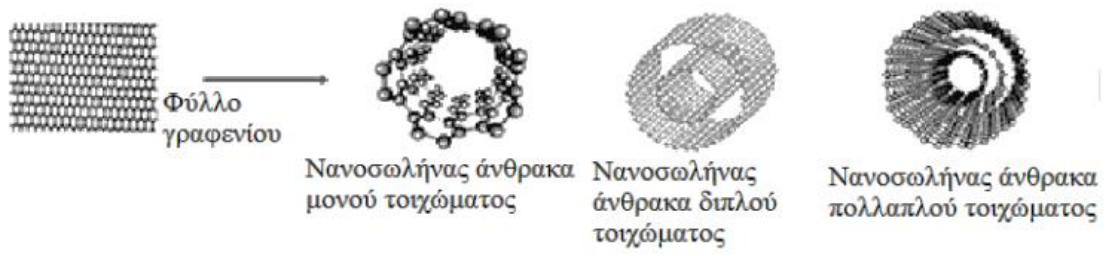


Εικόνα 2. Ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την καβεολίνη (πηγή: Donahue et al., 2019)

Τα νανοσωματίδια συμπεριλαμβανομένων των νανοσφαιριδίων και των νανοκαψουλών χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα πολυμερικά, τα ανόργανα και τα υβριδικά (Kiparrisides et al., 2013; Rawat et al., 2006). Αναλυτικότερα:

- Τα πολυμερικά νανοσωματίδια είναι κολλοειδείς νανομεταφορείς με μορφή νανοσφαιριδίου ή νανοκάψουλας. Τα κύρια υλικά από τα οποία δομούνται είναι η χιτοζάνη και τα παράγωγα της (όπως N-τριμέθυλο χιτοζάνη, μονο-N-καρβοξυμέθυλο χιτοζάνη), πολυεστέρες (όπως πολυγαλακτικό οξύ PLA) και συμπολυμερές γαλακτικού-γλυκουλικού οξέος (PLGA). Νανοσωματίδια κατασκευασμένα από τα δύο τελευταία παράγωγα μελετώνται για τον εγκλεισμό αντιγόνων και φαρμακευτικών μορίων. Τα χιτοζάνη NPs έχουν ως δραστική ουσία την *toxoplasma gondii* και στοχεύσουν τον βλεννώδη ιστό. Τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια είναι εξαιρετικά ασφαλή για τη χορήγηση τους καθώς έχουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα. Άλλα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους είναι η πολύ-εκαπρωλακτόνη (PLL), το πολυακρυλικό οξύ (PAA), πολυμεθακρυλικό οξύ (PMAA), κυανακρυλικός πολυακρυλεστέρας (PACA), το άμυλο και η δεξτράνη (Cho et al., 2008; Rawat et al., 2006).
- Τα ανόργανα νανοσωματίδια παρασκευάζονται από ανόργανες ενώσεις όπως το διοξείδιο του πυριτίου, το διοξείδιο του τιτανίου και το οξείδιο του αλουμινίου. Το εξαιρετικά μικρό τους μέγεθος (μικρότερο από 50nm) το δίνει την δυνατότητα να αποφεύγει το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Στα ανόργανα νανοσωματίδια ανήκουν οι νανοσωλήνες και τα νανοςύρματα τα οποία είναι αυτοσυναρμολογούμενα φύλλα μορίων. Οι νανοσωλήνες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: στους νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος (MWNCT - multi walled nano carbon tubes), διπλού τοιχώματος (DWNCT – double walled nano carbon tubes) και σε αυτούς με μονό τοίχωμα (SWNCT – singled walled nano

carbon tubes) (**Εικόνα 3**). Οι τελευταίοι προτιμώνται στην χορήγηση φαρμάκων καθώς έχουν μέγεθος νουκλειικού οξέος (Rawat et al., 2006). Άλλα χαρακτηριστικά αυτών των ανόργανων νανοσωματιδίων πέραν του μεγέθους τους είναι η συμβατότητα και η ευκολία μεταβολής της επιφάνειας τους για αποτελεσματικότερη στόχευση (Μασμανίδου, 2015). Τέλος, είναι μία κατηγορία νανοσωματιδίων τα οποία χρησιμοποιούνται στην στοχευμένη χορήγηση βιομορίων, γονιδίων, πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Rawat et al., 2006).



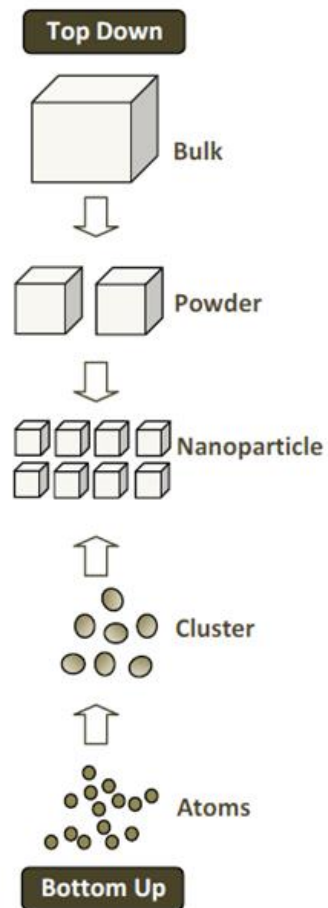
Εικόνα 3. Κατηγορίες νανοδομών άνθρακα (πηγή: Mansiur Misel Teontor, 2017)

1.7 Γενικές αρχές σύνθεσης των νανοσωματιδίων

Τα άτομα αποτελούν τις βασικές δομικές μονάδες της ύλης και ο συνδυασμός τους μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό σύνθετων δομών, όπως είναι τα μόρια και οι ενώσεις. Στην περίπτωση των νανοϋλικών υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι σύνθεσης σε επίπεδο νανοκλίμακας, (α) η τεχνική/μέθοδος «Bottom-Up» (από κάτω προς τα πάνω) και (β) η τεχνική/μέθοδος «Top-Down» (από πάνω προς τα κάτω) (**Εικόνα 4**).

Στην μέθοδο Bottom-Up οι νανοδομές δημιουργούνται με την αυτόματη σύνδεση (self-assembly) ορισμένων υλικών και τη δημιουργία συγκεκριμένων διατάξεων. Η συγκεκριμένη διαδικασία επιτρέπει την αυθόρμητη διάταξη των διαφορετικών ατόμων, μορίων ή νανοϋλικών, μετά από την ανάμειξή τους και το σχηματισμό σταθερών, καθορισμένων δομών με μοναδικές γεωμετρικές και ηλεκτρονιακές δομές. Το υλικό συντίθεται από το ατομικό ή μοριακό επίπεδο της ύλης μέσω χημικών αντιδράσεων, επιτρέποντας στα στοιχειώδη σωματίδια να μεγαλώνουν σε μέγεθος (Bottom-Up).

Αντίθετα, η μέθοδος Top-Down αναφέρεται στην παρασκευή των νανοϋλικών με επιθυμητό μέγεθος ή σχήμα, μέσω διαδικασιών και μηχανισμών σμίκρυνσης συμπαγών υλικών (<http://www.mio-ecsde.org>).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής νανοδομών με Bottom-Up (από κάτω προς τα πάνω) και Top-Down (από πάνω προς τα κάτω) τεχνικές (πηγή <http://www.gitam.edu>).

1.8 Τρόποι σύνθεσης νανοσωματιδίων

Ανάλογα με το προαπαιτούμενο μέγεθος των νανοσωματιδίων, τα χαρακτηριστικά που θέλουμε να έχουν, τον βαθμό αποικοδόμησης και τις ιδιότητες της μεταφερόμενης ουσίας επιλέγεται διαφορετική μέθοδος για την Παρασκευή τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η εξάτμιση διαλύτη από απλό γαλάκτωμα, η εξαλάτωση, η γαλακτωματοποίηση / διάχυση, η απομάκρυνση διαλύτη / νανοκαθίζηση, η γαλακτωματοποίηση / διάχυση / εξάτμιση, η ξήρανση με εκνέφωση, η κροκίδωση ή ιοντική συμπλοκοποίηση και η εξάτμιση διαλύτη από διπλό γαλάκτωμα (Davinder et al., 2013).

Με τη μέθοδο της εξάτμισης διαλύτη μπορούν να παραχθούν νανοσωματίδια μεγέθους από λίγα νανόμετρα έως μερικά μικρόμετρα. Οργανικά διαλύματα του πολυμερούς ή του φαρμάκου που μεταφέρουν γαλακτωματοποιείται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει σταθεροποιητή. Στη συνέχεια, μέσω παροχής ενέργειας μειώνονται τα σταγονίδια γαλακτώματος και εξατμίζεται η οργανική φασή μέσω πίεσης. Τέλος, τα νανοσωματίδια που προκύπτουν λυοφιλοποιούνται για να αποθηκευτούν (Davinder et al., 2013).

Στην εξαλάτωση, έχουμε διαλύτη με πολυμερές και φάρμακα στα οποία προστίθεται υδατικό διάλυμα με παράγοντα εξαλάτωσης και σταθεροποιητή και αναδεύονται. Προστίθεται μικρή ποσότητα νερού σε γαλάκτωμα ελαίου σε νερό για διάλυση και έτσι διαχέεται ο οργανικός διαλύτης και προκύπτουν τα νανοσωματίδια (Pooni et al., 2011).

1.9 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων

Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των νανοσωματιδίων κάθε φορά εξαρτάται από το προαπαιτούμενο μέγεθος των νανοσωματιδίων, τα επιφανειακά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων τα οποία καθορίζουν τον χρόνο κυκλοφορίας στον οργανισμό, το βαθμό βιοαποικοδόμησης και τοξικότητας, το επιθυμητό προφίλ

αποδέσμευσης του φαρμάκου και τις εγγενείς ιδιότητες φαρμάκου. Θα αναλύσουμε ξεχωριστά την κάθε μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα:

- Γαλακτοματοποίηση/διάχυση:

Αποτελεί μία διαφορετική εκδοχή της εξάτμισης διαλύτη από απλό γαλάκτωμα. Σε αυτή τη μέθοδο παραγωγής παρατηρείται μία ελαιώδη φάση και μία υδατοδιαλυτή. Η ελαιώδη φάση αποτελείται από ένα διαλύτη αναμίξιμο με το νερό και από ένα διαλύτη μη αναμίξιμο. Η τριβή που αναπτύσσεται μεταξύ της ελαιώδους φάσης και της μη οδηγούν στο σχηματισμό μικρών σωματιδίων. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναμίξιμου με το νερό διαλύτη τόσο μειώνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων που παράγονται (Wallace et al., 2012).

- Απομάκρυνση διαλύτη/νανοκαθίζηση:

Τα κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο παραγωγής είναι ένα διάλυμα φαρμάκου με το πολυμερές και το λιπόφιλο επιφανειοδραστικό τα οποία βρίσκονται σε ημιπολικό διαλύτη. Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό εγχύεται σε διάλυμα που εμπεριέχει σταθεροποιητή. Η ταχεία διάχυση του διαλύτη προκαλεί την παραγωγή νανοσωματιδίων (Davinders et al., 2013).

- Γαλακτωματοποίηση/διάχυση/εξάτμιση:

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται στοιχεία από εκείνη της εξάτμισης και της διάχυσης προκειμένου να παραχθούν τα νανοσωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, διάλυμα πολυμερούς σε διαλύτη προστίθεται στην υδατική φάση καθώς αναδεύεται. Στη συνέχεια προστίθεται νερό και προκαλείται νανοκαθίζηση. Λόγω της συνεχούς ανάδευσης διασπείρεται η οργανική φάση με τη μορφή σφαιριδίου και ύστερα μέσω του σταθεροποιητή της διεπιφάνειας, σταθεροποιείται το γαλάκτωμα. Το μέγεθος των σφαιριδίων μπορεί να μειωθεί με ομογενοποίηση και προσθήκη νερού. Έτσι αποσταθεροποιείται τη διάχυση του

οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση με αποτέλεσμα να δημιουργείται τοπικός υπερκορεσμός στην διεπιφάνεια και να σχηματίζονται τα νανοσωματίδια. Τέλος, με προσθήκη θερμότητας (40C) απομακρύνεται η οργανική φάση (Davinders et al., 2013).

- Ξήρανση με εκνέφωση:

Σε αυτή τη μέθοδο παράγονται μικροσωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της διαδικασίας της εξάτμισης διαλύτη σταγόνες διαλύματος μετατρέπονται σε ξηρά σωματίδια. Η διαδικασία παραγωγής των σωματιδίων και οι ιδιότητες τους εξαρτώνται από τις ιδιότητες του διαλύτη και από τις μεταβλητές της διεργασίας ξήρανσης με εκνέφωση (Davinders et al., 2013).

- Κροκίδωση ή ιοντική συμπλοκοποίηση:

Οι δύο υδατικές φάσεις αλληλεπιδρούν ηλεκτρικά μεταξύ τους και δημιουργούνται θρόμβοι. Μέσω της ιοντικής συμπλοκοποίησης το λιπίδιο μετατρέπεται σε σύμπλοκο λόγω των ιοντικών συνθηκών αλληλεπίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου (Davinders et al., 2013).

- Εξάτμιση διαλύτη από διπλό γαλάκτωμα:

Αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου εξάτμισης διαλύτη από απλό γαλάκτωμα. Πιο αναλυτικά, προκειμένου να συλλεχθούν τα νανοσωματίδια πραγματοποιείται υπερφυγοκέντρωση και ακολούθως λυοφιλοποίηση. Το μέγεθος που θα αποκτήσουν τα νανοσωματίδια από αυτή τη μέθοδο παραγωγής εξαρτάται από την ένταση, τον χρόνο, τον τρόπο γαλακτωματοποίησης, την ποσότητα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν, την συγκέντρωση πολυμερούς, το ιξώδες της οργανικής και της υδατικής φάσης και τέλος την θερμοκρασία. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ευκολία της παρασκευής των νανοσωματιδίων και το γεγονός ότι αυξάνεται ο βαθμός εγκλεισμού πρωτεϊνικών ουσιών χάρη στην υψηλή διαλυτότητά τους στο νερό (Cleland et al., 1996).

1.10 Ιδιότητες των NPs

Τα NPs έχουν μοναδικές ηλεκτρικές, μαγνητικές, μηχανικές και θερμικές ιδιότητες (Fabrega et al., 2011; Luoma, 2008). Οι ηλεκτρικές εξαρτώνται άμεσα από τις οπτικές τους ιδιότητες (Eustin και El-Sayed, 2006), ενώ οι μαγνητικές ιδιότητές τους έχουν μεγάλη εφαρμογή στην Ιατρική Διαγνωστική, όπως η μαγνητική τομογραφία, αλλά και στο περιβάλλον με την απολύμανση των υδάτων (Wu et. al., 2008). Οι μηχανικές ιδιότητες των μεταλλικών NPs, όπως η πήξη, η σκληρότητα, η επίστρωση της επιφάνειας, η ικανότητα προσκόλλησης και η ελαστικότητα, διαφέρουν από αυτές των συμβατικών μετάλλων (Guo et. al., 2014), ενώ η θερμική αγωγιμότητά τους (όπως συμβαίνει στην περίπτωση του Cu NP) μπορεί να είναι 700 φορές μεγαλύτερη από την τιμή αγωγιμότητας του νερού.

1.11 Τεχνικές χαρακτηρισμού NPs

Τα NPs αποτελούνται από (α) τον πυρήνα που είναι το κύριο μέρος, (β) το στρώμα του κελύφους, που έχει διαφορετική χημική σύσταση από τον πυρήνα και (γ) το επιφανειακό στρώμα (Shin et. al, 2016). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα NPs είναι σύνθετα μόρια με διαφορετική σύσταση, μέγεθος και σχήμα που ποικίλει μεταξύ συμμετρικών (π.χ. σφαίρα, κύβος κ.λπ.) και μη-συμμετρικών σχημάτων (π.χ. διακλαδισμένα συστήματα), είναι σημαντικός ο χαρακτηρισμός τους (σχήμα, μέγεθος, δομή, μορφολογία), προκειμένου να ερμηνεύσουμε πολλές από τις ιδιότητές τους.

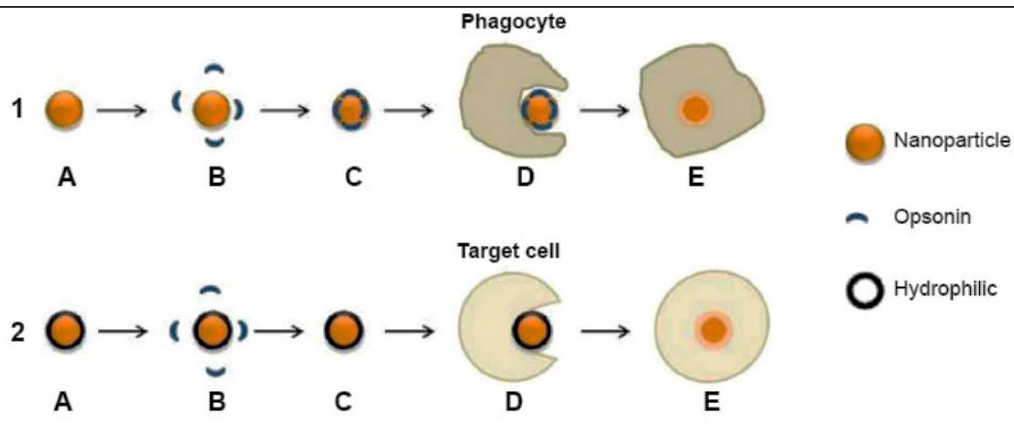
Η μορφολογία των NPs, καθώς και η σύσταση και η φύση τους, μελετώνται με σύγχρονες τεχνικές μικροσκοπίας, όπως (α) η μικροσκοπία πολωμένου φωτός (polarized optical microscopy/POM), (β) η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης/διαπερατότητας δέσμης (transmission electron microscopy/TEM), (γ) η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (scanning electron microscopy/SEM), ενώ οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της δομής τους είναι (α) η περίθλαση ακτίνων X (X-ray diffraction/XRD), (β)

η φασματοσκοπία ακτίνων X (energy – dispersive X-ray/EDX) και γ) η φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων X (X-ray photoelectron spectroscopy/XPS). Επίσης, δεδομένου ότι το μέγεθος των NPs παίζει σημαντικό ρόλο στην εν γένει συμπεριφορά τους, ο προσδιορισμός του πραγματοποιείται συνήθως με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης του φωτός (dynamic light scattering/DLS) (Khan et al., 2017).

1.12 Τρόποι πρόσληψης των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα

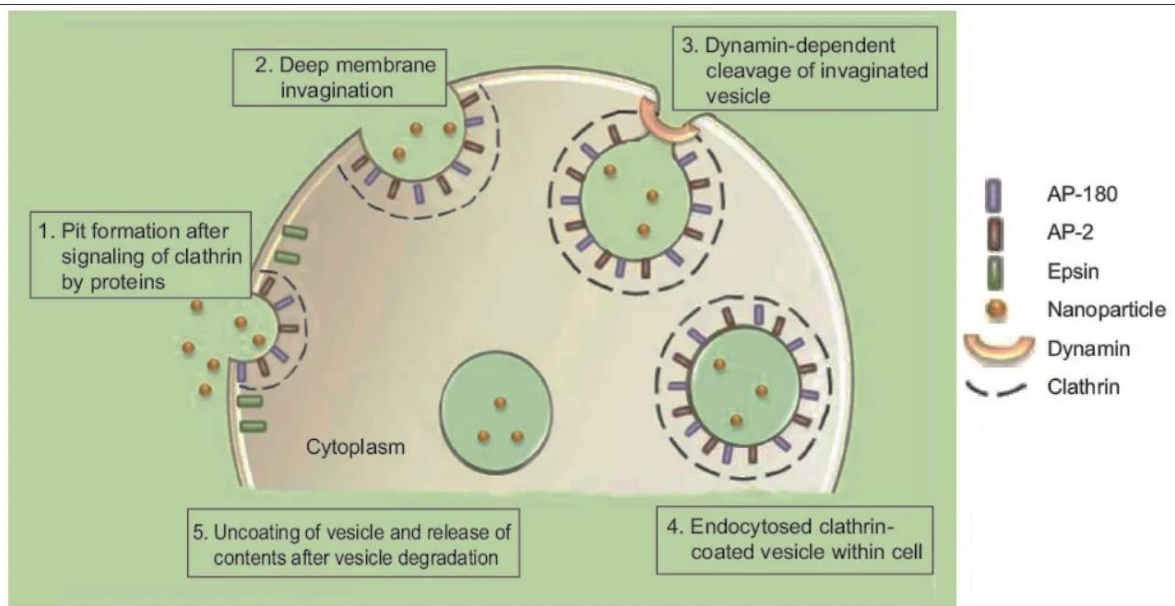
Οι τρεις βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους το κύτταρο μπορεί να προσλάβει έναν νανομεταφορέα και συγκεκριμένα το νανοσωματίδιο είναι η φαγοκυττάρωση, η ενδοκύττωση και η πινοκύττωση. Αναλύοντας κάθε μηχανισμό ξεχωριστά επισημαίνουμε πως:

- η φαγοκυττάρωση είναι μια διαδικασία η οποία απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και επηρεάζεται από την θερμοκρασία, τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Τα κύρια κύτταρα που πραγματοποιούν την φαγοκυττάρωση είναι τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα. Παρόλα αυτά μπορεί να πραγματοποιηθεί και από ινοβλάστες, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα σε μικρότερο βαθμό. Κατά την φαγοκυττάρωση αρχικά το νανοσωματίδιο αναγνωρίζεται με οψωνισμό και επισημαίνονται με οψωνίνες. Έτσι προσκολλώνται στα κύτταρα με υποδοχείς και τα μικροϊνίδια ακτίνης δημιουργούν ψευδοπόδια σχηματίζοντας εγκολπώσεις. Το φαγόσωμα το οποίο εμπεριέχει το νανοσωματίδιο, την ανοσοσφαιρίνη γ, την πρωτεΐνη συμπληρώματος και τις οψωνίνες μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Το κυστίδιο αυτό μετακινείται προς το λυσόσωμα σχηματίζοντας το φαγολυσόσωμα το οποίο έχει όξινο περιβάλλον (Kumari et al., 2010; Hillaireau et al., 2009; Groves et al., 2008; Park et al., 2009) (**Εικόνα 5**).



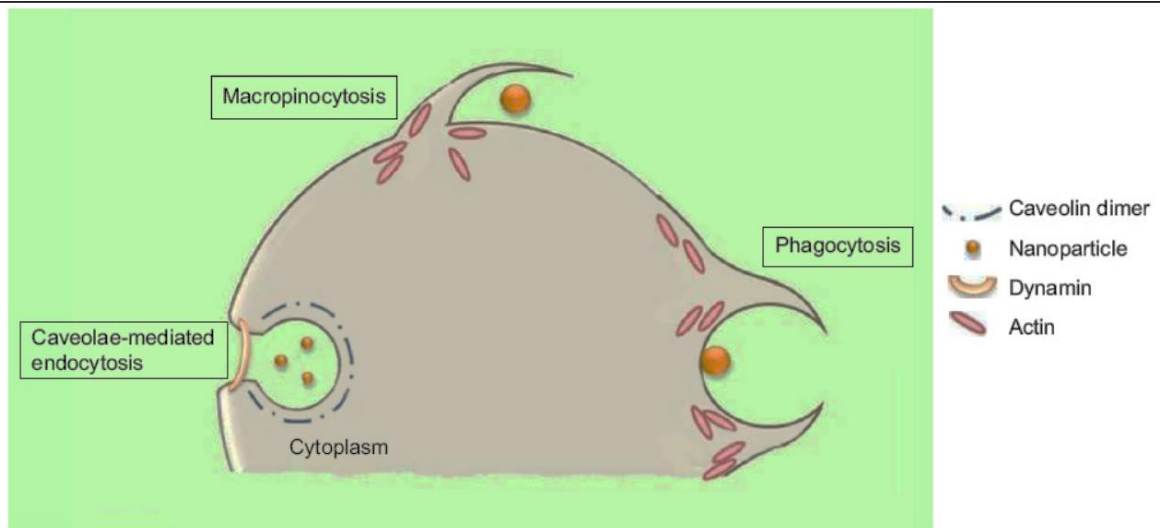
Εικόνα 5. (1) Διαδρομή μη επικαλυμμένου υδρόφοβου νανοσωματιδίου. (2) μονοπάτι επικαλυμμένου υδρόφιλου νανοσωματιδίου. Σημειώσεις: (1) (Α) Νανοσωματίδια στην κυκλοφορία του αίματος. (Β) οι οψονίνες αναγνωρίζουν τα νανοσωματίδια ως ξένο σώμα λόγω της υδρόφοβης επιφάνειας. (Γ) οψωνοποίηση νανοσωματιδίων. (Δ) και (Ε) φαγοκυττάρωση από φαγοκύτταρο και εξάλειψη νανοσωματιδίων. (2) (Α) Υδρόφιλο νανοσωματίδιο επικαλυμμένο με πολυμερές στην κυκλοφορία του αίματος. (Β) το στερικό εμπόδιο διατηρεί απωστικές δυνάμεις μεταξύ οψονινών και νανοσωματιδίων. (Γ) το νανοσωματίδιο συνεχίζει να κυκλοφορεί έως ότου επιτευχθεί ο στόχος. (Δ) και (Ε) ενδοκυττάρωση από κύτταρο στόχο (πηγή: Murugan et al., 2015).

- Η ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από κλαθρίνη κατά την οποία δημιουργείται μεμβρανική εσοχή επικαλυπτόμενη από πολλές πρωτεΐνες και κυρίως την κλαθρίνη. Η κλαθρίνη συμμετέχει στο σχηματισμό τριμερούς συμπλέγματος με συμμετρική δομή το οποίο ονομάζεται δομή τρισκέλιον ή τρισκελής. Τα πολυγωνικά αυτά πλέγματα μετατρέπουν την εσοχή σε κυστίδιο τα οποίο εμπεριέχουν τα νανοσωματίδια. Τα κυστίδια μεταφέρουν τα νανοσωματίδια στο προλυοσωμικό οργανίδιο (αρχικό ενδόσωμα) το οποίο ωρίμαζει και μετατρέπεται σε τελικό ενδόσωμα. Στην συνέχεια ακολουθεί η σύντηξη του με το λύοσωμα και η απελευθέρωση προϊόντων αποικοδόμησης των νανοσωματιδίων στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, η ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από κλαθρίνη απαιτείται υδρόλυση ATP και συμμετοχή GTP-συνδεόμενων πρωτεϊνών (Xiang et al., 2012) **(Εικόνα 6)**.



Εικόνα 6. Μηχανισμός ενδοκύτωσης με την μεσολάβηση μορίων κλαθρίνης (πηγή: Murugan et al., 2015)

- Η ενδοκύττωση με μεσολάβηση μορίων καβεολίνης κατά την οποία η κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου δημιουργεί εγκολπώσεις στις οποίες τα νανοσωματίδια εγκλωβίζονται και μετακινούνται προς το κυτταρόπλασμα. Τα κυστίδια που σχηματίζονται στην κυτταρική επιφάνεια διαθέτουν ινώδες κάλυμμα από την πρωτεΐνη καβεοζίνη. Τα συγκεκριμένα κυστίδια είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη και λιπίδια. Χαρακτηριστικό την συγκεκριμένης ενδοκύττωσης είναι ότι το νανοσωματίδιο διαφεύγει την λυοσωμική αποικοδόμηση (Kumari et al., 2010; Xu et al., 2012) (**Εικόνα 7**).

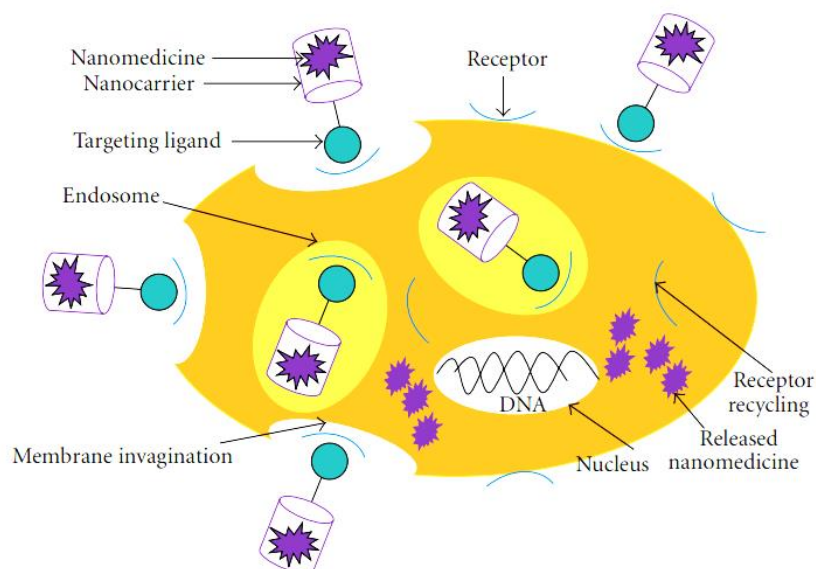


Εικόνα 7. Οι μηχανισμοί της ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση καβεολίνης, της μακροπινοκύτωσης και της φαγοκυττάρωσης (πηγή: Murugan et al., 2015).

- Η μακροπυκνότητα κατά την οποία σχηματίζονται ψευδοπόδια (διαδικασία καθοδηγούμενη από ακτίνη) από την μεμβράνη χωρίς να κυκλώνουν το σωματίδιο αλλά εκείνο συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια δημιουργούνται ενδοκυτταρικά κυστίδια (μακροπυκνωσώματα) τα οποία συντήκονται μεταξύ τους, αποκτούν όξινο pH και συρρικνώνονται. Στο τελικό στάδιο μπορεί να συντηχθούν με τα λυοσώματα ή να ανακυκλώσουν το περιεχόμενό τους στην κυτταρική επιφάνεια (Kerr et al., 2009; Falcone et al., 2006).

1.13 Σύνδεση νανοσωματιδίου-αντιγόνου και απορρόφηση από το κύτταρο

Συνήθως τα νανοσωματίδια που μεταφέρουν αντιγόνα είναι συνδεδεμένα μέσω φυσικής προσρόφησης. Η σύνδεση αυτή είναι ασθενής και βασίζεται στην υδροφοβική αλληλεπίδραση. Νανοσωματίδια που πραγματοποιούν απλή φυσική προσρόφηση είναι αυτά του χρυσού, του διοξειδίου του πυριτίου και του φωσφορικού ασβεστίου. Άλλος τρόπος για την μεταξύ τους σύνδεση είναι η χημική σύζευξη η οποία αποτελεί μία πιο σταθερή σύνδεση. Κατά την χημική σύζευξη το αντιγόνο συνδέεται χημικά με την επιφάνεια του νανοσωματιδίου και για να απελευθερωθεί μέσα στο κύτταρο-στόχο θα πρέπει να προσληφθεί μαζί με το νανοσωματίδιο που το μεταφέρει και στην συνέχεια να αποσυνδεθούν μέσα στο κύτταρο. Ο τελευταίος σταθερός τρόπος σύνδεσης του αντιγόνου με τον νανομεταφορέα του είναι ο εγκλεισμός. Εκεί τα αντιγόνα αναμειγνύονται με πρόδρομες ουσίες των νανοσωματιδίων κατά την διάρκεια σχηματισμού τους με αποτέλεσμα τα αντιγόνα να μπορούν να απελευθερωθούν μέσα στο κύτταρο-στόχο όταν προσληφθούν από αυτό και αποσυντεθεί το αντίσωμα που το εμπεριέχει. Πρέπει να αναφερθεί πως τα λιποσώματα και τα πολυμερικά νανοσωματίδια έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τα αντιγόνα και με τους δύο τελευταίους τρόπους, δηλαδή την χημική σύζευξη και τον εγκλεισμό (Akashi, 2011) (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Διάγραμμα που απεικονίζει την εσωτερίκευση του νανοφαρμάκου από το κύτταρο. Στο αρχικό στάδιο, το φάρμακο κολπίζει το κύτταρο μεμβράνη για να επιδιώξει την είσοδο στο κύτταρο. Μέσα στο κύτταρο, περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη που σχηματίζει το ενδοσώμα. Από το ενδοσώμα, το περιεχόμενο του φαρμάκου και οι συνδέτες στόχοι απελευθερώνονται, εξαπλώνονται στο κύτταρο. Ενώ το φάρμακο θεραπεύει την ασθένεια, οι συνδέτες μεταναστεύουν προς την κυτταρική επιφάνεια να συμμετέχει στη στόχευση φαρμάκων, ξεκινώντας έτσι έναν νέο κύκλο δραστηριότητας (πηγή: Khanna, 2012) .

1.14 Ανοσοενισχυτικά

Ταυτόχρονα με την χορήγηση νανοσωματιδίων που μεταφέρουν αντιγόνα γίνεται και χορήγηση ανοσοενισχυτικών ουσιών προάγοντας την ανοσολογική απάντηση. Με αυτή την προσθήκη επιταχύνεται η παραγωγή αντισωμάτων έναντι του καρκινικού κυττάρου σε λιγότερο χρόνο και μελλοντική προστασία μέσω της κυτταρικής μνήμης.

Με την συγχορήγηση των ανοσοενισχυτικών είναι δυνατό να μειώσουμε την ποσότητα χορήγησης αντιγόνου μέσω των νανοσωματιδίων ή τη συχνότητα των δόσεων. Τα ανοσοενισχυτικά είναι προτιμότερο να χορηγούνται σε νεογνά και σε ηλικιωμένα άτομα (Μίχος, 2010). Χρησιμοποιούνται πέντε είδη ανοσοενισχυτικών ουσιών: μεταλλικά άλατα, ανοσοενισχυτικά προερχόμενα από μικροοργανισμούς, γαλακτώματα, κυτταροκίνες και πολυσακχαρίτες (Μαθθαιολαμπάκης, 2009).

Αναλύοντας κάθε είδος ξεχωριστά, στην πρώτη κατηγορία χρησιμοποιούνται υδροξείδιο του αλουμινίου, φωσφορικά άλατα αλουμινίου, άλατα ασβεστίου, σιδήρου και ζirkονίου. Τα δύο πρώτα προκαλούν αλλεργίες, νευροτοξικότητα και αυξημένη παραγωγή αντισώματος IgE. Αντίθετα, ενώ στα υπόλοιπα τρία έχουμε αυξημένη χυμική απάντηση η επαγωγή κυτταρικών απαντήσεων είναι ανεπαρκής με αποτέλεσμα να μην υπάρχει προστασία έναντι των μεταλλαγμένων κυττάρων.

Στο δεύτερο είδος ανήκουν ουσίες προερχόμενες από βακτήρια (όπως η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων) ή μύκητες και πολυσακχαρίτες οι οποίοι ενισχύουν την ανοσολογική απάντηση. Ακόμα, μπορεί να αποτελέσουν πηγή ανοσοενισχυτικών ουσιών τα ίδια τα βακτήρια όπως *C. Granulosum*, *Bordetella pertussis* *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum* και *Neiseria meningitides* τα οποία παρόλα αυτά δεν μπορούν να χορηγηθούν στον ανθρώπινο οργανισμό όντας τοξικά για εκείνον. Τέλος, στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τοξίνες προερχόμενες από βακτήρια όπως η βακτηριακή ενδοτοξίνη του λιπιδίου A και η θερμοευαίσθητη εντεροτοξίνη από την *Escherichia coli*.

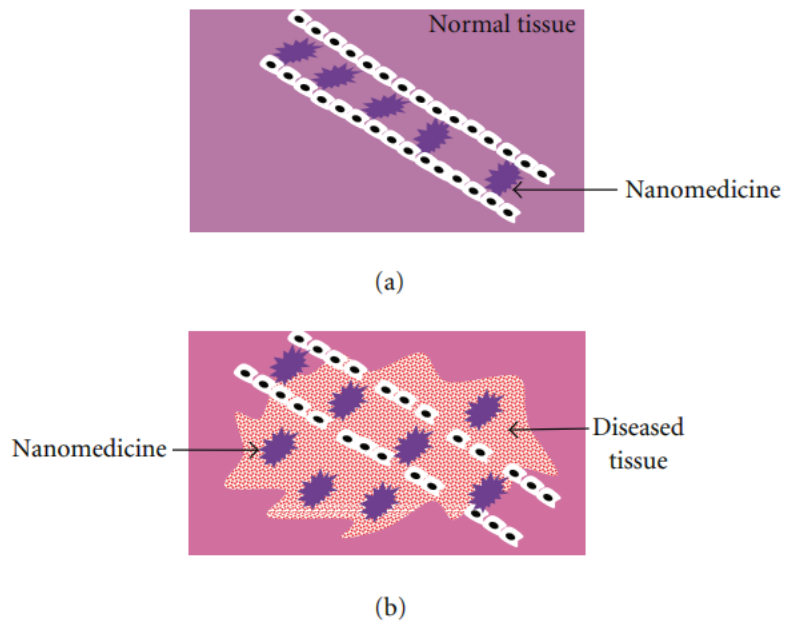
Στην ομάδα των γαλακτωμάτων ανήκουν τα οργανικά διαλύματα σε νερό ή νερού σε οργανικό διαλύτη όπου τα συγκεκριμένα ανοσοενισχυτικά έχουν αργή αποδέσμευση αντιγόνου και διέγερση των T λεμφοκυττάρων. Όντας εξαιρετικά τοξικά για τον άνθρωπο προκαλώντας φλεγμονή και έλκος, η χρήση τους περιορίζεται σε ασθενής με καρκίνο τελευταίου σταδίου. Λόγω της μεγάλης τοξικότητας τους έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανοσοενισχυτικά φυσικά έλαια, ελαίου σε νερό και νερού σε έλαιο τα οποία έχουν μικρότερη τοξικότητα και αυξημένη αποτελεσματικότητα. Στις κυτταροκίνες περιλαμβάνεται η ιντερλευκίνη 12 η οποία προάγει την ανοσοαπόκριση. Στην τελευταία κατηγορία των πολυσακχαριτών ανήκει ο υδρογονάνθρακας ινσουλίνη η οποία όταν αποκτήσει μικροσωματιδιακή μορφή αποκτά ανοσοενισχυτικές ιδιότητες. Έτσι διαπιστώνουμε πως ο ανοσοενισχυτικός παράγοντας θα πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά προκειμένου να χρησιμοποιείται στην καθημέρα πράξη και να είναι ασφαλής για τον ασθενή. Πιο αναλυτικά αυτά τα χαρακτηριστικά είναι (Ματθαιολαμπάκης, 2009):

- να μην προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες και αυτοάνοσα νοσήματα στον ασθενή
- να είναι χημικά σταθερά και με μεγάλο χρόνο ζωής
- να παράγονται εύκολα και οικονομικά
- να προκαλούν ανοσολογική απάντηση και να παράγουν αντισώματα
- να δημιουργείται ανοσολογική μνήμη μέσω των Toll-like υποδοχέων

1.15 Τρόποι στόχευσης πάσχοντα ιστό

Οι νανομεταφορείς όντας φορτωμένοι με κάποια δραστική ουσία, μόρια ή νανοσωματίδια έχουν ως στόχο να την μεταφέρουν στον συγκεκριμένο πάσχοντα καρκινικό ιστό. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω της φυσικής – παθητικής διαδικασίας είτε μέσω της ενεργητικής – μοριακής. Κατά την πρώτη νανομεταφορείς συνδεδεμένοι με ουσίες μικρού μοριακού βάρους έχουν την ικανότητα να διαπερνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη αν όχι όλων

τότε των περισσότερων ιστών με αποτέλεσμα να χάνεται η στοχευμένη μεταφορά ουσιών σε συγκεκριμένο ιστό του οργανισμού. Αντίθετα, ουσίες με μεγάλο μοριακό βάρος (άνω του 40kDa) αποφεύγουν μηχανισμούς αποβολής από το σώμα όπως μεταβολισμός, απέκκριση, οψωνισμός και φαγοκυττάρωσης ώστε να μπορούν να μείνουν στην γενική κυκλοφορία για περισσότερο χρονικό διάστημα. Έτσι αυξάνεται η συγκέντρωση των νανομεταφορέων στο αίμα και μέσω διάχυσης να περνούν στα αιμοφόρα αγγεία των καρκινικών όγκος έχοντας πιο διαπερατά τριχοειδή αγγεία σε συγκριτικά με αυτά των υγιών ιστών. Τα νανοσωματίδια ταξιδεύουν μέσω των αγγείων και στην περιοχή του όγκου το μεταφερόμενο φάρμακο διεισδύει μέσω των οπών του αγγείου στον όγκο-στόχο (**Εικόνα 9**). Συγκριτικά με τους νανομεταφορείς μικρού μοριακού βάρους ουσιών επιτυγχάνεται η στοχευμένη και κατευθυνόμενη μεταφορά τους σε καρκινικούς ιστούς (Khanna, 2012; Αναγνώστου, 2012).



Εικόνα 9. Παθητική στόχευση φαρμάκων μέσω διαρρέοντων αιμοφόρων αγγείων στο καρκινικό τμήμα. (α) Στον φυσιολογικό ιστό, δεν υπάρχουν ρήξεις και η Το φάρμακο ταξιδεύει σταθερά μέσω του αιμοφόρου αγγείου. (β) Στην προσβεβλημένη από τον όγκο περιοχή, το φάρμακο διεισδύει μέσω οπών και συσσωρεύεται στην όγκος. Έτσι, συσσωρεύεται υψηλή συγκέντρωση φαρμάκου στην τελευταία περιοχή, ξεκινώντας την επουλωτική δράση (πηγή: Khanna, 2012).

Έχει παρατηρηθεί πως ιστοί με φλεγμονή απελευθερώνουν χημειοτακτικούς παράγοντες οι οποίοι οδηγούν σε αγγειακή αναδιαμόρφωση και εξαγγείωση λευκοκυττάρων. Έτσι αυξάνεται η διαπερατότητα τους σε νανομεταφορείς.

Είναι γνωστό πως τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να αναπαράγονται ταχύτατα με αποτέλεσμα να δημιουργείται η ανάγκη για νεοαγγειογένεση προκειμένου να συνεχίσουν τα κύτταρα να προσλαμβάνουν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά από την κυκλοφορία του αίματος μέσα στα αγγεία. Το γεγονός αυτό προκαλεί δυσαναλογία μεταξύ των αγγειογενετικών παραγόντων (αυξητικοί παράγοντες) με των μεταλλοπρωτεϊνών οδηγώντας σε διογκωμένα αγγεία με άφθονους πόρους, διογκωμένες συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και διαταραγμένη λεμφική παροχέτευση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ναοσωματίδια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 50kDa να συγκεντρώνονται στον διάμεσο όγκο (Cho et al., 2008).

Στη δεύτερη κατηγορία (μοριακή) πραγματοποιείται ενεργητική στόχευση υποδοχέων των καρκινικών κυττάρων ή των ενδοθηλιακών αγγειογενετικών κυττάρων. Στη μοριακή στόχευση η ουσία και ο νανομεταφορέας ενώνονται με ένα μόριο το οποίο μπορεί να είναι ένα από παρακάτω: αντίσωμα, υδατάνθρακας, πεπτίδιο ή ολιγονουκλεοτίδιο. Τα μόρια αυτά ονομάζονται κατευθυντήριες ομάδες (targeting moiety). Έτσι, δημιουργείται ένα σύμπλοκο μεταξύ του συνδέτη ή αντίσωμα που δρουν ως κατευθυντήριες ομάδες, ενός πολυμερούς ή λιπιδίου (φορέας) και του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου. Στη συνέχεια, συνδέονται με το κύτταρο-στόχο και μέσω ενδοκυττάρωσης εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Η δυσκολία στον συγκεκριμένο τρόπο στόχευσης έγκειται στο να βρεθούν μη ανοσολογικές και εξειδικευμένες κατευθυντήριες ομάδες. Προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της ενεργητικής στόχευσης είναι να εκφράζονται πλήρως και ομοιογενώς τα αντιγόνα στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και να μην αποβάλλονται γρήγορα από το οργανισμό. Η μοριακή στόχευση έχει βρει εφαρμογή στον καρκίνο του μαστού όπου η αντικαρκινική ουσία doxorubicin βρίσκεται εγκλωβισμένη σταθεροποιημένα

λιποκύτταρα και τα τελευταία συνδέονται με συγκεκριμένο τμήμα μονοκλωνικού αντισώματος (fab). Όταν χορηγείται αυτό το σύμπλεγμα εμποδίζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού τα οποία υπερεκφράζουν την HER2/new (Khanna, 2012; Αναγνώστου, 2012).

1.16 Μικροπεριβάλλον του όγκου

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) εκτός από τα πολλά και διαφορετικά κύτταρα όπως τα ανοσοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα φλεγμονώδη κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα αποτελείται και από τα αγγεία, τις χημειοκίνες και την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) (Wu et al., 2017; Denton et al., 2018; Guo et al., 2018).

Τα ανοσοκύτταρα συμπεριλαμβανόμενου των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (DCs) μπορούν να επιτεθούν στα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα να εκριζώνεται ο όγκος. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες στο TME γνωστοί ως CAFs συνθέτουν μεγάλο ποσοστό ECM στο μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζοντας την εξέλιξη του όγκου και την εξέλιξη της θεραπείας (Hirata et al., 2017).

Στο περιβάλλον του όγκου παρατηρείται υποξία, γεγονός που οφείλεται στη ανώμαλη αγγείωση. Η υποξία οδηγεί στην εξέλιξη του όγκου και περιορίζει την θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Το μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζει τη διείσδυση, τη λειτουργικότητα και την ανοχή του φαρμάκου με αποτέλεσμα τα χαμηλά ποσοστά ανταπόκριση.

Έτσι η τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου είναι μία επιλογή που απασχολεί τους ερευνητές που ενδιαφέρονται για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου (Musetti et al., 2018; Rajendrakumar et al., 2018). Οι στρατηγικές διαμόρφωσης του TME του όγκου έχουν ως στόχο την θεραπευτική αποτελεσματικότητα και τις ανθεκτικές αποκρίσεις (Casey et al., 2015; Dougan et al., 2017). Οι παράγοντες από τους οποίους διαμορφώνεται το TME είναι ένα ανταγωνιστή κυτταροτοξικού αντιγόνου λεμφοκυττάρου 4 (CTLA4), ένα αντι-

ιντερλευκίνης-6 μονοκλωνικό αντίσωμα siltuximab, ένα αντίσωμα έναντι του χημειοελεγκτικού χημειοκινών υποδοχέα 2 (CCL2) carlumab και ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής των $\alpha 4\beta 1$ και $\alpha 4\beta 7$ ιντεγκρινών natalizumab και έχουν δείξει επιτυχία ως προς την θεραπεία των όγκων (Uy et al., 2012; Song et al., 2014; Podar et al., 2011).

Συγκριτικά με τα αντικαρκινικά φάρμακα τα νανοσωματίδια παρατείνουν τον χρόνο κατακράτησης και στόχευση στον πάσχοντα ιστό μειώνοντας έτσι την τοξικότητα. Ακόμη, τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να αλλάξουν το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον TME. Η υποξία του TME οδηγεί σε ανοσοκαταστολή συσσωρεύοντας ανοσοκατασταλτικά κύτταρα όπως τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) και τα κατασταλτικά κύτταρα προερχόμενα από μυελοειδή (MDSCs) και εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες (VEGF και TGF- β). Αυτά τα υποκατάστατα αναστέλλουν τις λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων, μεταφέρουν μακροφάγα στον προ-ογκογόνο φαινότυπο M2 και οδηγούν σε ανώμαλη ίνωση. Τα νανοσωματίδια μπορούν να στοχεύσουν αυτά τα συστατικά στο TME και να μετατρέψουν το ανοσοκατασταλτικό TME σε ανοσοϋποστήριξη με σκοπό την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας. Τα νανοσωματίδια με σύζευξη με συγκεκριμένους συνδέτες επιτυγχάνουν στοχευμένη παροχή στο TME και ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου ενισχύοντας την θεραπευτική αποτελεσματικότητα (Yang et al., 2017; Chen et al., 2018; Li et al., 2018)

1.17 Ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια αντιγόνου

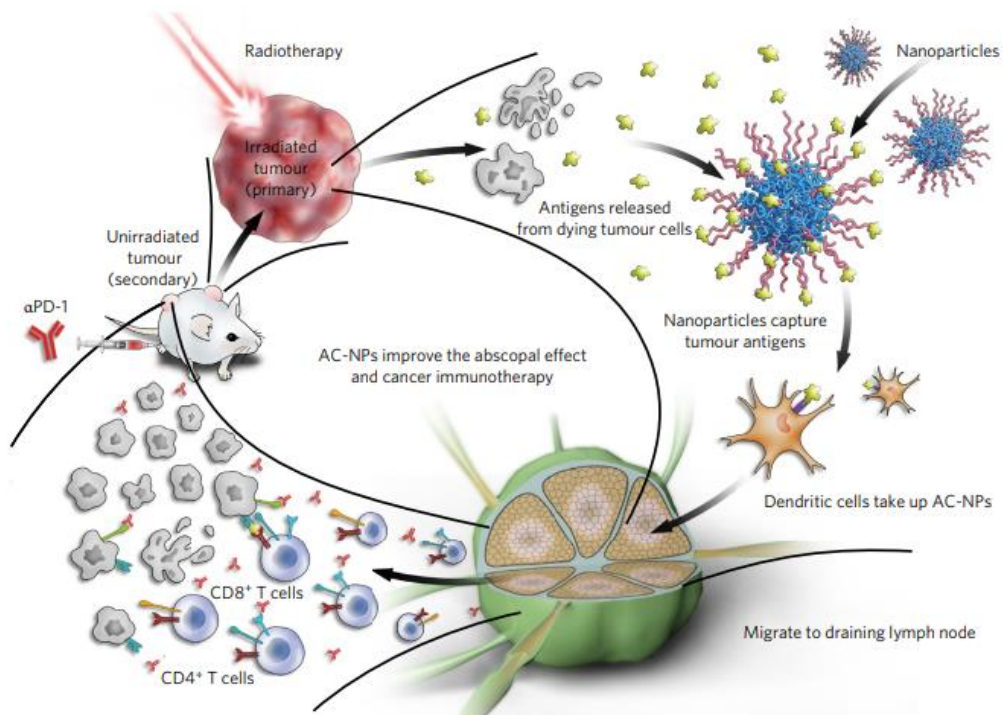
Η ανοσοθεραπεία είναι μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική διαδικασία που χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική ως βελτιωμένη θεραπεία κατά του καρκίνου (Couzin-Frankel, 2013; McNutt, 2013). Τα αντισώματα τα οποία μπλοκάρουν τις αρνητικές ρυθμιστικές οδούς του ανοσοποιητικού συστήματος (checkpoint inhibitors) (Pardoll, 2012), συμπεριλαμβάνοντας τα CTLA-4 και τους υποδοχείς PD-1 βελτιώνουν την επιβίωση σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο όπως το μελάνωμα, καρκίνος της ουροδόχου κύστης και

του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Brahmer et al., 2012; Hamid et al., 2013; Hodi et al., 2010; Topalian et al., 2012; Wolchok et al., 2013; Garon et al., 2015).

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας έγκειται στην φυσική άμυνα του ανοσοποιητικού του οργανισμού καθώς εμποδίζει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και την υποτροπή (Lu et al., 2016; Bourla et al., 2016; Tang et al., 2016). Αρκετοί συμπαγείς όγκοι αναγνωρίζονται και εξαφανίζονται μέσω ανοσολογικής επιτήρησης με κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα όπως CD8+ T κύτταρα και NK κύτταρα (Aguila et al., 2011; Overwijk et al., 2000). Καθώς αναπτύσσεται ο όγκος και πραγματοποιούνται αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του μετατρέπεται όλο και περισσότερο σε ανοσοκατασταλτικό.

Ο συνδυασμός ανοσοθεραπείας και ακτινοθεραπείας βελτιώνει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ειδικότερα όταν χρησιμοποιείται μία πιο βελτιωμένη προσέγγιση ανοσοθεραπείας με την χρήση νανοσωματιδίων που δεσμεύουν αντιγόνα (AC-Nps) (Couzin-Frankel, 2013; Postow et al., 2012). Τα AC-Nps παρέχουν ειδικές για τον όγκο πρωτεΐνες σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας Apd-1. Μελέτες έχουν δείξει πως τα AC-Nps προκαλούν αύξηση των CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων και αύξηση της αναλογίας CD4+/Treg και της CD8+/Treg. Τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να βελτιώσουν την θεραπευτική ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία μέσω της δέσμευσης από τον όγκο πρωτεϊνικών αντιγόνων (TDPAs) τα οποία ελευθερώνονται με την ακτινοβολία του όγκου. Αντιγόνα σχετιζόμενα με τον όγκο (TAAs) δεσμεύονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. (Fang et al., 2015; Smith et al., 2013; Goldberg et al., 2015; Irvine et al., 2015; Shao et al., 2015; Kim et al., 2015). Τέτοια κύτταρα είναι τα δενδριτικά και τα μονοκύτταρα μακροφάγα τα οποία επεξεργάζονται τα αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στα T κύτταρα μέσω μορίων μείζονος ιστοσυμβατότητας κατηγορία I και II (MHC I και MHC II). Για την ωρίμανση και την μεταφορά των αντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στους λεμφαδένες απαιτούνται

μονοπάτια ενεργοποίησης. Έτσι, το σύμπλοκο MHC-TAA αναγνωρίζεται από το T- κύτταρο το οποίο διαθέτει υποδοχέα T-κυττάρων και στην συνέχεια ακολουθεί η σηματοδότησης της κυτοκίνης με αποτέλεσμα να σχηματίζονται T λεμφοκύτταρα ειδικά για τον όγκο τα οποία μεταναστεύουν στον πρωτοπαθή όγκο και στην συνέχεια σε όλο το σώμα με σκοπό να υπερνικήσει τις μεταστάσεις (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της χρήσης AC-NPs για τη βελτίωση της ανοσοθεραπείας του καρκίνου. Μετά την ακτινοθεραπεία, τα AC-NPs συνδέονται με αντιγόνα όγκου και βελτιώνουν την παρουσίασή τους στα δενδριτικά κύτταρα. Η βελτιωμένη παρουσίαση αντιγόνου και η ανοσολογική ενεργοποίηση είναι συνεργιστική με τη θεραπεία με aPD-1 (πηγή: Min et al., 2017).

2. Μέθοδοι

Η απαιτούμενη βιβλιογραφία συλλέχτηκε από τις παρακάτω βάσεις δεδομένων

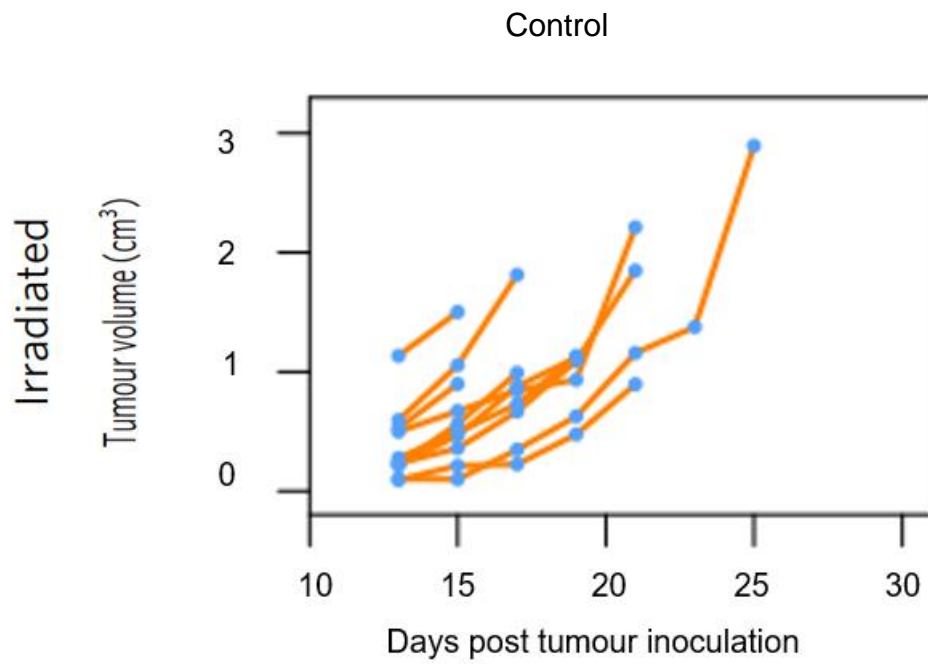
- PubMed
- NCBI
- ClinicalTrials.gov
- EMBASE
- SCOPUS
- Cochrane Library
- Web of Science

Από τις συγκεκριμένες βάσεις χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 148 papers.

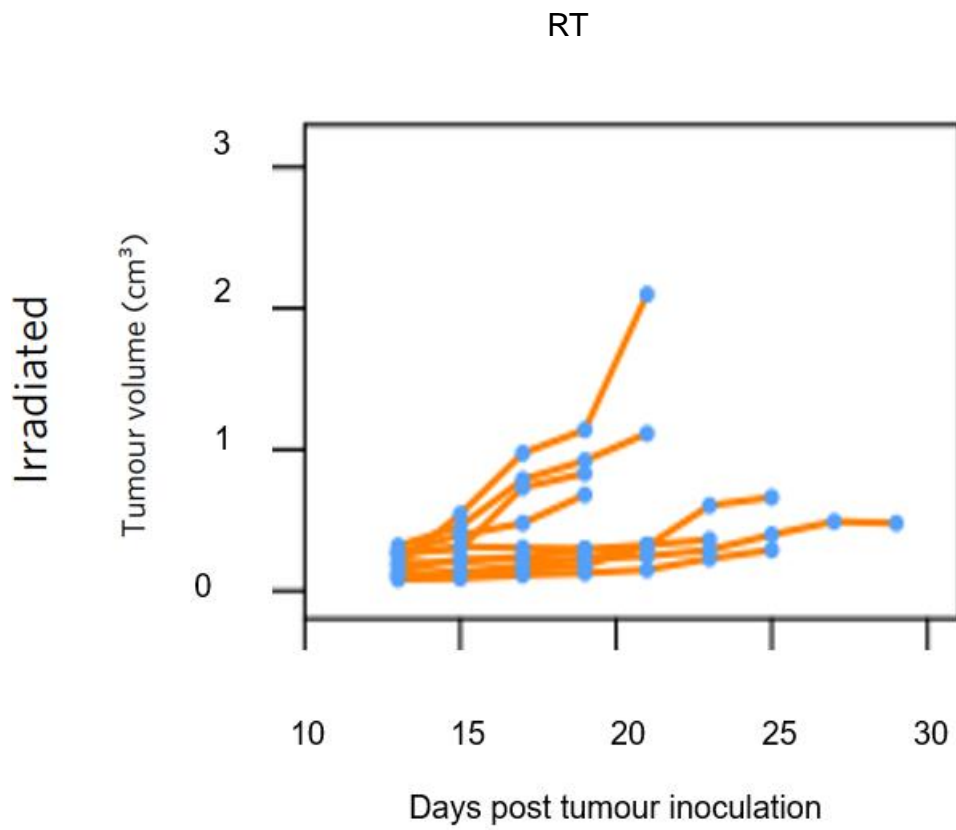
Η επιλογή των μελετών έγινε με κριτήριο την αγγλική γλώσσα, χρονικό περιορισμό μικρότερο των 26 ετών και αφορούσαν κλινικές δοκιμές, άρθρα και άρθρα ανασκόπησης.

Αποτελέσματα

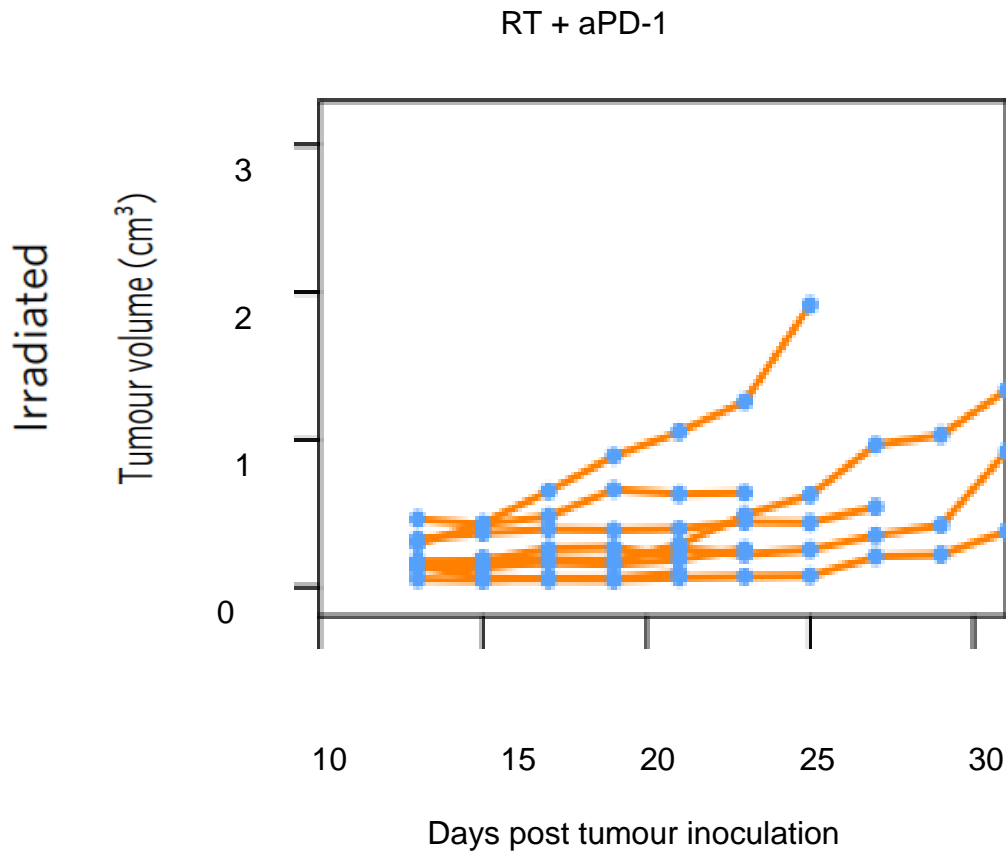
Πίνακας 1. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων (πρωτοπαθών) όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που δεν υποβλήθηκαν σε καμία θεραπεία (πηγή: Min et al., 2017).



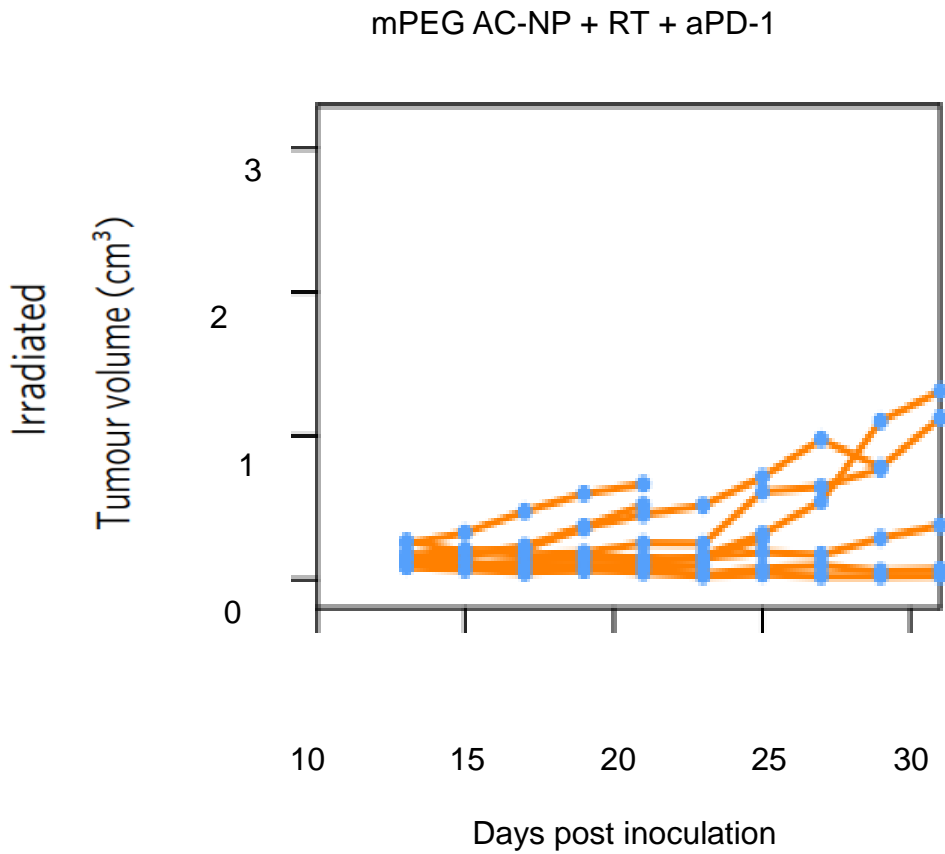
Πίνακας 2. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων (πρωτοπαθών) όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία (πηγή: Min et al., 2017).



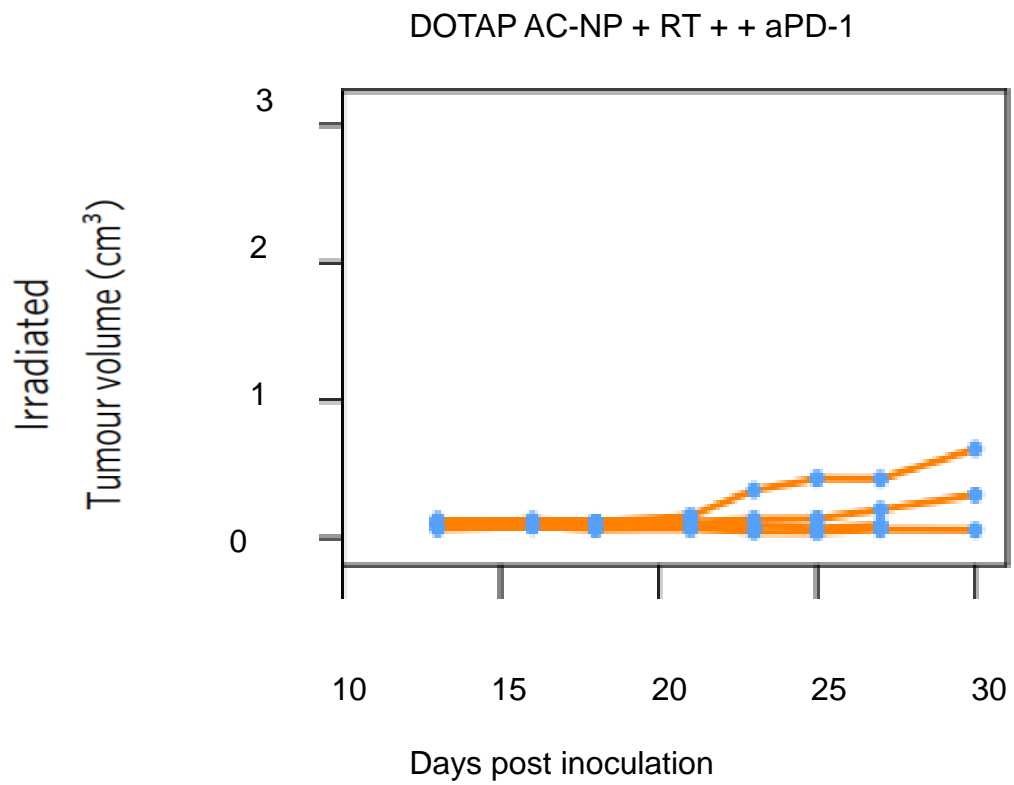
Πίνακας 3. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων (πρωτοπαθών) όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανοσοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (Min et al., 2017)



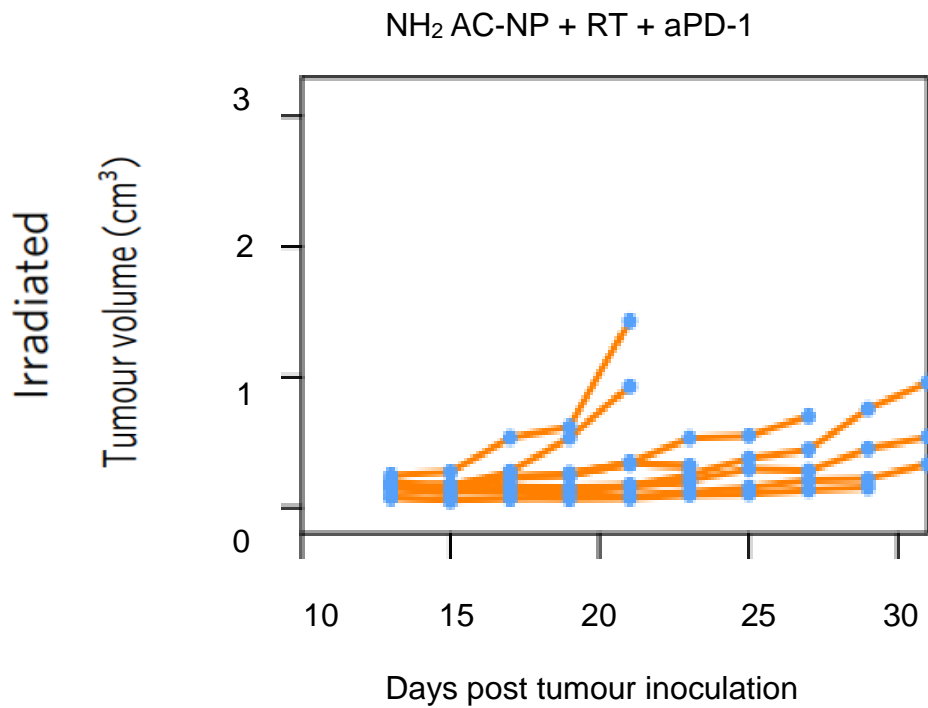
Πίνακας 4. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων (πρωτοπαθών) όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανοσοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και mPEG AC-NP (πηγή: Min et al., 2017).



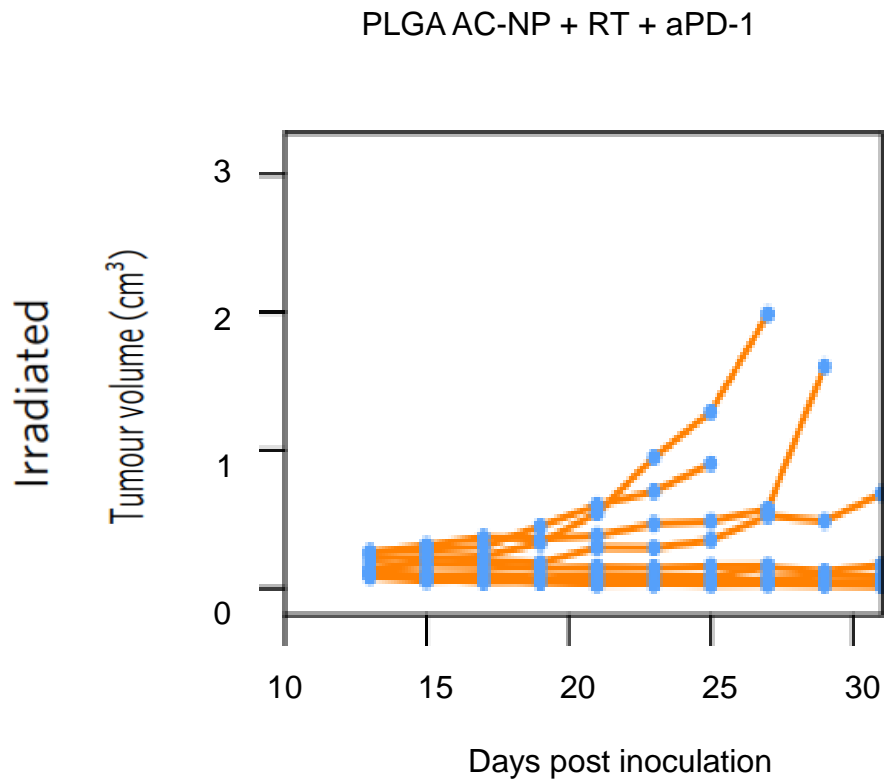
Πίνακας 5. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανοσοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και DOTAP AC-NP (Min et al., 2017)



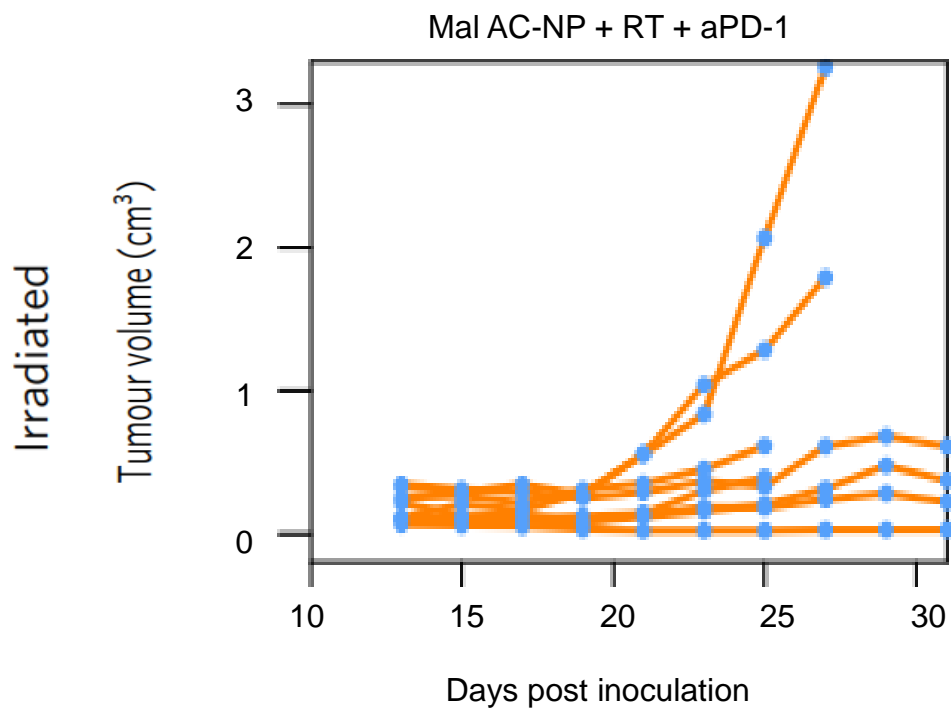
Πίνακας 6. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανοσοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και NH₂ AC-NP (Min et al., 2017).



Πίνακας 7. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανοσοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και PLGA AC-NP (πηγή: Min et al., 2017).

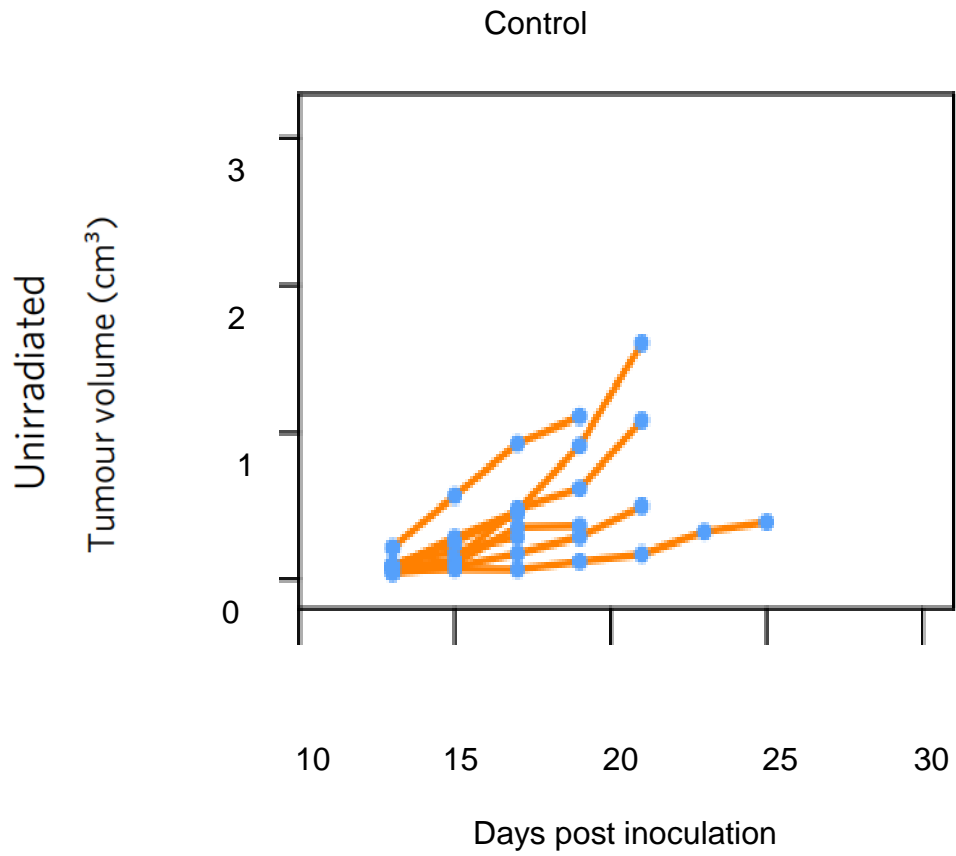


Πίνακας 8. Καμπύλη ανάπτυξης ακτινοβολημένων όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανοσοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και Mal AC-NP (πηγή: Min et al., 2017).

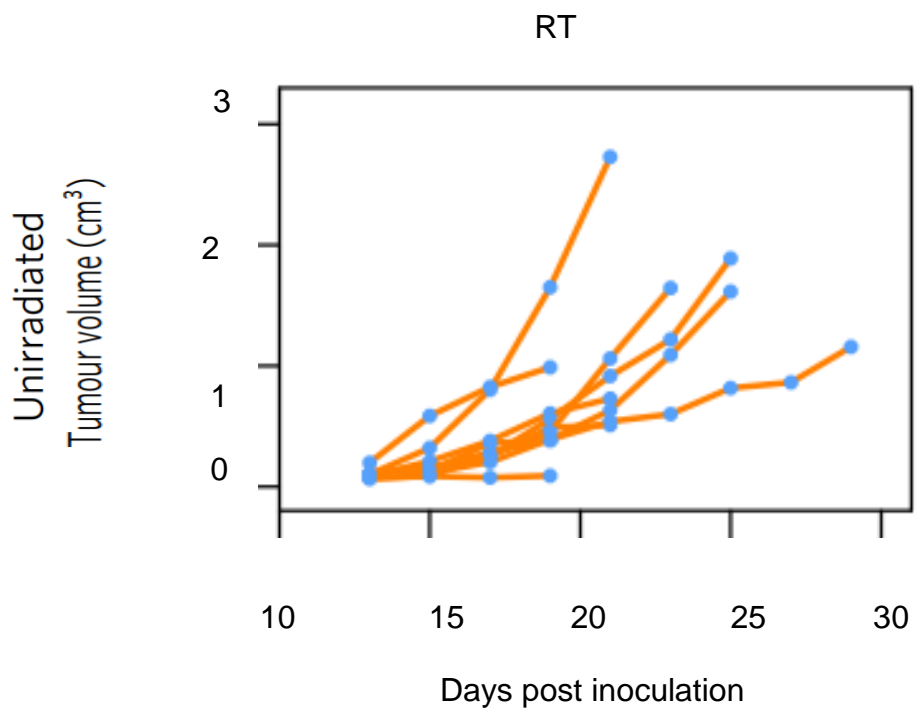


Από τα άνω διαγράμματα διαπιστώνουμε πως στις ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν PLGA και Mal AC-NPs η διάσταση του όγκου (σε cm³) είχε την μικρότερη αύξηση σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά τον εμβολιασμό συγκριτικά με όλες τις ομάδες (ακτινοβολημένοι όγκοι και μη). Έτσι έχουν καλύτερη ανταπόκριση σε ακτινοβολημένους και μη όγκους καθώς και αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας.

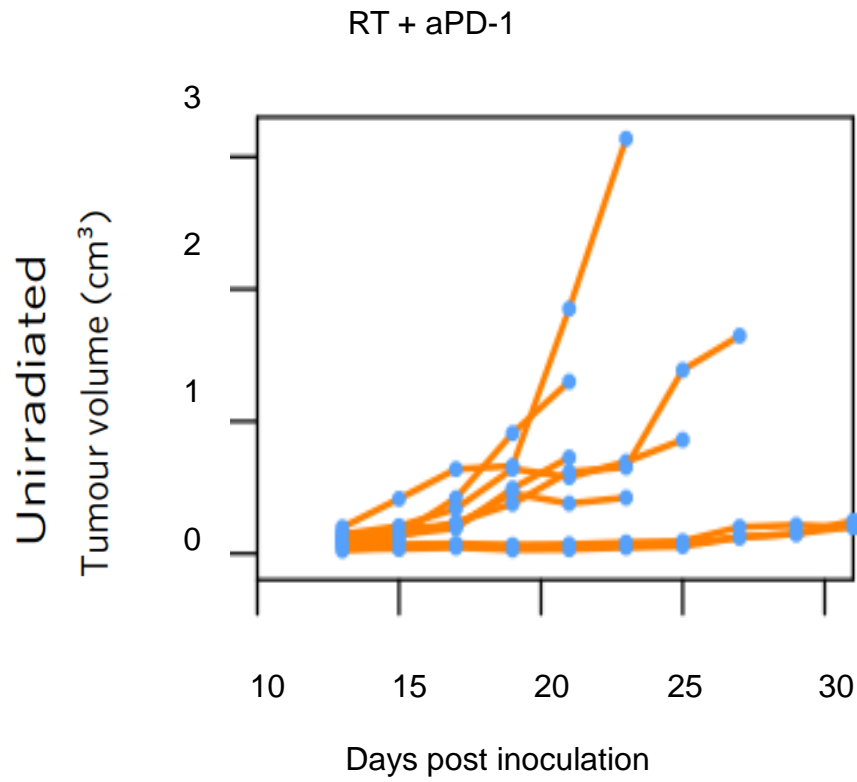
Πίνακας 9. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που δεν υποβλήθηκαν σε καμία θεραπεία (πηγή: Min et al., 2017).



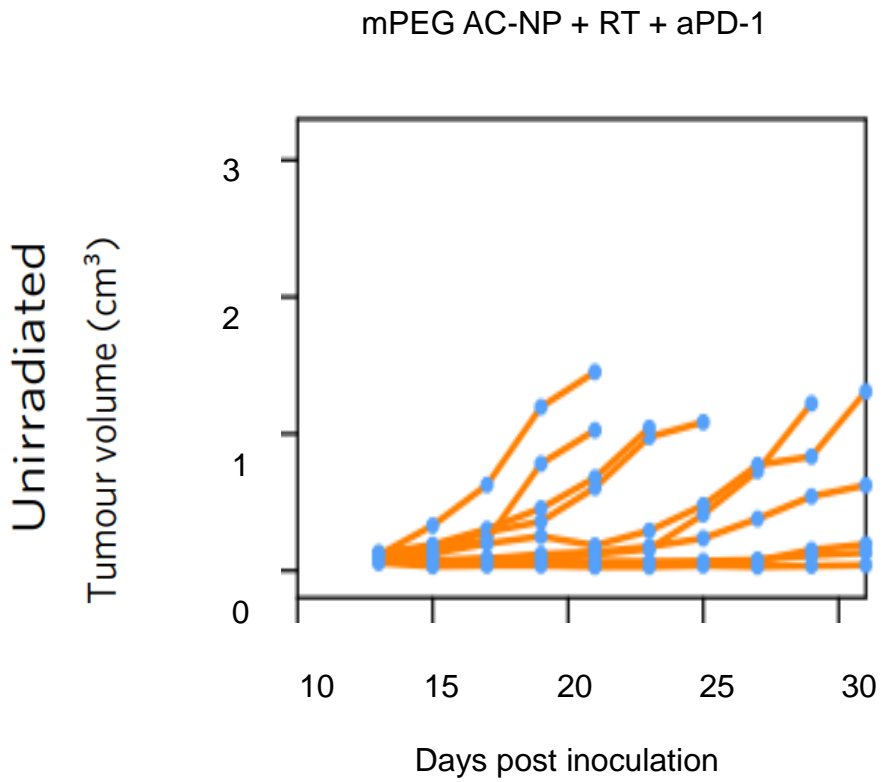
Πίνακας 10. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία (πηγή: Min et al., 2017).



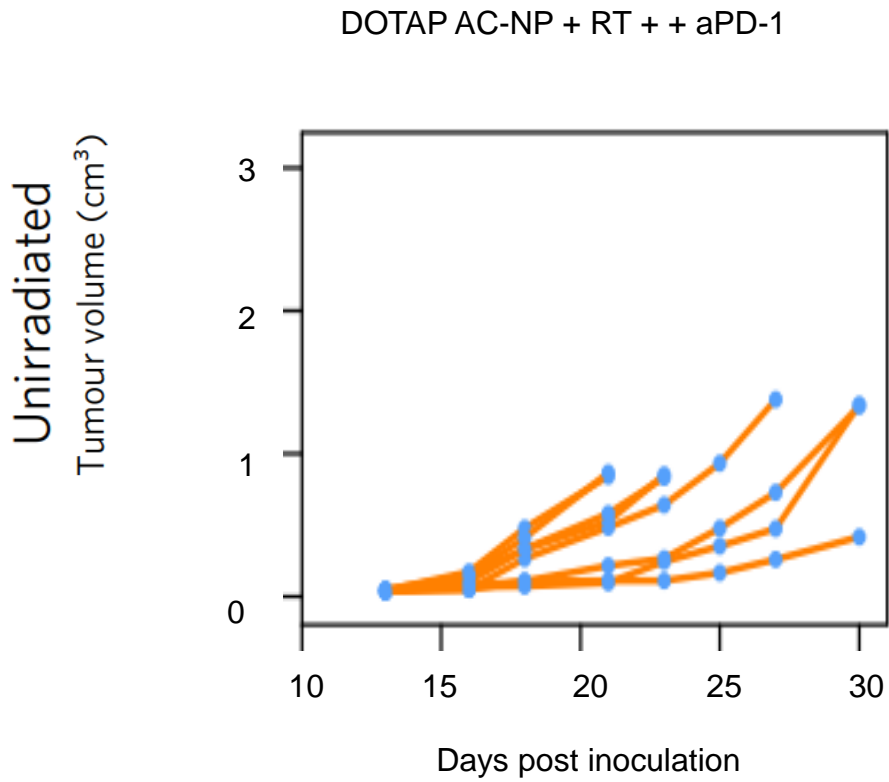
Πίνακας 11. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία και ανοσοθεραπεία (πηγή: Min et al., 2017).



Πίνακας 12. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια mPEG (πηγή: Min et al., 2017).

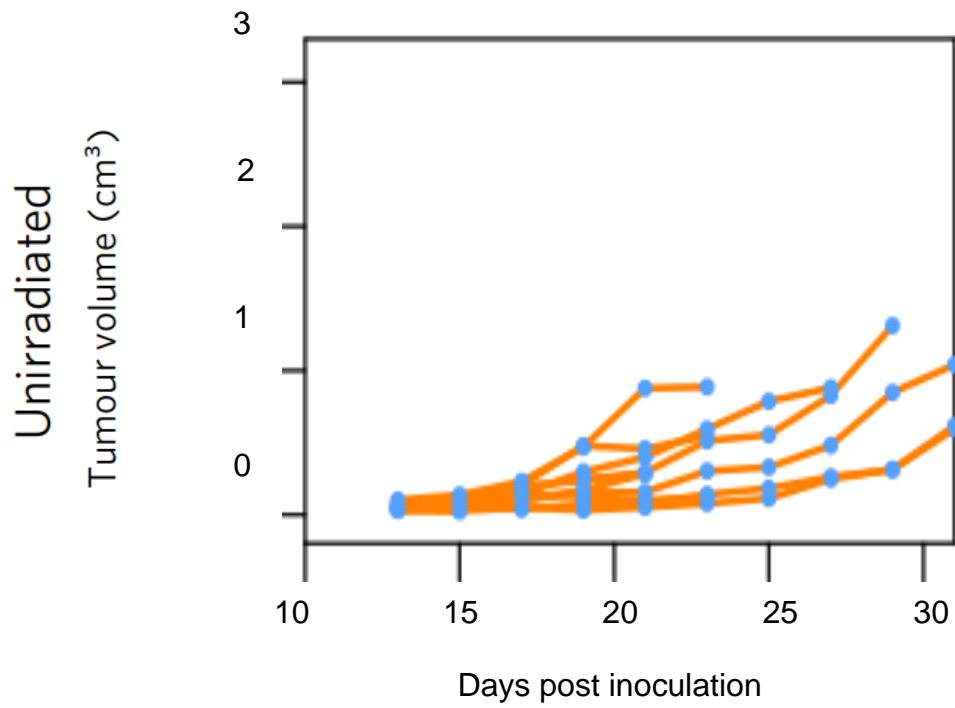


Πίνακας 13. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια DOTAP (πηγή: Min et al., 2017).

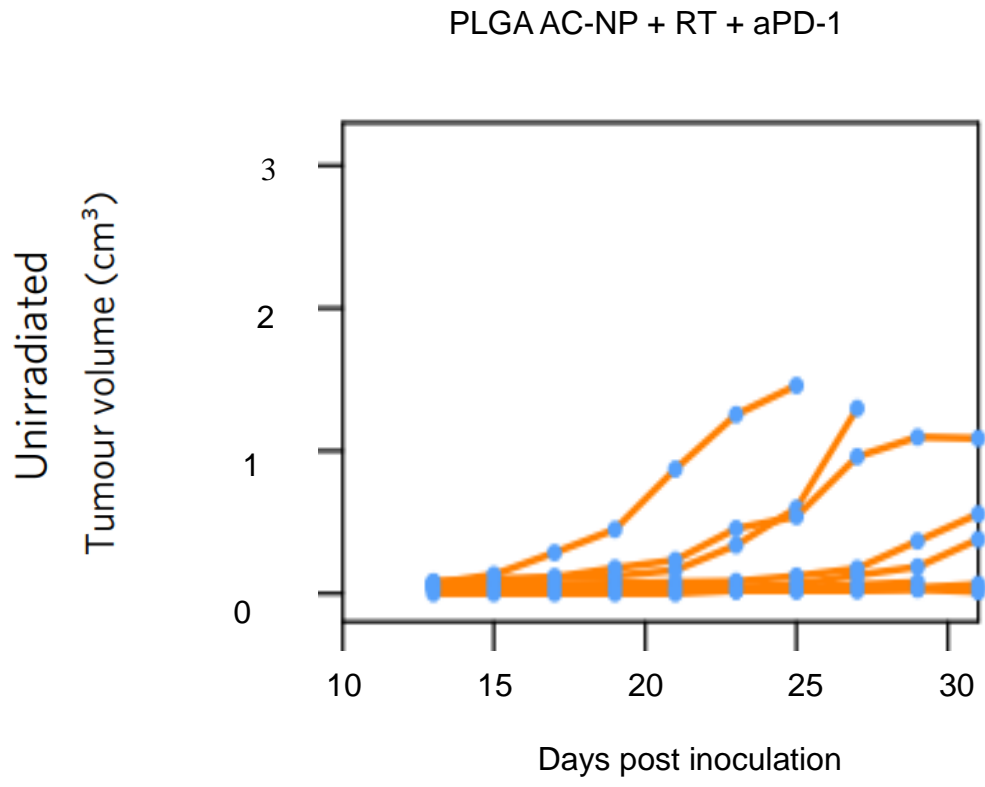


Πίνακας 14. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια NH₂ (πηγή: Min et al., 2017).

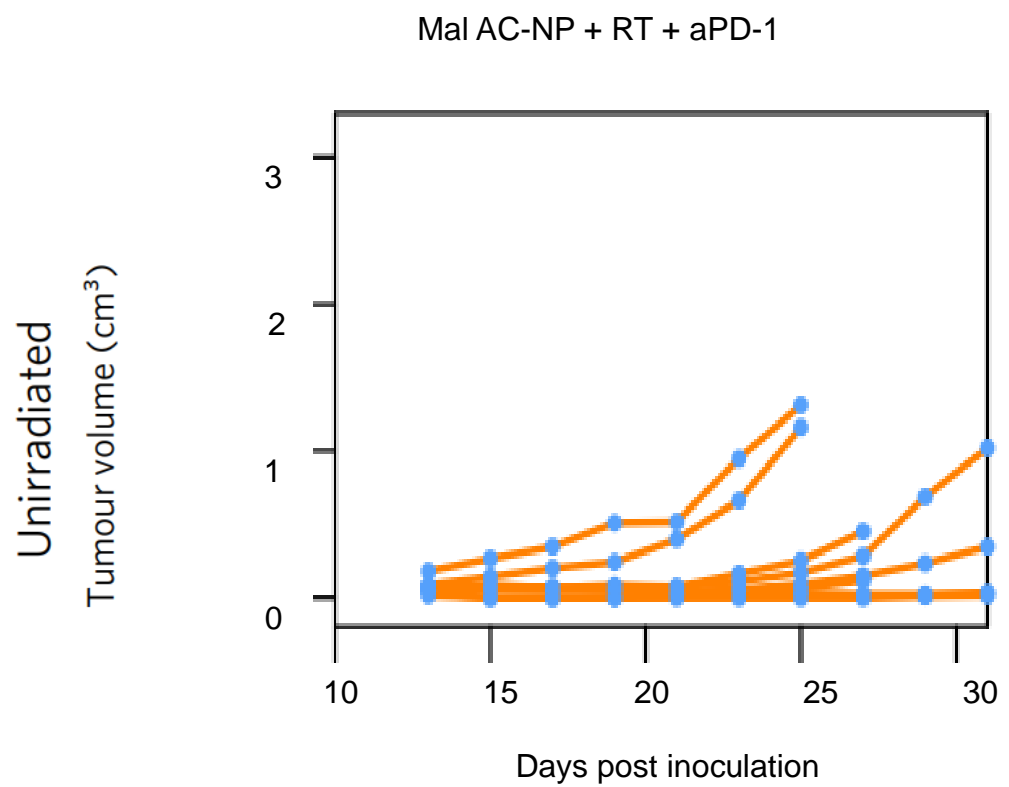
NH₂ AC-NP + RT + aPD-1



Πίνακας 15. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια PLGA (πηγή: Min et al., 2017).

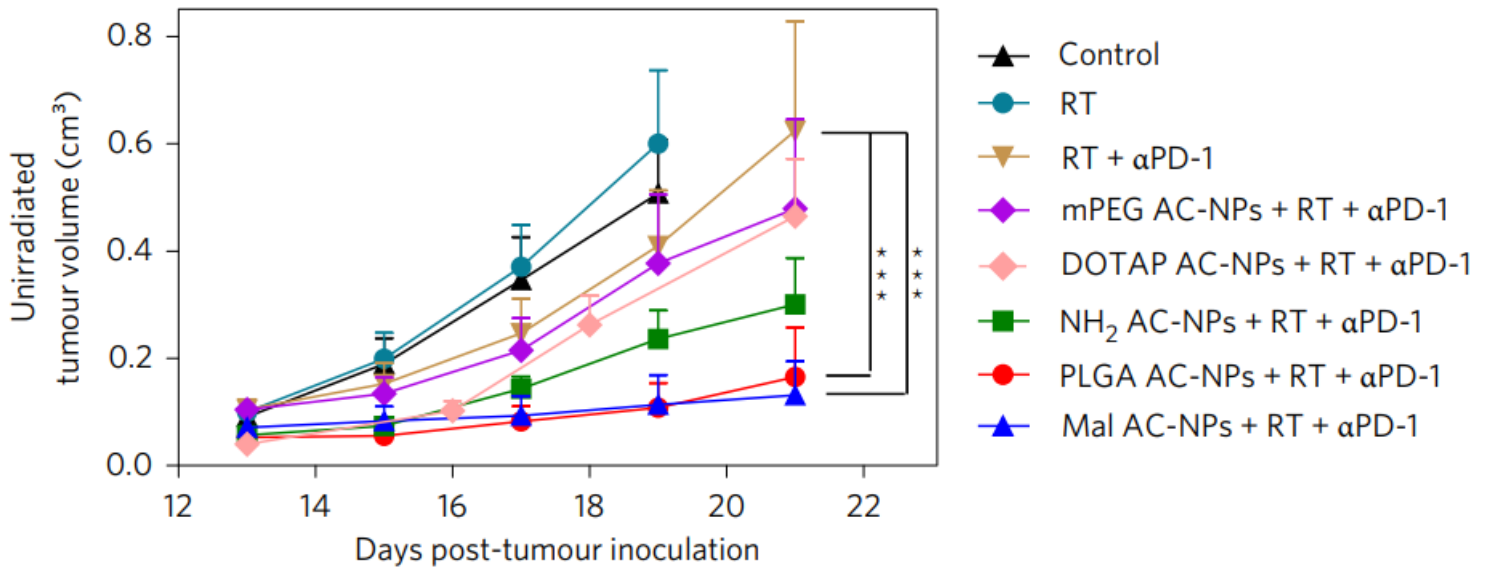


Πίνακας 16. Καμπύλη ανάπτυξης μη ακτινοβολημένων όγκων (δευτερογενών) σε μεμονωμένα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια Mal (πηγή: Min et al., 2017).



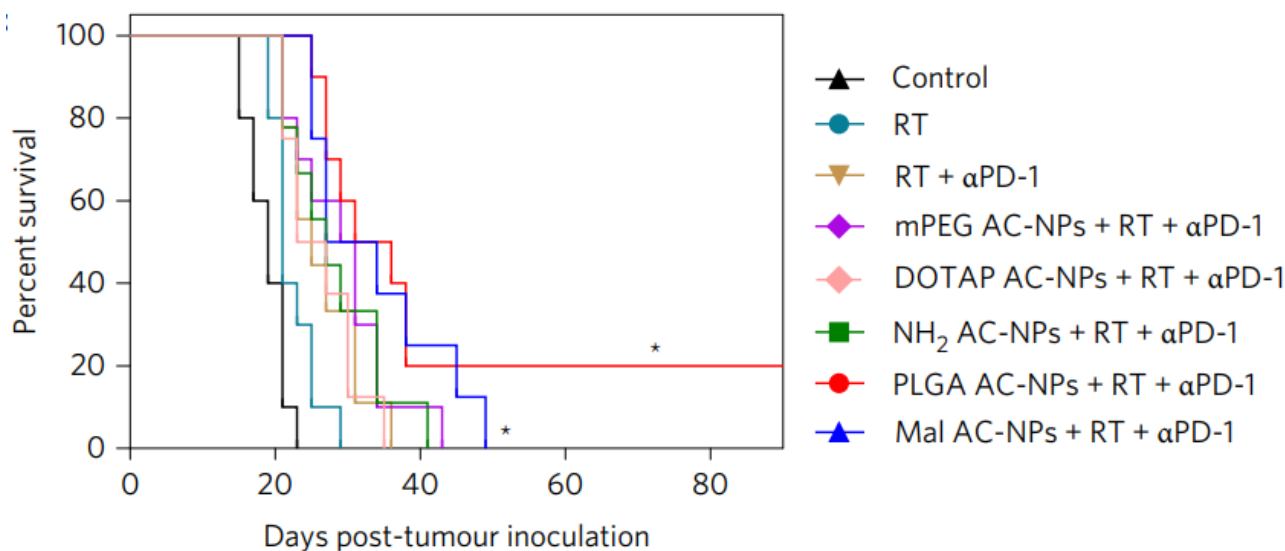
Ακόμη παρατηρούμε πως σε δευτερογενείς όγκους (μη ακτινοβολημένοι) η χορήγηση μόνο RT και η χορήγηση RT σε συνδυασμό με Apd-1 δεν είχαν κανένα όφελος καθώς αυξήθηκε κατά πολύ ο όγκος της μάζας στις αντίστοιχες ημέρες μετά τον εμβολιασμό συγκριτικά με τους υπόλοιπους συνδυασμούς που χορηγήθηκαν. Συμπληρωματικά, το ουσιαστικό όφελος επιβεβαιώνεται και σε αυτόν τον πίνακα πως προκύπτει από τον συνδυασμό PLGA AC-NPs + RT + Apd-1 και από τον Mal AC-NPs + RT + Apd-1.

Πίνακας 17. Μέσες καμπύλες ανάπτυξης όγκου μη ακτινοβολημένων (δευτερογενών) όγκων στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία (πηγή: Min et al., 2017).

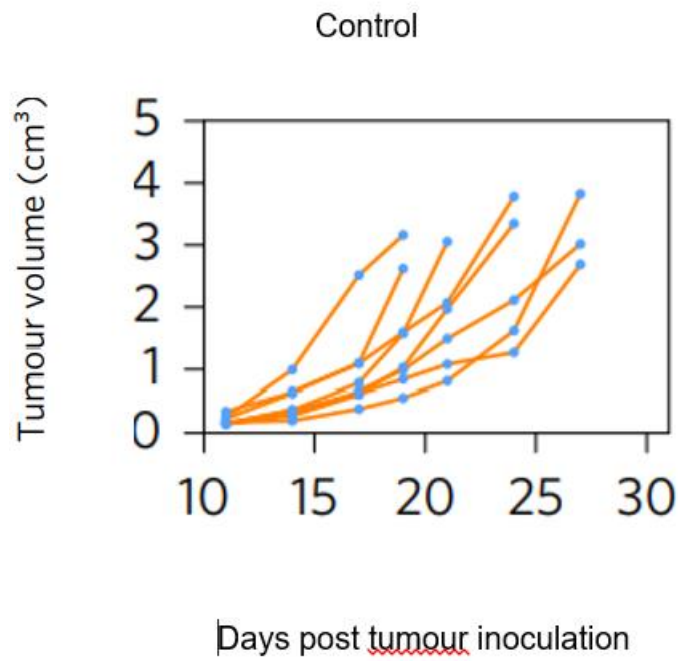


Διαπιστώνουμε πως το ποσοστό επιβίωσης μειώνεται με ταχύτερο ρυθμό στο control και στη συνέχεια ακολουθούν ποντίκια που έχουν υποστεί μόνο RT. Αντιθέτως το ποσοστό επιβίωσης μειώνεται με αρκετά χαμηλότερο ρυθμό σε ποντίκια στα οποία γίνεται χρήση Mal AC-Nps + RT +aPD-1, ενώ στα άτομα τα οποία έχει χρησιμοποιηθεί PLGA AC-NPS + RT + Arpd-1 το ποσοστό μειώνεται με αργούς ρυθμούς ώσπου φτάνει σε ένα πλατό των 20% ποσοστό επιβίωσης στις 40 ημέρες και συνεχίζει χωρίς μείωση. Έτσι η μεγαλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα μεταφράζεται σε βελτιωμένη και μακρύτερη επιβίωση σε ποσοστό 20% στο συνδυασμό RT + Arpd-1 + PLGA AC-NP. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι τα PLGA και τα Mal AC-Nps συσσωρεύονται σε μεγαλύτερο βαθμό στα δενδριτικά κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (CD11c+), στα μακροφάγα (F4/80+) και στα B-κύτταρα (B220+) συγκριτικά με τα υπόλοιπα NPS που χορηγήθηκαν.

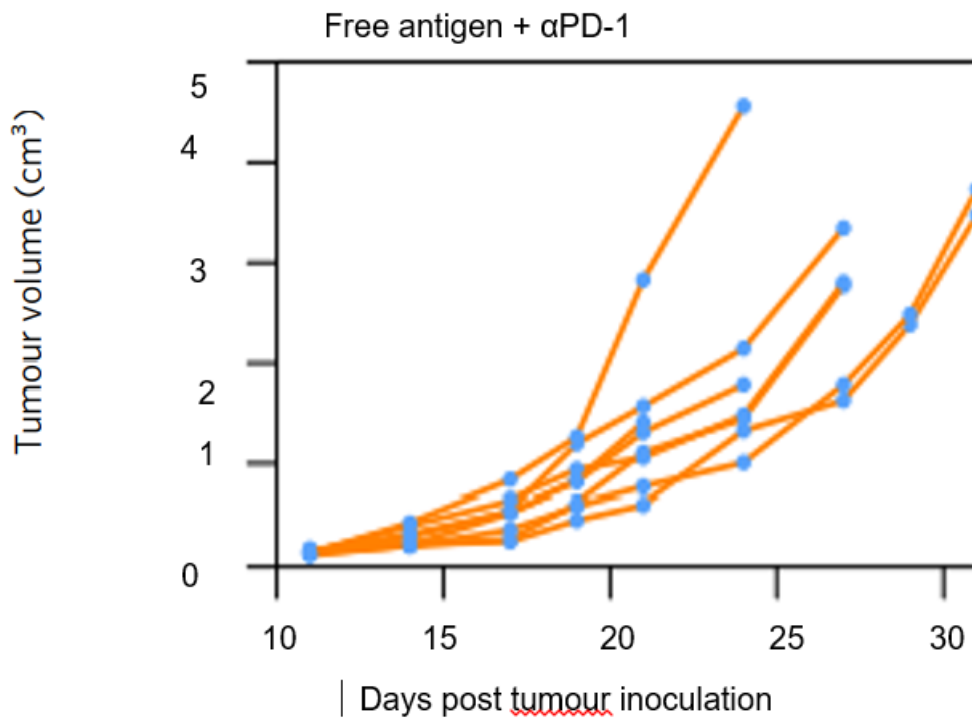
Πίνακας 18. Καμπύλες επιβίωσης των ποντικών (control n = 10, RT n = 10, RT + αPD-1 n = 9, mPEG AC-NPs + RT + αPD-1 n = 10, DOTAP AC-NPs + RT + αPD-1 n = 8, NH₂ AC-NPs + RT + αPD-1 n = 9, PLGA AC-NPs + RT + αPD-1 n = 10, Mal AC-NPs + RT + αPD-1 n = 8). Η ανάπτυξη του όγκου με την πάροδο του χρόνου συγκρίθηκε με αμφίδρομη ANOVA με διόρθωση Bonferroni. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσο όρο ± τυπική απόκλιση. Οι διαφορές στην επιβίωση προσδιορίστηκαν για κάθε ομάδα με τη μέθοδο Kaplan-Meier και η συνολική τιμή P υπολογίστηκε με τη δοκιμή log-rank. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,005 (πηγή: Min et al., 2017).



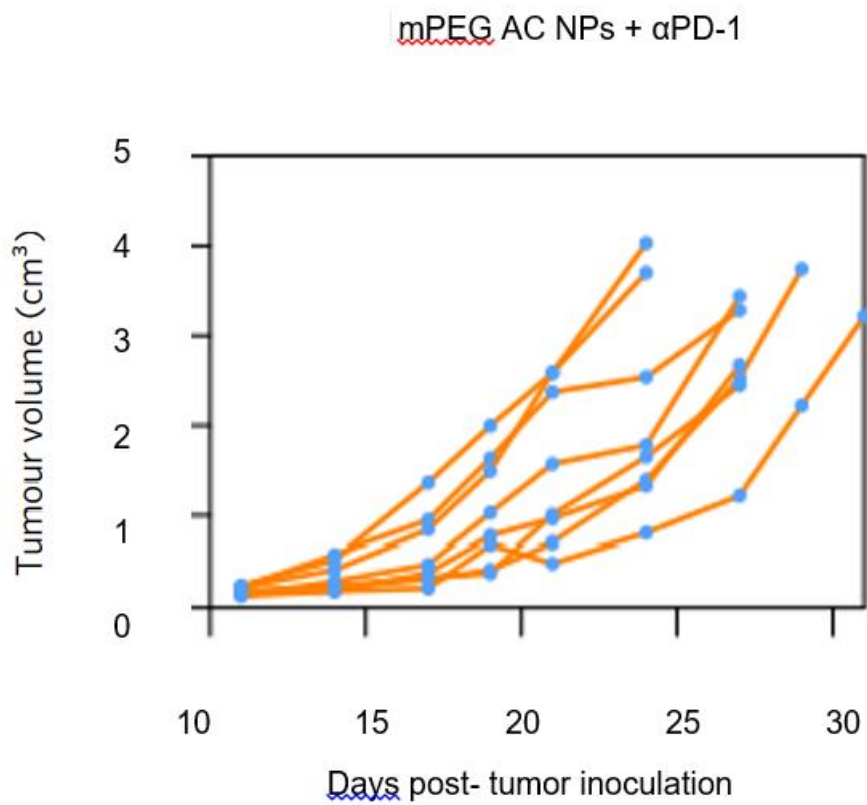
Πίνακας 19. Καμπύλη ανάπτυξης όγκου μεμονωμένων ζώων που δεν έχουν λάβει ανοσοθεραπεία και νανοσωματίδια (πηγή: Min et al., 2017).



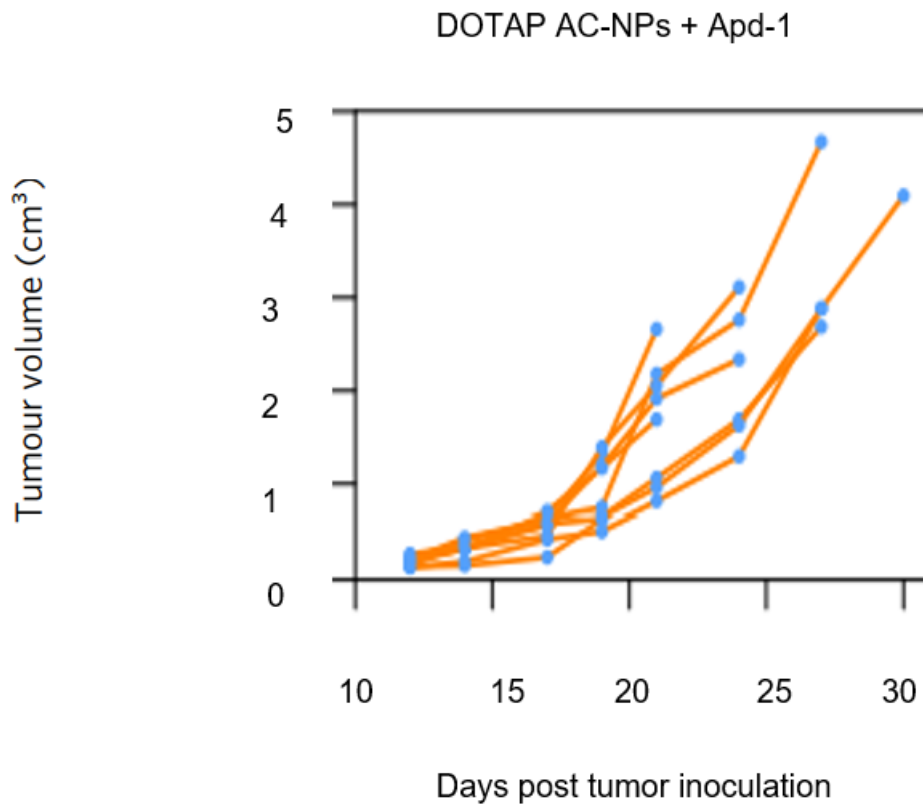
Πίνακας 20. Καμπύλες ανάπτυξης όγκου μεμονωμένων ζώων αντιμετωπίζονται με ανοσοθεραπεία και ελεύθερο αντιγόνο όγκου (πηγή: Min et al., 2017).



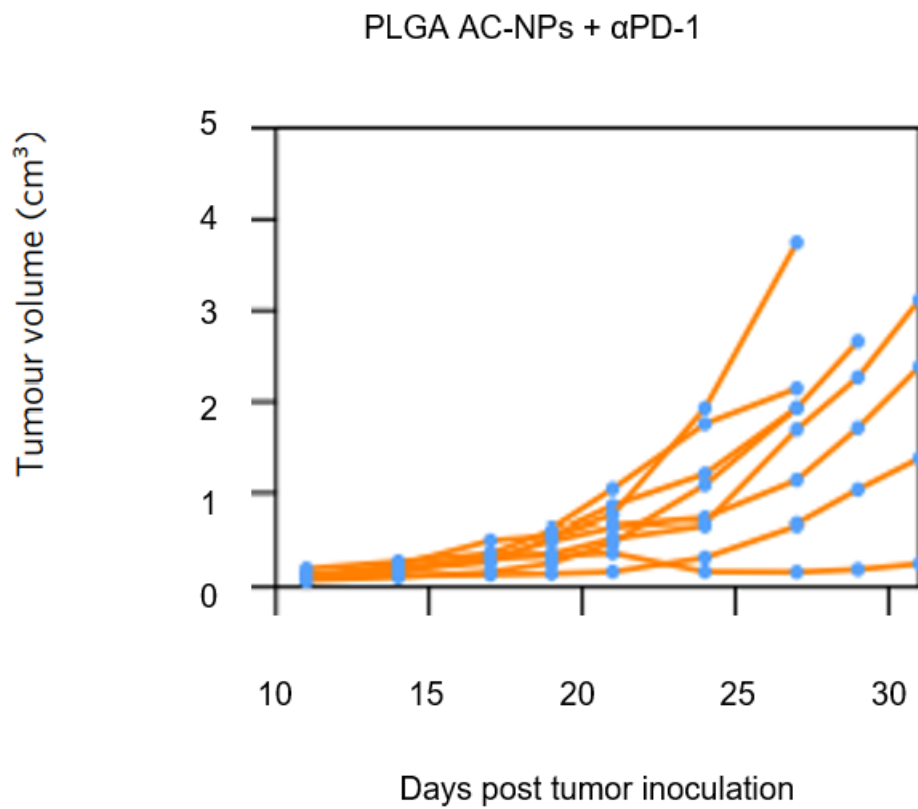
Πίνακας 21. Καμπύλη ανάπτυξης όγκου μεμονωμένων ζώων αντιμετωπίζονται με ανοσοθεραπεία και επικαλυμμένα με TDPA mPEG AC-NPs (πηγή: Min et al., 2017).



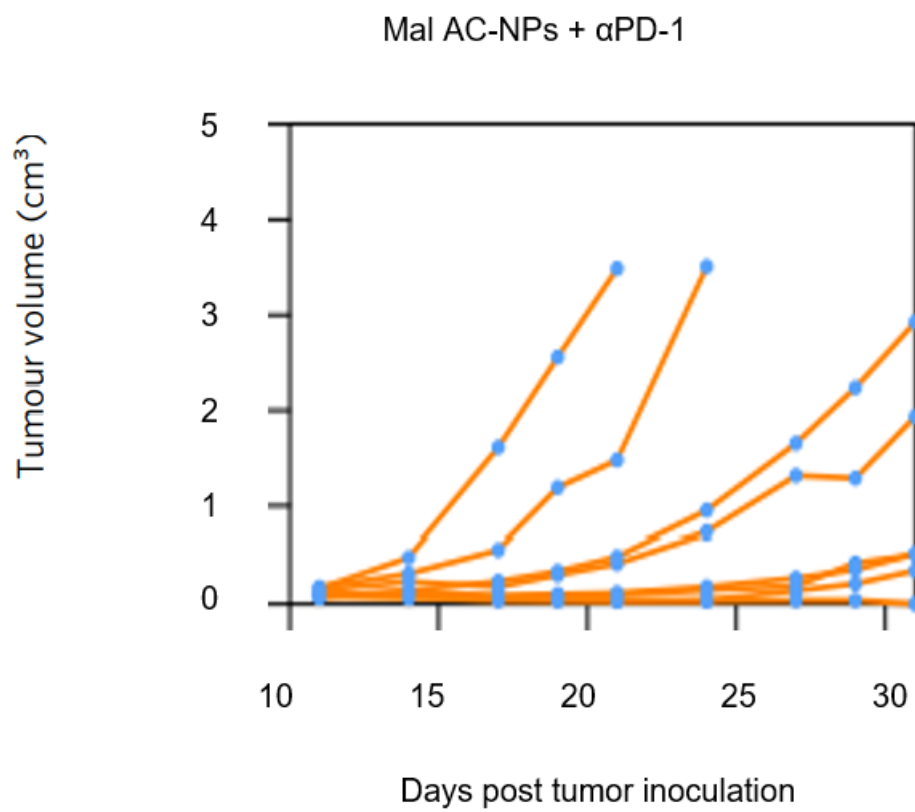
Πίνακας 22. Καμπύλη ανάπτυξης όγκου μεμονωμένων ζώων αντιμετωπίζονται με ανοσοθεραπεία και επικαλυμμένα με TDPA DOTAP AC-NPs (πηγή: Min et al., 2017).



Πίνακας 24. Καμπύλη ανάπτυξης όγκου μεμονωμένων ζώων αντιμετωπίζονται με ανοσοθεραπεία και επικαλυμμένα με TDPA PLGA AC-NPs (πηγή: Min et al., 2017).

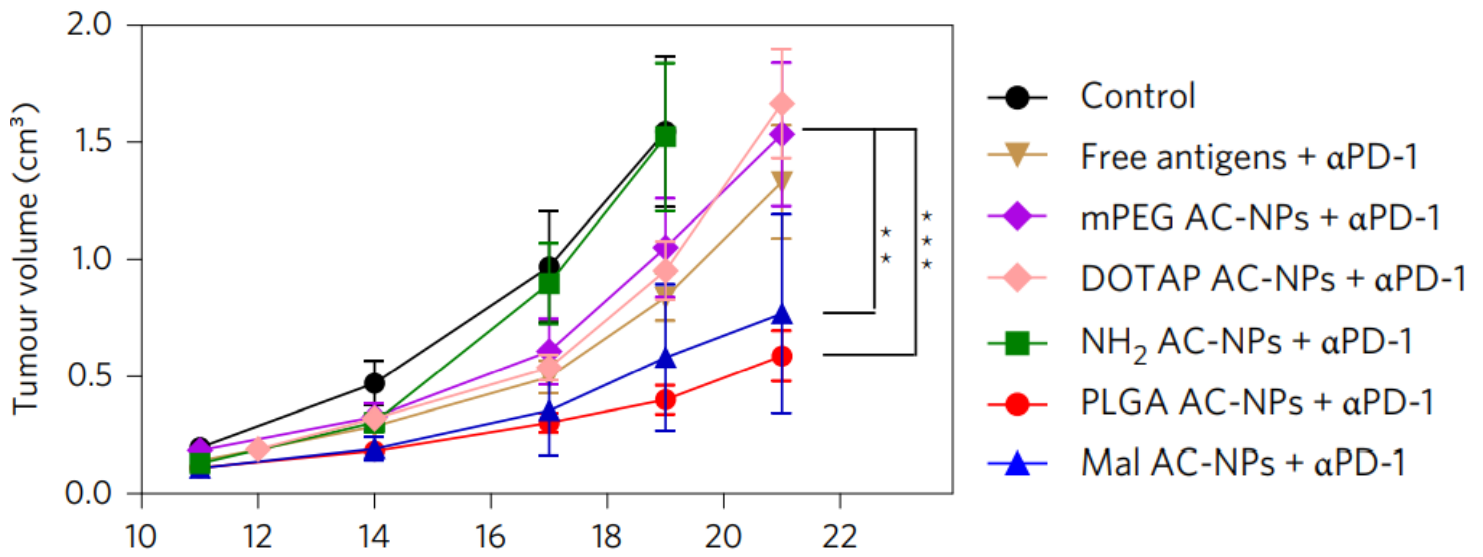


Πίνακας 25. Καμπύλη ανάπτυξης όγκου μεμονωμένων ζώων αντιμετωπίζονται με ανοσοθεραπεία και επικαλυμμένα με TDPA Mal AC-NPs (πηγή: Min et al., 2017).



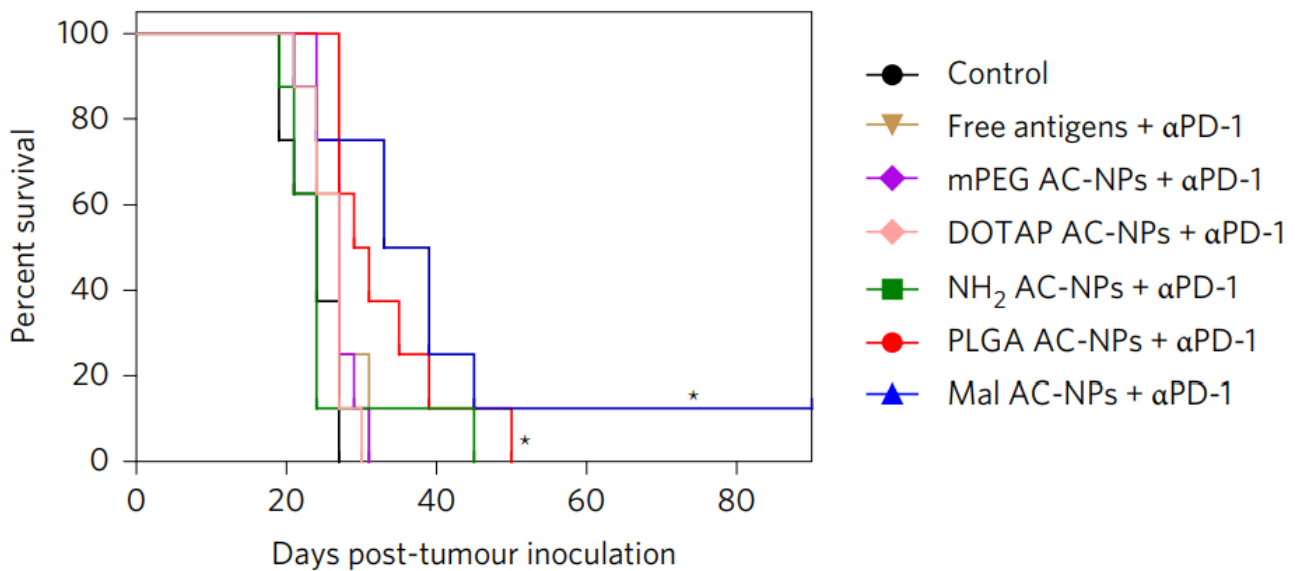
Διαπιστώνουμε πως η χορήγηση τόσο των PLGA AC-NPS + APD-1 όσο και των Mal AC-NPS + APD-1 επικαλυμμένων με TDPAs καθυστερεί την ανάπτυξη του όγκου και ειδικότερα με την προσθήκη των τελευταίων σε αρκετά ποντίκια το μέγεθος του όγκου δεν αυξήθηκε στο διάστημα από 0 έως 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Πίνακας 26. Μέσες καμπύλες ανάπτυξης όγκου (πηγή: Min et al., 2017).



Παρατηρούμε πως στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε DOTAP AC-NPS + Apd-1 είχαν την μεγαλύτερη αύξηση όγκου ύστερα από 21 ημέρες μετά τον εμβολισμό και ποντίκια με NH₂ AC-NPS +APD-1 στις 19 ημέρες. Τέλος μικρότερη αύξηση όγκου είχαν ποντίκια στα οποία είχαν χορηγηθεί PLGA AC-NPS + APD-1 και Mal AC-NPS + APD-1.

Πίνακας 27. Καμπύλες επιβίωσης των ποντικών (n = 8). Η ανάπτυξη του όγκου με την πάροδο του χρόνου συγκρίθηκε με αμφίδρομη ANOVA με Bonferroni. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσο όρο \pm s.e.m. Διαφορές στην επιβίωση προσδιορίστηκαν για κάθε ομάδα με τη μέθοδο Kaplan-Meier και η συνολική τιμή P υπολογίστηκε με τη δοκιμή log-rank. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,005 (πηγή: Min et al., 2017).



Στα ποντίκια που χορηγήθηκε PLGA AC-NPS + APD-1 είχαν την πιο αργή και σταθερή μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε διάστημα από 0 έως 50 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και σε αυτά που χορηγήθηκε Mal AC-NPS + APD-1 μετά από τις 40 ημέρες από τον εμβολιασμό απέκτησαν ένα πλατό όσον αφορά το ποσοστό επιβίωσης φτάνοντας το 20% και διατηρώντας το σταθερό με το πέρασ των ημερών αυξάνοντας έτσι το χρόνο επιβίωσης.

4. Συμπεράσματα

Από την παραπάνω μελέτη γίνεται αντιληπτό πως τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε συνδυασμός ακτινοθεραπείας, ανοσοθεραπείας και PLGA- AC-Nps ή ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και Mal AC-Nps είχαν καλύτερη ανταπόκριση, αποτελεσματικότητα στην ανοσοθεραπεία συγκριτικά με τα υπόλοιπα ποντίκια καθώς και βελτιωμένη και μακρύτερη επιβίωση. Ακόμη, σε δευτερογενείς όγκους (μη ακτινοβολημένοι) η χορήγηση ακτινοθεραπείας και ακτινοθεραπείας με ανοσοθεραπείας δεν είχε κανένα όφελος στα άτομα που το έλαβαν και παρουσίασε ταχεία αύξηση του μεγέθους του όγκου. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως η μεγαλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα μεταφράζεται σε βελτιωμένη και μακρύτερη επιβίωση σε ποσοστό 20% στο συνδυασμό RT + Apd-1 + PLGA AC-NP.

5. Βιβλιογραφία

- Aguilar, L.K., Guzik, B.W., Aguilar-Cordova, E., 2011. Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: mechanisms and clinical development. *Journal of Cellular Biochemistry* 112(8), 1969-1977.
- Akashi, T., Baba, M., Akashi, M., 2011. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of Immune responses by nanoparticles. *Polymers in Nanomedicine* 247, 31-64.
- Amaral-Silva, G. K., Martins, M. D., Pontes, H. A., Fregnani, E. R., Lopes, M. A., Fonseca, F. P., et al., 2017. Mismatch repair system proteins in oral benign and malignant lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 46, 241–245.
- An, J.Y., Kim, H., Cheong, J.H., Hyung, W.J., Kim, H., Noh, S.H., 2012. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *International Journal of Cancer* 131, 505–511.
- Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, Ph., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., Gramontet, A., 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 350(23), 2343–51.
- Andre, T., Boni, C., Navarro, M., et al., 2009. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology* 27, 3109- 3116.
- André, T., Shiu, K., Kim, T.W., Jensen, B.V., Jensen, L.H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., de la Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J., Le, D.T., Yoshino, T., Van Cutsem, E., Yang, P., Farooqui, M.Z.H., Marinello, P., Diaz, L.A., 2020. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 383, 23.
- Badalamenti, G., Fanalea, D., Incorvaia, L., Barracoa, N., Listia, A., Maragliano, R., Vincenzib, B., Calò, V., Iovannac, J.L., Bazana, V., Russoa, A., et al 2019. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: can a drop dig a stone?. *Cellular Immunology* 343.
- Ban, C., Junop, M., Yang, W., 1999. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 97, 85-97.

- Bebenek, A., and Ziuzia-Graczyk, I. 2018. Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Current Genetics* 64, 985–996.
- Bjornson, K.P., Blackwell, L.J., Sage, H., Baitinger, C., Allen, D., Modrich, P., 2003. Assembly and molecular activities of the MutS tetramer. *The Journal of biological chemistry* 278, 34667-34673.
- Bonadona, V., Bonaiti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y.J., Caron, O., Colas, C., Nogues, C., Lejeune-Dumoulin, S., Olivier-Faivre, L., Polycarpe-Osaer, F., Nguyen, T.D., Desseigne, F., Saurin, J.C., Berthet, P., Leroux, D., Duffour, J., Manouvrier, S., Frebourg, T., Sobol, H., Lasset, C., Boniti-Pellie, C., French Cancer Genetics Network, 2011. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 305, 2304–2310.
- Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.J., Topalian, S.L, Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H.C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T.M., Alaparthi, S., Grosso, J.F., Korman, A.J., Parker, S.M., Agrawal, S., Goldberg, S.M., Pardoll, D.M., Gupta, A., Wigginton, J.M., 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England Journal of Medicine* 12, 252-264.
- Carp, O., Huisman, C.L., Reller, A., 2004. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry* 32, 33–177.
- Casey, S.C., Amedei, A., Aquilano, K., Azmi, A.S., Benencia, F., Bhakta, D., Bilsland, A.E., Boosani, C.S., Chen, S., Ciolo, M.R., Crawford, S., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Guha, G., Halicka, D., Helferich, W.G., Heneberg, P., Honoki, K., Keith, W.N., Kerkar, S.P., Mohammed, S.I., Niccolai, E., Newsheem, S., Rupasinghe, V., Samadi, A., Singh, N., Talib, W.H., Venkateswaran, V., Whelan R.L., Yang, X., Felsher, D.W., 2015. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology* 35, 199-223.
- Chang, L., Chang, M., Chang, H.M., Chang, F., 2017. Expanding role of microsatellite instability in diagnosis and treatment of colorectal cancers. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 48, 305–313.

- Chen, Q., Liu, G., Liu, S., Su, H., Wang, Y., Li, J., Luo, C., 2018. Remodeling the tumor microenvironment with emerging nanotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* 39, 59-74.
- Cho, K., Wanh, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D.M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research*, 14(5), 1310-1316.
- Choi, Y.Y., Bae J.M., An J.Y., Kwon I.G., Cho, I., Shin, H.B., Eiji, T., Aburahmah, M., Kim, H., Cheong J. H., Hyung, W. J., Noh, S.H., 2014. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *Journal of Surgical Oncology* 110, 129–135.
- Clark, N., Wu, X., and Her, C., 2013. MutS homologues hMSH4 and hMSH5: genetic variations, functions, and implications in human diseases. *Current Genomics* 14, 81–90.
- Cleland, J.L., Jones, A.J.S., 1996. Stable formulation of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres. *Pharmaceutical Research* 13, 1464-1474.
- Corso, G., Velho, S., Paredes, J., Pedrazzani, C., Martins, D., Milanezi, F., Pascale, V., Vindigni, C., Pinheiro, H., Leite, M., Marrelli, D., Sousa, S., Carneiro, F., Oliveira, C., Roviello, F., Seruca, R., 2011. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *European Journal of Cancer* 47, 443–451.
- Cryan, S.A., 2005. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *The AAPS Journal*, 20-41.
- Davinder, S., Hankumar, S.L., Nirmala, N., 2013. Nanoparticles: An overview. *Journal of drug delivery & Therapeutic* 3 (2), 169-175.
- Denton, A.E., Roberts, E.W., Fearon, D.T., 2018. Stromal cells in the tumor microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1060, 99-114.
- Donahue, N.D., Acar, H., Wilhelm, S., 2019. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 143, 68–96.
- Dougan, M., Dougan S.K., 2017. Targeting immunotherapy to the tumor microenvironment. *Journal of Cellular Biochemistry* 118, 3049-3054.

- Edelbrock, M. A., Kaliyaperumal, S., and Williams, K. J., 2013. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutation Research* 743–744, 53–66.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R., 2011. Silver Nanoparticles: Behaviour και Effect in the Aquatic Environment. *Environment International* 37 (2), 517-531.
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E., Meldolesi, J., 2006. Macropinocytosis: Regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *Journal of Cell Science* 119, 4758–4769.
- Fang, R.H., Kroll, A.V., Zhang, L., 2015. Nanoparticle-based manipulation of antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. *Small* 11, 5483-5496.
- Finch, A.C., 1985. Polymer for microcapsule walls. *Chemistry and Industry* 18, 752-756.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D., Howell, S.B., 1996. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Research* 56(21), 4881–6.
- Fishel, R., 2015. Mismatch repair. *Journal of Biological Chemistry* 290, 26395–26403.
- Garon, E., Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.J., Felip, E., Lee, J.S., Hellmann, M.D., Hamid, O., Goldman, J.W., Soria, J.C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R.Z., Zhang, J., Luceford, J.K., Rangwala, R., Lubiniecki, G.M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L., 2015. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* 372, 2018-2028.
- Goellner, E.M., Putnam, C.D., Kolodner, R.D., 2015. Exonuclease 1-dependent and independent mismatch repair. *DNA repair* 32, 24-32.
- Goldberg, M.S., 2015. Immunoengineering: how nanotechnology can enhance cancer immunotherapy. *Cell* 161, 201-204.
- Groves, E., Dart, A., Covarelli, V., Caron, E., 2008. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cellular Molecular Life Sciences* 65(13), 1957–1976.
- Guo, D., Xie, G., Luo, J., 2014. Mechanical properties of nanoparticles: basics και applications. *Journal of Physics D: Applied Physics* 47, 13001.

- Guo, S., Deng, C.X., 2018. Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation. *International Journal of Biological Sciences* 14, 2083-2093.
- Haller, D.G., Tabernero, J., Maroun, J., Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., Schmoll H.J., 2011. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of Clinical Oncology* 29(11),1465–1471.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., Dronca, R., Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Zarour, H., Joshua, A.M., Gergich, K., Elassaiss-Schaap, J., Algazi, A., Mateus, C., Boasberg, P., Tume, P.C., Chmielowski, B., Ebbinghaus, S.W., Li, X.N., Kang, S.P., Ribas, A., 2013. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England Journal of Medicine* 369, 134-144.
- Hanaoka, F., and Sugasawa, K., 2016. DNA Replication, recombination, and repair. *Molecular Mechanisms and Pathology*.
- Harfe, B.D., Jinks-Robertson, S., 2000. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual review of genetics* 34, 359-399.
- Harush-Frenkel, O., Rozentur, E., Benita, S., Altschuler, Y., 2018. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* 9(2), 435–443.
- Hillaireau, H., Couvreur, P., 2009. Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular Molecular Life Sciences* 66(17), 2873–2896.
- Hirata, E., Sahai, E., 2017. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7(7) a026781.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.S., Akerley, W., Alfons J.M. van den Eertwegh, et al. 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 363, 711-723.

<http://ec.europa.eu>

<http://www.mio-ecsde.org>

- Huang, Y., and Li, G. M., 2018. DNA mismatch repair preferentially safeguards actively transcribed genes. *DNA Repair* 71, 82–86.
- Irvine, D.J., Hanson, M.C., Rakhra, K., Tokatlian, T., 2015. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy. *Chemical Reviews*, 115, 11109-11146.
- Jennifer Couzin-Frankel 2013. Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy. Science* 342, 1432-1433.
- Jiricny, J., 2013. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(4)a012633.
- Karlsson, J., Ungell, A., Gråsjö, J., Artursson, P., 1999. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *European Journal of Pharmaceutical Science* 9(1), 47–56.
- Kawakami, T., Shiina, H., Igawa, M., Deguchi, M., Nakajima, K., Ogishima, T., Tokizane, T., Urakami, S., Enokida, H., Miura, K., Ishii, N., Kane, C.J., Carroll, P.R., Dahiya, R., 2004. Inactivation of the hMSH3 mismatch repair gene in bladder cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 934–942.
- Kerr, M.C., Teasdale, R.D., 2009. Defining Macropinocytosis. *Traffic* 10, 364–371.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I., 2017. Nanoparticles: Properties, applications και toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Khanna, V.K., 2012. Targeted delivery of nanomedicines. *ISRN Pharmacology* 85(6), 572-593.
- Kim, C.G., et al 2016. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *British Journal of Cancer* 115, 25–33.
- Kim, J., et al., 2015. Injectable, spontaneously assembling, inorganic scaffolds modulate immune cells in vivo and increase vaccine efficacy. *Nature Nanotechnology* 33, 64-72.
- Kiparissides, C., Kammona, O., 2008. Nanotechnology advances in controlled drug delivery systems. *Physica Status Solidi* 5, 3828-3833.
- Kiparrisides, C., Kammona, O., 2013. Nanoscale carries for targeted delivery of drugs and therapeutic biomolecules. *The Canadian journal of chemical engineering*, 91(4), 638-651.

- Kuebler, J.P., Wieand, H.S., O'Connell, M.J., Smith, R.E., Colangelo, L.H., Yothers, G., Petrelli, N.J., Findlay, M.P., Seay, T.E., Atkins, J.N., Zapas, J.L., Goodwin, J.W., Fehrenbacher, L., Ramanathan, R.K., Conley, B.A., Flynn, P.J., Soori, G., Colman, L.K., Levine, E.A., Lanier, K.S., Wolmarket, N., 2007. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *Journal of Clinical Oncology* 25(16),2198–2204.
- Kumari, S., Mg, S., Mayor, S., 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research* 20(3), 256–275.
- Kunkel, T. A., 2009. Evolving views of DNA replication (in)fidelity. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 74, 91–101.
- Lamers, M.H., Winterwerp, H.H., Sixma, T.K., 2003. The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *The EMBO journal* 22, 746-756.
- Li, G.M., 2003. DNA mismatch repair and cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, 997-1017.
- Li, M., Zhang, F., Su, Y., Zhou, J., Wang, W., 2018. Nanoparticles designed to regulate tumor microenvironment for cancer therapy. *Life Sciences* 201, 37-44.
- Lin, I.C., Liang, M., Liu, T.Y., Monteiro, M.J., Toth, I., 2012. Cellular transport pathways of polymer coated gold nanoparticles. *Nanomedicine* 8(1), 8–11.
- Lipkin, S.M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A. D., Lynch, H. T., Elliott, R.M., Collins, F.S., 2000. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genetics* 24, 27–35.
- Liu, D., Keijzers, G., and Rasmussen, L.J., 2017. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research* 773, 174–187.
- Longley, M.J., Pierce, A.J., Modrich, P., 1997. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *Nucleic acids, protein synthesis and molecular genetics* 272, 10917-10921.
- Luoma, S.N., 2008. Silver nanotechnologies kai the environment: Old problems or new challenges.

- Lynch, H.T., de la Chapelle. A., 2003. Hereditary colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 348, 919–932.
- Lynch, H.T., Lynch, P.M., Lanspa, S.J., Snyder, C.L., Lynch, J.F., Boland, C.R., 2009. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* 76(1), 1–18.
- Lynch, H.T., Snyder, C.L., Shaw, T.G., Heinen, C.D., Hitchins, M.P., 2015. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nature Reviews Cancer* 15, 181–194.
- Markets Ra, 2011. The World Market for Nanoparticle Titanium Dioxide (TiO₂).
- Marrelli, D., Polom, K., Pascale, V., Vindigni, C., Piagnerelli, R., De Franco, L., Ferrara, F., Roviello, G., Garosi, L., Petrioli, R., Roviello, F., 2016. Strong prognostic value of microsatellite instability in intestinal type non-cardia gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology* 23, 943–950.
- McCulloch, S.D., Gu, L., Li, G.M., 2003. Bi-directional processing of DNA loops by mismatch repair-dependent and -independent pathways in human cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 3891-3896.
- McNutt, M., 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342, 1417.
- Modrich, P., 2016. Mechanisms in *E. coli* and human mismatch repair (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 55, 8490–8501.
- Mohan, H.M., Ryan, E., Balasubramanian, I., Kennelly, R., Geraghty, R., Sclafani, R., Fennelly, D., McDermott, R., Ryan, E.J., O'Donoghue, D., Hyland, J.M.P., Martin, S.T., O'Connell, P.R., Gibbons, D., Winter, Des., Sheahan, K., 2016. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 42, 1680–1686.
- Murugan, K., Choonara, Y.E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L.C., Pillay, V., 2015. Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *International Journal of Nanomedicine* 10(1), 2191-2206.
- Musetti, S., Huang, L., 2018. Nanoparticle-mediated remodeling of the tumor microenvironment to enhance immunotherapy. *ACS Nano* 12, 11740-11755.
- Muthu, M.S., Singh, S., 2008. Studies on biodegradable polymeric nanoparticles of risperidone: in vitro and in vivo evaluation. *Nanomedicine* 3(3), 305–319.

- Nakashima, H., Honda, M., Inoue, H., Shibuta, K., Arinaga, S., Era, S., Ueo, H., Mori, M., Akiyoshi, T., 1995. Microsatellite instability in multiple gastric cancers. *International Journal of Cancer* 64, 239–242.
- Nanotechnology, 2015 (<http://www.nano.gr>)
- Nielsen, F.C., Jager, A.C., Lutzen, A., Bundgaard, J.R., Rasmussen, L.J., 2004. Characterization of human exonuclease 1 in complex with mismatch repair proteins, subcellular localization and association with PCNA. *Oncogene* 23, 1457-1468.
- nnphysics.auth.gr
- Overwijk, W.W., Restifo, N.P., 2000. Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the 'self' to destroy the 'other'. *Critical Reviews in Immunology* 20(6), 433-450.
- Paino, I.M., Marangoni, V.S., de Oliveira Rde, C., Antunes, L.M., Zucolotto, V., 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear human cells. *Toxicology Letters* 215, 119–125.
- Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissues. *Advanced drug delivery reviews* 55, 329-347.
- Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264.
- Park, H., Cox, D., 2009. Cdc42 regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis through the activation and phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and neural-WASP. *Molecular Biology of the Cell* 20(21), 4500–4508.
- Plotz, G., Piiper, A., Wormek, M., Zeuzem, S., Raedle, J., 2006. Analysis of the human MutLalpha.MutSalpha complex. *Biochemical and biophysical research communications* 340, 852-859.
- Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J., Zeuzem, S., 2002. hMutSalpha forms an ATP-dependent complex with hMutLalpha and hMutLbeta on DNA. *Nucleic acids research* 30, 711-718.
- Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J., Zeuzem, S., 2003. N-terminus of hMLH1 confers interaction of hMutLalpha and hMutLbeta with hMutSalpha. *Nucleic acids research* 31, 3217-3226.

- Podar, K., Zimmerhack, A., Fulciniti, M., Tonon, G., Hainz, U., Tai, Y.T., Vallet, S., Halama, N., Jager, D., Olson, D.L., Sattler, M., Chauhan, D., Anderson, K.C., 2011. The selective adhesion molecule inhibitor Natalizumab decreases multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. *British Journal of Haematology* 155, 438-448.
- Polom, K., Marrelli, D., Roviello, G., Pascale, V., Voglino, C., Rho, H., Marini, M., Macchiarelli, R., Roviello, F., 2017. Molecular key to understand the gastric cancer biology in elderly patients—the role of microsatellite instability. *Journal of Surgical Oncology* 115, 344–350.
- Poovi, G., Dhana lekshmi, U.M., Narayanan, N., Neelakanta Reddy, P., 2011. Preparation and characterization of repaglinide loaded chitosan polymeric nanoparticles. *Research journal of nanoscience and nanotechnology* 1(1), 12-24.
- Postow, M. A., Callahan, M. K., Barker, C. A., Yamada, Y., Yuan, J., Kitano, S., Zhenyu M., Rasalan, T., Adamow, M., Ritter, E., Sedrak, C., Jungbluth, A. A., Chua, R., Yang, A.S., Roman, R. A., Rosner, S., Benson, B., Allison, J. P., Lesokhin, A. M., Gnjatic, S., Wolchok, J. D., 2012. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England Journal of Medicine* 366, 925-931
- Poulogiannis, G., Frayling, I. M., and Arends, M. J., 2010. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 56, 167–179.
- Poynter, J.N., Siegmund, K.D., Weisenberger, D.J., Long, T.I., Thibodeau, S.N., Lindor, N., 2008. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 17(11), 3208–3215.
- Rajendrakumar, S.K., Uthaman, S., Cho, C.S., Park, I.K., 2018. Nanoparticle-based phototriggered cancer immunotherapy and its domino effect in the tumor microenvironment. *Biomacromolecules* 19, 1869-1887.
- Randolph, G.J., Jakubzick, C., Qu, C.F., 2008. Antigen Presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current opinion in immunology*.
- Raut, C.P., Pawlik, T.M., Rodriguez-Bigas, M.A., 2004. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutation Research* 568(2), 275–282.

- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., 2006. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 29(9), 1790-1798.
- Renfro, L.A., Allegra, C.J., Andre, T., et al., 2015. Timedependent patterns of recurrence and death in resected colon cancer (CC): Pooled analysis of 12,223 patients from modern trials in the ACCENT database containing oxaliplatin. *Journal of Clinical Oncology* 33, 198s
- Rosenthal, S. H., Sun, W., Zhang, K., Liu, Y., Nguyen, Q., Gerasimova, A., 2020. Development and validation of a 34-gene inherited cancer predisposition panel using next-generation sequencing. *BioMed Research International* 2020, 3289023.
- Sameer, A. S., Nissar, S., and Fatima, K., 2014. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 23, 246–257.
- Samowitz, W.S., 2015. Evaluation of colorectal cancers for Lynch syndrome: practical molecular diagnostics for surgical pathologists. *Modern Pathology* 28, 109–113.
- Shao, K., et al., 2015. Nanoparticle-based immunotherapy for cancer. *ACS Nano* 9, 16-30.
- Shin, W.K., Cho, J., Kannan, A.G., Lee, Y.S., Kim, D.W., 2016. Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO₂ nanoparticles for lithium-ion polymer batteries. *Scientific Reports* 6, 26332.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2017. Cancer statistics 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67, 7–30.
- Slattery, M.L., Curtin, K., Anderson, K., Ma, K.N., Ballard, L., Edwards, S., Schaffer, D., Potter, J., Leppert, M., Samowitz, W.S., 2000. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 92(22), 1831–1836.
- Smith, D.M., Simon, J.K., Baker, J.R., 2013. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology* 13, 592-605.
- Smyrk, T.C., Watson, P., Kaul, K., Lynch, H.T., 2001. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 91, 2417–2422.

- Song, L., Smith, M.A., Doshi, P., Sasser, K., Fulp, W., Altiock, S., Haura, E.B., 2014. Antitumor efficacy of the anti-interleukin-6 (IL-6) antibody siltuximab in mouse xenograft models of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 9, 974.
- Spampinato, C., Modrich, P., 2000. The MutL ATPase is required for mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* 275, 9863-9869.
- Thibodeau, S.N., French, A.J., Cunningham, J.M., Tester, D., Burgart, L.J., Roche, P.C., McDonnell, S.K., Schaid, D.J., Vockley, C.W., Michels, V.V., Farr Jr, G.M., O'Connell, M.J., 1998. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Research* 58(8), 1713–8.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.D., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., Sznol, M., 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England Journal of Medicine* 366, 2443-2454.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2012. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65, 87– 108.
- Tran, P.T., Erdeniz, N., Symington, L.S., Liskay, R.M., 2004. EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair* 3, 1549-1559.
- Twyman, C., Rech, A. J., Maity, A., Rengan, R., Pauken, K. E., Stelekati, E., Benci, J. L., Xu, B., Dada, H., Odorizzi, P. M., Herati, R. S., Mansfield, K. D., Patsch, D., Amaravadi, R. K., Schuchter, L. M., Ishwaran, H., Mick, R., Pryma, D. A., Xu, X., Feldman, M. D., Gangadhar, T. C., Hahn, S. M., Wherry, E. J., Vonderheide, R. H., Minn A. J., 2015. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 520. 373-377.
- Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L.J., Hamelin, R., Hamilton, S.R., Hiatt, R.A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H.T., Peltomaki, P., Ramsey, S.D., Rodriguez-Bigas, M.A., Vasen, H.F.A., Hawk, E.T., Barrett, J.C., Freedman, A.N., Srivastava, S., 2004. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch

syndrome) and microsatellite instability. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 96 (4), 261–268.

Uy, G.L., Retting, M.P., Motabi, I.H., McFarland, K., Trinkaus, K.M., Hladnik, L.M., Kulkarni, S., Abboud, C.N., Cashen, A.F., Stockerl-Goldstein, K.E., Vij, R., Westervelt, P., DiPersio, G.F., 2012. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 3917-3924.

Wallace, S.J., Li, J., Nation, R.L., Boyd, B. J., 2012. Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug delivery and translation research* 2 (4), 284-292.

Ward, R., Meagher, A., Tomlinson, I., O'Connor, T., Norrie, M., Wu, R., Hawkins, N., 2001. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48(6), 821–829.

Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.A., Reed, K., Burke, M.M., Caldwell, A., Kronenberg, S.A., Agunwamba, B.U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H.D., Feely, W., Horak, C.E., Hong, Q., Korman, A.J., Wigginton, J.M., Gupta, A., Sznol, M., 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine* 369, 122-133.

Wu, T., Dai, Y., 2017. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters* 387, 61-68.

Wu, W., He, Q., Jiang, C., 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters* 3, 397–415.

Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J.C., Jin, T., Dai, K., Zhang, X., 2012. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *Journal of Controlled Release* 158(3), 371–378.

Xu, S., Olenyuk, B.Z., Okamoto, C.T., Hamm-Alvarez, S.F., 2012. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1), 121–138.

Yamamoto, H., and Imai, K., 2015. Microsatellite instability: an update. *Archives of Toxicology* 89, 899–921.

- Yang, G., Zheng, R.Y., Jin, Z.S., 2019. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 145, 2891–2899.
- Yang, S., Gao, H., 2017. Nanoparticles for modulating tumor microenvironment to improve drug delivery and tumor therapy. *Pharmacological Research* 126, 97-108.
- Yang, Y.P., 2015. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *Journal of clinical investigation* 125, 3335.
- Yothers, G., O'Connell, M.J., Allegra, C.J., et al., 2011. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: Updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *Journal of Clinical Oncology* 29, 3768-3774.
- Zaanan, A., Cuilliere-Dartigues, P., Guilloux, A., Parc, Y., Louvet, C., de Gramont, A., Tiret, E., Dumont, S., Gayet, B., Validire, P., Fléjou, J-F., Duval, A., Praz, F., 2010. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Annals of Oncology* 21(4), 772–780.
- Zhao, L., Selh, A., Wibowo, N., Zhao, CX., Mitter, N., Yu, C., Middelberg, A.P.J., 2014. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32(3), 327-337.
- Αναγνώστου, Ε.Χ., 2012. Μελέτη υβριδικών μαγνητικών νανοσωματιδίων για την ελεγχόμενη χορήγηση αντικαρκινικών ουσιών. Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Κατσικογιάννη, Γ., 2005. Μελέτη των ιδιοτήτων φόρτωσης και αποδέσμευσης βιοδιασπώμενων νανοσωματιδίων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Μασμανίδου, Ο., 2015. Ανάπτυξη λειτουργικών πολυμερικών νανοσωματιδίων για στόχευση δεδριτικών κυττάρων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Ματθαιολαμπάκης, Γ., 2009. Μελέτη της ανοσοαπόκρισης μετά την διαδερματική χορήγηση αντιγόνου εγκλεισμού σε νανοσφαίρες πολυγαλακτικού οξέος. Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Μίχος, Α.Γ., 2010. Ανοσοενισχυτικά και εμβόλια. Παιδιατρική θεραπευτική ενημέρωση.

6. Εκτεταμένη σύνοψη

Η εμφάνιση ενός όγκου είναι αποτέλεσμα περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά και πολλαπλών μηχανισμών και γονιδίων. Για να κατανοήσουμε την εμφάνιση του καρκίνου και να προτείνουμε θεραπευτικό πλάνο θα πρέπει να συνυπολογιστούν διάφοροι παράμετροι όπως τους υποτύπους MSI, το στάδιο της νόσου, τα ετερογενή μοριακά χαρακτηριστικά της κακοήθειας, το γενετικό προφίλ, την ηλικία του ασθενή, το φύλο κ. ά.. Οι υπότυποι MSI στις νόσους είναι ένας χρήσιμος δείκτης αλλά όχι ο μοναδικός για την αξιολόγηση της πρόγνωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών οι υπότυποι MSI αποτελούν προγνωστικοί βιοδείκτες για να την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. Η πλειονότητα των ασθενών με MSI-H παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση και αποτελεσματικότητα συγκριτικά με τους άλλους δύο υποτύπους μικροδορυφορικής γενετικής αστάθειας. Έτσι ασθενείς τέτοιου τύπου ανταποκρίνονται καλύτερα σε χημειοθεραπεία, 5-FU χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Οι υπότυποι MSI εκτός από την αξιολόγηση του βαθμού κακοήθειας, της αποτελεσματικότητας και της πρόγνωσης, παρέχουν πληροφορίες για την δημιουργία βελτιωμένων και εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπειάς.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σε ασθενείς με GC και CRC καρκίνο οι οποίοι έλαβαν ανοσοθεραπεία ή χημειοθεραπεία και τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα MSI καρκινικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στην oxaliplatin (Fink et al., 1996), αλλά προς το παρόν υπάρχουν λίγα και αντικρουόμενα δεδομένα για τη σχέση MMR-oxaliplatin (Kim et al., 2010; Zaanan et al., 2010). Τα αποτελέσματα της ανοσοθεραπείας δίνουν την ελπίδα για κλινικές δοκιμές με neo-adjuvant ή adjuvant θεραπεία σε μεταστατικό CRC MSI-H. Αντίθετα, στη μελέτη φάσης 3 MAGIC συγκρίνει την επίδραση χημειοθεραπείας (epirubicin, cisplatin, 5-FU) συνδυαστικά με χειρουργείο σε ασθενείς με GC νόσο ως μέσο θεραπείας με ασθενείς που υποβάλλονται μόνο σε χειρουργείο ως μέσο αντιμετώπισης της νόσου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι ασθενείς MSI-H που είχαν υποβληθεί μόνο σε χειρουργείο

είχαν καλύτερο OS συγκριτικά με ασθενείς MSS ή MSI-L. Ακόμη, έδειξαν πως ασθενείς MSI-H που έκαναν χημειοθεραπεία είχαν διπλάσιο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με ασθενείς MSS.

Στη νόσο GC τα χημειοθεραπευτικά που χρησιμοποιούνται είναι cisplatin, ενώ στην CRC τα oxaliplatin πράγμα που δικαιολογεί και τα διαφορετικά αποτελέσματα. Έτσι κρίνεται αναγκαίο στην εποχή της εξατομικευμένης θεραπείας να πραγματοποιηθούν δοκιμές χημειοθεραπείας και ανοσοθεραπείας ώστε να κατανοηθεί η σχέση μεταξύ του ανοσο-μικροπεριβάλλοντος και του μοριακού προφίλ του όγκου.

Μία νέα θεραπευτική μέθοδος μη ευρέως διαδεδομένη στη ναυοιατρική είναι η χρήση των νανοσωματιδίων. Μία μέθοδος πολλά υποσχόμενη η οποία βρίσκεται σε πειραματικά στάδια. Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της ναυοιατρικής είναι ραγδαία και έχει συνδράμει σε νέες ιδέες για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Τα νανοσωματίδια έχουν αποφέρει πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Πρώτον, το πιο προφανές πλεονέκτημα των νανοσωματιδίων είναι η δυνατότητα συντονισμού τους έτσι ώστε να μπορούν να σχεδιάζονται σε διάφορα μεγέθη, σχήματα και λειτουργίες. Μπορούν να τροποποιηθούν με μόρια στόχευσης ή να φορτωθούν με διάφορα φάρμακα, επιτυγχάνοντας έτσι στοχευμένη παροχή και ταυτόχρονη χορήγηση θεραπευτικών παραγόντων. Οι επιφανειακές ιδιότητες των NPs είναι τόσο θεμελιώδεις όσο και τα άλλα βασικά χαρακτηριστικά που υπαγορεύουν την εσωτερίκευση. Για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου, απαιτείται υψηλός χρόνος κυκλοφορίας των NP στο σώμα για να αναγνωρίσουν τα NPs τη συγκεκριμένη θέση ενδιαφέροντός τους. Οι οψονίνες που προσροφούνται στην επιφάνεια των υδρόφοβων NPs μειώνουν τον χρόνο κυκλοφορίας ξεκινώντας τον καταρράκτη ανοσοαπόκρισης που επιτρέπει τη φαγοκυττάρωση των NPs μετά την αναγνώριση ως ξένα αντικείμενα. Εάν το φάρμακο απορροφάται άσκοπα από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου μειώνεται και οι ανεπιθύμητες ενέργειες ασκούνται στο ανοσοποιητικό σύστημα και αποτελούν απειλή τοξικότητας εντός του ξενιστή. Η ελαχιστοποίηση της αναγνώρισης των NPs από το

δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και το επακόλουθο ανοσοποιητικό σύστημα θα ενισχύσει την πιθανότητα πρόσληψης από τα κύτταρα-στόχους. Δεύτερον, τείνουν να συσσωρεύονται στον όγκο πολύ περισσότερο από ό,τι στον φυσιολογικό ιστό λόγω της διαρρέουσας αγγείωσης του όγκου και της κατεστραμμένης λεμφικής παροχέτευσης, δηλαδή του φαινομένου EPR, το οποίο αυξάνει σημαντικά τη συσσώρευση φαρμάκων στον όγκο και μειώνει τις επιδράσεις εκτός στόχου. Τέλος, απαιτείται η απελευθέρωση των φαρμάκων σε ένα ακριβές σημείο κατά τη διάρκεια μιας συγκεκριμένης περιόδου, λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα του TME κατά την ανάπτυξη του όγκου.

Με μοναδικές ιδιότητες, τα νανοσωματίδια μπορούν να προστατεύσουν την αποικοδόμηση ή τη συσσώρευση φαρμάκων και ως απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα (π.χ. pH, υποξία ή H₂O₂) απελευθερώνουν φάρμακα με χωροχρονικό τρόπο. Σε αυτήν την ανασκόπηση συνοψίσαμε τις ιδιότητες και τη χρήση των νανοσωματιδίων στην νανοιατρική καθώς επίσης και τα αποτελέσματα μίας σπουδαίας μελέτης που υπογραμμίζει πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα οφέλη που μπορεί να προσφέρει στους ασθενείς. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις ανώμαλες δομές και λειτουργίες του TME, μειώνοντας έτσι την ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα και μεγεθύνοντας τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χημειοθεραπείας, της ακτινοθεραπείας και της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε πως τα PLGA και Mal AC-Nps θα μπορούσαν να βελτιώσουν σημαντικά την ανοσοθεραπεία και το αποκοιλιακό αποτέλεσμα και προκάλεσαν την πιο ισχυρή θεραπευτική απόκριση σε όλες τις ομάδες θεραπείας. Η μεγαλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα μεταφράστηκε επίσης σε βελτιωμένη επιβίωση. Εντυπωσιακά, η στρατηγική θεραπείας RT + aPD-1 + PLGA AC-NP απέδωσε πλήρες ποσοστό απόκρισης 20%. 4). Επιπλέον, η διευκολυνόμενη από PLGA και Mal AC-NP ανοσοθεραπευτική ενίσχυση χάνεται μετά την εξάντληση των T-κυττάρων CD8+.

Είναι σημαντικό, επίσης, ότι τα AC-NPs βελτιώνουν την ανοσοθεραπεία σε ένα μοντέλο ορθοτοπικού όγκου καρκίνου του μαστού. Μια επιτυχημένη ανοσοθεραπευτική απόκριση όγκου απαιτεί την πρόσληψη και παρουσίαση καρκινικών αντιγόνων από τα APC και την πρόκληση μιας αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης. Ακόμη παρατηρήθηκε πως σε δευτερογενείς όγκους (μη ακτινοβολημένοι) η χορήγηση μόνο RT και η χορήγηση RT σε συνδυασμό με Arpd-1 δεν είχαν κανένα όφελος καθώς αυξήθηκε κατά πολύ ο όγκος της μάζας στις αντίστοιχες ημέρες μετά τον εμβολιασμό συγκριτικά με τους υπόλοιπους συνδυασμούς που χορηγήθηκαν. Συμπληρωματικά, το ουσιαστικό όφελος επιβεβαιώνεται και σε αυτόν τον πίνακα πως προκύπτει από τον συνδυασμό PLGA AC-NPs + RT + Arpd-1 και από τον Mal AC-NPs + RT + Arpd-1.

Υπάρχουν, ωστόσο, αρκετές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν καθ' οδόν για τη μετάφραση της νανοϊατρικής στην κλινική πράξη. Πρώτον, οι περιορισμοί των νανοσωματιδίων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στην περιορισμένη γνώση του ανοσοποιητικού δικτύου κατά την ογκογένεση. Η έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία αποτελείται από ένα σύνθετο δίκτυο, επομένως η επίδραση της εξάντλησης ή της αναστολής ενός συστατικού σε ολόκληρο το δίκτυο παραμένει ασαφείς. Ειδικά για αυτές τις στοχευμένες θεραπείες, η αναστολή ενός ή περισσότερων συστατικών μπορεί να αντισταθμιστεί από την ανοδική ρύθμιση άλλων οδών. Δεύτερον, υπάρχουν μεμονωμένες παραλλαγές στα θεραπευτικά αποτελέσματα της νανοϊατρικής. Λαμβάνοντας υπόψη την ετερογένεια της δομής σε διαφορετικούς όγκους, οι ανταποκρίσεις διαφορετικών όγκων στην ίδια θεραπεία είναι αρκετά διαφορετικές, κυρίως λόγω της διαφορετικής αγγείωσης του όγκου. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές ανησυχίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους των νανοσωματιδίων. Πρώτον, η κύρια ανησυχία είναι η πιθανή ανοσογονικότητα. Τα ίδια τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι αντιγονικά. Οι ανοσολογικές αποκρίσεις στα νανοσωματίδια θα επιτάχυναν την κάθαρσή τους, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους. Επιπλέον, η ισχυρή ενεργοποίηση της ανοσίας μπορεί να

οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές, όπως η αιμόλυση και η θρομβογένεση. Δεύτερον, οι στρατηγικές διαμόρφωσης TME που αλλάζουν εν μέρει τη δομή του TME και αντιστρέφουν το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον σε ανοσοϋποστήριξη ενέχουν πιθανούς κινδύνους που σχετίζονται με την προώθηση της μετάστασης όγκου, επομένως οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της στρατηγικής διαμόρφωσης TME θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Τέλος, οι τρέχουσες δοκιμές τοξικότητας για νανοσωματίδια είναι ανώριμες. Δεδομένου του γεγονότος ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων θα μπορούσαν να αλλάξουν κατά την αντίδραση με άλλες βιολογικές ουσίες στο σώμα, η τελική τους μορφή θα πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά. Ως εκ τούτου, απαιτούνται ακόμη μεγάλες προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση του μεγέθους, του σχήματος, των προσδεμάτων και άλλων ιδιοτήτων και για την αξιολόγηση των πιθανών κινδύνων των νανοσωματιδίων προτού μεταφραστούν στην κλινική πράξη. Με βαθύτερη γνώση της ανοσολογίας του καρκίνου και της νανοϊατρικής, τα νανοσωματίδια θα φέρουν επανάσταση στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου στο εγγύς μέλλον. Η θεραπευτική μέθοδος που μελετήθηκε δεν έχει εφαρμοστεί ακόμα σε ασθενείς παρά μόνο σε ποντίκια σε πειραματικό-ερευνητικό στάδιο. Παρόλα ταύτα είναι μία μέθοδος πολλά υποσχόμενη που θα μπορέσει να προσφέρει μεγαλύτερη διάρκεια στην επιβίωση και καλύτερη ποιότητα ζωής.