



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ»

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ανάλυση Υγρής Βιοψίας και Γλοιώματα

(Liquid Biopsy analysis and Gliomas)

ΟΝΟΜΑ - ΕΠΩΝΥΜΟ

ΣΚΟΥΡΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ

2024

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Χριστίνα Πιπέρη

Καθηγήτρια, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Την τριμελή επιτροπή συμπληρώνουν οι:

Γεώργιος Στράντζαλης

Καθηγητής, Διευθυντής Νευροχειρουργικής Κλινικής, Ευαγγελισμός, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Πηνελόπη Κορκολοπούλου

Καθηγήτρια, Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Σε όλους όσους αναζητούν τη γνώση, για τη γνώση αυτή καθαυτή

Ευχαριστίες

Πάνω απ' όλα, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την επιβλέπουσα μου Καθηγήτρια, Χριστίνα Πιπέρη, για την εμπειριστατωμένη καθοδήγησή της και τον χρόνο που μου αφιέρωσε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματικής αλλά και κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Μου παρείχε ανεκτίμητη βοήθεια και συνείσφερε σημαντικά, προσφέροντας πολύτιμες συμβουλές και με βοηθούσε να αντιμετωπίσω άμεσα κάθε πρόκληση που προέκυπτε. Φυσικά, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιάννη και Ντίνα, αλλά και τους φίλους μου για την αδιάκοπη στήριξή τους κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών μου σπουδών. Τέλος, θέλω να εκφράσω την εκτίμησή μου προς όλους τους συμφοιτητές μου, τους καθηγητές και συναδέλφους, καθώς οι αλληλεπιδράσεις με αυτούς μου προσέφεραν την κατάλληλη διανοητική διέγερση που χρειαζόμουν, καθιστώντας έτσι την εμπειρία αυτή πραγματικά αξέχαστη.

Περίληψη/Abstract

Περίληψη: Τα γλοιώματα είναι οι πιο συχνοί πρωτογενείς όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Εκδηλώνουν σημαντική γενετική και επιγενετική ποικιλομορφία, είναι δύσκολο να παρακολουθηθούν κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους και εμφανίζουν υψηλά ποσοστά υποτροπής και θνησιμότητας. Η ιστολογική βιοψία είναι μια καθιερωμένη μέθοδος για την συλλογή κυττάρων του όγκου και την παθολογοανατομική ανάλυση τους, επιτρέποντας τη διάγνωση, την κατηγοριοποίηση και την πρόγνωση όταν έχει εντοπισθεί η ανατομική περιοχή του όγκου και υπάρχει η δυνατότητα χειρουργικής εξαίρεσης. Ωστόσο, η ιστολογική βιοψία είναι επεμβατική και σε κάποιους ασθενείς αναποτελεσματική, ενώ επίσης δεν μπορεί να λαμβάνει χώρα πολύ συχνά για την άμεση ανίχνευση των μεταλλάξεων, την καθημερινή παρακολούθηση της νόσου ή την άμεση αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην θεραπεία. Ως λύση, η υγρή βιοψία έχει αναδυθεί ως μια ελάχιστα επεμβατική πράξη, προσφέροντας εύκολη και γρήγορη λήψη δείγματος από τον όγκο και περαιτέρω την συνεχή παρακολούθηση αυτού. Αντιπροσωπεύει μια νέα και προτιμητέα προσέγγιση για την άμεση απόκτηση δεδομένων σχετικά με τον όγκο, την εξατομικευμένη διάγνωση, την πρόγνωση και την πιθανότητα υποτροπής.

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην περιγραφή των νεότερων εξελίξεων στο πεδίο της υγρής βιοψίας και την αποτελεσματικότητα της στη διάγνωση και διαχείριση των γλοιωμάτων, υποδεικνύοντας αρκετούς δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των χαρακτηριστικών του όγκου, όπως το ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), το ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), τα κυκλοφορόντα πρωτεϊνικά στοιχεία, τα κυκλοφορόντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και τα εξωσώματα (ή εξωσωμάτια). Επιπλέον, η παρούσα διπλωματική εργασία συζητά τα οφέλη του συνδυασμού της υγρής βιοψίας με την ακτινογενωμική, για την υποστήριξη της πρώιμης και ακριβούς διάγνωσης των γλοιωμάτων,

την ακριβή προγνωστική αξιολόγηση και την παρακολούθηση της νόσου σε πραγματικό χρόνο, με απώτερο σκοπό την επίτευξη βέλτιστων θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Abstract: Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system (CNS). They exhibit significant genetic and epigenetic diversity, are challenging to monitor, and have high relapse and mortality rates. Tissue biopsy is a well-established method for collecting and analyzing tumor cells, allowing for diagnosis, classification, and prognosis prediction when the tumor's location is confirmed for surgical removal. However, it is invasive and impractical for frequent patient screening, mutation detection, disease monitoring, or therapy resistance assessment. As a solution, liquid biopsy has emerged as a minimally invasive alternative, offering easy tumor sampling and continuous monitoring. It represents a novel and preferable approach to obtain rapid data on potential tumor risk, personalized diagnosis, prognosis, and recurrence assessment. This thesis describes the advancements in liquid biopsy for glioma diagnosis and management, highlighting various biomarkers that can be employed for analyzing tumor characteristics, including cell-free DNA (cfDNA), cell-free RNA (cfRNA), circulating proteins, circulating tumor cells (CTCs), and exosomes. Additionally, it discusses the advantages of combining liquid biopsy with radiogenomics to support early and accurate diagnoses, precise prognostic evaluations, and real-time disease monitoring, ultimately striving for more optimal treatment protocols.

Λέξεις κλειδιά: γλοίωμα, γλοιοβλάστωμα, ιστική βιοψία, υγρή βιοψία, cfDNA (ελεύθερο κυτταρικό DNA), CTCs (κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου), εξωσωμάτια, LINE-1, επιγενετική, ακτινογενωμική

Keywords: glioma; glioblastoma; tissue biopsy; liquid biopsy; cfDNA; CTCs; exosomes; LINE-1; epigenetics; radiogenomics

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη/Abstract.....	5-6
Λίστα εικόνων/Λίστα πινάκων	8
Δήλωση συγγραφέα διπλωματικής εργασίας	9
Μεθοδολογία, στρατηγική αναζήτησης και εξαγωγή δεδομένων βιβλιογραφικής ανασκόπησης	10
1. Εισαγωγή/Σκοπός, στόχοι και ερευνητικά ερωτήματα	11-18
2. Βασικές Αρχές και Εφαρμογές της Υγρής Βιοψίας.....	19
2.1. Αναλυτές που εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά μέσω της υγρής βιοψίας.....	20
2.1.1. Ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), Ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), και κυκλοφορόντες πρωτεΐνες.....	21-25
2.1.2. Κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου (CTCs).....	25-26
2.1.3. Εξωκυττάρια κυστίδια/Εξωσωμάτια (Extracellular Vesicles, EVs/Exosomes) και μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα (micro-ribonucleic acids, miRNAs).....	26
3. Βιοδείκτες που εντοπίζονται μέσω της ανάλυσης της Υγρής Βιοψίας για την διάγνωση των Γλοιωμάτων.....	29
3.1. cfDNA, cfRNA, και Κυκλοφορόντες πρωτεΐνες στην διάγνωση των Γλοιωμάτων.....	29
3.1.1. cfDNA.....	29-35
3.1.2. cfRNA.....	35-36
3.1.3. Κυκλοφορόντες πρωτεΐνες.....	36-38
3.2. Τα CTCs στην διάγνωση των Γλοιωμάτων.....	38-40

3.3. Τα Εξωσώματα στην διάγνωση των Γλοιωμάτων.....	40-42
4. Συνδυασμός Ακτινογενωμικής (Radiogenomics) και Υγρής Βιοψίας για την διάγνωση των Γλοιωμάτων.....	44-46
5. Συζήτηση-Μελλοντικές προοπτικές.....	47-49
Βιβλιογραφία.....	50-76
Δημοσίευση της διπλωματικής εργασίας σε διεθνές επιστημονικό περιοδικό.....	77

Λίστα εικόνων

Εικόνα 1.....	12
Εικόνα 2.....	13
Εικόνα 3.....	14
Εικόνα 4.....	18
Εικόνα 5.....	20
Εικόνα 6.....	47

Λίστα πινάκων

Πίνακας 1.	27-29
Πίνακας 2.	42-44

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο υπογράφων Σκούρας Παναγιώτης του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 7450532100019 φοιτητής του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

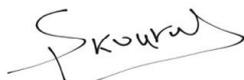
Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του διπλώματός μου».

Ημερομηνία,

05/03/2024, Αθήνα

Ο Δηλών,

Σκούρας Παναγιώτης



Μεθοδολογία, στρατηγική αναζήτησης και εξαγωγή δεδομένων βιβλιογραφικής

ανασκόπησης

Η διπλωματική αφορά μια πρόσφατη ανασκόπηση της τρέχουσας βιβλιογραφίας στην υγρή βιοψία η οποία βασίστηκε σε διαφορετικές βάσεις δεδομένων. Η αναζήτηση διεξήχθη στις ακόλουθες ηλεκτρονικές επιστημονικές βάσεις δεδομένων: PubMed, Scopus. Εφαρμόστηκε συγκεκριμένος τρόπος αναζήτησης σχετικών επιστημονικών άρθρων με βάση το θέμα της διπλωματικής, χρησιμοποιώντας λέξεις κλειδιά όπως liquid biopsy, gliomas, radiogenomics. Οι όροι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν είτε συνδυαστικά είτε με μικρές τροποποιήσεις, όπως glioma biomarkers, glioma biomarkers and liquid biopsy, σε όλες τις βάσεις δεδομένων. Δεν τέθηκε χρονικός περιορισμός για την αναζήτηση των επιστημονικών άρθρων.

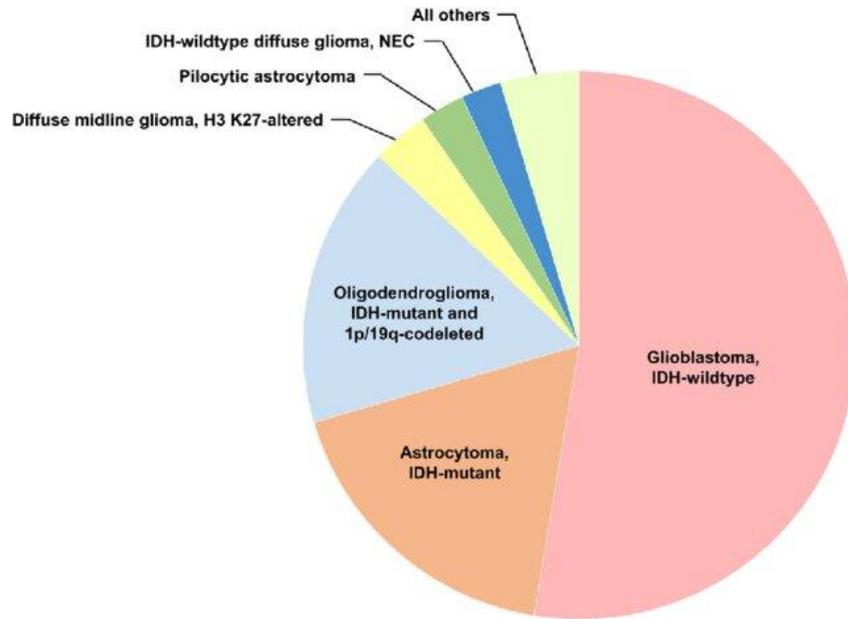
Όσον αφορά τα κριτήρια συμπερίληψης, στην ανασκόπηση συμπεριελήφθησαν όλων των ειδών οι έρευνες, όπως για παράδειγμα, οι τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές, οι μελέτες σειράς, οι μελέτες συστηματικής ανασκόπησης, ανθρώπινες και ζωικές μελέτες σχετικά την εφαρμογή της υγρής βιοψίας στα γλοιώματα. Όσον αφορά τα κριτήρια απόρριψης, εξαιρέθηκαν όσα άρθρα δεν βρίσκονταν σε μορφή πλήρους ελεύθερου κειμένου (full text άρθρα) και όσα ήταν γραμμένα σε διαφορετική από την αγγλική γλώσσα.

Η διαλογή των κειμένων και εξαγωγή δεδομένων έγινε σε δύο φάσεις, όπου, στην πρώτη, επιλέχθηκαν όσα άρθρα θεωρούνταν εντός του πεδίου ανάλυσής και, στη δεύτερη, επαναξιολογήθηκαν για το αν πληρούν όλα τα κριτήρια εγκυρότητας.

1. Εισαγωγή

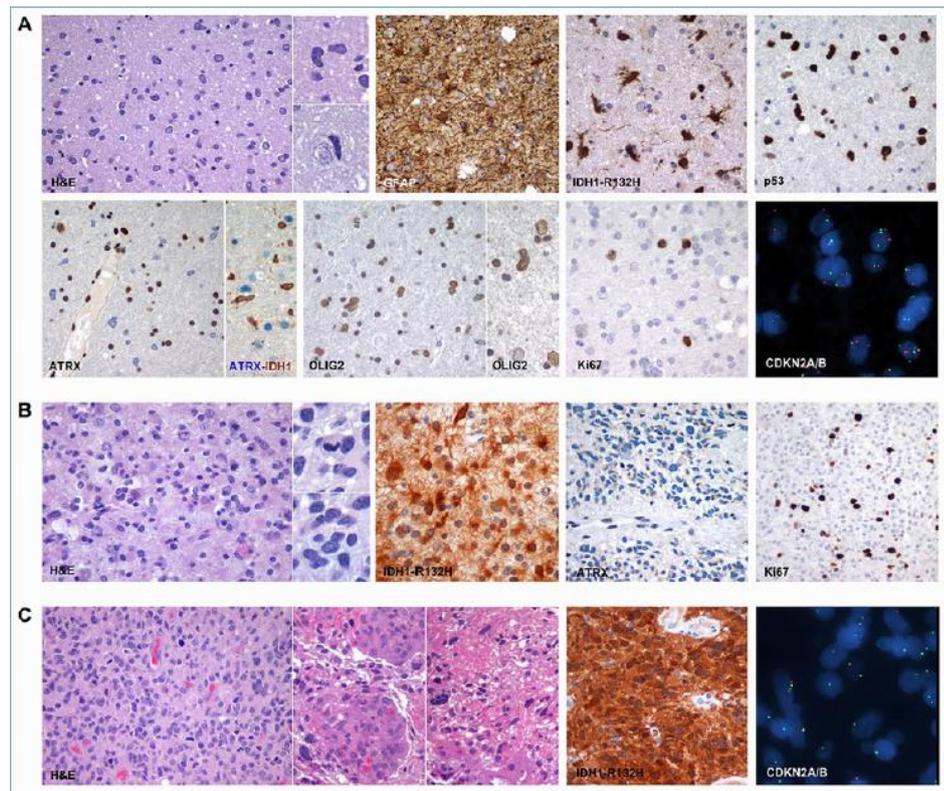
Τα γλοιώματα είναι οι πιο συχνοί εμφανιζόμενοι πρωτοπαθής όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), και χαρακτηρίζονται από υψηλή ετερογένεια και επιθετικότητα, υψηλά ποσοστά υποτροπής και θνητότητας. Συγκεκριμένα, αντιπροσωπεύουν το 24,7% όλων των πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου και ένα το 74,6% των κακοήθων όγκων εγκεφάλου (Skouras, Markouli, et al., 2023). Το γλοιοβλάστωμα (Αστροκύττωμα βαθμού 4), είναι ο πιο επιθετικός όγκος εγκεφάλου, με δυσμενή πρόγνωση παρά τις επιθετικές θεραπείες όπως ο συνδυασμός χειρουργικής εξαίρεσης, ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία [π.χ. Τεμοζολομίδη (TMZ)]. Ο όγκος χαρακτηρίζεται από υψηλή διηθητικότητα, ο κίνδυνος υποτροπής είναι αρκετά υψηλός μετά τη χειρουργική επέμβαση, το φαρμακευτικό σχήμα εμφανίζει περιορισμένη διείσδυση στον όγκο, επίσης αναπτύσσει αντίσταση στη χημειοθεραπεία, οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο σε χαμηλά ποσοστά επιβίωσης (Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Παρά τις σημαντικές προόδους στην κατανόηση της ανάπτυξης των γλοιωμάτων (gliomagenesis), οι ακριβείς μοριακές αλλαγές που ευθύνονται για τον διαφοροποιητικό χαρακτήρα των γλοιωμάτων σε διάφορους υποτύπους παραμένουν ανεξερεύνητες (Björkblom et al., 2022).

Στην εικόνα 1., παρατηρούμε τον σχετικό επιπολασμό των γλοιωμάτων σε ενήλικες. Τα διάχυτα γλοιώματα των ενηλίκων (adult-type diffuse gliomas) παρατηρούνται συχνότερα, με το γλοιοβλάστωμα, με τον υπότυπο IDH-wildtype, να είναι ο πλέον κυρίαρχος. Μεταξύ των διάχυτων γλοιωμάτων των ενηλίκων όλων των βαθμών, η εμφάνιση της μετάλλαξης IDH αναφέρεται να είναι περίπου 40%–50% (Suh et al., 2019).



Εικόνα 1. Το σχεδιάγραμμα παρουσιάζει την συχνότητα εμφάνισης των γλοιωμάτων στους ενήλικες από δεδομένα που προέρχονται από την μοριακή ταξινόμηση 1480 περιστατικών στο Νοσοκομείο Severance. Το συγκεκριμένο διάγραμμα πίτας προορίζεται ως σχηματική αναπαράσταση, παρά ως ακριβής επίπτωση των όγκων, λόγω της ποικίλης κατανομής αυτών ανάμεσα σε διάφορες εθνικότητες και ιδρύματα, NEC = δεν σταδιοποιείται αλλού (το σχήμα δανείστηκε από την μελέτη των Park et al, 2023 (Park et al., 2023, p. 202))

Η ενσωμάτωση μοριακών παραμέτρων παράλληλα με την ιστολογική ανάλυση, εισήχθη το 2016 (Louis et al., 2016) και βελτιστοποιήθηκε στην κατάταξη των όγκων ΚΝΣ του WHO το 2021 (Louis et al., 2021), όπου αξιοποιήθηκε η πρόοδος στη γενωμική του καρκίνου, για να βελτιωθεί η κατηγοριοποίηση των ασθενών με όγκους εγκεφάλου. Στην εικόνα 2. αποτυπώνονται οι διάφοροι τύποι αστροκυτωμάτων και η ανάλογη ιστοπαθολογική τους εικόνα.

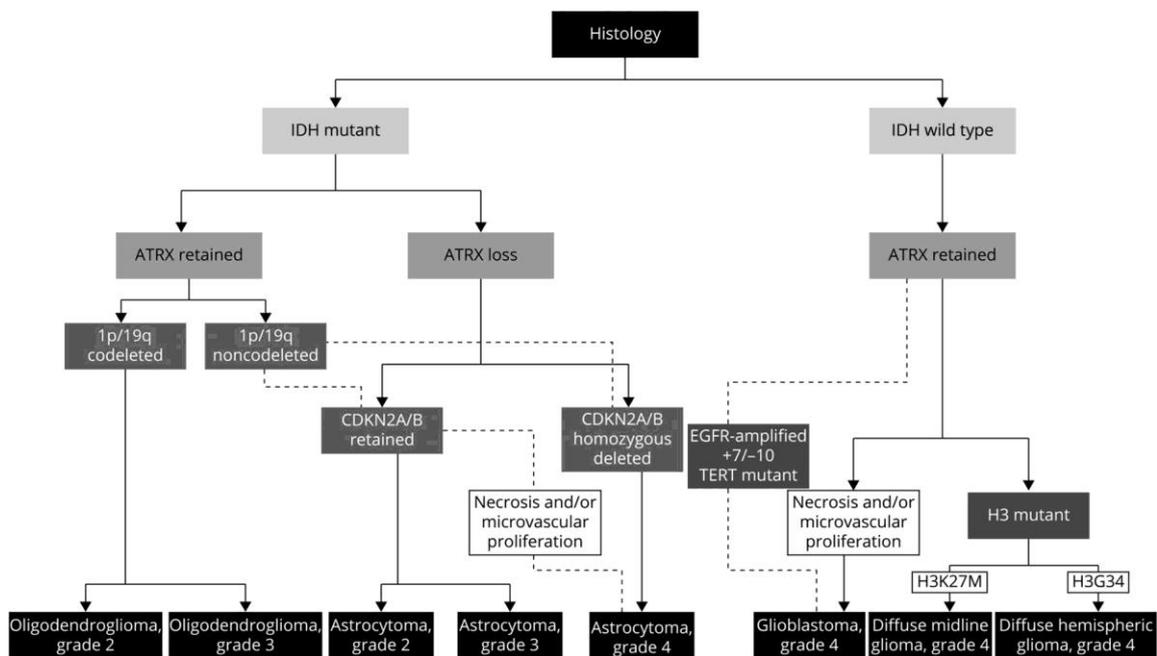


Εικόνα 2. (Α) Αστροκύττωμα, με μετάλλαξη IDH, κατηγορίας 2. Οι εικόνες απεικονίζουν ένα διάχυτο διηθητικό αστροκύττωμα με χαμηλή κυτταρική πυκνότητα και χαμηλή μητωτική δραστηριότητα, (Β) Αστροκύττωμα, με μετάλλαξη IDH, κατηγορίας 3. Αυξημένη πυκνότητα κυττάρων, ατυπία και υψηλότερος ρυθμός μιτώσεων χαρακτηρίζουν αυτούς τους όγκους, (C) Αστροκύττωμα, με μετάλλαξη IDH, κατηγορίας 4. Η αυξημένη πυκνότητα κυττάρων, ο πολυμορφισμός, η αναπλασία, η νέκρωση και/ή η σπειραματοειδής μικροαγγειακή εξάπλωση είναι χαρακτηριστικά όγκων αυτής της κατηγορίας (το σχήμα δανείστηκε από το επιστημονικό άρθρο των Antonelli and Poliani, 2022 (Antonelli & Poliani, 2022))

Η μοριακή ομαδοποίηση των όγκων, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η ανίχνευση των μεταλλάξεων της IDH, η 1p19q-συνδιαγραφή, και η διαγραφή των CDKN2A/B, βοηθά πλέον στην πιο ακριβή κατηγοριοποίηση των γλοιωμάτων, επηρεάζοντας όχι μόνο τα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου του όγκου, αλλά και τα κλινικά αποτελέσματα (Björkblom

et al., 2022). Επίσης, οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι κρίσιμες στη μετάβαση από υγιή σε κακοήθη κύτταρα, εμπλέκοντας περίπλοκες αλληλεπιδράσεις με γενετικές αλλαγές.

Επηρεάζουν κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την προοδευτική εξέλιξη του γλοιώματος, συμπεριλαμβανομένης της επισκευής του DNA, της απόπτωσης, της διήθησης των κυττάρων και της πρόσληψής τους, όλες αυτές που συνεισφέρουν σημαντικά στην “αναταραχή” που μετατρέπει τα φυσιολογικά κύτταρα σε κύτταρα κακοήθειας (γλοιώματα). Τα δύο βασικά είδη επιγενετικών τροποποιήσεων είναι η μεθυλίωση του DNA και οι αλλαγές των ιστονών (Kreth et al., 2014). Παρακάτω στην εικόνα 3. απεικονίζεται η κατάταξη των γλοιωμάτων.



Εικόνα 3. Αλγόριθμος Κατάταξης Διάχυτων Γλοιωμάτων των Ενηλίκων (το σχήμα δανείστηκε από το επιστημονικό άρθρο των Meulen et al, 2022 (van der Meulen et al., 2022))

Οι προσεγγίσεις θεραπείας για τα γλοιώματα περιλαμβάνουν μια συνδυασμένη παρέμβαση χειρουργικής, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας. Τα αποτελέσματα επιβίωσης των ασθενών με γλοίωμα εμφανίζουν σημαντική μεταβλητότητα, εξαρτώμενη από τον υπότυπο του γλοιώματος και τους προγνωστικούς παράγοντες. Το γλοιοβλάστωμα,

ειδικότερα η παραλλαγή IDH-wildtype, συνδέεται με μια πολύ κακή πρόγνωση, χαρακτηριζόμενη από έναν διάμεσο χρόνο επιβίωσης μόλις 12 έως 18 μήνες (Wen & Kesari, 2008). Αντιθέτως, τα γλοιώματα χαμηλού βαθμού (LGG) εμφανίζουν μια πιο ευνοϊκή πρόγνωση, με έναν διάμεσο χρόνο επιβίωσης που κυμαίνεται από 5 έως 7 χρόνια (van den Bent et al., 2005).

Στους ενήλικους ασθενείς, η θετική προγνωστική αξία αποδίδεται στις μεταλλάξεις του IDH, οι οποίες λειτουργούν ως οι σημαντικότεροι προγνωστικοί δείκτες. Ωστόσο, η διαγραφή του *CDKN2A* στα αστροκυτώματα με μετάλλαξη IDH υποδηλώνει το υψηλότερο βαθμό κακοήθειας. Επιπλέον, η παρουσία μεταλλάξεων στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου *TERT*, οι αλλαγές στον EGFR, ή ο συνδυασμός ύπαρξης επιπλέον χρωμοσώματος 7 και απώλειας 10 [gain of chromosome 7 and loss of chromosome 10 (7+/10-)] μπορούν να χαρακτηρίσουν το αστροκύτωμα τύπου IDH-wildtype σε γλοιοβλάστωμα. Σε παιδιατρικούς ασθενείς, οι πιο κρίσιμοι δείκτες που παρουσιάζουν κακή πρόγνωση είναι οι μεταβολές στον H3F3A. Η μεθυλίωση του υποκινητή του *MGMT* κατέχει καίρια κλινική σημασία στην πρόγνωση των αποτελεσμάτων θεραπείας με Τεμοζολομίδη. Αντίθετα, οι ελλείψεις στις διορθώσεις αναντιστοιχίας προκαλούν φαινότυπο υπερμετάλλαξης, προβλέποντας κακή αντίδραση στην TMZ (Śledzińska et al., 2021).

Σκοπός, στόχοι και ερευνητικά ερωτήματα

Σκοπός, της παρούσας διπλωματικής εργασίας - ανασκόπησης είναι η διερεύνηση των εξελίξεων και της αποτελεσματικότητας, μέσα από τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα, της τεχνικής της Υγρής Βιοψίας (Liquid biopsy, LB), για τη διάγνωση και θεραπεία των γλοιωμάτων, και για την εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου. Ειδικότερα, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η παρουσίαση των εξελίξεων και η

εφαρμογή της LB στα γλοιώματα μέσα από έγκυρες διεθνείς επιστημονικές βάσεις δεδομένων.

Επομένως, ως κύρια ερευνητικά ερωτήματα τίθενται τα εξής:

- Έχει προχωρήσει η έρευνα που σχετίζεται με την υγρή βιοψία και τα γλοιώματα;
- Μέσω της LB, ποιοι βιοδείκτες μπορούν να αναδείξουν καλύτερα το μοριακό προφίλ του όγκου και να θέσουν την διάγνωση, και κατά πόσο αυτοί οι βιοδείκτες είναι ειδικοί για κάθε υπότυπο αλλά και για κάθε στάδιο της νόσου;
- Πως μπορεί η ακτινογενωμική να επωφεληθεί από την εξέλιξη της LB, και πως μπορούν μαζί να αναγνωρίζουν με ακρίβεια και γρήγορα τις μοριακές αλλαγές ενός όγκου; Επίσης υπάρχουν εξελίξεις όσον αφορά την επίτευξη ακριβούς διάγνωσης με ακριβή τρόπο, ενισχύοντας την ακτινογενωμική με τα οφέλη της LB;

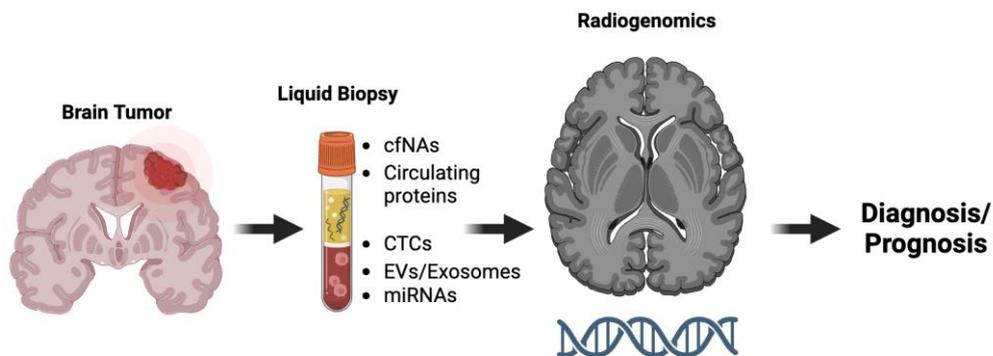
Μέχρι σήμερα, η χρήση δείγματος ιστού από βιοψίες χρησιμοποιείται για την ιστολογική και μοριακή ανάλυση όγκων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση, να ταξινομηθούν οι τύποι των όγκων, να ανιχνευθούν οι ειδικές για τον εκάστοτε όγκο μεταλλάξεις και να αποφασιστούν με αυτόν τον τρόπο τα θεραπευτικά πρωτόκολλα για την αντίστοιχη περίπτωση (Cohen et al., 2018). Η βιοψία ιστού, παρόλο που αποτελεί σημαντικό κομμάτι της διάγνωσης αλλά και της πρόγνωσης, αποτελεί ωστόσο μια επεμβατική και πολλές φορές απαιτητική διαδικασία. Μια χειρουργική βιοψία εγκεφαλικού ιστού αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας και την πιθανότητα βλάβης σε ένα σημαντικό εγκεφαλικό τμήμα (π.χ., ένα γλοίωμα το οποίο διηθεί μία σημαντική και ευαίσθητη περιοχή του βρεγματικού ή του μετωπιαίου λοβού), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νευρολογικά ελλείμματα, ιδίως στην περίπτωση του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου στα παιδιά (Chen & Zhao, 2019).

Επιπλέον, οι επεμβατικές διαδικασίες διέπονται από περιορισμούς στην λήψη του δείγματος του όγκου, ως προς την ποσότητα και την ποιότητα του βιοπτικού υλικού. Τα συνεχή δείγματα βιοψίας ιστού κατά την διάρκεια της θεραπείας και παρακολούθησης του όγκου, καθιστούν δύσκολη διαδικασία τον χαρακτηρισμό του προφίλ του όγκου (Perakis & Speicher, 2017). Η όλη αυτή καθιερωμένη διαδικασία λήψης βιοψιών, περιορίζει την διενέργεια όλων των απαραίτητων μοριακών εξετάσεων που απαιτούνται για μια αξιόπιστη, με βάση τις σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες (guidelines), διάγνωση. Σε αυτό το πλαίσιο, η ανίχνευση των γενετικών μεταλλάξεων αλλά και των επιγενετικών αλλαγών, δεν είναι πάντα δυνατή.

Η βιοψία του ιστού ενδέχεται να μην επιτρέπει την ικανοποιητική ανίχνευση του όγκου σε πρώιμα στάδια ή σε περιπτώσεις υπολειμματικής νόσου και κατά αυτόν τον τρόπο η βιοψία δεν είναι κατάλληλη για έλεγχο (Hirahata et al., 2022). Επιπλέον, η χρονική και χωρική ετερογένεια του όγκου μπορεί να μειώσει την πρακτική χρησιμότητα των ιστών βιοψίας ως εργαλεία, για την παρακολούθηση της προόδου της θεραπείας του όγκου και την σωστή αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία (Cohen et al., 2018). Ειδικότερα, σε πολυεστιακές μορφές όγκων, ενδέχεται να είναι απαραίτητο η διενέργεια λήψης πολλαπλών βιοψιών για να διαπιστωθεί με ακρίβεια η παθολογία του όγκου, καθώς οι όγκοι εξελίσσονται συνεχώς, τόσο χωρικά όσο και χρονικά, κατά ιδίου σκοπού ή και ως αποτέλεσμα ως προς την θεραπεία (Perakis & Speicher, 2017).

Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα, η ελάχιστη επεμβατική διαδικασία της υγρής βιοψίας, αποτελεί λύση σε αυτά τα προβλήματα, και ως μια συνεχώς εξελισσόμενη διαδικασία που θα επιτρέψει την πρώτη διάγνωση του όγκου και φυσικά θα δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο, την πρόγνωση αλλά και την πιθανότητα υποτροπής της παθολογίας.

Σε αυτή την διπλωματική εργασία, παραθέτουμε και αναλύουμε τις πιο πρόσφατες εξελίξεις της LB για ασθενείς με γλοιώματα, εστιάζοντας στους πιο υποσχόμενους βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των διαφόρων χαρακτηριστικών του όγκου. Επιπλέον, η συνδυαστική χρήση της LB με τη ακτινογενωμική όχι μόνο προτείνεται ως πιθανή προσέγγιση για την επίτευξη πρώιμων και ακριβών διαγνώσεων και πρόγνωσης αλλά και για τη δυνατότητα παρακολούθησης της νόσου σε πραγματικό χρόνο και παράλληλα για την λήψη των βέλτιστων αποφάσεων θεραπείας (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας της LB και της ακτινογενωμικής για την διάγνωση και την πρόγνωση της νόσου. Το μικροπεριβάλλον ενός όγκου εγκεφάλου παράγει διάφορους αναλύτες (cfNAs = cell free nucleic acids/ελεύθερα κυτταρικά νουκλεϊκά οξέα, Circulating proteins/κυκλοφορόντες πρωτεΐνες, CTCs = Circulating tumor cells/κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου, EVs/Exosomes = Extracellular vesicles/εξωκυττάρια κυστίδια ή εξωσωμάτια, miRNAs = micro ribonucleic acids/μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα) στα διάφορα βιολογικά υγρά (όπως αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σάλιο και ούρα), οι οποίοι μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της διαδικασίας της υγρής βιοψίας. Σε συνδυασμό με την ιατρική απεικόνιση του όγκου, η ακτινογενωμική, μπορεί να διευκολύνει τόσο τη διάγνωση όσο και την πρόγνωση της νόσου (δημιουργήθηκε με πρόσβαση στο BioRender)

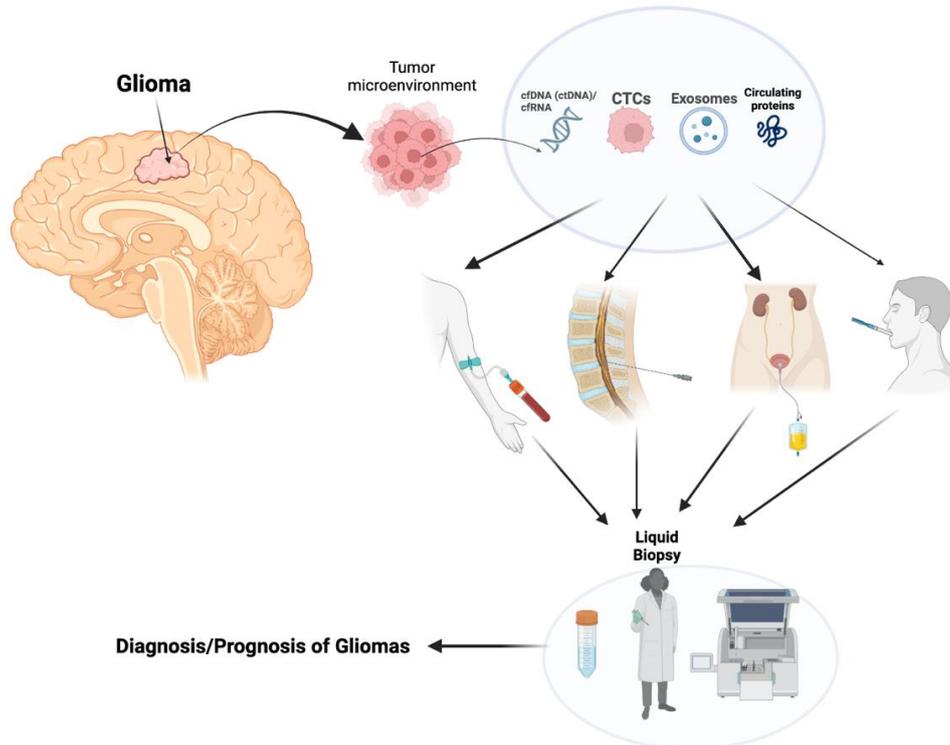
2. Βασικές Αρχές και Εφαρμογές της Υγρής Βιοψίας

Τα κύτταρα των όγκων μπορεί να απελευθερώσουν πολλά στοιχεία στην κυκλοφορία τα οποία μπορούν να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένα όργανα σε όλο το σώμα. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν ανέπαφα κυτταρικά στοιχεία του όγκου, καθώς και το κυτταρικό DNA και RNA των όγκων, πρωτεΐνες ή εξωσωμάτια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες του όγκου που κυκλοφορούν στο αίμα και μπορεί να μας παρέχουν παρόμοιες πληροφορίες με αυτές που παρέχει η βιοψία του όγκου, εντοπίζοντας την πρωτοπαθή εστία της παθολογίας και παίζοντας έτσι ένα ρόλο κλειδί στην παρακολούθηση της προόδου του όγκου ή της αποτελεσματικότητας της θεραπείας κατά του όγκου (Cohen et al., 2018).

Δεδομένης της αυξανόμενης ευαισθησίας των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των νουκλεϊνικών οξέων, είναι σήμερα δυνατό να αναλύσουμε νουκλεϊκά οξέα που απελευθερώνονται από όγκους και κυκλοφορούν στο αίμα. Η γενετική και επιγενετική ανάλυση του κυκλοφορούντος κυτταρικού DNA του όγκου, για παράδειγμα, αποτελεί ένα σημαντικό νέο εργαλείο σχετικά με τη θεραπεία. Χρησιμοποιώντας την υγρή βιοψία (YB), οι κλινικοί μπορούν να λάβουν δεδομένα σχετικά με τον κίνδυνο και τον προγνωστικό χαρακτήρα της νόσου και να προβλέψουν τις πιθανότητες υποτροπής του όγκου (Schilsky & Longo, 2022). Πιο αναλυτικά, η YB είναι μια μέθοδος ελάχιστης επεμβατικότητας (π.χ. φλεβοκέντηση) που επιτρέπει τον εντοπισμό πολλών διαφορετικών αναλυτών (Chen & Zhao, 2019) σε ποικίλα βιολογικά υγρά για την παρακολούθηση της προόδου της νόσου (Eibl & Schneemann, 2021; Poulet et al., 2019). Δεδομένου ότι οι περισσότεροι όγκοι απελευθερώνουν διάφορους αναλύτες στην κυκλοφορία του αίματος, η YB συνήθως περιλαμβάνει την λήψη αίματος. Ωστόσο, άλλα σωματικά υγρά, όπως η βλέννη ή τα πτύελα, το πλευριτικό υγρό, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και τα ούρα, επίσης μπορούν να αναλυθούν (Bauman et al., 2022; Lone et al., 2022).

2.1. Αναλύτες που εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά μέσω της υγρής βιοψίας

Το 1996, το National Comprehensive Cancer Network (NCCN) εισήγαγε αρκετούς βιοδείκτες στην κλινική πράξη, βασιζόμενο σε κλινικούς και/ή τεχνικούς παράγοντες για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς (Hayes et al., 1996). Το 2011, το NCCN ενημέρωσε και θέσπισε συγκεκριμένους βιοδείκτες ως καθιερωμένη αντιμετώπιση (standard of care) σε ορισμένους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων και των γλοιωμάτων (Febbo et al., 2011). Αναλύτες με δυνατότητα βιοδείκτη που μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της Υγρής Βιοψίας (Liquid Biopsy) περιλαμβάνουν το κυτταρικό ελεύθερο DNA (cfDNA), το κυτταρικό ελεύθερο RNA (cfRNA), τις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες, κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου (CTC) και τα εξωκυττάρια κυστίδια ή εξωσωμάτια (EVs) όπως τα εξωσωμάτια, τα οποία μπορεί να περιέχουν το DNA του όγκου και άλλα νανομόρια όπως τα mRNA/miRNA (εικόνα 5) (Jelski & Mroczko, 2021; Westphal & Lamszus, 2015).



Εικόνα 5. Ανίχνευση διαφόρων αναλυτών όγκου σε διάφορα βιολογικά υγρά (ΕΝΥ, ούρα, αίμα, πτύελα) με υγρή βιοψία. Πολλά είδη βιο-υγρών μπορούν να συλλεχθούν

χρησιμοποιώντας την ΥΒ και οι αναλύτες που προέρχονται από τον όγκο (cfDNA, cfRNA, εξωσώματα) μετρούνται χρησιμοποιώντας γενωμικές διαδικασίες για να βοηθήσουν στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία του όγκου (δημιουργήθηκε με πρόσβαση στο BioRender)

2.1.1. Ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), Ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), και κυκλοφορόντες πρωτεΐνες

Το κυκλοφορούν cfDNA αφορά σε θραύσματα DNA των κυττάρων του όγκου που μπορούν να ανιχνευθούν στην κυκλοφορία. Τα κύτταρα του όγκου που υπόκεινται νέκρωση και/ή υποβάλλονται σε απόπτωση απελευθερώνουν cfDNA στην κυκλοφορία του αίματος, το οποίο περαιτέρω μεταβολίζεται από την DNase ή άλλα ένζυμα (Aarthy et al., 2015). Βασιζόμενοι σε αυτά τα στοιχεία, το αίμα του ασθενούς μπορεί να περιέχει cfDNA που φέρει θραύσματα του κυκλοφορόντος DNA του όγκου προερχόμενο από τα κύτταρα του όγκου. Αυτό μπορεί να εξεταστεί περαιτέρω σε μοριακό επίπεδο για να αποκαλυφθεί πλήρως το μοριακό προφίλ του όγκου (Rykona et al., 2012). Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του cfDNA, έχει χρόνο ημίσειας ζωής σχεδόν δύο ώρες και μπορεί να ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μετά την λήψη και απομόνωση του δείγματος (Roth et al., 2011). Βασιζόμενοι στα προαναφερθέντα δεδομένα, το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη των μοριακών δυναμικών του όγκου σε πραγματικό χρόνο (Aarthy et al., 2015). Σε ασθενείς με γλοίωμα, η πλειονότητα του cfDNA που δεν είναι προερχόμενη από τον όγκο αποτελείται από cfDNA το οποίο προέρχεται από διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της νέκρωσης και άλλων κυτταρικών εκκριτικών διαδικασιών (Carpenter & Bagley, 2022). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός απελευθέρωσης του cfDNA εξαρτάται από βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του φύλου, του δείκτη μάζας σώματος, της υγείας του εκάστοτε οργανισμού και

της παρουσίας λοιμώξεων ή συστηματικών φλεγμονωδών καταστάσεων (Aucamp et al., 2018; Bronkhorst et al., 2019).

Η ανάλυση του κυκλοφορόντος DNA του όγκου (ctDNA) περιλαμβάνει τον εντοπισμό και την ανάλυση θραυσμάτων DNA που εκκρίνονται από τα κύτταρα του όγκου στην κυκλοφορία του αίματος. Με την απομόνωση και την ανάλυση των αλληλουχιών του ctDNA, μπορούν να αναγνωριστούν και να αναλυθούν συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές που συσχετίζονται με τον εγκεφαλικό όγκο. Οι τεχνολογίες cfDNA μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο ctDNA που είναι ενδεικτικές ενός όγκου εγκεφάλου. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να περιλαμβάνουν μονονουκλεοτιδικές μεταβολές (SNVs = single nucleotide variants), εισαγωγές/διαγραφές (indels), ή μεγαλύτερες δομικές μεταβολές, όπως συγχωνεύσεις γονιδίων ή χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (Mair & Mouliere, 2022). Η ανάλυση της ποικιλίας του αριθμού αντιγράφων (Copy number variation - CNV) του cfDNA επιτρέπει τον εντοπισμό αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων του DNA, όπως ενισχύσεις ή διαγραφές, οι οποίες μπορούν να παρέχουν δεδομένα στο γενωμικό τοπίο των όγκων του εγκεφάλου (Mouliere et al., 2018; Sun et al., 2019). Αυτές οι προηγμένες τεχνολογίες επιτρέπουν σε πραγματικό χρόνο (real-time) την παρακολούθηση της δυναμικής του όγκου και της ανταπόκρισης του στη θεραπεία μέσω της ανάλυσης του ctDNA σε διάφορες στιγμές κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό νεοεμφανιζόμενων γενετικών αλλαγών και μηχανισμών αντοχής, καθοδηγώντας έτσι τις αποφάσεις σχετικά με τη θεραπεία (Euskirchen et al., 2017).

Το ENY έχει προταθεί ως το πιο κατάλληλο βιολογικό δείγμα για την αξιολόγηση του cfDNA σε όγκους εγκεφάλου. Η συλλογή του, ωστόσο, απαιτεί μια επεμβατική διαδικασία που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί τακτικά για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης του όγκου στην θεραπεία (Y. Wang et al., 2015). Συνεπώς, υπάρχει αυξανόμενη ανάγκη για τη χρήση εναλλακτικών βιολογικών υγρών, όπως αίμα, πτύελα και ούρα, τα οποία μπορούν

επίσης να χρησιμοποιηθούν σε συγκεκριμένα σωληνάρια συλλογής με σταθεροποιητικά διαλύματα (buffer), όπως το EDTA.

Το σάλιο, από την άλλη πλευρά, λειτουργεί ως ένα ζωτικό βιολογικό υγρό που διαθέτει πλεονεκτήματα έναντι του αίματος, κυρίως επειδή δεν πήζει. Αυτό το χαρακτηριστικό το καθιστά πιο εύκολο στη συλλογή του, να μεταφερθεί αλλά και να αποθηκευτεί. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι το σάλιο αποτελείται κυρίως από νερό, γλυκοπρωτεΐνες, ένζυμα και πρωτεΐνες, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την ανάλυση του δείγματος. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι πρωτεΐνες των πτυέλων, τα cfDNA και cfRNA βρίσκονται σε κυστίδια (ενδοκυστίδια) μέσα σε δομές εξωσωματίων, μπορεί να υποστούν γρήγορη διάσπαση όταν εκτίθενται σε ξένο περιβάλλον εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος (Helmerhorst & Oppenheim, 2007). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το σάλιο έχει έναν παχύρευστο χαρακτήρα και μπορεί να περιέχει κατάλοιπα τροφής ή άλλα σωματίδια, τα οποία μπορεί να αποτελούν πρόκληση κατά την ανάλυση των cfDNA, cfRNA ή των εξωσωμάτων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη ότι τα εξωσώματα, καθώς είναι μεγαλύτερα από τις πρωτεΐνες, μπορεί να χαθούν απρόθυμα κατά τη διαδικασία φιλτραρίσματος (Hyun et al., 2018).

Επιπλέον, ενώ τα ούρα ως βιολογικό υγρό είναι πολλά υποσχόμενα, η κατανόησή μας για το cfDNA των ούρων και τις μεθόδους επεξεργασίας τους παραμένει περιορισμένη. Το cfDNA που μπορεί να εντοπιστεί στα ούρα, αντίθετα από το cfDNA που προέρχεται από το αίμα, εμφανίζει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής (Yao et al., 2016), λόγω αυξημένης δραστηριότητας των DNase I και II (Bryzgunova et al., 2015; Nadano et al., 1993). Είναι σημαντικό να ανασταλεί η λειτουργικότητα των DNases για να αποτραπεί η αποσύνθεση και να διατηρηθεί η ακεραιότητα του cfDNA που προέρχεται από τα ούρα. Μία αποτελεσματική προσέγγιση αποτελεί η προηγούμενη επεξεργασία των δειγμάτων των ούρων με EDTA και η αποθήκευση τους στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μακροχρόνια διατήρηση.

Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποστειρωμένα δοχεία για την αποθήκευση των δειγμάτων στους 4 °C ή σε πάγο, και άμεση επεξεργασία του δείγματος κατά προτίμηση (*New Method to Preserve the Original Proportion and Integrity of Urinary Cell-free DNA*, n.d.). Ωστόσο, ακόμα και υπό αυτές τις συνθήκες, υπάρχει κίνδυνος απώλειας του cfDNA (Lee et al., 2020).

Παρόμοια με τα cfDNAs, τα cfRNAs είναι θραύσματα RNA που διακρίνονται σε κωδικοποιημένα και μη-κωδικοποιημένα RNAs (ncRNAs) (Senhaji et al., 2022). Τα ncRNAs κατηγοριοποιούνται επιπλέον ανάλογα με το μήκος τους, σε μικρότερα μόρια που μπορεί να αποτελούνται από 200 νουκλεοτίδια και λιγότερα σε μέγεθος και σε μεγαλύτερα μόρια που υπερβαίνουν τα 200 νουκλεοτίδια. Η ομάδα των μικρών ncRNAs περιλαμβάνει τα μικροRNAs (miRNAs), τα short interfering RNAs (siRNAs), τα piwi-interacting RNAs (piRNAs) και τα small nucleolar RNAs (snoRNAs) (Derrien et al., 2012; Esteller, 2011).

Τα μόρια των cf-ncRNAs χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα, καθώς βρίσκονται μέσα σε κυστίδια ή συσχετίζονται με πρωτεΐνες (Bhan et al., 2017). Συμμετέχουν στη κυτταρική επικοινωνία και μπορεί να έχουν ρυθμιστικό ρόλο ή να αλλάζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου, επηρεάζοντας την πρόοδο και την διήθηση του όγκου στους πέριξ ιστούς (Lu, 2020; Umu et al., 2018). Τα cf-ncRNAs αποτελούν εξαιρετικούς υποψήφιους βιοδείκτες για τη διάγνωση πολλών ασθενειών (Boon et al., 2016; Liu et al., 2021; Lu, 2020), αλλά είναι επίσης κατάλληλοι για τον έλεγχο και την παρακολούθηση των όγκων και τη μελέτη αντίστασης των όγκων στη θεραπεία (Szilágyi et al., 2020).

Τέλος, οι κυκλοφορούντες πρωτεΐνες, που συχνά μεταφέρονται από εξωσωμάτια και εξωκυττάρια κυστίδια, είναι συνήθως μεμβρανικοί υποδοχείς, σύμπλοκα υποδοχέων, παράγοντες ανάπτυξης ή κυτοκίνες (Kalluri & LeBleu, 2020). Ενώ πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει με επιτυχία μια ποικιλία φορτίου πρωτεΐνης που υπάρχει σε εξωκυττάρια κυστίδια

(EVs), που προέρχεται από κάποιο γλοιοβλάστωμα (GB), η πλήρης και λεπτομερής κατανόηση του προφίλ των πρωτεϊνών που μεταφέρουν τα EVs εξερευνάτε ακόμη (Schey et al., 2015).

2.1.2. Κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου (CTCs)

Τα CTCs είναι κύτταρα που προέρχονται από έναν πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή (μεταστατικό) όγκο. Τα CTCs μπορεί να συμμετέχουν στη μεταστατική διαδικασία. Ωστόσο, η κυτταρική μετακίνηση είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και οι παθογενετικοί της μηχανισμοί πρέπει να διασαφηνιστούν πλήρως. Επίσης, παραμένει ασαφές εάν τα CTCs προέρχονται από κεντρικούς υποπληθυσμούς του όγκου ή αν αντιπροσωπεύουν το σύνολο του όγκου (Massagué & Obenauf, 2016). Αυτά τα κύτταρα εισέρχονται στη ροή των διαφόρων βιολογικών υγρών, όπως το αίμα, το ENY (κεντρικό νευρικό σύστημα) και τα ούρα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, στην περίπτωση των εγκεφαλικών όγκων, τα CTCs συλλέγονται πιο εύκολα από το ENY παρά από το αίμα. Επιπλέον, η παρακέντηση δεξαμενής (Cisternal puncture) φαίνεται ότι παρέχει πιο ακριβή αποτελέσματα σε σύγκριση με την οσφουονωτιαία παρακέντηση, αν και η οσφουονωτιαία παρακέντηση φαίνεται να είναι λιγότερο επεμβατική και λιγότερο επικίνδυνη όσον αφορά τις πιθανές επιπλοκές από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης, πρέπει να σημειώσουμε ότι το ENY ανακυκλώνεται και ανταλλάσσεται πλήρως κάθε τρεις έως πέντε ημέρες (Sullivan et al., 2014). Συνεπώς, χρειάζεται να ανακαλυφθεί μία καθολικά αποδεκτή μέθοδος για την αναγνώριση και την συλλογή των CTCs (Perryman & Erler, 2014).

Σε αυτό το πλαίσιο, είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι κυκλοφορούντα καλοήγη επιθηλιακά κύτταρα μπορεί επίσης να βρεθούν σε φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, το οποίο υποδεικνύει την ανάγκη για χαρακτηρισμό των μοριακών δοκιμών των CTCs (Pantel et al., 2012). Σε μια ευρεία γκάμα μελετών, φαίνεται ότι τα CTCs φαίνονται χρήσιμα ως

δείκτες για την πρόγνωση διάφορων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, το μελάνωμα κλπ. (Keup et al., 2018). Όσον αφορά τους όγκους εγκεφάλου, και ιδιαίτερα το GB, έχει δείξει ότι τα CTCs μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα των ασθενών σε ποσοστό 20% έως 40% (Gao et al., 2016; Krol et al., 2018).

2.1.3. Εξωκυττάρια κυστίδια/ Εξωσωμάτια (Extracellular Vesicles, EVs/Exosomes) και μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα (micro-ribonucleic acids, miRNAs)

Αρχικά, τα εξωσώματα θεωρούνταν ως απόβλητα των κυττάρων, αλλά τώρα γνωρίζουμε ότι λειτουργούν ως κυστίδια σήματος μεταξύ των κυττάρων και αποτελούν συντονιστές της κυτταρικής επικοινωνίας μέσω της μεταφοράς πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων (Théry, 2011). Η μεταφορά των εξωσωμάτων εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου-αποδέκτη και συμβαίνει κυρίως μέσω φαγο- ή ενδοκυττάρωσης (Christianson et al., 2013; Cocucci & Meldolesi, 2015).

Τα εξωσώματα παίζουν κύριο ρόλο στην παθοφυσιολογία των ασθενειών, καθώς και στην κυτταρική ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την ανοσοαντίδραση (De Toro et al., 2015; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Τα κύτταρα του όγκου εκπέμπουν έναν υψηλό αριθμό εξωσωμάτων στον εξωκυτταρικό χώρο, τα περισσότερα από τα οποία είναι δομημένα από λειτουργικά βιομόρια (Romano et al., 2020). Σε αυτό το πλαίσιο, τα εξωσώματα ερευνήθηκαν αρχικά ως μη-κυτταρικά θεραπευτικά αντιγόνα για την ανάπτυξη εμβολίων κατά των όγκων ή των μολυσματικών ασθενειών (André et al., 2002; Chaput et al., 2004). Ωστόσο, τα εξωσώματα μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν miRNAs και άλλες ενώσεις που μπορούν να αντικατοπτρίσουν την πρόοδο διάφορων ασθενειών του εγκεφάλου, και κατ' επέκταση ότι τα εξωσωμάτια μπορούν να χρησιμεύσουν ως αντιπροσωπευτικά εργαλεία για το μοριακό προφίλ του αντίστοιχου όγκου (M. Shi et al., 2019; Skouras, Gargalionis, et al., 2023) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Οι κύριοι αναλύτες που μπορούν να απομονωθούν μέσω της υγρής βιοψίας και οι τεχνικές απομόνωσής τους

MS PCR—methylation-specific PCR; NGS—next generation sequencing; TAS—targeted analysis sequencing; WES—whole exome sequencing; WGS—whole genome sequencing, ddPCR—droplet digital PCR; MAF—mutant allelic frequency; EpCAM—epithelial cell adhesion molecule; FISH—fluorescence in situ hybridization; qPCR—quantitative polymerase chain reaction

Δείγμα Υγρής Βιοψίας	Πηγή δείγματος	Τεχνικές απομόνωσης βιοδεικτών	Οφέλη	Βιβλιογραφία
cfDNA (ctDNA)	Αίμα, ΕΝΥ, πτύελα	MS/digital PCR, sequencing, LOH ddPCR, MAF, TAS/WES, NGS	Μοριακή διάγνωση, Εξέλιξη του μεγέθους του όγκου, και παρακολούθηση ανταπόκρισης του όγκου στην θεραπεία	(Balaña et al., 2003; Bettegowda et al., 2014; Boisselier et al., 2012; Euskirchen et al., 2017; Hyun et al., 2018; Lavon et al., 2010; Mouliere et al., 2018; Y. Wang et al., 2015)

cfRNA	Αίμα, ENY	Microarray, qPCR	Μοριακή διάγνωση, Εξέλιξη του μεγέθους του όγκου, και παρακολούθηση ανταπόκρισης του όγκου στην θεραπεία	(Boon et al., 2016; Liu et al., 2021; Lu, 2020; M. Shi et al., 2019; Szilágyi et al., 2020)
Κυκλοφορόντες πρωτεΐνες	Αίμα, Ούρα, ENY, Πτύελα	qPCR, NGS, microarray	Διάγνωση και πρόγνωση	(Jelski & Mroczko, 2021; Kalluri & LeBleu, 2020; Schey et al., 2015)
CTCs	Αίμα, ENY	EpCAM Immunomagnetic isolation, FISH, density gradient centrifugation/telomerase activity	Μοριακή διάγνωση, Εξέλιξη του μεγέθους του όγκου, και παρακολούθηση ανταπόκρισης του όγκου στην θεραπεία	(Gao et al., 2016; Krol et al., 2018; Lynch et al., 2020; Macarthur et al., 2014; G. Shi et al., 2013)
EVs	Αίμα, Πτύελα	qPCR, NGS, microarray	Μοριακή διάγνωση και πρόγνωση του όγκου	(Hyun et al., 2018; Oliosio et al., 2021; Skouras, Gargalionis, et

				al., 2023; X. Wang et al., 2021; Yue et al., 2016)
--	--	--	--	---

3. Βιοδείκτες που εντοπίζονται μέσω της ανάλυσης της Υγρής Βιοψίας για την διάγνωση των Γλοιωμάτων

Η δυνατότητα της υγρής βιοψίας να αναλύει παράγωγα του όγκου που βρίσκονται στα διάφορα σωματικά υγρά έχει οδηγήσει στην αυξανόμενη χρήση της σε διάφορους τύπους όγκων. Αυτή η τεχνική παρέχει ζωτικής σημασίας διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες, καθώς και αναγνώριση της κατάστασης του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Στην περίπτωση των γλοιωμάτων, η χρήση της υγρής βιοψίας είναι εξαιρετικά υποσχόμενη (Jones et al., 2021). Παρακάτω, αναλύονται οι επιπλέον cfDNA βιοδείκτες, που ανιχνεύονται σε διάφορες μελέτες ανάλυσης υγρής βιοψίας για τη διάγνωση των γλοιωμάτων.

3.1. cfDNA, cfRNA, και Κυκλοφορόντες πρωτεΐνες στην διάγνωση των Γλοιωμάτων

3.1.1. cfDNA

Η ΥΒ έχει επιτρέψει τον εντοπισμό του cfDNA σε ασθενείς με όγκους εγκεφάλου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δημιουργώντας τη δυνατότητα να ενσωματωθεί στην κλινική πράξη, με στόχο τον εντοπισμό τόσο γενετικών όσο και επιγενετικών αλλαγών στους όγκους. Το cfDNA μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο βιοδείκτη, που υποδεικνύει την κατάσταση του όγκου, προκειμένου να διευκολύνει την παρακολούθηση της νόσου και τη διάκριση μεταξύ ατόμων χωρίς όγκο και ασθενών με όγκους εγκεφάλου (Faria et al., 2018).

Μια μελέτη επέδειξε ότι ο ορός των υγιών μαρτύρων χαρακτηρίζεται συνεχώς από χαμηλά επίπεδα cfDNA, αντίθετα με τους ασθενείς με γλοϊώμα που είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις cfDNA. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι το cfDNA θα μπορούσε να λειτουργήσει ως χρήσιμος βιοδείκτης για τη διάκριση των ασθενών με γλοϊώματα από τα υγιή άτομα αλλά να χρησιμοποιηθεί και ως ένδειξη για την πρόοδο του όγκου (Roth et al., 2011).

Το cfDNA μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ποσοτική μέτρηση γενετικών (π.χ., μεταλλάξεις του γονιδίου *IDH*) ή επιγενετικών αλλαγών (μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT*) (Faria et al., 2018; Mathios & Phallen, 2022). Στο cfDNA που προέρχεται από ασθενείς με γλοϊώμα, υπάρχουν διάφορα γονίδια και επιγενετικές αλλαγές που μπορούν να ανιχνευθούν και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου. Ένα εξαιρετικό παράδειγμα είναι η μετάλλαξη H3K27M χαρακτηριστική των διάχυτων διηθητικών γλοιομάτων γέφυρας [Diffuse midline gliomas (DMGs)]. Στη μελέτη της Daphne Li και των συνεργατών της, το cfDNA απομονώθηκε από δύο τύπους δειγμάτων: ένας τύπος με μετάλλαξη H3.3K27M και ο άλλος τύπος H3 wildtype (H3WT). Τα δείγματα περιλάμβαναν ιστούς όγκου H3.3K27M (τέσσερα δείγματα), ENY (έξι δείγματα), πλάσμα (τέσσερα δείγματα) και ανθρώπινα πρωτογενή παιδιατρικά κύτταρα γλοιομάτων. Οι ερευνητές παρατήρησαν ευαισθησία και ειδικότητα 100% στην ανίχνευση μεταλλάξεων τόσο στους αντίστοιχους ιστούς DMG όσο και στα δείγματα του ENY (D. Li et al., 2021). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η μετάλλαξη H3K27M ανιχνεύθηκε στο ENY και το πλάσμα στο 88% των ασθενών με DMG. Μεταξύ των δύο, το ENY εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση cfDNA (Panditharatna et al., 2018).

Η γενική μεθυλίωση του DNA (global DNA methylation) μέσω της μεθυλίωσης του μεταθετού στοιχείου LINE-1 (L1) παίζει καθοριστικό ρόλο όσον αφορά τις επιγενετικές αλλαγές στα κύτταρα ενός γλοιομάτος, επιτρέποντας τη διάγνωση μέσω της ανάλυσης του

cfDNA. Η προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην κυτοσίνη, προκαλεί τον σχηματισμό 5-μεθυλοκυτοσίνης, ο οποίος αποτελεί τον πιο γνωστό μηχανισμό τροποποίησης του DNA μέσω επιγενετικών διεργασιών, και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο των όγκων και, ειδικότερα, των γλοιωμάτων (Lander et al., 2001; Markouli et al., 2021). Η ανεπάρκεια ρύθμισης των κυττάρων σε συστημικό επίπεδο, συχνά συνδέεται με την ανάπτυξη όγκων, μπορεί να προκύψει είτε από υπομεθυλίωση του DNA είτε από αυξημένη δραστηριότητα των LINE-1 τρανσποζιόνιων (transposons) (Pfeifer, 2018). Η πλειοψηφία των φαινομένων αντιμεταθέσεων που συμβαίνουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα πραγματοποιούνται από non-LTR (long-terminal repeat) ρετροτρανσποζόνια (retrotransposons), με τα LINEs (long interspersed elements) να είναι τα πιο κυρίαρχα. Από όλα τα LINEs, το LINE-1 αποτελεί περίπου ένα έκτο της γενωμικής αντιμετάθεσης (genomic transposition) και μπορεί να ανευρεθεί σε πολλαπλά αντίγραφα σε ελεύθερα κύτταρα, σε δείγματα αίματος. Λόγω της αφθονίας του και των μοναδικών χαρακτηριστικών του, όπως η κατάσταση μεθυλίωσης, το LINE-1 έχει τη δυνατότητα να λειτουργήσει ως πολύτιμος επιγενετικός βιοδείκτης για τον εντοπισμό νεοπλασιών σε δείγματα υγρής βιοψίας (Lander et al., 2001).

Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην ανίχνευση των φαινομένων αντιμετάθεσης (retrotransposition) του LINE-1 σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως στα NPCs κύτταρα (neural precursor cells) που προέρχονται τόσο από ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) όσο και από εμβρυικά εγκεφαλικά βλαστικά κύτταρα. Μελέτες με φαινόμενα αντιμετάθεσης που πραγματοποιήθηκαν σε αυτούς τους τύπους κυττάρων επιβεβαίωσαν την ύπαρξη δραστηριότητας του LINE-1 και στις δύο συνθήκες (Coufal et al., 2009).

Επιπλέον, η ανάλυση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) ανέδειξε ένα σημαντικό αυξημένο αριθμό αντιγράφων του LINE-1 ORF2 σε πολλές περιοχές δειγμάτων υγιούς ενήλικου ανθρώπινου εγκεφάλου, υποδεικνύοντας την παρουσία δραστηριότητας του LINE-1 μέσα στον εγκέφαλο. Η χρήση της RC-Seq (retrotransposon capture sequencing)

επέτρεψε επίσης στους ερευνητές να εντοπίσουν σωματικές LINE-1 επιδράσεις σε γονίδια κωδικοποίησης πρωτεϊνών με διαφορεική έκφραση και ήταν ενεργά εντός του εγκεφάλου (Baillie et al., 2011). Μια μελέτη αξιολόγησε τα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 μέσω της ποσοτικής bisulfite pyrosequencing τεσσάρων CpG τοποθεσιών σε υγιή δείγματα εγκεφάλου, καθώς και σε κατεψυγμένους ιστούς όγκων όπως αστροκυτώματα βαθμού 2/3, πρωτοπαθές/δευτεροπαθές GB και ολιγοδενδρογλιώματα βαθμού 2/3. Παρατηρήθηκε ένα σχετικά υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης του LINE-1 σε δείγματα αστροκυττώματος, ολιγοδενδρογλιώματος και ολιγοαστροκυττώματος, ενώ τα δείγματα του γλιοβλαστώματος έδειξαν τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα στα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 και τα χαμηλότερα σκορ του LINE-1 (υποδεικνύοντας γενική (global) υπομεθυλίωση) σε σύγκριση με άλλους υποτύπους. Επιπλέον, τα γλιώματα που ταξινομήθηκαν ως έχοντα κλάση 1 πρότυπο μεθυλίωσης γονιδίων εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 (Zheng et al., 2011). Επίσης, τα δείγματα φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού και οι ιστοί χαμηλού βαθμού γλιομάτων, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 σε σύγκριση με τα πρωτοπαθή/δευτεροπαθή γλιοβλαστώματα καθώς και η αυξημένη δραστηριότητα μεθυλίωσης του LINE-1 λειτούργησε ως θετικός προγνωστικός δείκτης στα πρωτοπαθή γλιοβλαστώματα. Τέλος, η μεθυλίωση του LINE-1 διαπιστώθηκε να υπάρχει σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων υγιούς εγκεφαλικού ιστού, χαμηλόβαθμων γλιομάτων και πρωτοπαθών/δευτεροπαθών γλιοβλαστωμάτων (Ohka et al., 2011) γεγονός που υποδεικνύει ότι το LINE-1 παίζει ρόλο στη διάγνωση και/ή την πρόγνωση των γλιομάτων.

Σε μία άλλη μελέτη του Sabedot και των συν ερευνητών του, χρησιμοποίησαν genome-wide DNA methylation profiling σε πανομοιότυπα γονιδιώματα για τον εντοπισμό μοναδικών μοτίβων μεθυλίωσης σε ιστολογικό υλικό και cfDNA από γλιώματα ασθενών. Χρησιμοποίησαν ένα μετρήσιμο σύστημα βαθμολόγησης και ονομάσανε GeLB (glioma-

epigenetic liquid biopsy score), για να αξιολογήσουν την μεθυλίωση του cfDNA και να διαγνώσουν την νόσο. Αυτή η μη επεμβατική τεχνική αποκάλυψε μια δραστηριότητα μεθυλίωσης του cfDNA που σχετίζεται με την παρουσία γλοιώματος και κάποιων ανοσοτροποποιήσεων. Ανεξάρτητες δοκιμές σε συγκριτικές ομάδες (Independent cohort testing) επιβεβαίωσαν το GeLB ως ένα υψηλά αποτελεσματικό εργαλείο, με 100% ευαισθησία και 97,78% ειδικότητα για τον διαχωρισμό ασθενών σε γλοιώμα-θετικούς ή γλοιώμα-αρνητικούς. Οι αλλαγές στη βαθμολογία GeLB κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης αντικατοπτρίζουν τις κλινικοπαθολογικές συνθήκες και τις επιδράσεις της θεραπείας στην νόσο, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα του εργαλείου αυτού για τη διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενών με γλοιώματα (Sabedot et al., 2021). Επιπλέον, ο Nassiri και οι συνεργάτες του, ανέδειξαν ότι τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα, εμφάνιζαν χαρακτηριστικά τοπόσημα, ικανά να ανιχνεύουν και να διακρίνουν με ακρίβεια μεταξύ κοινών πρωτοπαθών ενδοκράνιων όγκων. Αυτοί οι όγκοι συχνά μοιράζονταν γενεές κυττάρων-καταγωγής (cell-of-origin lineages), κάτι το οποίο αποτελεί πρόκληση για να μπορεί να γίνει διάκριση χρησιμοποιώντας τις κανονικές μεθόδους απεικόνισης. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια τεχνική που ονομάζεται cfMeDIP-seq (cell-free methylated DNA immunoprecipitation and high-throughput sequencing) για να ανιχνεύσουν με επιτυχία ctDNA προερχόμενο από όγκους εγκεφάλου (Nassiri et al., 2020).

Σε μια άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε από τους Martínez-Ricarte και συνεργάτες τους, αναλύθηκε το γονιδίωμα ασθενών με DMG. Η ανάλυση αυτή περιλάμβανε την εξέταση μεταλλάξεων σε επτά γονίδια: *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *TERT*, *ATRX*, *H3F3A*, και *HIST1H3B*. Η μελέτη ανέλυσε το ctDNA που προερχόταν από το ENY και οι ερευνητές έθεσαν με επιτυχία την διάγνωση του DMG, προσφέροντας έτσι πολύτιμη βοήθεια σε κλινικές και χειρουργικές θεραπευτικές αποφάσεις (Martínez-Ricarte et al., 2018). Μια επιπλέον μελέτη υπογράμμισε τη σημασία της υγρής βιοψίας στην διάγνωση και την

παρακολούθηση του εξελισσόμενου μοριακού τοπίου των όγκων κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η μελέτη είχε ως στόχο τον εντοπισμό μεταλλάξεων στον εκκινητή (promoter) TERT (C228T και C250T), στο cfDNA των ασθενών με γλοιώματα, παρέχοντας στοιχεία για τις πρακτικές εφαρμογές της ανίχνευσης των κυκλοφορούντων μεταλλάξεων εκκινητή TERT στο cfDNA σε ασθενείς με γλοιώματα, επιδεικνύοντας κλινικά σημαντική ευαισθησία και ειδικότητα (Muralidharan et al., 2021). Ο Fujioka και οι συνεργάτες του εξέλιξαν περαιτέρω μία νέα, υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας μοριακή μέθοδο διάγνωσης χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ψηφιακής PCR βασισμένη σε τσιπ για την ανίχνευση του cfDNA που προέρχεται από το ENY που λήφθηκε από 11 ασθενείς με υψηλόβαθμα γλοιώματα. Το απομονωμένο cfDNA αναλύθηκε για διαγνωστικές μεταλλάξεις στο IDH1 R132H στον εκκινητή TERT (C228T και C250T) και H3F3A (K27M). Μεταλλάξεις που έθεταν την διάγνωση εντοπίστηκαν σε δείγματα DNA του όγκου από 28 από τους 34 ασθενείς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, προσδιορίστηκαν ακριβείς μοριακές διαγνώσεις χρησιμοποιώντας ενδοκράνιο ENY από 20 ασθενείς, καλύπτοντας το 71% των περιπτώσεων (Fujioka et al., 2021).

Η μελέτη του Husain και των συνεργατών του εξέτασε τα επίπεδα προ-ακτινοθεραπείας του cfDNA χρησιμοποιώντας αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS, Next-generation sequencing) και συνέκριναν τα αποτελέσματα με ανοσοϊστοχημική (IHC) ανάλυση, εμφανίζοντας υψηλό βαθμό αντιστοιχίας. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμη σε περιπτώσεις όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι δυνατή ή σε περιπτώσεις υποτροπής ενός διάχυτου διηθητικού γλοιώματος (Husain et al., 2022).

Τέλος, στη μελέτη του Palande και των συνεργατών του εντοπίστηκαν μεταλλάξεις γονιδίων και συγχωνεύσεις (gene-gene fusions) γονιδίων στο cfDNA ασθενών με GB. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε τη βάση δεδομένων ChiTaRS (chimeric transcript repository) 5.0 για τον εντοπισμό συγχώνευσης γονιδίων σε δείγματα cfDNA. Βρέθηκαν συγχωνεύσεις που

εμπλέκουν το *PDGFRA* σε 44% των δειγμάτων GB, τα οποία μπορούν να στοχευτούν αποτελεσματικά με τη χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης. Άλλες συγχωνεύσεις γονιδίων, όπως *BCR-ABL1*, *COL1A1-PDGFB*, *NIN-PDGFRB* και *FGFR1-BCR*, εντοπίστηκαν επίσης σε cfDNA που θα μπορούσαν να στοχευτούν με ανάλογα του imatinib. Επιπλέον, εντοπίστηκαν συγχωνεύσεις *ROSI* σε 8% των δειγμάτων cfDNA και θα μπορούσαν πιθανώς να στοχευτούν επίσης με τα συγκεκριμένα φάρμακα (Palande et al., 2022).

3.1.2. cfRNA

Όσον αφορά τα cfRNAs και τη χρήση τους στα γλοιώματα, ο Dong και οι συνεργάτες τους ανακάλυψαν ότι ο ορός ασθενών με GB εμφάνισε σημαντική μείωση σε 24 miRNAs και σημαντική αύξηση σε 115 miRNAs, πράγμα που δεν παρατηρήθηκε στον ορό των υγιών μαρτύρων (Dong et al., 2014). Επιπλέον, ο Wang και οι συνεργάτες του εντόπισαν τρία miRNAs που ήταν υπο-ρυθμισμένα, συγκεκριμένα τα miR-128, miR-485-3p και miR-342-3p, σε ασθενείς, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Αυτά τα miRNAs έδειξαν συσχέτιση με τους βαθμούς του GB και χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες για τον προσδιορισμό του βαθμού του όγκου και την παρακολούθηση στην ανταπόκριση της θεραπείας (Q. Wang et al., 2012).

Το miRNA-21 είναι το πιο εκτενώς μελετημένο miRNA στον καρκίνο και η υπερέκφραση του παρατηρείται τόσο στον ιστό όσο και στο πλάσμα των ασθενών με GB. Αυτή η υψηλή έκφραση συνδέεται στενά με χαμηλότερα ποσοστά συνολικής επιβίωσης και υψηλότερο βαθμό κακοήθειας (Wu et al., 2013). Το miR-21 λειτουργεί ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος εκτελώντας τα αποτελέσματά του μέσω της αναστολής της κασπάσης. Η καταστολή της δραστηριότητας του miR-21 επομένως εμποδίζει

την ανάπτυξη των κυττάρων, ενισχύει την αποπτωτική διαδικασία και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων GB (Ilhan-Mutlu et al., 2012; Wu et al., 2013).

Αξίζει να σημειωθεί μια μελέτη που εντόπισε το TP73-AS1 ως κλινικά σημαντικό lncRNA στο GB. Οι ερευνητές παρατήρησαν μια σημαντική υπερέκφραση του TP73-AS1 σε πρωτοπαθή δείγματα GB. Παρείχαν αποδείξεις ότι το TP73-AS1 λειτουργεί ως αξιόπιστος προγνωστικός βιοδείκτης, καθώς αυτό το lncRNA προάγει την επιθετικότητα του όγκου και παρέχει αντίσταση στη θεραπεία με TMZ στα κύτταρα του GB (Mazor et al., 2019).

Στη μελέτη του Shen και των συνεργατών του, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του μακρο-μη κωδικοποιητικού RNA HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic RNA) και μειωμένα επίπεδα του GAS5 στον ορό των ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Αυτά τα μοτίβα έκφρασης συνδέονταν με μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης 2 ετών (Shen et al., 2018).

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η μεταφορά του μακρο-μη κωδικοποιητικού RNA HOTAIR μέσω εξωσωμάτων στον ορό εμφανίζει ελπιδοφόρα διαγνωστική αξία στο GB (Yuan et al., 2020).

3.1.3. Κυκλοφορούντες πρωτεΐνες

Λαμβάνοντας υπόψιν την εντυπωσιακή ετερογένεια των ασθενών και της νόσου, καθώς και την ευρεία εμπλοκή των πρωτεϊνών σε πολλές διαδικασίες, είναι δύσκολο να βρεθούν διαγνωστικοί δείκτες πλάσματος/ορού για το γλοιοβλάστωμα με επαρκή κλινική αξία. Ωστόσο, η εκτενής έρευνα έχει εντοπίσει τα επίπεδα πολλών κυκλοφορούντων πρωτεϊνών να συσχετίζονται με την παρουσία του γλοιοβλαστώματος. Ένα παράδειγμα είναι η πλασματική γλυκοπρωτεΐνη (haptoglobin), η οποία αποτελεί πρωτεΐνη οξειάς φάσης που συμμετέχει στην προστασία των ιστών από το οξειδωτικό στρες (Naryzhny et al., 2021). Τα επίπεδα της απτοσφαιρίνης (haptoglobin) μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια παθολογιών, αν και η μονομερής εκτίμησή της ενδέχεται να μην είναι επαρκώς ειδική και ευαίσθητη, έχουν

ανιχνευθεί πολλαπλές πρωτεΐνες της ($\alpha 2$ και β -αλυσίδα) που εκφράζονται αυξημένα στο πλάσμα των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, υποδεικνύοντας τη δυναμική της χρήση ως βιοδείκτης του αίματος που είναι ειδικός για το γλοιοβλάστωμα (Naryzhny et al., 2021).

Επιπλέον, μια ποσοτική πρωτεομική ανάλυση έδειξε ότι πολλές πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η CNDP1 που ρυθμίζει τα επίπεδα καρνοσίνης, ο φλεγμονώδης δείκτης φερριτίνης ελαφράς αλυσίδας (FTL) και η πρωτεΐνη σήματος Ca^{2+} S100A9, βρέθηκαν να είναι τροποποιημένες στους ιστούς του γλοιοβλαστώματος, με την CNDP1 να προτείνεται ως δυναμικός στόχος φαρμάκου. Αυτό επιβεβαιώνει ότι οι εξετάσεις βάσει πλάσματος για την αρχική διάγνωση ή την παρακολούθηση πιθανής υποτροπής της νόσου, μπορούν να είναι εξαιρετικά χρήσιμες για την νόσο (Bellia et al., 2014; Gautam et al., 2012). Επιπλέον, στη μελέτη του Pérez-Larraya και των συνεργατών του, πραγματοποιήθηκε μια ολοκληρωμένη ανάλυση των επιπέδων της IGFBP-2, της πρωτεΐνης (IF) III GFAP και της γλυκοπρωτεΐνης YKL-40 στο πλάσμα, ως επιπλέον εργαλείο διάγνωσης και πρόγνωσης. Αυτή η προσέγγιση είναι πολλά υποσχόμενη, ιδιαίτερα για ασθενείς με μη χειρουργήσιμες βλάβες (Gállego Pérez-Larraya et al., 2014). Επίσης, αποκαλύφθηκε η παρουσία αντισωμάτων φετουίνης-A, μιας γλυκοπρωτεΐνης που λειτουργεί ως δείκτης εξέλιξης της νόσου του γλοιοβλαστώματος. Έχει προταθεί ότι έκτοπα επίπεδα της φετουίνης-A μπορούν να παίξουν ρόλο στην πρόοδο του γλοιοβλαστώματος. Επομένως, προτάθηκε η αξιολόγηση των αυτοαντισωμάτων φετουίνης-A στον ορό των ασθενών με γλοιοβλάστωμα να λειτουργεί πιθανώς ως εργαλείο screening, καθιστώντας την ως έναν από τους πιο πρώιμους ενδεικτικούς δείκτες για την ανάπτυξη της νόσου (Ochieng et al., 2018).

Ο Naryzhny και συνεργάτες είχαν ως στόχο την εντοπισμό κοινών πρωτεϊνών σε εξωσώματα σε διάφορες κυτταρικές σειρές και την έρευνα πιθανών βιοδεικτών για το γλοιοβλάστωμα. Μέσω πρωτεομικής ανάλυσης των εξωσωμάτων, εντόπισαν 133 πρωτεΐνες, όπως η πυρουβική κινάση PKM [pyruvate kinase PKM (KPYM)], η αννεξίνη A1 [annexin

A1 (ANXA1)], η μεταβατική ενδοπλασματική ATPase [transitional endoplasmic reticulum ATPase (TERA)], η αλφα-ενολάση [alpha-enolase (ENOA)], η νουκλεοφοσμίνη [nucleophosmin (NPM)] και η κοφιλίνη [cofilin (COF1)], οι οποίες βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα. Η μελέτη ανέδειξε μία συσχέτιση μεταξύ ορισμένων πρωτεϊνών που υπερεκφράζονταν σε κύτταρα της γλοίας και της ανίχνευσής τους σε εξωσώματα, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη πολλαπλών δυνητικών πρωτεϊνικών βιοδεικτών σε εξωσώματα γλοιοβλαστώματος (Naryzhny et al., 2020). Μια άλλη έρευνα που περιλάμβανε τη φασματομετρία μάζας SWATH και την πρωτεομική αναλυτική προσέγγιση με στόχο την απόλυτη ποσοτική πρωτεομική προσέγγιση, μελετήθηκαν ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αποκάλυψαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων της λευκίνης-πλούσιας αλφα-2-γλυκοπρωτεΐνης [leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1)], του συμπληρωματικού στοιχείου C9 και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης [C-reactive protein (CRP)] και του μεγέθους του όγκου (Miyauchi et al., 2018). Σε μια μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τον Qin και τους συνεργάτες του, ανακαλύφθηκε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της υψηλής έκφρασης της YKL-40 και της μη ικανοποιητικής συνολικής επιβίωσης μεταξύ ασθενών με γλοιοβλάστωμα, θέτοντας την YKL-40 ως έναν υποσχόμενο προγνωστικό βιοδείκτη για την νόσο (Qin et al., 2017).

3.2. Τα CTCs στην διάγνωση των Γλοιωμάτων

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το σημαντικό ρόλο των κυκλοφορούντων κυττάρων του όγκου (CTCs) σε όγκους του ΚΝΣ. Τα CTCs παρέχουν ένα λιγότερο επεμβατικό τρόπο λήψης δειγμάτων όγκου· ορισμένα είδη CTC μπορεί να υποδεικνύουν την πρόοδο του πρωτοπαθούς όγκου και τις αλλαγές στην κακοήγη γενετική πληροφορία κατά την υποτροπή της νόσου. Έχει αναφερθεί ότι τα CTCs του γλοιοβλαστώματος εμφανίζουν υψηλό επιπολασμό, που εκτιμάται να είναι περίπου 75% (Müller et al., 2014).

Οι συγκεντρώσεις των CTC έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διάφορων παθήσεων. Σύμφωνα με τον Santos και άλλων συνεργατών του, τα CTCs παρουσιάζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα στον πρόωρο εντοπισμό του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα των ασθενών που πρόσφατα έχουν αναπτύξει τη νόσο. Ως εκ τούτου, η ανίχνευση των CTC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Sastre et al., 2008).

Όσον αφορά τα γλοιώματα, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός μπορεί να περιορίσει τον αριθμό των CTCs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Παρόλα αυτά, έχουν εντοπιστεί κυκλοφορούντα κύτταρα στο αίμα των ασθενών με γλοίωμα και αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει τον εντοπισμό των CTCs στο αίμα των ασθενών με γλοίωμα μέσω της χρήσης διάφορων τεχνικών απομόνωσης. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CTC-iChip για τον εμπλουτισμό των CTCs και τον χρωματισμό τους με αντισώματα όπως το SOX2, το EGFR, η tubulin b-3, το c-MET και το A2B5, ο Sullivan και άλλοι εντόπισαν CTCs στο αίμα ασθενών με γλοίωμα σε συχνότητα 39%. Ανακάλυψαν επίσης ότι τα CTCs εμφανίζουν ένα μεσεγχυματικό μοριακό χαρακτηριστικό (Sullivan et al., 2014). Ο Muller κ.ά. πραγματοποίησαν μια μελέτη όπου χρησιμοποίησαν κλίμακες Ficoll-Paque μέσω διαφορικής φυγοκέντρισης, ακολουθούμενες από GFAP χρωματισμό, προκειμένου να εντοπίσουν το 20,6% των CTCs (Sastre et al., 2008). Επιπλέον, ο Gao και οι συνεργάτες του κατέδειξαν ότι τα CTCs ανευρίσκονταν σε 77% των δειγμάτων αίματος από ασθενείς με όγκο εγκεφάλου και σε 82% των ασθενών με GB (Gao et al., 2016).

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη από τον MacArthur και συνεργάτες έδειξε ότι τα CTCs θα μπορούσαν επίσης να λειτουργήσουν ως προγνωστικός παράγοντας. Χρησιμοποιώντας γραμμικής πυκνότητας φυγοκέντρωση (density gradient centrifugation), απομονώθηκαν CTCs και αναλύθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου τελομεράσης σε ασθενείς με όγκο εγκεφάλου. Η μελέτη απέδειξε ότι πριν τη θεραπεία με ακτινοθεραπεία, τα CTCs

απομονώθηκαν σε 72% των ασθενών έναντι μόλις 8% μετά τη θεραπεία (Macarthur et al., 2014). Επιπλέον, τα αντι-γλοιοματικά απταμερή (aptamers) Gli-233 και Gli-55 έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των CTCs σε υγρές βιοψίες με σκοπό την αύξηση της διαγνωστικής ειδικότητας (Kichkailo et al., 2023). Τα απταμερή είναι μόρια νουκλεϊκών οξέων που συνδέονται αποκλειστικά με τους στόχους τους, όπως πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον όγκο, με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα (Ni et al., n.d.). Έτσι, έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε biosensing, βιορύθμιση (bioregulation) και βιοαπεικόνιση (bioimaging) ως αξιόπιστα σύμπλοκα αναγνώρισης (Song et al., 2019, p. 20). Επιπλέον, ο Kichkailo και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα απταμερή μπορούν να συνδέονται ειδικά με τα κύτταρα της γλοίας για τον εντοπισμό όγκων στο ΚΝΣ (Kichkailo et al., 2023). Παρόλο που απαιτείται περισσότερη έρευνα για να αναδειχθεί η πλήρης δυναμική των CTCs στη διάγνωση των γλοιομάτων και του GB, η χρήση τους ως προγνωστικοί παράγοντες για τα γλοιώματα είναι πολύ ελπιδοφόρα.

3.3. Τα Εξωσώματα στην διάγνωση των Γλοιομάτων

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων του GB είναι η ικανότητά τους να χρησιμοποιούν τα invadopodia, μέσω των οποίων είναι σε θέση να εισβάλλουν σε γειτονικά κύτταρα, ειδικότερα σε αστροκύτταρα. Τα invadopodia είναι επεκτάσεις προερχόμενες από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου του GB, που προσκολλώνται σε γειτονικούς ιστούς και προάγουν την πρωτεολυτική αποσύνθεση του κυτταροσκελετού, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω διήθηση (Gourlay et al., 2017; Mallawaarachy et al., 2017). Πολλές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα εξωσώματα του GB, παίζουν ρόλο στον σχηματισμό των invadopodia, μεταξύ των οποίων η ANXA1, η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την ακτίνη 3 [actin-related protein 3 (ACTR3)], η integrin β1 (ITGB1), η καλρετικουλίνη [calreticulin (CALR)] και η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον προγραμματισμένο κύτταρο θανάτου 6 [programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6IP)] (Mallawaarachy et al., 2017). Οι Hallal και

συνεργάτες παρατήρησαν επίσης τον σχηματισμό ποδοσωμάτων σε αστροκύτταρα και την αποσύνθεση του πλέγματος μετά την αλληλεπίδρασή τους με εξωσώματα που προέρχονταν από GB κύτταρα, μία διαδικασία που φαίνεται να υποστηρίζεται από τη μείωση των επιπέδων p53. Έτσι, τα εξωσώματα αποκτούν καρκινογόνο χαρακτήρα και προάγουν τα γειτονικά αστροκύτταρα σε ογκογένεση (H Rashed et al., 2017).

Σε αυτό το πλαίσιο, τα εξωσώματα GB μπορούν να ανιχνευθούν τόσο στο αίμα όσο και στο ENY με χρήση της της υγρής βιοψίας. Αυξημένος αριθμός εξωσωμάτων που προέρχονται από έναν όγκο μπορούν να βρεθούν στο ENY. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ENY δεν είναι μολυσμένο με εξωσώματα που σχετίζονται με το αίμα, όπως για παράδειγμα, εξωσώματα που προέρχονται από τα αιμοπετάλια του αίματος. Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, τα δείγματα αίματος συλλέγονται πιο εύκολα και λιγότερο επεμβατικά σε σύγκριση με το ENY (Gourlay et al., 2017; Klekner et al., 2019).

Επιπλέον, ο Shao και άλλοι περιέγραψαν πώς ένα σύστημα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μπορεί να ανιχνεύσει μικροκυτίδια που εκκρίνονται από τον όγκο στο αίμα (Shao et al., 2012). Έρευνες έχουν δείξει ότι μόρια που μεταφέρονται από εξωσώματα μπορεί να προωθήσουν την ανάπτυξη του όγκου και την αντίσταση στη θεραπεία μέσω του σχηματισμού ενός φιλικού προς τον όγκο μικροπεριβάλλοντος. Συνεπώς, τα εξωσώματα έχουν προταθεί ως υποσχόμενα εργαλεία στη διάγνωση και την πρόγνωση ενός γλοιοβλαστώματος, δίνοντας τη δυνατότητα να χαρακτηριστεί ο όγκος με μεγαλύτερη ακρίβεια (Gatto et al., 2021; Whitehead et al., 2019).

Παρά το γεγονός ότι λειτουργούν ως φορείς πολλών τύπων miRNA, συμπεριλαμβανομένων των miR-21/-29a/-221/-222, κ.ά., όπως αποδεικνύεται σε αρκετές μελέτες (in vitro και αναλύσεις microarray) τα εξωσώματα παίζουν επίσης καίριο ρόλο στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της αναστολής της απόπτωσης των κυττάρων του

γλοιοβλαστώματος (Quezada et al., 2018; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Μπορούν, επομένως, να χρησιμοποιηθούν ως υποσχόμενα μέσα παράδοσης για miRNA που καταπολεμούν τον όγκο και στοχεύουν τα γλοιώματα (Hagiwara et al., 2014). Περίπου 1000 πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί στα GB εξωσώματα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας· συνήθως λειτουργούν ως προ-αγγειογόνοι παράγοντες σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου, όπως η αγγειογενίνη, IL-6/-8 και τα TIMP-1 και TIMP-2, τα οποία είναι ικανά να ενισχύσουν την κακοήθεια προκαλώντας υποξία (Jaiswal & Sedger, 2019; Skog et al., 2008).

Τα εξωσώματα μπορεί επίσης να μεταφέρουν υποδοχείς με χαρακτηριστικά ογκογένεσης, όπως ο EGFRvIII, ο HER2, και ο PDGFR, οι οποίοι προωθούν την πολλαπλασιαστικότητα του γλοιοβλαστώματος προς τα υγιή στρωματικά κύτταρα (Skog et al., 2008). Επιπλέον, τα εξωσώματα μεταφέρουν PTEN, το οποίο βρίσκεται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα και η απουσία του συνδέεται με την ογκογένεση (Putz et al., 2012) (Πίνακας 2). Η πρωτεΐνη Ndfifip1 παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εσωτερικοποίηση (ενδοκύττωση) των εξωσωμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Ndfifip1 είναι κατεσταλμένη στα γλοιοβλαστώματα. Συνεπώς, η ενδοπυρηνική συγκέντρωση του PTEN μειώνεται, επιτρέποντας στα κύτταρα του όγκου να πολλαπλασιαστούν και να επιβιώσουν (Putz et al., 2012).

Πίνακας 2. Εξωσωματικοί βιοδείκτες προερχόμενοι από Γλοιώματα

Τύπος δείγματος	Περιεχόμενο (βιοδείκτης)	Πειραματικό μοντέλο	Οφέλη	Βιβλιογραφία
ENY/ Πλάσμα	miRNA-21	Ασθενείς με γλοίωμα (βαθμού 1 - 4)	Χαρακτηρισμός σταθερής VS εξελισσόμενη νόσος	(Ivo D'Urso et al., 2015; Quezada et al.,

				2018; R. Shi et al., 2015)
ΕΝΥ	miR-21/miR-103/miR-24/miR-125	Ασθενείς με γλοιοβλάστωμα	Διάγνωση της νόσου	(Akers et al., 2015; Ivo D'Urso et al., 2015)
ΕΝΥ	miR-151a	Ασθενείς με GB που έλαβαν θεραπεία TMZ	Πρόβλεψη στην ανταπόκριση της θεραπείας	(Zeng et al., 2018)
Αίμα	EGFR/EGFRvIII	In vitro (μNMR)	Χαρακτηρισμός του μοριακού προφίλ	(Figuroa et al., 2017; Skog et al., 2008)
Αίμα	PTRF	In vivo ποντίκια (xenograft)	Διάγνωση της νόσου	(Huang et al., 2018)
Αίμα	MGMT, APNG	Ασθενείς με γλοιοβλάστωμα (microfluidic chip)	Πρόγνωση της νόσου	(Mathios & Phallen, 2022; Shao et al., 2015)
Ορός	miR-320/miR-574 3p/RNU6-1	Ασθενείς με γλοιοβλάστωμα	Διάγνωση της νόσου	(Manterola et al., 2014)
Ορός	miR-301a	In vitro	Πρόγνωση της νόσου	(Lan et al., 2018)
Ορός	miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-106a-5p,	Αστροκύττωμα (βαθμού 2 - 4)	Πρόγνωση της νόσου	(Tzaridis et al., 2020; Zhi et al., 2015)

	miR-130-3p, miR-181b-5p, miR-208a-3p	(TaqMan low-density array)		
Ορός	miR-497, miR-125b	Ασθενείς με γλοιοβλάστωμα	Πρόγνωση της νόσου	(Regazzo et al., 2016)
Πλάσμα	miR-221/222	Ασθενείς με υψηλόβαθμα γλοιώματα	Διάγνωση της νόσου, Πρόβλεψη κακής διάγνωσης και ανταπόκριση στην θεραπεία	(C. Zhang et al., 2012)
Πλάσμα	PDGFR, CAV1, IL-8	In vivo γλοίωμα σε ποντίκια (xenograft)	Διάγνωση και πρόγνωση της νόσου	(Kucharzewska et al., 2013)
Αίμα	miR-100	Ασθενείς με γλοιοβλάστωμα	Διάγνωση της νόσου	(X. Zhang et al., 2019)

4. Συνδυασμός Ακτινογενωμικής και Υγρής Βιοψίας για την διάγνωση των Γλοιωμάτων

Η ακτινογενωμική είναι ένα πεδίο που ενσωματώνει μεγάλο αριθμό ποσοτικών δεδομένων που προέρχονται από ιατρικές εικόνες με το γενωμικό φαινότυπο ενός ατόμου και χρησιμοποιεί τεχνικές deep learning για την ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης. Αυτό το μοντέλο είναι χρήσιμο για την ταξινόμηση των ασθενών, την καθοδήγηση θεραπευτικών στρατηγικών και την αξιολόγηση κλινικών αποτελεσμάτων (Shui et al., 2021).

Η συνδυασμένη χρήση της υγρής βιοψίας και της ακτινογενωμικής μπορεί να προσφέρει μια ελπιδοφόρα προοπτική για τη μη επεμβατική διάγνωση ασθενειών και να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό της θεραπείας (εικόνα 6). Και οι δύο προσεγγίσεις έχουν ξεχωριστά μεγάλη δυναμική, αλλά ο συνδυασμός τους μπορεί να οδηγήσει σε ακόμη

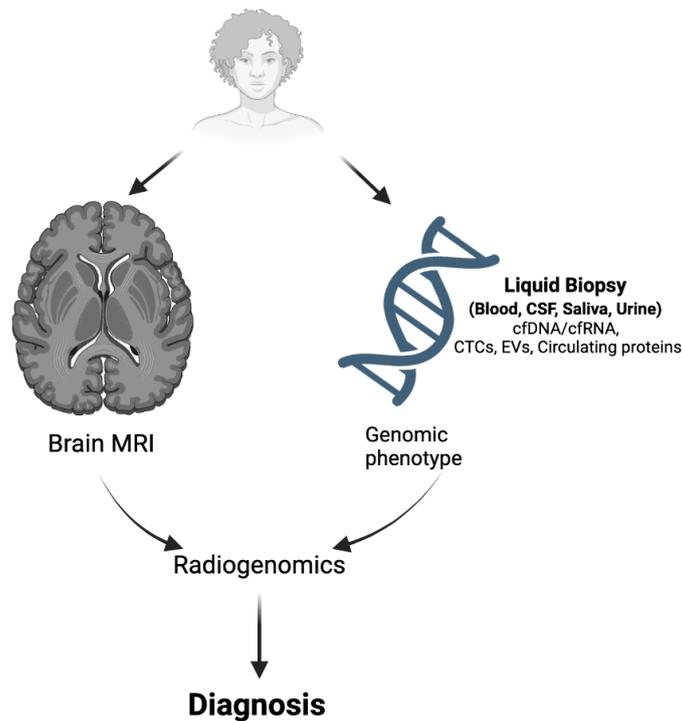
πιο ακριβείς και εμπειριστατωμένες διαγνώσεις. Η μελέτη εικόνων με χρήση της τεχνητής νοημοσύνης (AI) και βαθιάς μηχανικής μάθησης (machine και deep learning), έχει εξελιχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν μια όλο και πιο πολύπλοκη ανάλυση υπολογιστικών διεργασιών και χαρακτηριστικών από εικόνες, με τη δυνατότητα να προβλέπουν ακριβώς τις μοριακές αλλαγές που απαιτούνται για την διάγνωση της νόσου. Ως αποτέλεσμα, αποτελούν μια ελπιδοφόρα προσέγγιση για τη βελτίωση της ακρίβειας και της εύστοχης διάγνωσης των γλοιωμάτων (Gore et al., 2021; Jian et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, το πεδίο της ακτινογενωμικής προσφέρει μια μοναδική ευκαιρία για την πρόβλεψη γενετικών μεταλλάξεων, την κατάσταση μοριακών δεικτών και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών μέσω της ανάλυσης χαρακτηριστικών από εικόνες. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί δεδομένα εικόνας ως αντικαταστάτη της παρουσίας γενετικών αλλοιώσεων, παρέχοντας έναν μη επεμβατικό και αποτελεσματικό τρόπο διάγνωσης και παρακολούθησης των γλοιωμάτων (Jain & Chi, 2021).

Η ακτινογενωμική έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε άλλες μορφές καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού (Matsutani et al., 2020) και τον καρκίνο του πνεύμονα (Lafata et al., 2021). Αυτές οι μελέτες έχουν αναδείξει τις δυνατότητες της ακτινογενωμικής να προβλέπει με ακρίβεια τα γενετικά χαρακτηριστικά των όγκων μέσω της ανάλυσης δεδομένων απεικόνισης. Η εφαρμογή της ακτινογενωμικής στα γλοιώματα αποτελεί ευκαιρία για τη βελτίωση της ακρίβειας και της αποτελεσματικότητας της μη επεμβατικής διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου.

Στη μελέτη του Li Y και άλλων, χρησιμοποιήθηκαν MRI radiomics (machine learning) και κατάφεραν να προβλέψουν μεταλλάξεις ATRX (Alpha-thalassemia mental retardation syndrome) σε χαμηλόβαθμα γλοιώματα (Y. Li et al., 2018). Σε μια άλλη μελέτη, οι ίδιες μεταλλάξεις αναγνωρίστηκαν με ML (machine learning) σε γλοιώματα, με 94% ευαισθησία και 92% ειδικότητα (Calabrese et al., 2020). Τα DMG με H3F3A μεταλλάξεις στις ιστόνες

έχουν μεγαλύτερη ενίσχυση του σήματος στις ακολουθίες T2 μαγνητικού τομογράφου, ενώ οι όγκοι χωρίς τη μετάλλαξη έχουν φτωχή αναγνώριση του NCET (non-contrast-enhancing tumor) περιθωρίου. Επιπλέον, οι όγκοι χωρίς μετάλλαξη παρουσιάζουν έντονο οίδημα και παρουσιάζουν διήθηση του φλοιού (Q. Li et al., 2021). Μια μελέτη ανάλυσης radiomics (πολυπαραμετρική MRI) κατάφερε να εντοπίσει ότι οι όγκοι που φιλοξενούν μεταλλάξεις TERT έχουν περισσότερες νεκρωτικές περιοχές, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις TERT υποδηλώνουν υψηλόβαθμο προφίλ (Tian et al., 2020).

Η μελέτη των Moon και συνεργατών εντόπισαν αρκετά χαρακτηριστικά των υψηλόβαθμων γλοιομάτων σε σχέση με τη μεθυλίωση του εκκινητή του MGMT (Moon et al., 2012). Όσον αφορά άλλους όγκους του εγκεφάλου και, ιδιαίτερα, τα ολιγοδενδρογλιώματα, υπο-κατηγοριοποιούνται σε IDH-μεταλλαγμένα και με συνδιαγραφή στο 1p/19q (Louis et al., 2021), κάποιες μελέτες κατάφεραν να προβλέψουν την συνδιαγραφή 1p/19q με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, ανάλυση μιας εικόνας ακολουθίας T2 (Brown et al., 2008; Casale et al., 2021; Kong et al., 2020). Ο συνδυασμός της υγρής βιοψίας με γενωμικά στοιχεία του ακτινογενωμικού προφίλ, αντιπροσωπεύει μια ελπιδοφόρα προσέγγιση που θα φέρει επανάσταση στον τρόπο αντιμετώπισης της νόσου. Αυτός ο συνδυασμός μπορεί να διευκολύνει την πρόωμη διάγνωση, να παρέχει πιο ακριβή εκτίμηση της πρόγνωσης της νόσου, και να επιτρέπει την παρακολούθηση της νόσου σε πραγματικό χρόνο, και όλα αυτά με ελάχιστη επεμβατικότητα. Επιπλέον, αυτή η εξατομικευμένη προσέγγιση (personalized medicine) στην μη επεμβατική διάγνωση των όγκων εγκεφάλου μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για την ιατρική ακριβείας (precision medicine), προσαρμοσμένη στις ατομικές ανάγκες του κάθε ασθενούς/ανθρώπου (personalized medicine).



Εικόνα 6. Επίδραση της ακτινογενωμικής στη διάγνωση όγκων εγκεφάλου.

Η ακτινογενωμική ενσωματώνει μεγάλο αριθμό ποσοτικών δεδομένων που προέρχονται από ακτινολογικές εικόνες με γενωμικούς φαινότυπους διαφόρων ατόμων από την ανάλυση υγρών βιοψιών, προκειμένου να διευκολύνει την διάγνωση των γλοιωμάτων (δημιουργήθηκε με πρόσβαση στο BioRender)

5. Συζήτηση-Μελλοντικές προοπτικές

Σημαντικές πρόοδοι έχουν σημειωθεί στον τομέα της υγρής βιοψίας τα τελευταία 20 χρόνια, προχωρώντας από τη βασική έρευνα στις κλινικές εφαρμογές σε κάποιους τύπους όγκων, όπως τον καρκίνο του πνεύμονα, του προστάτη, του μαστού και το μελάνωμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή του στις καθημερινές ιατρικές πρακτικές εκτός από τα μεγάλα ιδρυματικά/πανεπιστημιακά νοσοκομεία, παραμένει περιορισμένη. Παρά τις διάφορες μελέτες που αναδεικνύουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε διάφορους τύπους όγκων και κλινικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της διάγνωσης της νόσου, της πρόγνωσης, της

παρακολούθησης και της θεραπευτικής ανταπόκρισης, εξακολουθεί να λείπει η ύπαρξη τυποποιημένων μεθόδων και γενετικών δεικτών. Η διαδικασία συλλογής βιολογικών υγρών, η επιλογή του βιοδείκτη και η διαδικασία ανίχνευσης πρέπει να μελετηθούν εκτενώς σε μελλοντικές κλινικές δοκιμές προκειμένου να επιτραπεί η ενσωμάτωση της Υγρής Βιοψίας στην κλινική πράξη.

Επιπλέον, μια σειρά παραγόντων μπορεί να επηρεάσει τη χρησιμότητα, την ευαισθησία και την ειδικότητα διάφορων βιοδεικτών Υγρής Βιοψίας, όπως ο υποτύπος του όγκου (για παράδειγμα, Γλοιοβλάστωμα vs Χαμηλόβαθμα Γλοιώματα), το μέγεθος και η ανατομική τοποθεσία του όγκου, το μέγεθος της ρήξης του αιμοτοεγκεφαλικού φραγμού, και το στάδιο της νόσου. Επιπλέον, η αξία κάθε βιοδείκτη θα ποικίλλει βάσει των διαφορετικών σταδίων της νόσου, όπως κατά την αρχική διάγνωση, την παρακολούθηση του ασθενούς με σταθερή νόσο, την εξέλιξη της ενεργού νόσου ή την επανεμφάνιση της νόσου, επομένως ενδέχεται να απαιτηθεί λήψη συνδυασμού βιοδεικτών (Soffietti et al., 2022). Επιπλέον, ιδανικά θα πρέπει να καθοριστεί από που θα πραγματοποιείται η συλλογή των βιοδεικτών για κάθε ασθενή και κάθε τύπο όγκου, καθώς και η καλύτερη μέθοδος στην περίπτωση συλλογής ENY, δηλαδή οσφυϊκά vs από κάποια δεξαμενή του εγκεφάλου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Είναι επίσης απαραίτητο να βρεθούν κυκλοφορούντες βιοδείκτες που είναι ειδικοί για κάθε τύπο όγκου, καθώς πολλοί δεν είναι ειδικοί για τους διάφορους τύπους Γλοιωμάτων και δεν επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών τύπων όγκων σε ασθενείς με παρόμοια συμπτώματα ή υποκατηγορίες του ίδιου όγκου (Ronvaux et al., 2022).

Συνολικά, η χρήση της υγρής βιοψίας και της ακτινογενωμικής προσφέρει σημαντική ευκαιρία για την επίτευξη μη επεμβατικών διαγνώσεων των όγκων εγκεφάλου και την αναγνώριση με επιτυχία των μοριακών τους αλλαγών. Εάν ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα, η ανάλυση των συστατικών του όγκου στα σωματικά υγρά και η χρήση των δεδομένων απεικόνισης για τον προσδιορισμό γενετικών ανωμαλιών μέσω αυτών των

τεχνικών μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την φύση και την συμπεριφορά των όγκων του κεντρικού νευρικού συστήματος, επιτρέποντας έτσι τον πιο αποτελεσματικό σχεδιασμό του θεραπευτικού σχήματος και την παρακολούθηση στην ανταπόκριση της θεραπείας.

Βιβλιογραφία

- Aarthy, R., Mani, S., Velusami, S., Sundarsingh, S., & Rajkumar, T. (2015). Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *19*(6), 339–350. <https://doi.org/10.1007/s40291-015-0167-y>
- Akers, J. C., Ramakrishnan, V., Kim, R., Phillips, S., Kaimal, V., Mao, Y., Hua, W., Yang, I., Fu, C.-C., Nolan, J., Nakano, I., Yang, Y., Beaulieu, M., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2015). miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients. *Journal of Neuro-Oncology*, *123*(2), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1784-3>
- André, F., Scharz, N. E. C., Chaput, N., Flament, C., Raposo, G., Amigorena, S., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2002). Tumor-derived exosomes: A new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*, *20 Suppl 4*, A28-31. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00384-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00384-5)
- Antonelli, M., & Poliani, P. L. (2022). Adult type diffuse gliomas in the new 2021 WHO Classification. *Pathologica*, *114*(6), 397–409. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-823>
- Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S., & Pretorius, P. J. (2018). The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: A critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *93*(3), 1649–1683. <https://doi.org/10.1111/brv.12413>
- Baillie, J. K., Barnett, M. W., Upton, K. R., Gerhardt, D. J., Richmond, T. A., De Sapio, F., Brennan, P. M., Rizzu, P., Smith, S., Fell, M., Talbot, R. T., Gustincich, S., Freeman, T. C., Mattick, J. S., Hume, D. A., Heutink, P., Carninci, P., Jeddloh, J. A., & Faulkner, G. J. (2011). Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*, *479*(7374), 534–537. <https://doi.org/10.1038/nature10531>

- Balaña, C., Ramirez, J. L., Taron, M., Roussos, Y., Ariza, A., Ballester, R., Sarries, C., Mendez, P., Sanchez, J. J., & Rosell, R. (2003). O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(4), 1461–1468.
- Bauman, M. M. J., Bouchal, S. M., Monie, D. D., Aibaidula, A., Singh, R., & Parney, I. F. (2022). Strategies, considerations, and recent advancements in the development of liquid biopsy for glioblastoma: A step towards individualized medicine in glioblastoma. *Neurosurgical Focus*, 53(6), E14.
<https://doi.org/10.3171/2022.9.FOCUS22430>
- Bellia, F., Vecchio, G., & Rizzarelli, E. (2014). Carnosinases, Their Substrates and Diseases. *Molecules*, 19(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules19022299>
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>
- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Research*, 77(15), 3965–3981. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>
- Björkblom, B., Wibom, C., Eriksson, M., Bergenheim, A. T., Sjöberg, R. L., Jonsson, P., Brännström, T., Antti, H., Sandström, M., & Melin, B. (2022). Distinct metabolic

- hallmarks of WHO classified adult glioma subtypes. *Neuro-Oncology*, 24(9), 1454–1468. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac042>
- Boisselier, B., Gállego Pérez-Larraya, J., Rossetto, M., Labussière, M., Ciccarino, P., Marie, Y., Delattre, J.-Y., & Sanson, M. (2012). Detection of IDH1 mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology*, 79(16), 1693–1698. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826e9b0a>
- Boon, R. A., Jaé, N., Holdt, L., & Dimmeler, S. (2016). Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *Journal of the American College of Cardiology*, 67(10), 1214–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.12.051>
- Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., & Holdenrieder, S. (2019). The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100087>
- Brown, R., Zlatescu, M., Sijben, A., Roldan, G., Easaw, J., Forsyth, P., Parney, I., Sevick, R., Yan, E., Demetrick, D., Schiff, D., Cairncross, G., & Mitchell, R. (2008). The use of magnetic resonance imaging to noninvasively detect genetic signatures in oligodendroglioma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(8), 2357–2362. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1964>
- Bryzgunova, O. E., E, B. O., Laktionov, P. P., & II, J. II. (2015). Extracellular Nucleic Acids in Urine: Sources, Structure, Diagnostic Potential. *Acta Naturae*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-3-48-54>
- Calabrese, E., Villanueva-Meyer, J. E., & Cha, S. (2020). A fully automated artificial intelligence method for non-invasive, imaging-based identification of genetic alterations in glioblastomas. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68857-8>

- Carpenter, E. L., & Bagley, S. J. (2022). Clinical utility of plasma cell-free DNA in gliomas. *Neuro-Oncology Advances*, 4(Supplement_2), ii41–ii44.
<https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac014>
- Casale, R., Lavrova, E., Sanduleanu, S., Woodruff, H. C., & Lambin, P. (2021). Development and external validation of a non-invasive molecular status predictor of chromosome 1p/19q co-deletion based on MRI radiomics analysis of Low Grade Glioma patients. *European Journal of Radiology*, 139, 109678.
<https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2021.109678>
- Chaput, N., Taïeb, J., Schartz, N. E. C., André, F., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2004). Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 53(3), 234–239. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0472-x>
- Chen, M., & Zhao, H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: Cancer screening and early detection. *Human Genomics*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0220-8>
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J.-P., & Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17380–17385.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1304266110>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 364–372.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
- Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A., Wong, F., Mattox, A., Hruban, R. H., Wolfgang, C. L., Goggins, M. G., Dal Molin, M., Wang, T.-L., Roden, R., Klein, A. P., Ptak, J., Dobbyn, L., ... Papadopoulos, N.

- (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6378), 926–930.
<https://doi.org/10.1126/science.aar3247>
- Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T., Morell, M., O’Shea, K. S., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*, 460(7259), 1127–1131.
<https://doi.org/10.1038/nature08248>
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., & Mongini, C. (2015). Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in Immunology*, 6, 203.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00203>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775–1789.
<https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Dong, L., Li, Y., Han, C., Wang, X., She, L., & Zhang, H. (2014). miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients. *International Journal of Oncology*, 45(2), 746–756. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2459>
- Eibl, R. H., & Schneemann, M. (2021). Liquid Biopsy and Primary Brain Tumors. *Cancers*, 13(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/cancers13215429>
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>

- Euskirchen, P., Bielle, F., Labreche, K., Kloosterman, W. P., Rosenberg, S., Daniau, M., Schmitt, C., Masliah-Planchon, J., Bourdeaut, F., Dehais, C., Marie, Y., Delattre, J.-Y., & Idhah, A. (2017). Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing. *Acta Neuropathologica*, *134*(5), 691–703. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1743-5>
- Faria, G., Silva, E., Da Fonseca, C., & Quirico-Santos, T. (2018). Circulating Cell-Free DNA as a Prognostic and Molecular Marker for Patients with Brain Tumors under Perillyl Alcohol-Based Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1610. <https://doi.org/10.3390/ijms19061610>
- Febbo, P. G., Ladanyi, M., Aldape, K. D., De Marzo, A. M., Hammond, M. E., Hayes, D. F., Iafrate, A. J., Kelley, R. K., Marcucci, G., Ogino, S., Pao, W., Sgroi, D. C., & Birkeland, M. L. (2011). NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *9 Suppl 5*, S1-32; quiz S33. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0137>
- Figuerola, J. M., Skog, J., Akers, J., Li, H., Komotar, R., Jensen, R., Ringel, F., Yang, I., Kalkanis, S., Thompson, R., LoGuidice, L., Berghoff, E., Parsa, A., Liau, L., Curry, W., Cahill, D., Bettegowda, C., Lang, F. F., Chiocca, E. A., ... Carter, B. S. (2017). Detection of wild-type EGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. *Neuro-Oncology*, *19*(11), 1494–1502. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox085>
- Fujioka, Y., Hata, N., Akagi, Y., Kuga, D., Hatae, R., Sangatsuda, Y., Michiwaki, Y., Amemiya, T., Takigawa, K., Funakoshi, Y., Sako, A., Iwaki, T., Iihara, K., & Mizoguchi, M. (2021). Molecular diagnosis of diffuse glioma using a chip-based digital PCR system to analyze IDH, TERT, and H3 mutations in the cerebrospinal

- fluid. *Journal of Neuro-Oncology*, 152(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03682-7>
- Gállego Pérez-Larraya, J., Paris, S., Idbaih, A., Dehais, C., Laigle-Donadey, F., Navarro, S., Capelle, L., Mokhtari, K., Marie, Y., Sanson, M., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.-Y., & Mallet, A. (2014). Diagnostic and prognostic value of preoperative combined GFAP, IGFBP-2, and YKL-40 plasma levels in patients with glioblastoma. *Cancer*, 120(24), 3972–3980. <https://doi.org/10.1002/cncr.28949>
- Gao, F., Cui, Y., Jiang, H., Sui, D., Wang, Y., Jiang, Z., Zhao, J., & Lin, S. (2016). Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget*, 7(44), 71330–71340. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11114>
- Gatto, L., Franceschi, E., Di Nunno, V., Tosoni, A., Lodi, R., & Brandes, A. A. (2021). Liquid Biopsy in Glioblastoma Management: From Current Research to Future Perspectives. *The Oncologist*, 26(10), 865–878. <https://doi.org/10.1002/onco.13858>
- Gautam, P., Nair, S. C., Gupta, M. K., Sharma, R., Polisetty, R. V., Uppin, M. S., Sundaram, C., Puligopu, A. K., Ankathi, P., Purohit, A. K., Chandak, G. R., Harsha, H. C., & Sirdeshmukh, R. (2012). Proteins with Altered Levels in Plasma from Glioblastoma Patients as Revealed by iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis. *PLOS ONE*, 7(9), e46153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046153>
- Gore, S., Chougule, T., Jagtap, J., Saini, J., & Ingalthalikar, M. (2021). A Review of Radiomics and Deep Predictive Modeling in Glioma Characterization. *Academic Radiology*, 28(11), 1599–1621. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2020.06.016>
- Gourlay, J., Morokoff, A. P., Luwor, R. B., Zhu, H.-J., Kaye, A. H., & Stylli, S. S. (2017). The emergent role of exosomes in glioma. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 35, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.09.021>

- H Rashed, M., Bayraktar, E., K Helal, G., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., & Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3), E538. <https://doi.org/10.3390/ijms18030538>
- Hagiwara, K., Ochiya, T., & Kosaka, N. (2014). A paradigm shift for extracellular vesicles as small RNA carriers: From cellular waste elimination to therapeutic applications. *Drug Delivery and Translational Research*, *4*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0180-9>
- Hayes, D. F., Bast, R. C., Desch, C. E., Fritsche, H., Jr., Kemeny, N. E., Jessup, J. M., Locker, G. Y., Macdonald, J. S., Mennel, R. G., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., & Winn, R. J. (1996). Tumor Marker Utility Grading System: A Framework to Evaluate Clinical Utility of Tumor Markers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *88*(20), 1456–1466. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.20.1456>
- Helmerhorst, E. J., & Oppenheim, F. G. (2007). Saliva: A dynamic proteome. *Journal of Dental Research*, *86*(8), 680–693. <https://doi.org/10.1177/154405910708600802>
- Hirahata, T., ul Quraish, R., Quraish, A. ul, ul Quraish, S., Naz, M., & Razzaq, M. A. (2022). Liquid Biopsy: A Distinctive Approach to the Diagnosis and Prognosis of Cancer. *Cancer Informatics*, *21*, 11769351221076062. <https://doi.org/10.1177/11769351221076062>
- Huang, K., Fang, C., Yi, K., Liu, X., Qi, H., Tan, Y., Zhou, J., Li, Y., Liu, M., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, J., Li, M., & Kang, C. (2018). The role of PTRF/Cavin1 as a biomarker in both glioma and serum exosomes. *Theranostics*, *8*(6), 1540–1557. <https://doi.org/10.7150/thno.22952>
- Husain, A., Mishra, S., Hadi, R., Sahu, A., Kumari, S., Rastogi, M., Khurana, R., Shukla, S., Siddiqui, M. H., & Husain, N. (2022). Dynamics of cell-free DNA in predicting

- response in adult diffuse glioma on chemoradiotherapy. *Cancer Genetics*, 268–269, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2022.09.006>
- Hyun, K.-A., Gwak, H., Lee, J., Kwak, B., & Jung, H.-I. (2018). Salivary Exosome and Cell-Free DNA for Cancer Detection. *Micromachines*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/mi9070340>
- Ilhan-Mutlu, A., Wagner, L., Wöhrer, A., Furtner, J., Widhalm, G., Marosi, C., & Preusser, M. (2012). Plasma MicroRNA-21 Concentration May Be a Useful Biomarker in Glioblastoma Patients. *Cancer Investigation*, 30(8), 615–621. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.708071>
- Ivo D’Urso, P., Fernando D’Urso, O., Damiano Gianfreda, C., Mezzolla, V., Storelli, C., & Marsigliante, S. (2015). miR-15b and miR-21 as Circulating Biomarkers for Diagnosis of Glioma. *Current Genomics*, 16(5), 304–311. <https://doi.org/10.2174/1389202916666150707155610>
- Jain, R., & Chi, A. S. (2021). Radiogenomics identifying important biological pathways in gliomas. *Neuro-Oncology*, 23(2), 177–178. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa290>
- Jaiswal, R., & Sedger, L. M. (2019). Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes—Implications for Cancer Biology and Treatments. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00125>
- Jelski, W., & Mroczko, B. (2021). Molecular and Circulating Biomarkers of Brain Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms22137039>
- Jian, A., Jang, K., Manuguerra, M., Liu, S., Magnussen, J., & Di Ieva, A. (2021). Machine Learning for the Prediction of Molecular Markers in Glioma on Magnetic Resonance

- Imaging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neurosurgery*, 89(1), 31–44.
<https://doi.org/10.1093/neuros/nyab103>
- Jones, J., Nguyen, H., Drummond, K., & Morokoff, A. (2021). Circulating Biomarkers for Glioma: A Review. *Neurosurgery*, 88(3), E221–E230.
<https://doi.org/10.1093/neuros/nyaa540>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6478), eaau6977.
<https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Keup, C., Mach, P., Aktas, B., Tewes, M., Kolberg, H.-C., Hauch, S., Sprenger-Haussels, M., Kimmig, R., & Kasimir-Bauer, S. (2018). RNA Profiles of Circulating Tumor Cells and Extracellular Vesicles for Therapy Stratification of Metastatic Breast Cancer Patients. *Clinical Chemistry*, 64(7), 1054–1062.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.283531>
- Kichkailo, A. S., Narodov, A. A., Komarova, M. A., Zamay, T. N., Zamay, G. S., Kolovskaya, O. S., Erakhtin, E. E., Glazyrin, Y. E., Veprintsev, D. V., Moryachkov, R. V., Zabluda, V. V., Shchugoreva, I., Artyushenko, P., Mironov, V. A., Morozov, D. I., Khorzhevskii, V. A., Gorbushin, A. V., Koshmanova, A. A., Nikolaeva, E. D., ... Berezovski, M. V. (2023). Development of DNA aptamers for visualization of glial brain tumors and detection of circulating tumor cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 32, 267–288.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.015>
- Klekner, Á., Szivos, L., Virga, J., Árkosy, P., Bognár, L., Birkó, Z., & Nagy, B. (2019). Significance of liquid biopsy in glioblastoma—A review. *Journal of Biotechnology*, 298, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.011>
- Kong, Z., Jiang, C., Zhang, Y., Liu, S., Liu, D., Liu, Z., Chen, W., Liu, P., Yang, T., Lyu, Y., Zhao, D., You, H., Wang, Y., Ma, W., & Feng, F. (2020). Thin-Slice Magnetic

- Resonance Imaging-Based Radiomics Signature Predicts Chromosomal 1p/19q Co-deletion Status in Grade II and III Gliomas. *Frontiers in Neurology*, *11*, 551771. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.551771>
- Kreth, S., Thon, N., & Kreth, F. W. (2014). Epigenetics in human gliomas. *Cancer Letters*, *342*(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.008>
- Krol, I., Castro-Giner, F., Maurer, M., Gkountela, S., Szczerba, B. M., Scherrer, R., Coleman, N., Carreira, S., Bachmann, F., Anderson, S., Engelhardt, M., Lane, H., Evans, T. R. J., Plummer, R., Kristeleit, R., Lopez, J., & Aceto, N. (2018). Detection of circulating tumour cell clusters in human glioblastoma. *British Journal of Cancer*, *119*(4), 487–491. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0186-7>
- Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., & Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(18), 7312–7317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110>
- Lafata, K. J., Corradetti, M. N., Gao, J., Jacobs, C. D., Weng, J., Chang, Y., Wang, C., Hatch, A., Xanthopoulos, E., Jones, G., Kelsey, C. R., & Yin, F.-F. (2021). Radiogenomic Analysis of Locally Advanced Lung Cancer Based on CT Imaging and Intratreatment Changes in Cell-Free DNA. *Radiology: Imaging Cancer*, *3*(4), e200157. <https://doi.org/10.1148/rycan.2021200157>
- Lan, F., Qing, Q., Pan, Q., Hu, M., Yu, H., & Yue, X. (2018). Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *Cellular Oncology*, *41*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0355-3>

- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., ... International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Lavon, I., Refael, M., Zelikovitch, B., Shalom, E., & Siegal, T. (2010). Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades. *Neuro-Oncology*, *12*(2), 173–180. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop041>
- Lee, E. Y., Lee, E.-J., Yoon, H., Lee, D. H., & Kim, K. H. (2020). Comparison of Four Commercial Kits for Isolation of Urinary Cell-Free DNA and Sample Storage Conditions. *Diagnostics*, *10*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040234>
- Li, D., Bonner, E. R., Wierzbicki, K., Panditharatna, E., Huang, T., Lulla, R., Mueller, S., Koschmann, C., Nazarian, J., & Saratsis, A. M. (2021). Standardization of the liquid biopsy for pediatric diffuse midline glioma using ddPCR. *Scientific Reports*, *11*(1), 5098. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84513-1>
- Li, Q., Dong, F., Jiang, B., & Zhang, M. (2021). Exploring MRI Characteristics of Brain Diffuse Midline Gliomas With the H3 K27M Mutation Using Radiomics. *Frontiers in Oncology*, *11*, 646267. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.646267>
- Li, Y., Liu, X., Qian, Z., Sun, Z., Xu, K., Wang, K., Fan, X., Zhang, Z., Li, S., Wang, Y., & Jiang, T. (2018). Genotype prediction of ATRX mutation in lower-grade gliomas using an MRI radiomics signature. *European Radiology*, *28*(7), 2960–2968. <https://doi.org/10.1007/s00330-017-5267-0>

- Liu, S. J., Dang, H. X., Lim, D. A., Feng, F. Y., & Maher, C. A. (2021). Long noncoding RNAs in cancer metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, *21*(7), 446–460.
<https://doi.org/10.1038/s41568-021-00353-1>
- Lone, S. N., Nisar, S., Masoodi, T., Singh, M., Rizwan, A., Hashem, S., El-Rifai, W., Bedognetti, D., Batra, S. K., Haris, M., Bhat, A. A., & Macha, M. A. (2022). Liquid biopsy: A step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer*, *21*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820.
<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, *23*(8), 1231–1251.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Lu, M. (2020). Circular RNA: Functions, applications and prospects. *ExRNA*, *2*(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/s41544-019-0046-5>
- Lynch, D., Powter, B., Po, J. W., Cooper, A., Garrett, C., Koh, E.-S., Sheridan, M., van Gelder, J., Darwish, B., Mckechnie, S., Bazina, R., Jaeger, M., Roberts, T. L., de Souza, P., & Becker, T. M. (2020). Isolation of Circulating Tumor Cells from Glioblastoma Patients by Direct Immunomagnetic Targeting. *Applied Sciences*, *10*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/app10093338>

- Macarthur, K. M., Kao, G. D., Chandrasekaran, S., Alonso-Basanta, M., Chapman, C., Lustig, R. A., Wileyto, E. P., Hahn, S. M., & Dorsey, J. F. (2014). Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Research, 74*(8), 2152–2159. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0813>
- Mair, R., & Mouliere, F. (2022). Cell-free DNA technologies for the analysis of brain cancer. *British Journal of Cancer, 126*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01594-5>
- Mallawaarachy, D. M., Hallal, S., Russell, B., Ly, L., Ebrahimkhani, S., Wei, H., Christopherson, R. I., Buckland, M. E., & Kaufman, K. L. (2017). Comprehensive proteome profiling of glioblastoma-derived extracellular vesicles identifies markers for more aggressive disease. *Journal of Neuro-Oncology, 131*(2), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2298-3>
- Manterola, L., Guruceaga, E., Pérez-Larraya, J. G., González-Huarriz, M., Jauregui, P., Tejada, S., Diez-Valle, R., Segura, V., Samprón, N., Barrena, C., Ruiz, I., Agirre, A., Ayuso, Á., Rodríguez, J., González, Á., Xipell, E., Matheu, A., López de Munain, A., Tuñón, T., ... Alonso, M. M. (2014). A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro-Oncology, 16*(4), 520–527. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not218>
- Markouli, M., Strepkos, D., Basdra, E. K., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C. (2021). Prominent Role of Histone Modifications in the Regulation of Tumor Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(5), 2778. <https://doi.org/10.3390/ijms22052778>
- Martínez-Ricarte, F., Mayor, R., Martínez-Sáez, E., Rubio-Pérez, C., Pineda, E., Cordero, E., Cicuéndez, M., Poca, M. A., López-Bigas, N., Ramon Y Cajal, S., Vieito, M., Carles, J., Taberner, J., Vivancos, A., Gallego, S., Graus, F., Sahuquillo, J., & Seoane, J.

- (2018). Molecular Diagnosis of Diffuse Gliomas through Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA from Cerebrospinal Fluid. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(12), 2812–2819. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3800>
- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), Article 7586. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Mathios, D., & Phallen, J. (2022). Advances in molecular biomarkers and liquid biopsy in gliomas. *Neuro-Oncology Advances*, 4(Suppl 2), ii15–ii21. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac151>
- Matsutani, A., Udagawa, C., Matsunaga, Y., Nakamura, S., & Zembutsu, H. (2020). Liquid biopsy for the detection of clinical biomarkers in early breast cancer: New insights and challenges. *Pharmacogenomics*, 21(5), 359–367. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0130>
- Mazor, G., Levin, L., Picard, D., Ahmadov, U., Carén, H., Borkhardt, A., Reifenberger, G., Leprivier, G., Remke, M., & Rotblat, B. (2019). The lncRNA TP73-AS1 is linked to aggressiveness in glioblastoma and promotes temozolomide resistance in glioblastoma cancer stem cells. *Cell Death & Disease*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1477-5>
- Miyauchi, E., Furuta, T., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Uchida, Y., Sabit, H., Obuchi, W., Baba, T., Watanabe, M., Terasaki, T., & Nakada, M. (2018). Identification of blood biomarkers in glioblastoma by SWATH mass spectrometry and quantitative targeted absolute proteomics. *PLOS ONE*, 13(3), e0193799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193799>
- Moon, W.-J., Choi, J. W., Roh, H. G., Lim, S. D., & Koh, Y.-C. (2012). Imaging parameters of high grade gliomas in relation to the MGMT promoter methylation status: The CT,

- diffusion tensor imaging, and perfusion MR imaging. *Neuroradiology*, 54(6), 555–563. <https://doi.org/10.1007/s00234-011-0947-y>
- Mouliere, F., Mair, R., Chandrananda, D., Marass, F., Smith, C. G., Su, J., Morris, J., Watts, C., Brindle, K. M., & Rosenfeld, N. (2018). Detection of cell-free DNA fragmentation and copy number alterations in cerebrospinal fluid from glioma patients. *EMBO Molecular Medicine*, 10(12), e9323. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809323>
- Müller, C., Holtschmidt, J., Auer, M., Heitzer, E., Lamszus, K., Schulte, A., Matschke, J., Langer-Freitag, S., Gasch, C., Stoupiec, M., Mauermann, O., Peine, S., Glatzel, M., Speicher, M. R., Geigl, J. B., Westphal, M., Pantel, K., & Riethdorf, S. (2014). Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Science Translational Medicine*, 6(247), 247ra101. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009095>
- Muralidharan, K., Yekula, A., Small, J. L., Rosh, Z. S., Kang, K. M., Wang, L., Lau, S., Zhang, H., Lee, H., Bettgowda, C., Chicoine, M. R., Kalkanis, S. N., Shankar, G. M., Nahed, B. V., Curry, W. T., Jones, P. S., Cahill, D. P., Balaj, L., & Carter, B. S. (2021). TERT Promoter Mutation Analysis for Blood-Based Diagnosis and Monitoring of Gliomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 27(1), 169–178. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3083>
- Nadano, D., Yasuda, T., & Kishi, K. (1993). Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clinical Chemistry*, 39(3), 448–452.
- Naryzhny, S., Ronzhina, N., Zorina, E., Kabachenko, F., Zavialova, M., Zgoda, V., Klopov, N., Legina, O., & Pantina, R. (2021). Evaluation of Haptoglobin and Its Proteoforms as Glioblastoma Markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms22126533>

- Naryzhny, S., Volnitskiy, A., Kopylov, A., Zorina, E., Kamyshinsky, R., Bairamukov, V., Garaeva, L., Shlikht, A., & Shtam, T. (2020). Proteome of Glioblastoma-Derived Exosomes as a Source of Biomarkers. *Biomedicines*, *8*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070216>
- Nassiri, F., Chakravarthy, A., Feng, S., Shen, S. Y., Nejad, R., Zuccato, J. A., Voisin, M. R., Patil, V., Horbinski, C., Aldape, K., Zadeh, G., & De Carvalho, D. D. (2020). Detection and discrimination of intracranial tumors using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature Medicine*, *26*(7), 1044–1047. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0932-2>
- New method to preserve the original proportion and integrity of urinary cell-free DNA.* (n.d.). <https://doi.org/10.1002/jcla.22668>
- Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., & Lupold, S. E. (n.d.). Nucleic Acid Aptamers: Clinical Applications and Promising New Horizons. *Current Medicinal Chemistry*, *18*(27), 4206–4214.
- Ochieng, J., Nangami, G., Sakwe, A., Moye, C., Alvarez, J., Whalen, D., Thomas, P., & Lammers, P. (2018). Impact of Fetuin-A (AHSG) on Tumor Progression and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms19082211>
- Ohka, F., Natsume, A., Motomura, K., Kishida, Y., Kondo, Y., Abe, T., Nakasu, Y., Namba, H., Wakai, K., Fukui, T., Momota, H., Iwami, K., Kinjo, S., Ito, M., Fujii, M., & Wakabayashi, T. (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PloS One*, *6*(8), e23332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023332>
- Oliosio, D., Caccese, M., Santangelo, A., Lippi, G., Zagonel, V., Cabrini, G., Lombardi, G., & Dehecchi, M. C. (2021). Serum Exosomal microRNA-21, 222 and 124-3p as

- Noninvasive Predictive Biomarkers in Newly Diagnosed High-Grade Gliomas: A Prospective Study. *Cancers*, 13(12), 3006. <https://doi.org/10.3390/cancers13123006>
- Palande, V., Siegal, T., Detroja, R., Gorohovski, A., Glass, R., Flueh, C., Kanner, A. A., Laviv, Y., Har-Nof, S., Levy-Barda, A., Viviana Karpuj, M., Kurtz, M., Perez, S., Raviv Shay, D., & Frenkel-Morgenstern, M. (2022). Detection of gene mutations and gene–gene fusions in circulating cell-free DNA of glioblastoma patients: An avenue for clinically relevant diagnostic analysis. *Molecular Oncology*, 16(10), 2098–2114. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13157>
- Panditharatna, E., Kilburn, L. B., Aboian, M. S., Kambhampati, M., Gordish-Dressman, H., Magge, S. N., Gupta, N., Myseros, J. S., Hwang, E. I., Kline, C., Crawford, J. R., Warren, K. E., Cha, S., Liang, W. S., Berens, M. E., Packer, R. J., Resnick, A. C., Prados, M., Mueller, S., & Nazarian, J. (2018). Clinically relevant and minimally invasive tumor surveillance of pediatric diffuse midline gliomas using patient derived liquid biopsy. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(23), 5850–5859. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1345>
- Pantel, K., Denève, E., Nocca, D., Coffy, A., Vendrell, J.-P., Maudelonde, T., Riethdorf, S., & Alix-Panabières, C. (2012). Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clinical Chemistry*, 58(5), 936–940. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.175570>
- Park, Y. W., Vollmuth, P., Foltyn-Dumitru, M., Sahm, F., Ahn, S. S., Chang, J. H., & Kim, S. H. (2023). The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 1-Key Points of the Fifth Edition and Summary of Imaging Findings on Adult-Type Diffuse Gliomas. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 58(3), 677–689. <https://doi.org/10.1002/jmri.28743>

- Perakis, S., & Speicher, M. R. (2017). Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Medicine*, 15(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0840-6>
- Perryman, L., & Erler, J. T. (2014). Brain cancer spreads. *Science Translational Medicine*, 6(247), 247fs28. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009920>
- Pfeifer, G. P. (2018). Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1166. <https://doi.org/10.3390/ijms19041166>
- Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. (2019). Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytologica*, 63(6), 449–455. <https://doi.org/10.1159/000499337>
- Putz, U., Howitt, J., Doan, A., Goh, C.-P., Low, L.-H., Silke, J., & Tan, S.-S. (2012). The Tumor Suppressor PTEN Is Exported in Exosomes and Has Phosphatase Activity in Recipient Cells. *Science Signaling*, 5(243), ra70–ra70. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003084>
- Qin, G., Li, X., Chen, Z., Liao, G., Su, Y., Chen, Y., & Zhang, W. (2017). Prognostic Value of YKL-40 in Patients with Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Molecular Neurobiology*, 54(5), 3264–3270. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9878-2>
- Quezada, C., Torres, Á., Niechi, I., Uribe, D., Contreras-Duarte, S., Toledo, F., San Martín, R., Gutiérrez, J., & Sobrevia, L. (2018). Role of extracellular vesicles in glioma progression. *Molecular Aspects of Medicine*, 60, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.12.003>
- Regazzo, G., Terrenato, I., Spagnuolo, M., Carosi, M., Cognetti, G., Cicchillitti, L., Sperati, F., Villani, V., Carapella, C., Piaggio, G., Pelosi, A., & Rizzo, M. G. (2016). A restricted signature of serum miRNAs distinguishes glioblastoma from lower grade

gliomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* : CR, 35, 124.

<https://doi.org/10.1186/s13046-016-0393-0>

Romano, E., Netti, P. A., & Torino, E. (2020). Exosomes in Gliomas: Biogenesis, Isolation, and Preliminary Applications in Nanomedicine. *Pharmaceuticals*, 13(10), Article 10.

<https://doi.org/10.3390/ph13100319>

Ronvaux, L., Riva, M., Coosemans, A., Herzog, M., Rommelaere, G., Donis, N., D'Hondt, L., & Douxfils, J. (2022). Liquid Biopsy in Glioblastoma. *Cancers*, 14(14), 3394.

<https://doi.org/10.3390/cancers14143394>

Roth, C., Pantel, K., Müller, V., Rack, B., Kasimir-Bauer, S., Janni, W., & Schwarzenbach, H. (2011). Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer*, 11(1), 4.

<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-4>

Rykova, E. Y., Morozkin, E. S., Ponomaryova, A. A., Loseva, E. M., Zaporozhchenko, I. A., Cherdyntseva, N. V., Vlassov, V. V., & Laktionov, P. P. (2012). Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: Mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12 Suppl 1, S141-153.

<https://doi.org/10.1517/14712598.2012.673577>

Sabedot, T. S., Malta, T. M., Snyder, J., Nelson, K., Wells, M., deCarvalho, A. C., Mukherjee, A., Chitale, D. A., Mosella, M. S., Sokolov, A., Asmaro, K. P., Robin, A., Rosenblum, M. L., Mikkelsen, T., Rock, J., Poisson, L. M., Lee, I., Walbert, T., Kalkanis, S., ... Noushmehr, H. (2021). A serum-based DNA methylation assay provides accurate detection of glioma. *Neuro-Oncology*, 23(9), 1494–1508.

<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab023>

Sastre, J., Maestro, M. L., Puente, J., Veganzones, S., Alfonso, R., Rafael, S., García-Saenz, J. A., Vidaurreta, M., Martín, M., Arroyo, M., Sanz-Casla, M. T., & Díaz-Rubio, E.

- (2008). Circulating tumor cells in colorectal cancer: Correlation with clinical and pathological variables. *Annals of Oncology*, *19*(5), 935–938.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdm583>
- Schey, K. L., Luther, J. M., & Rose, K. L. (2015). Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods (San Diego, Calif.)*, *87*, 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.018>
- Schilsky, R. L., & Longo, D. L. (2022). Closing the Gap in Cancer Genomic Testing. *New England Journal of Medicine*, *387*(23), 2107–2110.
<https://doi.org/10.1056/NEJMp2210638>
- Senhaji, N., Squalli Houssaini, A., Lamrabet, S., Louati, S., & Bennis, S. (2022). Molecular and Circulating Biomarkers in Patients with Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms23137474>
- Shao, H., Chung, J., Balaj, L., Charest, A., Bigner, D. D., Carter, B. S., Hochberg, F. H., Breakefield, X. O., Weissleder, R., & Lee, H. (2012). Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nature Medicine*, *18*(12), 1835–1840. <https://doi.org/10.1038/nm.2994>
- Shao, H., Chung, J., Lee, K., Balaj, L., Min, C., Carter, B. S., Hochberg, F. H., Breakefield, X. O., Lee, H., & Weissleder, R. (2015). Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nature Communications*, *6*, 6999.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7999>
- Shen, J., Hodges, T. R., Song, R., Gong, Y., Calin, G. A., Heimberger, A. B., & Zhao, H. (2018). Serum HOTAIR and GAS5 levels as predictors of survival in patients with glioblastoma. *Molecular Carcinogenesis*, *57*(1), 137–141.
<https://doi.org/10.1002/mc.22739>

- Shi, G., Cui, W., Benchimol, M., Liu, Y.-T., Mattrey, R. F., Mukthavaram, R., Kesari, S., Esener, S. C., & Simberg, D. (2013). Isolation of rare tumor cells from blood cells with buoyant immuno-microbubbles. *PloS One*, 8(3), e58017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058017>
- Shi, M., Sheng, L., Stewart, T., Zabetian, C. P., & Zhang, J. (2019). New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Progress in Neurobiology*, 175, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.01.005>
- Shi, R., Wang, P.-Y., Li, X.-Y., Chen, J.-X., Li, Y., Zhang, X.-Z., Zhang, C.-G., Jiang, T., Li, W.-B., Ding, W., & Cheng, S.-J. (2015). Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget*, 6(29), 26971–26981. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4699>
- Shui, L., Ren, H., Yang, X., Li, J., Chen, Z., Yi, C., Zhu, H., & Shui, P. (2021). The Era of Radiogenomics in Precision Medicine: An Emerging Approach to Support Diagnosis, Treatment Decisions, and Prognostication in Oncology. *Frontiers in Oncology*, 10, 570465. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.570465>
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- Skouras, P., Gargalionis, A. N., & Piperi, C. (2023). Exosomes as Novel Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Tools in Gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms241210162>

- Skouras, P., Markouli, M., Kalamatianos, T., Stranjalis, G., Korkolopoulou, P., & Piperi, C. (2023). Advances on Liquid Biopsy Analysis for Glioma Diagnosis. *Biomedicines*, *11*(9), 2371. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11092371>
- Śledzińska, P., Bebyn, M. G., Furtak, J., Kowalewski, J., & Lewandowska, M. A. (2021). Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms221910373>
- Soffiatti, R., Bettegowda, C., Mellinghoff, I. K., Warren, K. E., Ahluwalia, M. S., De Groot, J. F., Galanis, E., Gilbert, M. R., Jaeckle, K. A., Le Rhun, E., Rudà, R., Seoane, J., Thon, N., Umemura, Y., Weller, M., van den Bent, M. J., Vogelbaum, M. A., Chang, S. M., & Wen, P. Y. (2022). Liquid biopsy in gliomas: A RANO review and proposals for clinical applications. *Neuro-Oncology*, *24*(6), 855–871. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac004>
- Song, Y., Shi, Y., Huang, M., Wang, W., Wang, Y., Cheng, J., Lei, Z., Zhu, Z., & Yang, C. (2019). Bioinspired Engineering of a Multivalent Aptamer-Functionalized Nanointerface to Enhance the Capture and Release of Circulating Tumor Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, *58*(8), 2236–2240. <https://doi.org/10.1002/anie.201809337>
- Suh, C. H., Kim, H. S., Jung, S. C., Choi, C. G., & Kim, S. J. (2019). Imaging prediction of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation in patients with glioma: A systemic review and meta-analysis. *European Radiology*, *29*(2), 745–758. <https://doi.org/10.1007/s00330-018-5608-7>
- Sullivan, J. P., Nahed, B. V., Madden, M. W., Oliveira, S. M., Springer, S., Bhere, D., Chi, A. S., Wakimoto, H., Rothenberg, S. M., Sequist, L. V., Kapur, R., Shah, K., Iafrate, A. J., Curry, W. T., Loeffler, J. S., Batchelor, T. T., Louis, D. N., Toner, M., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2014). Brain tumor cells in circulation are enriched for

mesenchymal gene expression. *Cancer Discovery*, 4(11), 1299–1309.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0471>

Sun, K., Jiang, P., Cheng, S. H., Cheng, T. H. T., Wong, J., Wong, V. W. S., Ng, S. S. M., Ma, B. B. Y., Leung, T. Y., Chan, S. L., Mok, T. S. K., Lai, P. B. S., Chan, H. L. Y., Sun, H., Chan, K. C. A., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2019). Orientation-aware plasma cell-free DNA fragmentation analysis in open chromatin regions informs tissue of origin. *Genome Research*, 29(3), 418–427. <https://doi.org/10.1101/gr.242719.118>

Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., & Nagy, B. (2020). Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186827>

Théry, C. (2011). Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*, 3, 15. <https://doi.org/10.3410/B3-15>

Tian, H., Wu, H., Wu, G., & Xu, G. (2020). Noninvasive Prediction of TERT Promoter Mutations in High-Grade Glioma by Radiomics Analysis Based on Multiparameter MRI. *BioMed Research International*, 2020, 3872314. <https://doi.org/10.1155/2020/3872314>

Tzaridis, T., Reiners, K. S., Weller, J., Bachurski, D., Schäfer, N., Schaub, C., Hallek, M., Scheffler, B., Glas, M., Herrlinger, U., Wild, S., Coch, C., & Hartmann, G. (2020). Analysis of Serum miRNA in Glioblastoma Patients: CD44-Based Enrichment of Extracellular Vesicles Enhances Specificity for the Prognostic Signature. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7211. <https://doi.org/10.3390/ijms21197211>

Umu, S. U., Langseth, H., Bucher-Johannessen, C., Fromm, B., Keller, A., Meese, E., Lauritzen, M., Leithaug, M., Lyle, R., & Rounge, T. B. (2018). A comprehensive

profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biology*, 15(2), 242–250.

<https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1403003>

van den Bent, M. J., Afra, D., de Witte, O., Ben Hassel, M., Schraub, S., Hoang-Xuan, K.,

Malmström, P.-O., Collette, L., Piérart, M., Mirimanoff, R., Karim, A. B. M. F., &

EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research

Council. (2005). Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-

grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: The EORTC 22845 randomised

trial. *Lancet (London, England)*, 366(9490), 985–990. <https://doi.org/10.1016/S0140->

[6736\(05\)67070-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67070-5)

van der Meulen, M., Ramos, R. C., Mason, W. P., Von Deimling, A., & Maas, S. L. N. (2022).

Opinion & Special Article: Glioma Classification. *Neurology*, 99(20), 903–908.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201262>

Wang, Q., Li, P., Li, A., Jiang, W., Wang, H., Wang, J., & Xie, K. (2012). Plasma specific

miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *Journal of*

Experimental & Clinical Cancer Research, 31(1), 97. <https://doi.org/10.1186/1756->

[9966-31-97](https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-97)

Wang, X., Cao, Q., Shi, Y., Wu, X., Mi, Y., Liu, K., Kan, Q., Fan, R., Liu, Z., & Zhang, M.

(2021). Identification of low-dose radiation-induced exosomal circ-METRN and miR-

4709-3p/GRB14/PDGFR α pathway as a key regulatory mechanism in Glioblastoma

progression and radioresistance: Functional validation and clinical theranostic

significance. *International Journal of Biological Sciences*, 17(4), 1061–1078.

<https://doi.org/10.7150/ijbs.57168>

Wang, Y., Springer, S., Zhang, M., McMahon, K. W., Kinde, I., Dobbyn, L., Ptak, J., Brem,

H., Chaichana, K., Gallia, G. L., Gokaslan, Z. L., Groves, M. L., Jallo, G. I., Lim, M.,

Olivi, A., Quinones-Hinojosa, A., Rigamonti, D., Riggins, G. J., Sciubba, D. M., ...

- Bettegowda, C. (2015). Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(31), 9704–9709.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1511694112>
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *The New England Journal of Medicine*, *359*(5), 492–507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>
- Westphal, M., & Lamszus, K. (2015). Circulating biomarkers for gliomas. *Nature Reviews. Neurology*, *11*(10), 556–566. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.171>
- Whitehead, C. A., Kaye, A. H., Drummond, K. J., Widodo, S. S., Mantamadiotis, T., Vella, L. J., & Stylli, S. S. (2019). Extracellular vesicles and their role in glioblastoma. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1–26.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1700208>
- Wu, L., Li, G., Feng, D., Qin, H., Gong, L., Zhang, J., & Zhang, Z. (2013). MicroRNA-21 expression is associated with overall survival in patients with glioma. *Diagnostic Pathology*, *8*(1), 200. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-200>
- Yao, W., Mei, C., Nan, X., & Hui, L. (2016). Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene*, *590*(1), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.033>
- Yuan, Z., Yang, Z., Li, W., Wu, A., Su, Z., & Jiang, B. (2020). Expression of Concern Issued: Exosome-Mediated Transfer of Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Temozolomide Resistance by miR-519a-3p/RRM1 Axis in Glioblastoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3499>
- Yue, X., Lan, F., Hu, M., Pan, Q., Wang, Q., & Wang, J. (2016). Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma.

Journal of Neurosurgery, 124(1), 122–128.

<https://doi.org/10.3171/2015.1.JNS141577>

Zeng, A., Wei, Z., Yan, W., Yin, J., Huang, X., Zhou, X., Li, R., Shen, F., Wu, W., Wang, X., & You, Y. (2018). Exosomal transfer of miR-151a enhances chemosensitivity to temozolomide in drug-resistant glioblastoma. *Cancer Letters*, 436, 10–21.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.004>

Zhang, C., Zhang, J., Hao, J., Shi, Z., Wang, Y., Han, L., Yu, S., You, Y., Jiang, T., Wang, J., Liu, M., Pu, P., & Kang, C. (2012). High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 119.

<https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-119>

Zhang, X., Liu, C., Pei, Y., Song, W., & Zhang, S. (2019). Preparation of a Novel Raman Probe and Its Application in the Detection of Circulating Tumor Cells and Exosomes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(32), 28671–28680.

<https://doi.org/10.1021/acsami.9b09465>

Zheng, S., Houseman, E. A., Morrison, Z., Wrensch, M. R., Patoka, J. S., Ramos, C., Haas-Kogan, D. A., McBride, S., Marsit, C. J., Christensen, B. C., Nelson, H. H., Stokoe, D., Wiemels, J. L., Chang, S. M., Prados, M. D., Tihan, T., Vandenberg, S. R., Kelsey, K. T., Berger, M. S., & Wiencke, J. K. (2011). DNA hypermethylation profiles associated with glioma subtypes and EZH2 and IGFBP2 mRNA expression. *Neuro-Oncology*, 13(3), 280–289. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq190>

Zhi, F., Shao, N., Wang, R., Deng, D., Xue, L., Wang, Q., Zhang, Y., Shi, Y., Xia, X., Wang, S., Lan, Q., & Yang, Y. (2015). Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. *Neuro-Oncology*, 17(3), 383–391.

<https://doi.org/10.1093/neuonc/nou169>

Δημοσίευση της διπλωματικής εργασίας σε διεθνές επιστημονικό περιοδικό

Title: Advances on Liquid Biopsy Analysis for Glioma Diagnosis

Authors: Panagiotis Skouras^{1,2}, Mariam Markouli³, Theodosis Kalamatianos², George Stranjalis², Penelope Korkolopoulou⁴ and Christina Piperi¹

Affiliations:

¹Department of Biological Chemistry, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

²1st Department of Neurosurgery, Evangelismos Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

³Department of Medicine, Boston Medical Center, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA

⁴Department of Pathology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 75 M. Asias Street, 11527 Athens, Greece

Journal: Biomedicines 2023, Volume 11, Issue 9, 2371