



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
National Hellenic Research Foundation

ΔΙΠΜΣ «ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ: ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΕΩΣ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Από το Μοριακό Αποτύπωμα έως τα Συνοδά
Διαγνωστικά με χρήση Τεχνολογιών Αιχμής
Υψηλής Απόδοσης»**

Ραγκούση Μαρία -Ιωάννα

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

Αθήνα 2021

**Postgraduate Program in Oncology: From Oncogenesis to
Therapy**

**Ragkousi Maria - Ioanna
Medical Laboratory Technologist**

**«From a molecular fingerprint toward
companion diagnostics using high throughput
technologies»**

ΡΑΓΚΟΥΣΗ ΜΑΡΙΑ ΙΩΑΝΝΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

**«Από το Μοριακό Αποτύπωμα έως τα Συνοδά Διαγνωστικά με χρήση
Τεχνολογιών Αιχμής Υψηλής Απόδοσης»**

Επιβλέπουσες

Μαρία Ζερβού, Κύρια Ερευνήτρια, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Θεοδώρα Κατσίλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαρία Ζερβού, Κύρια Ερευνήτρια, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Θεοδώρα Κατσίλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Αλέξανδρος Πίντζας, Διευθυντής Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Περίληψη

Η εφαρμογή της μεταβολομικής στις σύγχρονες κλινικές μελέτες αποτελεί ένα καινοτόμο εργαλείο για νέες διαγνωστικές και προγνωστικές προσεγγίσεις. Ειδικότερα, στην ογκολογία ακριβείας, καθίσταται καίριας σημασίας η βέλτιστη διαστρωμάτωση των ασθενών ως προς τη λήψη αποφάσεων και τη θεραπευτική προσέγγιση προς επιλογή. Υπό αυτό το πρίσμα, χαρτογραφείται το μοριακό αποτύπωμα του ασθενούς προς ταυτοποίηση υποψήφιων συνοδών βιοδεικτών με το όραμα οι τελευταίοι να αποτελέσουν συνοδά διαγνωστικά.

Η παρούσα εργασία εστιάζει στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και την υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας, δύο τεχνολογίες αιχμής υψηλής απόδοσης, ώστε να παρουσιαστούν οι τρέχουσες εξελίξεις, η πρόοδος, αλλά και οι προκλήσεις ως προς τον ρόλο των συνοδών διαγνωστικών στην κλινική πράξη. Αποδίδεται έμφαση, ως εκ τούτου και περιγράφονται χαρακτηριστικά παραδείγματα κλινικής εφαρμογής στην ογκολογία ακριβείας, ενώ γίνεται λόγος, ειδικότερα, για την πολιτική υγείας και τις απαιτήσεις των ρυθμιστικών οργανισμών. Συμπερασματικά, οι τεχνολογίες αιχμής που αναλύονται στην παρούσα διπλωματική εμφανίζουν σημαντική προοπτική εξέλιξης στον τομέα της μεταβολομικής, ιδιαίτερα όσον αφορά τον καρκίνο, αφού οι τρέχουσες κλινικές μελέτες παρουσιάζονται ιδιαίτερα ενθαρρυντικές.

Λέξεις-Κλειδιά

Μεταβολομική, Μεταβολίτες, Μοριακό Αποτύπωμα, Συνοδά διαγνωστικά, Βιοδείκτες, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρία μάζας, Καρκίνος, Πολιτική υγείας

ABSTRACT

Metabolomics may serve as an innovative tool in clinical trials empowering new diagnostic and prognostic approaches. In the era of precision oncology, patient stratification optimization as well as decision making becomes crucial. For this, dissecting the molecular fingerprint of each patient drives companion biomarkers identification and validation toward companion diagnostics. Herein, nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry, two state-of-the-art high-throughput technologies are explored as well as current developments and challenges in the context of companion diagnostics in clinical practice. Emphasis is put on clinical practice cases in precision oncology, while health policy and regulatory agencies' demands are discussed. In conclusion, the cutting-edge technologies explored present great prospects for development in the field of metabolomics, especially in cancer, as current clinical studies are rather encouraging.

Key-words

Metabolomics, Metabolites, Molecular fingerprint, Companion diagnostics, Biomarkers, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Cancer, Health policy

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<u>Συντομογραφίες</u>	07
<u>Πίνακας Σχημάτων</u>	09
1. Μοριακό Αποτύπωμα	11
2. Ογκολογία Ακριβείας	11
3. Συνοδά Διαγνωστικά	12
3.1 Παράλληλη ανάπτυξη φαρμάκου-διαγνωστικού.....	13
4. Βιοδείκτες	15
4.1 Καρκινικοί βιοδείκτες	16
4.2 Εύρεση Καρκινικών Βιοδεικτών	17
5. Μεταβολομική	20
5.1 Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός καρκινικών κυττάρων	21
5.2 Σχεδιάγραμμα μεταβολομικής μελέτης	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

6. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	25
6.1 Βασικές Αρχές NMR	25
6.2 Φασματογράφος NMR	25
6.3 Βάσεις δεδομένων NMR για ανίχνευση μεταβολιτών	27
6.4 Βήματα ανάλυσης	28
6.4.1 Προετοιμασία Δειγμάτων	28
6.4.2 Συλλογή Δεδομένων	29
6.4.3 Ανάλυση δεδομένων.....	30
7. Εφαρμογές NMR στην έρευνα για τον Καρκίνο	31
7.1 Διάγνωση-Πρόγνωση-Πρόβλεψη Καρκίνου.....	31
7.2 Αξιολόγηση τοξικότητας	36
7.3 Αξιολόγηση ανταπόκρισης στη θεραπεία.....	37
8. Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry)	38
8.1 Αρχή Μεθόδου	38

8.2	Πειραματική Διάταξη Φασματομέτρου Μάζας	39
8.3	Μέθοδος σύζευξης Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)	40
8.3.1	Βήματα Μεθόδου	41
9.	Εφαρμογές LC-MS στην έρευνα για τον καρκίνο	43
9.1	Διάγνωση-Πρόγνωση-Πρόβλεψη Καρκίνου	43
9.2	Αξιολόγηση ανταπόκρισης στη θεραπεία	45
9.3	Αξιολόγηση τοξικότητας	45
10.	Σύγκριση μεθόδων NMR – MS	47
11.	Συμπληρωματικότητα μεθόδων NMR-MS	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 –ΠΟΛΙΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑΣ

12.	Επικύρωση Βιοδεικτών	50
12.1	Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων	50
12.2	Κλινική Επικύρωση	52
12.3	Κλινική Εφαρμογή	53
13.	Οικονομικά θέματα υγείας.....	54

ΕΠΙΛΟΓΟΣ	56
-----------------------	-----------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57
---------------------------	-----------

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FDA: Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
IVD : *in vitro* διαγνωστικό
CDx: Συνοδό διαγνωστικό
IHC: Ανοσοϊστοχημεία
CISH: Χρωμογόνος *in situ* υβριδισμός
FISH: Φθορίζων *in situ* υβριδισμός
PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης
NGS: Αλληλούχηση Νέας Γενιάς
NSCLC: Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
ALK: κινάση αναπλαστικού λεμφώματος
PD-L1: Υποδοχέας προγραμματισμένου θανάτου 1
AFP: α-φετοπρωτεΐνη
PSA: Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο
CTCs: Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
mCRPC: Μεταστατικός ευνουχο-άντοχος καρκίνος του προστάτη
NMR: Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
MS: Φασματομετρία Μάζας
LC-MS : Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας
CS: Χημική μετατόπιση
FID: Επαγόμενη Ελεύθερη Απόσβεση
HMDB: Βάση μεταβολομικών δεδομένων ανθρώπου
SNR: λόγος σήματος προς θόρυβο
PCA: ανάλυση κύριων συνιστωσών
PLS-DA: διαχωριστική ανάλυση μερικών ελάχιστων τετραγώνων
HCC: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
RCC: Καρκίνος του νεφρού
MM: Πολλαπλό μύελωμα
SD: Τυπική απόκλιση
fDUrd: 5-φθορο-δεοξυριδίνη

CML: Χρόνια μυελογενής λευχαιμία

ESI: Ηλεκτροψεκασμός

CE: Conformité Européenne, ευρωπαϊκή συμμόρφωση

CLIA: Τροποποιήσεις βελτίωσης κλινικών εργαστηρίων

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1 - Εξατομικευμένη Ιατρική, παρόν και μέλλον	12
ΣΧΗΜΑ 2 - Πρότυπο παράλληλης ανάπτυξης φαρμάκου-διαγνωστικού.....	15
ΣΧΗΜΑ 3 - Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας εύρεσης καρκινικού βιοδείκτη.....	19
ΣΧΗΜΑ 4 - Η σχέση μεταξύ του κεντρικού δόγματος της μοριακής βιολογίας και των ομικών τεχνολογιών	20
ΣΧΗΜΑ 5- Σχεδιάγραμμα αναπαράστασης των βημάτων μιας μεταβολομικής μελέτης. Περιλαμβάνονται τα διαφορετικά στάδια από τη συλλογή του δείγματος και την προετοιμασία (i) ως την επικύρωση των μεταβολομικών βιοδεικτών (v) μέσω της καταγραφής και αναγνώρισής τους (ii) και της ανάλυσης δεδομένων (iii-iv) [τροποποιημένη εικόνα].....	23
Σχήμα 6 - Σχηματική παρουσίαση ενός τυπικού φασματογράφου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	26
ΣΧΗΜΑ 7 - Σύνθεση οργάνου NMR	27
ΣΧΗΜΑ 8- Σχηματική απεικόνιση βασικής ροής εργασίας μεταβολομικής ανάλυσης με NMR.....	28
ΣΧΗΜΑ 9- Οργανολογία φασματογράφου μάζας	39
ΣΧΗΜΑ 10 – Σχεδιάγραμμα οργανολογίας LC-MS	40
ΣΧΗΜΑ 11- Παράδειγμα χρωματογραφήματος δείγματος ορού από υγιή μάρτυρα (HC: μαύρο) και ασθενή με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) (CRC: κόκκινο).....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

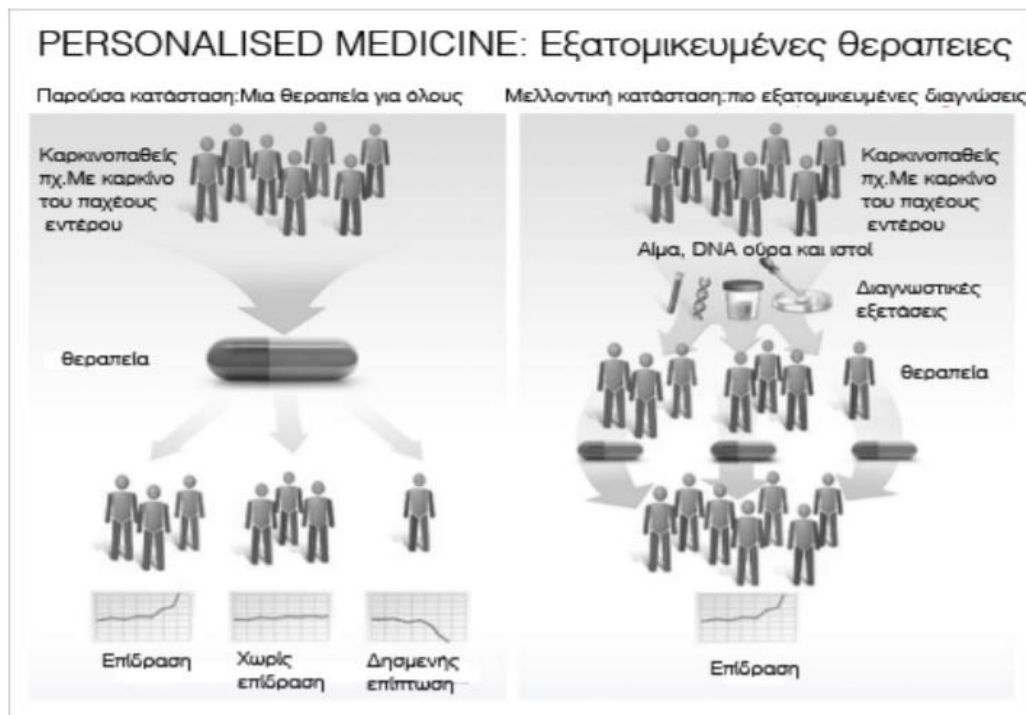
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μοριακό Αποτύπωμα

Οι καρκινικοί βιοδείκτες είναι βιομόρια που παράγονται είτε από καρκινικά κύτταρα είτε από άλλα κύτταρα του σώματος ως απόκριση στον όγκο. Κάθε τύπος κυττάρου έχει τη μοναδική μοριακή του υπογραφή και αναγνωρίσιμα χαρακτηριστικά, όπως επίπεδα ή δραστηριότητες μυριάδων γονιδίων, πρωτεϊνών ή άλλων μοριακών χαρακτηριστικών.¹ Αν μπορούσαν να προσδιοριστούν όλα τα μοριακά χαρακτηριστικά στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και η συσχέτιση καθενός από αυτά με τον φαινότυπο θα μπορούσε να χαρτογραφηθεί η μοριακή ετερογένεια του όγκου, αλλά και του ασθενή, συνολικά, ως σύστημα μελέτης.

2. Ογκολογία Ακριβείας

Τα τελευταία είκοσι χρόνια ο κλάδος της ογκολογίας έχει υποστεί μια σημαντική αλλαγή. Έχει ξεπεραστεί το δόγμα της μιας θεραπείας για όλους, της “one size fits all” προσέγγισης και ακολουθείται η λογική της ογκολογίας ακριβείας “precision oncology”, αφού έχει αποδειχθεί ότι κάθε μορφή καρκίνου δε χαρακτηρίζεται πάντοτε από την ίδια γενετική ταυτότητα (ή εν γένει, μοριακή υπογραφή) και συνεπώς, οι όγκοι ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου ή οργάνου δεν είναι ταυτόσημοι, με αποτέλεσμα ο κάθε ασθενής να παρουσιάζει το δικό του μοριακό αποτύπωμα. Η λογική της εξατομίκευσης έχει ως στόχο να αποδώσει καίριες λύσεις στην προηγούμενη προσέγγιση, που συχνά οδηγούσε σε ανεπαρκή ή υπερ-θεραπεία των ασθενών και σε συνακόλουθο κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών. Στόχος της ογκολογίας ακριβείας, σήμερα, είναι να προσαρμόζονται οι θεραπείες σε υπο-ομάδες ασθενών, που μοιράζονται παρόμοια μοριακά χαρακτηριστικά. Οι ερευνητές και οι επαγγελματίες υγείας, αλλά και οι εμπλεκόμενοι επιστήμονες στη χάραξη της πολιτικής υγειονομικής περίθαλψης αφιερώνονται στην ανάπτυξη καινοτόμων και συνάμα βιώσιμων θεραπευτικών προσεγγίσεων σε κάθε ασθενή ξεχωριστά. Το μοντέλο της εξατομικευμένης ιατρικής και ακόλουθα, της ογκολογίας ακριβείας, αφορά τη διαχείριση της κατάλληλης δόσης, του κατάλληλου φαρμάκου στον κατάλληλο ασθενή. Έτσι, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι συνοδοί βιοδείκτες και ως εκ τούτου, τα συνοδά διαγνωστικά.²



Σχήμα 1 : Εξατομικευμένη ιατρική, παρόν και μέλλον³

3. Συνοδά Διαγνωστικά

Σύμφωνα με την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), ως συνοδό διαγνωστικό ορίζεται μια *in vitro* διαγνωστική (IVD) δοκιμασία ή μια ιατρική συσκευή, η οποία παρέχει πληροφορίες απαραίτητες για την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση ενός θεραπευτικού φαρμάκου ή μιας βιολογικής θεραπευτικής ουσίας.^{2,4}

Τα συνοδά διαγνωστικά έχουν σκοπό την επιλογή του πληθυσμού των ασθενών, στους οποίους το υπό μελέτη φάρμακο αναμένεται να είναι πιο αποτελεσματικό ή τον αποκλεισμό του πληθυσμού των ασθενών, που έχουν τις λιγότερες δυνατές ή ελάχιστες θεραπευτικές δράσεις. Ακόμα, μπορεί να συμβάλλουν στον αποκλεισμό του πληθυσμού των ασθενών, που μπορεί να έχουν σοβαρές παρενέργειες στο φάρμακο και την επιλογή της βέλτιστης δόσης για κάθε ασθενή ή υπο-πληθυσμό ασθενών για την επίτευξη της βέλτιστης κλινικής έκβασης. Επομένως, η ανάπτυξη συνοδών βιοδεικτών και συνοδών διαγνωστικών στην ογκολογία ακριβείας είναι πολύ σημαντική.^{3, 4, 5}

Το πρώτο συνοδό διαγνωστικό που έλαβε έγκριση από τον FDA ήταν το Herceptest[®], το 1998. Το Herceptest[®] λειτουργεί ως επικουρικό μέσο για την αξιολόγηση ασθενών με καρκίνο του μαστού, για τους οποίους εξετάζεται το ενδεχόμενο υποβολής τους σε θεραπεία με Herceptin[™] (trastuzumab), καθορίζοντας την υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 σε καρκινικό ιστό μαστού με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.⁵ Το τελευταίο συνοδό διαγνωστικό, που προστέθηκε στη λίστα των εγκεκριμένων από τον FDA, είναι το FoundationOne Liquid CDx (Νοέμβριος 2020), το οποίο ανιχνεύει μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίζονται στις περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των γονιδίων BRCA1, BRCA2 και ATM σε ασθενείς με μεταστατικό ευνοχο-άντοχο καρκίνο του προστάτη (mCRPC), με τη μέθοδο της αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS-Next Generation Sequencing). Οι ασθενείς αυτοί ευνοούνται από τη θεραπεία με Olaparib (Lynparza).⁶ Ένα ακόμη παράδειγμα που αξίζει να αναφερθεί είναι η βεμουραφενίμπη (Vemurafenib), η οποία έλαβε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία ανεγχείρητου ή μελανώματος σταδίου VI, θετικού στη μετάλλαξη BRAFV600E, τον Αύγουστο του 2011. Η έγκριση του Vemurafenib κατέστησε υποχρεωτικό τον έλεγχο για τη μετάλλαξη BRAFV600E ώστε να επιλεγθούν οι ασθενείς που θα επωφεληθούν από αυτή τη θεραπεία. Το συνοδό διαγνωστικό Cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche Molecular Diagnostics) αναπτύχθηκε ταυτόχρονα με την ανακάλυψη του Vemurafenib. Η βεμουραφενίμπη χορηγείται σε ασθενείς οι οποίοι έχουν όγκο θετικό στη μετάλλαξη BRAF V600, κάτι που επιβεβαιώνεται από την επικυρωμένη δοκιμασία Cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test.⁷

3.1 Παράλληλη ανάπτυξη φαρμάκου-διαγνωστικού

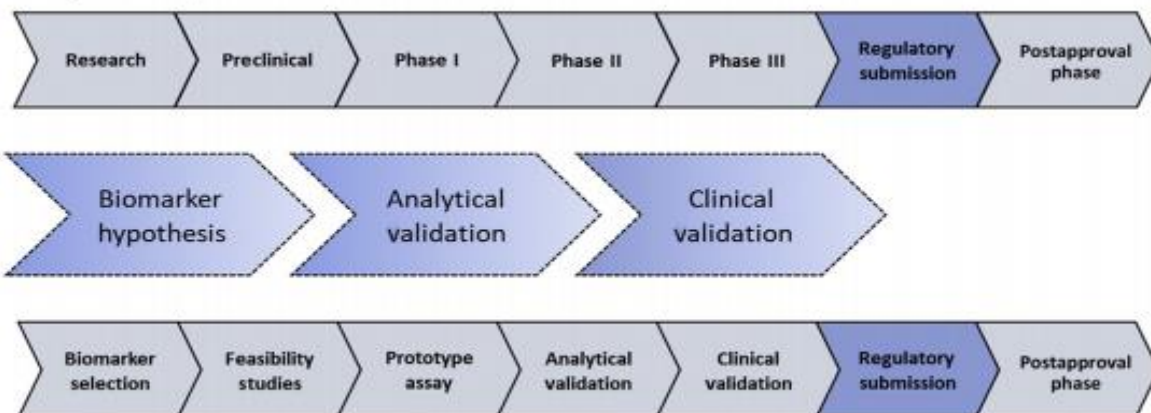
Η ανάπτυξη ενός συνοδού διαγνωστικού, συνήθως, ακολουθεί το πρότυπο της παράλληλης ανάπτυξης φαρμάκου και διαγνωστικού (Σχήμα 2). Η επιτυχία αυτού του προτύπου εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της επιλογής του κατάλληλου βιοδείκτη-στόχου κατά τη διάρκεια της πρώιμης έρευνας και της προκλινικής φάσης. Η επιλογή του βιοδείκτη στηρίζεται στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού, τόσο της ασθένειας, όσο και του μηχανισμού δράσης του προς ανάπτυξη φαρμάκου. Στη συνέχεια, ακολουθεί η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης του βιοδείκτη-στόχου, κάτι που εξαρτάται από τη φύση του τελευταίου. Οι μέθοδοι των συνοδών διαγνωστικών, που έχουν λάβει έγκριση από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) έως σήμερα είναι η ανοσοϊστοχημεία (IHC), ο *in situ* Υβριδισμός, ο

Χρωμογόνος *in situ* υβριδισμός (CISH), ο Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS). Μετά την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου, πραγματοποιείται μελέτη σκοπιμότητας για την επικύρωσή της. Επίσης, εκτιμάται αν επηρεάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου από προαναλυτικές διεργασίες που μπορεί να υποστεί το προς ανάλυση δείγμα. Η επιλεγμένη μέθοδος, στη συνέχεια, διερευνάται στις φάσεις I και II των κλινικών δοκιμών.⁸ Μόλις επικυρωθεί η αναλυτική μέθοδος, ξεκινά η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου, το οποίο θα πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο εκτέλεσης της εξέτασης, την προετοιμασία των δειγμάτων των ασθενών, τη ρύθμιση των παραμέτρων της εξέτασης και τέλος, την ερμηνεία και την τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.^{8,9}

Κατά τη διάρκεια της φάσης III των κλινικών δοκιμών, διασφαλίζεται, τόσο η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, όσο και η κλινική επικύρωση της μεθόδου του συνοδού διαγνωστικού. Σε αυτό το στάδιο, θα πρέπει να αποδειχθεί ότι το συνοδό διαγνωστικό δίνει την ικανότητα της πρόβλεψης του αποτελέσματος της θεραπείας σε κάθε ασθενή, καθώς ένα πρωτόκολλο συνοδού διαγνωστικού είναι χρήσιμο, μόνο, όταν παρέχει πληροφορίες που μπορούν να «εξατομικεύσουν» έναν ασθενή.⁹

Ένα παράδειγμα που αξίζει να αναφερθεί για την αποτελεσματικότητα της χρήσης ενός συνοδού διαγνωστικού κατά την ανάπτυξη ενός φαρμάκου είναι η ανάλυση που έγινε για την εκτίμηση του κινδύνου αποτυχίας της κλινικής δοκιμής φαρμάκου για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).την περίοδο μεταξύ 1998 και 2012. Το υλικό δεδομένων για την έρευνα ανακτήθηκε από διαφορετικές διαθέσιμες δημόσιες πηγές και αφορούσε 676 κλινικές δοκιμές με 199 φαρμακευτικές ενώσεις, οι οποίες πληρούσαν τα κριτήρια της ανάλυσης. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η επιτυχία της κλινικής φάσης III ήταν το μεγαλύτερο εμπόδιο για την έγκριση των φαρμάκων, με συνολικό ποσοστό επιτυχίας μόλις 11%. Από την άλλη, το ποσοστό επιτυχίας των στοχευμένων θεραπειών καθοδηγούμενες από την ύπαρξη βιοδεικτών εκτινάσσεται σε 62% ενώ αξιοσημείωτο επίσης είναι το ποσοστό επιτυχίας των στοχευμένων αναστολέων θεραπευτικών στόχων που εμπλέκονται στην εξέλιξη της νόσου (31%). Δύο παραδείγματα βιοδεικτών για τους οποίους υπάρχουν επικυρωμένα συνοδά διαγνωστικά που αφορούν τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα είναι η κινάση αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) και ο υποδοχέας προγραμματισμένου θανάτου 1 (PD-L1).^{10,11}

Drug development



Diagnostic development

Σχήμα 2 : Πρότυπο παράλληλης ανάπτυξης φαρμάκου-διαγνωστικού⁹

4. Βιοδείκτες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι πολύ σημαντικό να επιλεγεί ο κατάλληλος βιοδείκτης-στόχος, ώστε να μπορέσει να ξεκινήσει η διαδικασία της ανάπτυξης του συνοδού διαγνωστικού. Με την μέτρηση των βιοδεικτών μπορεί να αξιολογηθεί μια κατάσταση ως φυσιολογική ή παθολογική. Ακόμα, ο προσδιορισμός βιοδεικτών μπορεί να αποτελέσει δείκτη ανταπόκρισης σε κάποια θεραπευτική παρέμβαση. Ένας βιοδείκτης, επομένως μπορεί να χρησιμοποιείται για πρόωμη ανίχνευση (screening) ή ως διαγνωστικός, προγνωστικός, προβλεπτικός ή για την παρακολούθηση του ασθενούς.¹²

Για να χαρακτηριστεί μια ουσία ως βιοδείκτης θα πρέπει να πληροί ορισμένα πολύ συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Ένας βιοδείκτης θα πρέπει να έχει υψηλή κλινική ευαισθησία και ειδικότητα, υψηλή θετική και αρνητική προγνωστική αξία και να προσδιορίζεται με εύκολο, ασφαλές και οικονομικά βιώσιμο τρόπο.^{12,13}

4.1 Καρκινικοί Βιοδείκτες

Ο καρκίνος αφορά ένα πολυπαραγοντικό σύμπλεγμα ασθενειών, το οποίο περιλαμβάνει θεμελιώδεις ανωμαλίες και ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό κυττάρων, αλλάζοντας τη φυσιολογική κυτταρική συμπεριφορά.¹³

Οι όγκοι προκύπτουν από τη συσσώρευση γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των πρωτεϊνών, οι οποίες εκφράζονται στα προσβεβλημένα κύτταρα. Τα επίπεδα συγκεκριμένων πρωτεϊνών μπορούν να παρουσιάζονται αυξημένα ή μειωμένα. Ακόμα, οι όγκοι μπορεί να προκύψουν και ύστερα από αλλαγή της λειτουργίας και της κατανομής των πρωτεϊνών, λόγω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Αυτές οι μεταβολές μπορεί να επηρεάσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη φυσιολογία και την ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και τον κυτταρικό θάνατο. Στην έρευνα για τον καρκίνο, οι μοριακοί βιοδείκτες αναφέρονται σε ουσίες που είναι ενδεικτικές της παρουσίας του καρκίνου στον οργανισμό. Στους καρκινικούς βιοδείκτες συμπεριλαμβάνονται γονίδια, γονιδιακές παραλλαγές, διαφορές στην έκφραση μορίων RNA ή/και πρωτεϊνών, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, αλλά και πλήθος μεταβολιτών.^{14, 15}

Η κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης θα μπορούσε να εξηγήσει την παραγωγή και την απελευθέρωση καρκινικών βιοδεικτών στο αίμα, τα κύτταρα ή τα διάφορα σωματικά υγρά και ως εκ τούτου, την αύξηση των επιπέδων αυτών των μορίων κατά την έναρξη, ανάπτυξη και εξέλιξη ή μετάσταση του καρκίνου. Αυτή η αύξηση των επιπέδων των καρκινικών βιοδεικτών στα βιολογικά υγρά μπορεί να δημιουργηθεί με τρεις μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την υπερέκφραση ή ενίσχυση του γονιδιακού προϊόντος ή την ενίσχυση των επιγενετικών αλλαγών. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί η υπερέκφραση της πρωτεΐνης HE₄ στον καρκίνο των ωοθηκών, η οποία μπορεί να εντοπιστεί σε ορό ασθενών. Ο δεύτερος μηχανισμός, που οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων των καρκινικών βιοδεικτών, σχετίζεται με την έκκριση πρωτεϊνών ή την αποβολή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ένα παράδειγμα αυτού του μηχανισμού αποτελεί η αύξηση της α-φετοπρωτεΐνης (AFP) σε ασθενείς που πάσχουν από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Ο τρίτος μηχανισμός είναι η εισβολή των κυττάρων του όγκου και η αγγειογένεση, όπως συμβαίνει με το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA).¹⁵

Οι καρκινικοί βιοδείκτες μπορούν να ανιχνευθούν σε καρκινικά κύτταρα ή ιστούς προέλευσης συμπαγών όγκων, στο μυελό των οστών και τους λεμφαδένες ή ως κυκλοφορούντα κύτταρα (CTCs). Επίσης, εντοπίζονται σε μη επεμβατικά δείγματα, όπως βιολογικά σωματικά υγρά (ούρα, ορός, ασκητικό υγρό, κ.α.). Ο ιδανικός καρκινικός βιοδείκτης θα πρέπει να πληροί, εκτός από τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω, επιπλέον ιστική ειδικότητα, συσχέτιση με τη σταδιοποίηση της νόσου και την πρόγνωση, σύντομη ημιπερίοδο ζωής, ώστε να αντανακλά γρήγορα τυχόν πρώιμες αλλαγές στο φορτίο του όγκου για τη σωστή παρακολούθησή του και την ανίχνευση πιθανής υποτροπής. Τέλος, θα πρέπει να παρέχει σημαντική διάκριση της μετάστασης από την πρωτοπαθή εστία.¹⁵

4.2 Εύρεση Καρκινικών Βιοδεικτών

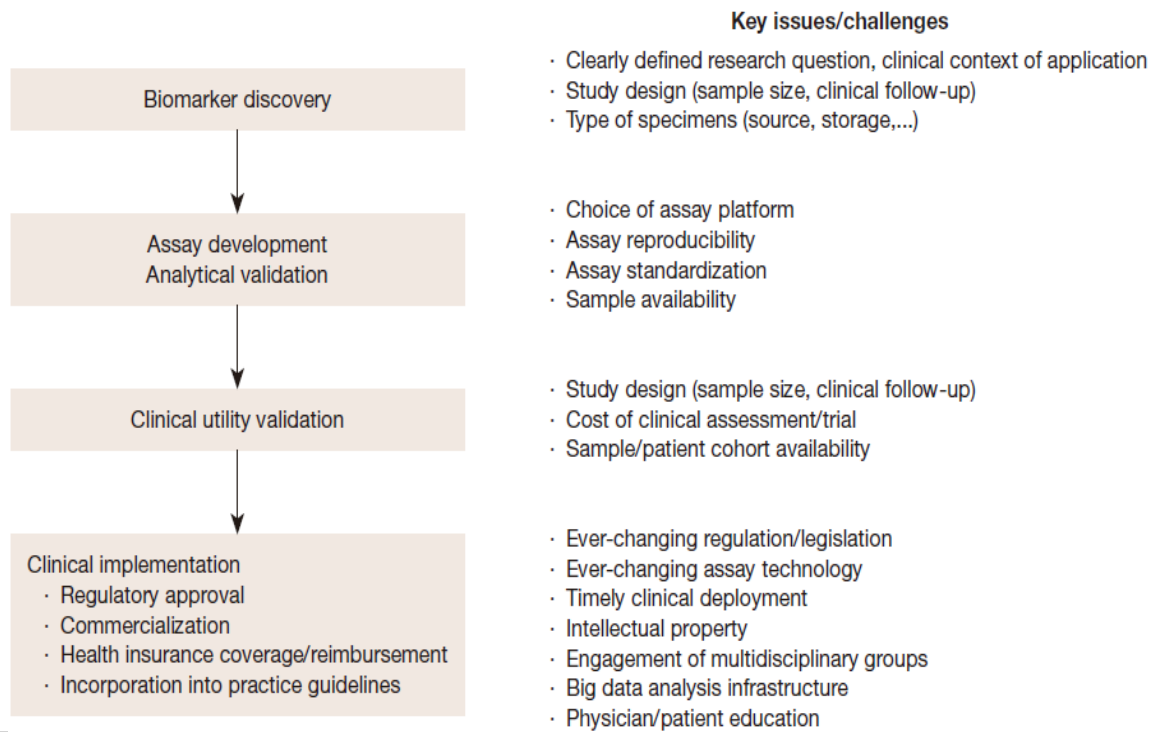
Ένας υποψήφιος βιοδείκτης μπορεί να αναγνωρισθεί μέσω πολλαπλών προσεγγίσεων, με τον πιο κλασσικό να αποτελεί η αναγνώριση υποψήφιου βιοδείκτη ύστερα από λεπτομερή μελέτη της βιολογίας του όγκου και του περιβάλλοντα χώρου του. Με την έκρηξη νέων γνώσεων σχετικά με τους όγκους και την έλευση της νέας τεχνολογίας, η ταυτοποίηση των βιοδεικτών εκτελείται, συχνά, χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση «ανακάλυψης», με χρήση τεχνολογιών αιχμής. Ωστόσο, λόγω της τεράστιας ποσότητας δεδομένων που παράγεται με τη χρήση των τεχνολογιών αυτών, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο σχεδιασμό της μελέτης και στην ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Βασικές πτυχές της ανάπτυξης βιοδεικτών, που θα συζητηθούν λεπτομερώς, περιλαμβάνουν τον προσεκτικό σχεδιασμό της μελέτης, εκτενείς δοκιμές και επικύρωση, καθώς και ακριβή αναφορά των αποτελεσμάτων.¹³

Για να εφαρμοστεί ένας βιοδείκτης στη κλινική πράξη, υπάρχουν ορισμένα «εμπόδια» που θα πρέπει να ξεπεραστούν. Αρχικά, πραγματοποιείται μελέτη σειράς δειγμάτων, ώστε να δοκιμαστεί ένας συγκεκριμένος δυνητικά νέος βιοδείκτης. Η επακόλουθη δοκιμή περιλαμβάνει, στη συνέχεια, την ανάλυση μιας ανεξάρτητης κοόρτης δειγμάτων για την επικύρωση της αρχικής υπόθεσης, δημιουργώντας ευρήματα και πρόσθετη αξιολόγηση, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι ο νέος βιοδείκτης θα παρέχει πρόσθετες πληροφορίες χρήσιμες για τη λήψη κλινικών αποφάσεων.¹³

Μετά τη φάση της ανακάλυψης, η οποία συνήθως περιλαμβάνει εσωτερική διαδικασία επικύρωσης, οι υποψήφιοι βιοδείκτες προσαρμόζονται σε κλινικά εφαρμόσιμες πλατφόρμες ανάλυσης και υπόκεινται σε δύο τύπους επικύρωσης: την αναλυτική επικύρωση και τη κλινική επικύρωση.¹⁵ Η αναλυτική εγκυρότητα περιγράφει την αξιολόγηση τεχνικών πτυχών της ίδιας της ανάλυσης του βιοδείκτη, η οποία πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η ευαισθησία, η ειδικότητα και η ευρωστία της ανάλυσης. Επιπλέον, το αποτέλεσμα πρέπει να είναι ακριβές και αναπαραγωγίμο, τόσο εντός μεμονωμένου εργαστηρίου, όσο και μεταξύ εργαστηρίων.

Μόλις αναπτυχθεί μια τεχνικά έγκυρη ανάλυση, ο βιοδείκτης πρέπει να μελετηθεί για να προσδιοριστεί εάν έχει κλινική ή «βιολογική» εγκυρότητα. Πρέπει, συνεπώς, να αξιολογηθεί για να επιβεβαιωθεί η απόδοσή του στην πρόβλεψη ή τη διάγνωση του κλινικού φαινοτύπου ή της έκβασης του ασθενούς. Η κλινική εγκυρότητα σχετίζεται με την παρατήρηση ότι ο βιοδείκτης διαιρεί αξιόπιστα τον συνολικό πληθυσμό ενδιαφέροντος σε δύο ξεχωριστές ομάδες, όπως αυτές που είναι περισσότερο ή λιγότερο πιθανό να υποστούν ένα συμβάν.

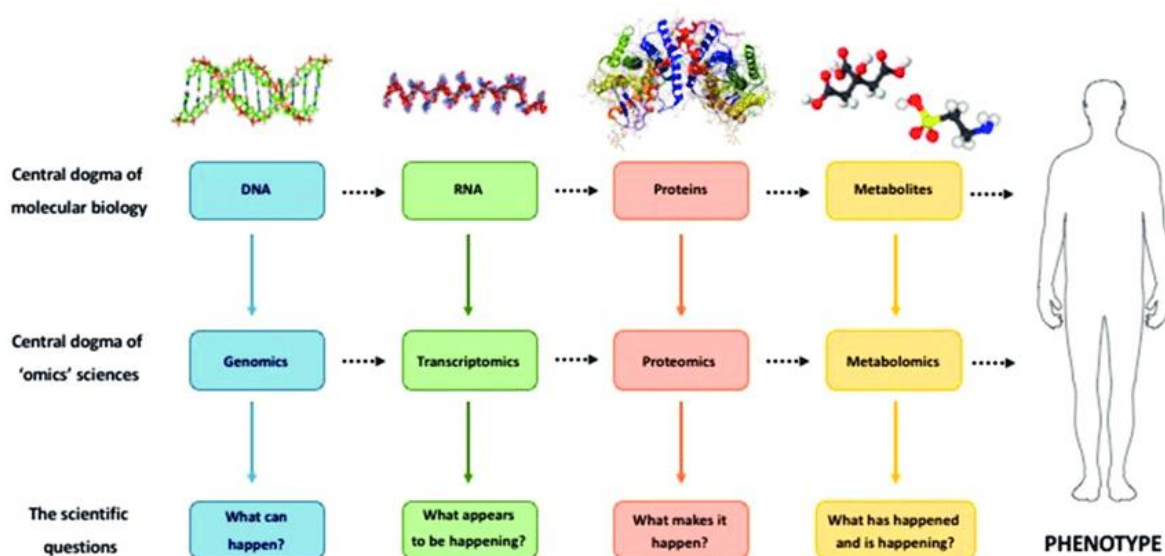
Ύστερα από την αναλυτική και κλινική επικύρωση του, ο νέος βιοδείκτης είναι πλέον έτοιμος να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη. Αυτή η φάση περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα βασικά στοιχεία, τα οποία ποικίλλουν ευρέως: κανονιστική έγκριση, εμπορευματοποίηση, κάλυψη από εταιρείες ασφάλισης υγείας και ενσωμάτωση στις οδηγίες κλινικής πρακτικής.^{13,16}



Σχήμα 3 : Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας εύρεσης καρκινικού βιοδείκτη¹⁶

5. Μεταβολομική (Metabolomics)

Τις τελευταίες δεκαετίες, η βιοϊατρική έρευνα για τον καρκίνο έχει υποστεί τεράστιες αλλαγές. Η μελέτη μεμονωμένων γονιδίων, μεταγράφων, πρωτεϊνών ή μεταβολιτών κυριαρχείται από τις -ομικές προσεγγίσεις (γονιδιωματική, μεταγραφωματική, πρωτεωμική και μεταβολομική) για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης. Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, το DNA (γονιδίωμα) μεταγράφεται σε mRNA (μεταγράφομα), το οποίο, με τη σειρά του, μεταφράζεται σε πρωτεΐνες. Κάθε βιοχημική διεργασία οδηγεί στο σχηματισμό μεταβολιτών. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4, το μεταβόλωμα είναι το τελικό προϊόν του γονιδιώματος και αντικατοπτρίζει όλες τις πληροφορίες που εκφράζονται και διαμορφώνονται, σε συνέργεια με όλα τα άλλα μοριακά σύνολα.¹⁷



Σχήμα 4 Η σχέση μεταξύ του κεντρικού δόγματος της μοριακής βιολογίας και των τεχνολογιών “omics”¹⁷

Από τα τέλη του περασμένου αιώνα, η μεταβολομική έρευνα εντάθηκε δραματικά, γεγονός που οφείλεται στη βελτίωση των αναλυτικών τεχνικών και των μεθόδων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition). Η μεταβολομική παρέχει μια επιπρόσθετη οδό στην έρευνα του καρκίνου.¹⁸

Το μεταβόλωμα περιλαμβάνει το σύνολο των μεταβολιτών/μικρών μορίων (<1,5 kDa), όπως πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια, σάκχαρα, οργανικά οξέα, κετόνες, αλδεΐδες, αμίνες, αμινοξέα, λιπίδια, στεροειδή και αλκαλοειδή, καθώς και μεταβολίτες φαρμάκων και ξενοβιοτικών. Τα δείγματα υπό μελέτη μπορεί να είναι ποικίλα, όπως αίμα, σίελος, ούρα και ιστοί και μπορούν να ληφθούν με διάφορους τρόπους.^{17,18,19} Οι μεταβολικές οδοί ενός κυττάρου αποτελούνται από ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Οι κυτταρικές λειτουργίες εκτελούνται από οργανωμένα και ιεραρχικά

επίπεδα πληροφοριών, οι οποίες ελέγχονται από περίπλοκες ρυθμιστικές δομές, κυρίως πρωτεΐνες και μόρια σηματοδότησης. Το πολύπλοκο αυτό δίκτυο παρέχει δυναμικότητα και ευρωστία στο κύτταρο, συσχετίζοντας το γονότυπο με τον φαινότυπο. Αυτές οι ιδιότητες ρυθμίζονται σε διάφορα σημεία ελέγχου στα φυσιολογικά κύτταρα. Διαταραχές στα βιολογικά μονοπάτια μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών, γεγονός που καθιστά τους μεταβολίτες των μικρών μορίων πολύ ελκυστικούς πιθανούς βιοδείκτες. Όπως αναφέρθηκε, προηγουμένως, τα δείγματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι κυρίως ευκόλως λαμβανόμενα βιολογικά υγρά και ο στόχος είναι οι πιθανοί μεταβολίτες-βιοδείκτες να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα σάρωσης μεγάλης κλίμακας.^{19,20,21}

5.1 Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός καρκινικών κυττάρων

Παρά τους πολύπλοκους, πολυγονικούς και περιβαλλοντικούς καθοριστικούς παράγοντες διαφορετικών τύπων καρκίνου, υπάρχουν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των όγκων, που συναντώνται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα του όγκου υφίστανται κάποιας μορφής μεταβολικού επαναπρογραμματισμού, ώστε να μπορέσουν να διατηρήσουν τους μηχανισμούς του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους.²¹ Αυτό το χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα δέκα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου από τους Δρ. Hanahan και Weinberg (2011).²² Μερικές από τις πιο εντυπωσιακές αλλαγές της κυτταρικής βιοενέργειας του όγκου περιλαμβάνουν την αύξηση της γλυκόλυσης, την αύξηση της γλουταμινολυτικής ροής, την αύξηση του μεταβολισμού των αμινοξέων και των λιπιδίων, την ενίσχυση της μιτοχονδριακής βιογένεσης, την επαγωγή της οδού της φωσφορικής πεντόζης και τη βιοσύνθεση μακρομορίων.^{23,24}

Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός του καρκίνου προάγει την ογκογένεση, διευκολύνοντας τον γρήγορο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την εισβολή και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ακόμα, ενισχύει την αντίσταση στις θεραπείες και άλλες κεντρικές κυτταρικές διεργασίες της ογκογένεσης. Από την άλλη πλευρά, καθώς προωθείται η ογκογένεση, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν κι άλλες μεταλλάξεις και τροποποιήσεις, που ενισχύουν περαιτέρω τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό και με τη σειρά τους, επιταχύνουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του όγκου. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια

ρυθμίζουν κατασταλτικά τις μεταβολικές αυτές αλλαγές του καρκίνου, εμποδίζοντας τη λειτουργία, την ενεργοποίηση και την έκφραση των βασικών καρκινικών μεταβολικών γονιδίων. Η ισορροπία μεταξύ ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων έχει καθοριστική επίδραση στην κατάσταση του καρκινικού μεταβολισμού.²⁴

Οποιοδήποτε από τα μεταβολικά υποστρώματα και τα προϊόντα αυτού του τεράστιου συνόλου αντιδράσεων θα μπορούσε να λειτουργήσει ως βιοδείκτης για τη διάγνωση, τη πρόγνωση ή την παρακολούθηση του καρκίνου.²²

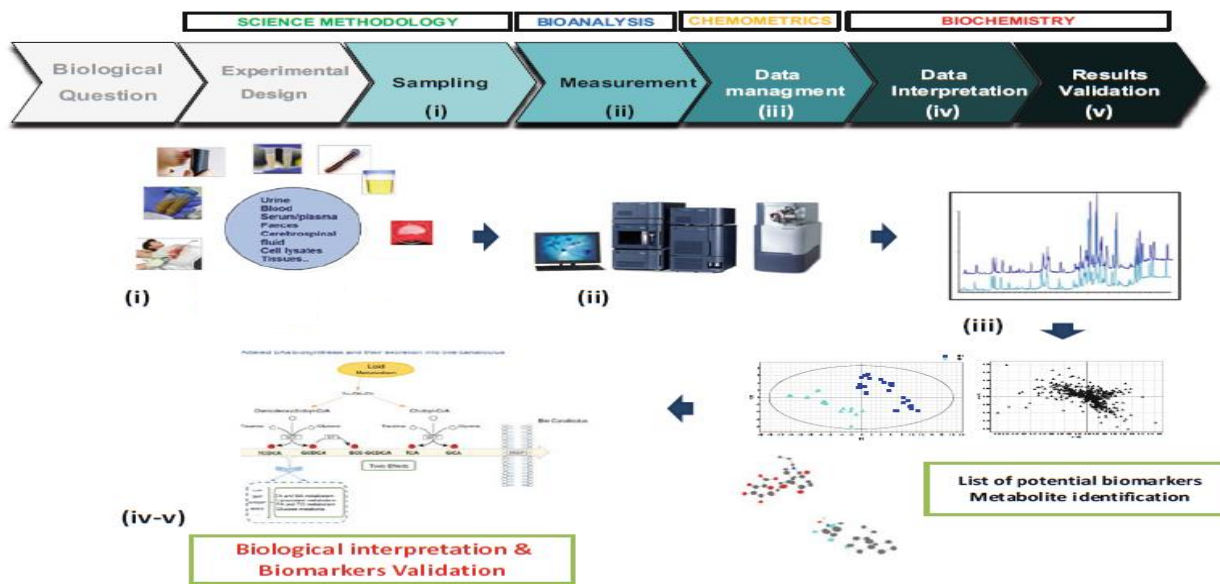
5.2 Σχεδιάγραμμα μεταβολομικής μελέτης

Μια μεταβολομική μελέτη αποτελείται από την προετοιμασία του δείγματος, τον διαχωρισμό των συστατικών- αν χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές μέθοδοι, την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των περιεχόμενων μεταβολιτών και τέλος, την ανάλυση και την ερμηνεία των δεδομένων. Οι μεταβολομικές στρατηγικές χωρίζονται σε δύο ξεχωριστές προσεγγίσεις, τη μη στοχευμένη (untargeted) και τη στοχευμένη (targeted). Η στοχευμένη μεταβολομική μελέτη αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων και προκαθορισμένων μεταβολιτών. Αυτή η προσέγγιση εκμεταλλεύεται την ολοκληρωμένη κατανόηση μιας τεράστιας ποικιλίας μεταβολιτών, της κινητικής τους, των τελικών προϊόντων και των γνωστών βιοχημικών οδών στις οποίες εμπλέκονται. Αντίθετα, η μη στοχευμένη προσέγγιση αφορά την ιχνηλάτιση όλων των μεταβολιτών σε ένα δείγμα. Η μη στοχευμένη προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών. Ένα ενδεικτικό διάγραμμα ροής εργασιών μιας μεταβολομικής μελέτης παρατίθεται στο σχήμα 5.^{25,26}

Το πρώτο βήμα μιας μεταβολομικής ανάλυσης είναι η θέση του βιολογικού ερωτήματος, καθώς σε αυτό στηρίζεται ολόκληρη η ανάλυση. Το βιολογικό ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί, θα καθορίσει την επιλογή του βιολογικού δείγματος και της αναλυτικής στρατηγικής που θα χρησιμοποιηθεί. Το δεύτερο βήμα, αποτελείται από τον σχεδιασμό του πειράματος, ο οποίος είναι ύψιστης σημασίας για κάθε μελέτη, καθώς είναι πολύ σημαντικό να διασφαλισθεί ότι τα δείγματα που συλλέγονται αντιπροσωπεύουν το βιολογικό ερώτημα. Προκειμένου να προσδιορισθούν και να εξετασθούν οι πιο σημαντικοί παράγοντες, που σχετίζονται με την υπό εξέταση υπόθεση, είναι απαραίτητη η εξάλειψη των εξωτερικών παραγόντων, που μπορούν να επηρεάσουν το πείραμα.²⁵

Ακολουθεί η προετοιμασία του δείγματος, κατά την οποία γίνεται η συλλογή και αποθήκευσή του. Η απομόνωση και η προετοιμασία του δείγματος γίνεται ανάλογα με τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία του. Τα ληφθέντα πειραματικά δεδομένα επεξεργάζονται και εξάγονται βιολογικές πληροφορίες από αυτά. Τέλος, πραγματοποιείται η ερμηνεία των δεδομένων και η επικύρωση των μεταβολικών βιοδεικτών. Η ερμηνεία των δεδομένων, συνήθως, πραγματοποιείται με τη διεξαγωγή βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η μεταβολομική ανάλυση παράγει ένα τεράστιο όγκο δεδομένων και η εξαγωγή της χρήσιμης βιολογικής πληροφορίας από τα μεγάλα σύνολα δεδομένων απαιτεί τη χρήση κατάλληλων χημειομετρικών και βιοστατιστικών προσεγγίσεων.^{25,26}

Ο προσδιορισμός του μεταβολώματος θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από αμεροληψία, περιεκτικότητα και ποσοτική μέτρηση. Οι συγκεντρώσεις των ενδογενών μεταβολιτών εκτείνονται σε ένα τεράστιο εύρος, (pM mM), επομένως, για τη μελέτη του μεταβολώματος είναι αναγκαία η χρήση τεχνολογιών αιχμής, όπως ακριβώς είναι και οι δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλυτικές προσεγγίσεις, που χρησιμοποιούνται στις μεταβολομικές μελέτες: ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS).^{20,21}



Σχήμα 5 Γενικό Σχεδιάγραμμα αναπαράστασης των βημάτων μιας μεταβολομικής μελέτης. Περιλαμβάνονται τα διαφορετικά στάδια από τη συλλογή του δείγματος και την προετοιμασία (i) ως την επικύρωση των μεταβολομικών βιοδεικτών (v) μέσω της καταγραφής και αναγνώρισής τους (ii) και της ανάλυσης δεδομένων (iii-iv) [τροποποιημένη εικόνα]²⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

6. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια ποσοτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τον ακριβή προσδιορισμό των συγκεντρώσεων μεταβολιτών στα διάφορα δείγματα. Κατά την τελευταία δεκαετία, το NMR αποτελεί ένα από τα κυριότερα αναλυτικά εργαλεία για την ανάλυση του μεταβολώματος.²⁸

6.1 Βασικές Αρχές NMR

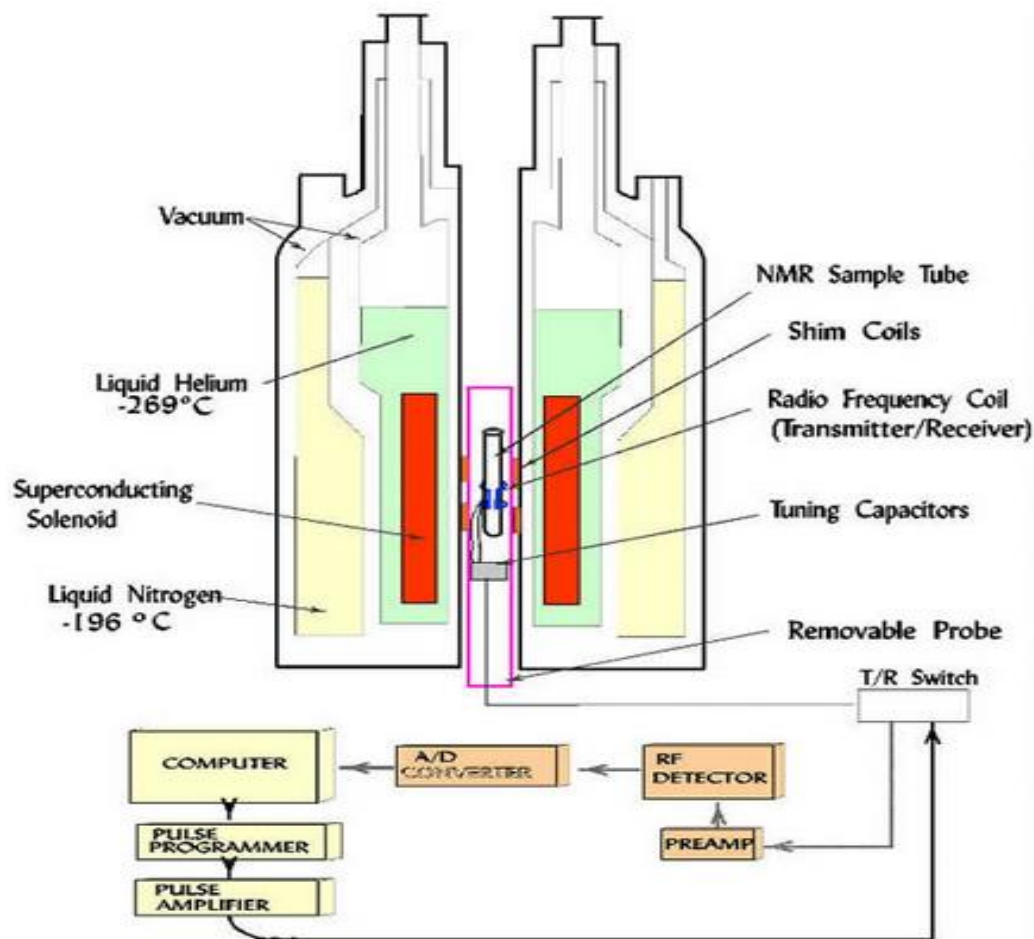
Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) αφορά ένα φαινόμενο το οποίο βασίζεται στις ιδιότητες μαγνητικά ενεργών πυρήνων όπως αποτελούν τα ισότοπα ^1H του υδρογόνου, ^{13}C του άνθρακα, ^{15}N του αζώτου και γενικά τα ισότοπα πυρήνων με περιττό αριθμό πρωτονίων ή/και νετρονίων. Η παρουσία ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου προσανατολίζει τους πυρήνες αυτούς παράλληλα ή αντιπαράλληλα ως προς αυτό ενώ εξαναγκάζονται σε μεταπωπτική κίνηση γύρω από τη διεύθυνσή του σε χαρακτηριστική συχνότητα η οποία εξαρτάται από το είδος του πυρήνα. Η επιβολή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συχνότητας ίση προς τη συχνότητα μετάπτωσης διεγείρει τους πυρήνες ενώ με την παύση της ακτινοβολίας η ενέργεια που έχει απορροφηθεί εκπέμπεται παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον του πυρήνα και κατ' επέκταση τη δομή του μορίου που το περιέχει. Το ληφθέν αναλογικό σήμα έχει τη μορφή αποβαίνουσας ταλάντωσης και καλείται FID (Free Induction Decay- Επαγόμενη Ελεύθερη Απόσβεση). Η φασματοσκοπία ^1H NMR εφαρμόζεται ευρέως και ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα λόγω της φυσικής αφθονίας του ισότοπου (99,99%).^{28,29}

6.2 Φασματογράφος NMR

Ο σύγχρονος φασματογράφος NMR αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα³⁰:

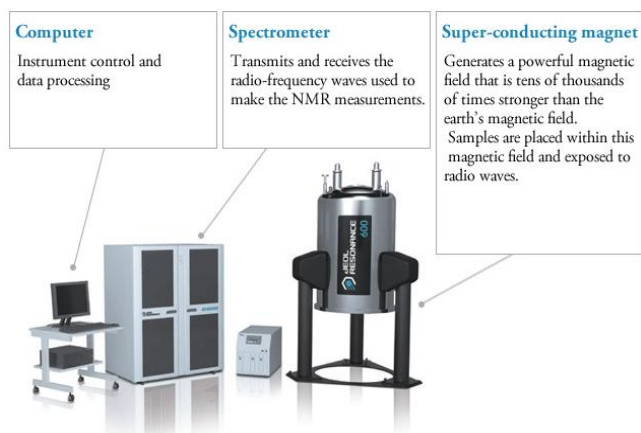
- Έναν ισχυρό, υπεραγωγίμο μαγνήτη υπό μορφή σωληνοειδούς εμβαπτισμένο σε περιβάλλον υγρού ηλίου ο οποίος δημιουργεί ένα σταθερό μαγνητικό πεδίο υψηλής έντασης. (7.05 - 23.5 Tesla).
- Έναν αισθητήρα (probe) εντός του οποίου τοποθετείται το υπό ανάλυση δείγμα και αποτελείται από συντονιζόμενα κυκλώματα για την εκπομπή του παλμού διέγερσης των πυρήνων καθώς και τη λήψη της εκπεμπόμενης ενέργειας κατά την αποδιέγερσή τους

- Μία κονσόλα με ηλεκτρονικές μονάδες που περιλαμβάνουν το συνθετητή και πομπό των παλμών ραδιοσυχνοτήτων για τη διέγερση των πυρήνων, το δέκτη που σε συνδυασμό με τον προενισχυτή και τον μετατροπέα ADC ενισχύει και καταγράφει σε ψηφιακή μορφή την λαμβανόμενη FID
- Έναν υπολογιστή, ο οποίος ελέγχει την παραπάνω διαδικασία και επεξεργάζεται τα δεδομένα



Σχήμα 6 Σχηματική παρουσίαση ενός τυπικού φασματογράφου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

■ NMR instrument composition



Σχήμα 7 Σύνθεση οργάνου NMR (www.jeol.co.jp)

6.3 Βάσεις δεδομένων NMR για ανίχνευση μεταβολιτών

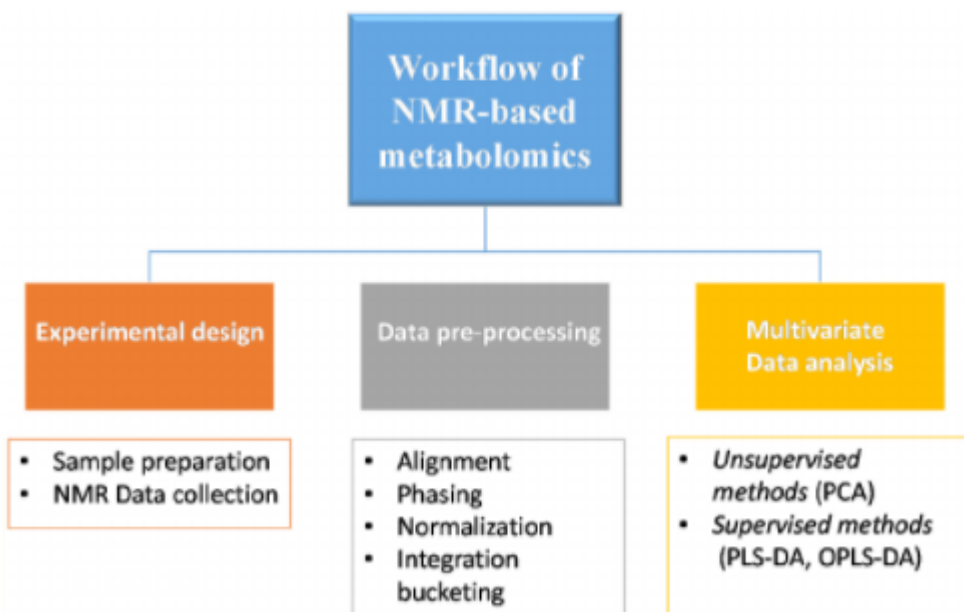
Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών μπορεί να υποστηριχθεί από μια σειρά ενημερωμένων λογισμικών και βάσεων δεδομένων καθώς και χρήση δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR, όπως πειράματα ομοπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^1H COSY και ^1H - ^1H TOCSY, και ετεροπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^{13}C HSQC και ^1H - ^{13}C HMBC η οποία θα επιτρέψει τον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό των μεταβολιτών.

Σήμερα, υπάρχουν πολλές βάσεις δεδομένων υψηλής ποιότητας, οι οποίες περιλαμβάνουν φάσματα αναφοράς NMR για εκατοντάδες μεταβολίτες. Πολλές από αυτές τις βάσεις δεδομένων είναι ελεύθερα προσβάσιμες, όπως η Human Metabolome Database (HMDB), η Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), η NMRShiftDB2 database και η AIST spectral database.³¹

Το πεδίο του NMR είναι συνεχώς εξελισσόμενο, με νέες τεχνικές να αναπτύσσονται διαρκώς. Αξίζει να αναφερθεί η τεχνική HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) με την οποία δύναται να αναλυθεί ιστός, ο οποίος παραμένει άθικτος μετά την ανάλυση. Αφενός αποφεύγονται διαδικασίες εκχύλισης και οποιασδήποτε προπαρασκευής του δείγματος ενώ αφετέρου, στη συνέχεια το άθικτο αυτό τμήμα του ιστού μπορεί να προχωρήσει για ιστολογική ανάλυση και να αναλυθούν τα αποτελέσματα τόσο σε επίπεδο μεταβολιτών όσο και παθολογίας του ιστού και να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.³²

6.4 Βήματα ανάλυσης

Συνοπτικά, τα βασικά στάδια στα οποία διακρίνεται ένα πείραμα NMR είναι η προετοιμασία του δείγματος, η συλλογή των πειραματικών δεδομένων και η προεπεξεργασία τους. Η πολυπλοκότητα και το πλήθος των πειραματικών δεδομένων απαιτούν την εφαρμογή πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων με χρήση επιβλεπόμενων και μη επιβλεπόμενων μεθόδων ώστε να παραχθούν μοντέλα διαφοροποίησης και να προταθούν στατιστικώς σημαντικές ενώσεις ως βιοδείκτες (Σχήμα 9)³³



Σχήμα 8 Σχηματική απεικόνιση βασικής ροής εργασίας μεταβολομικής ανάλυσης με NMR³³

6.4.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

Τα βιολογικά υγρά που εξετάζονται με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας NMR (π.χ. ούρα, πλήρες αίμα, ορός ή πλάσμα) και οι ιστοί (π.χ., ήπαρ, εγκέφαλος κλπ.) γενικά εξετάζονται άμεσα, χωρίς εκτεταμένη προετοιμασία δείγματος. Το αίμα, αποτελείται από το κυτταρικό στοιχείο καθώς και από το υγρό στοιχείο (πλάσμα). Το πλάσμα του αίματος χρησιμοποιείται γενικά για την ανάλυση μεταβολιτών είτε ως έχει, είτε μετά από απομάκρυνση των παραγόντων πήξης του αίματος και άλλων πρωτεϊνών γνωστών ως ορός αίματος. Για τη απομόνωση πλάσματος, προστίθεται ηπαρίνη ως αντιπηκτικό στο φιαλίδιο της συλλογής και στη συνέχεια φυγοκεντρείται. Όταν η μελέτη

αφορά τον ορό αίματος, κατά την λήψη χρησιμοποιούνται φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα και στη συνέχεια αφήνονται στον πάγο για ορισμένη ώρα μέχρι να πήξει το αίμα.³⁶ Ο ορός του αίματος είναι πλούσιος σε πρωτεΐνες οι οποίες συνήθως κατακρημνίζονται με χρήση οργανικού διαλύτη προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλοεπικάλυψη των φασματικών κορυφών των μεταβολιτών. Οι όγκοι που απαιτούνται είναι πολύ μικροί, <0,5 mL βιολογικού υγρού ή 10mg από ιστό. Στα δείγματα προστίθεται δευτεριωμένος διαλύτης, συνήθως δευτεριωμένο νερό (D₂O) και ρυθμιστικό φωσφορικό buffer (NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄) (pH ~ 7.4) ώστε η χημική μετατόπιση των μεταβολιτών να μην επηρεαστεί από διακυμάνσεις του pH ανάμεσα στα δείγματα. Στα δείγματα κοπράνων και ιστών θα πρέπει να προηγηθεί απομόνωση μεταβολιτών με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών(πχ. μεθανόλη και ακετονιτρίλιο). Τα δείγματα πρέπει αποθηκεύονται στους -80 ° C μέχρι την ανάλυση. Μετά την προετοιμασία τους, τα δείγματα τοποθετούνται σε κατάλληλους σωληνίσκους ή υποδοχείς όταν πρόκειται για στερεά δείγματα και εισέρχονται στον αισθητήρα εντός του μαγνήτη ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία συλλογής δεδομένων.^{34,35}

Σε ότι αφορά την ανάλυση δειγμάτων ιστού με HR-MAS θα πρέπει να εφαρμοστεί ένα αυστηρό πρωτόκολλο που αφορά κυρίως την ελαχιστοποίηση των χρονικών καθυστερήσεων ανάμεσα στη χειρουργική αφαίρεση του ιστού έως την κατάψυξή του (-80°C) διότι οι συνεχιζόμενες βιοχημικές διεργασίες στον ιστό μπορεί να αλλάξουν το μεταβολικό περιεχόμενο του. Ομοίως το διάστημα παρασκευής του δείγματος (τεμαχισμός) πριν από την ανάλυση όπως και το διάστημα της λήψης των πειραματικών δεδομένων θα πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατόν πιο σύντομα.³⁶

6.4.2 Χειρισμός και ανάλυση φασματικών δεδομένων NMR

Η προεπεξεργασία των φασματικών δεδομένων περιλαμβάνει βαθμονόμηση, διόρθωση της φάσης και της γραμμής βάσης, ευθυγράμμιση των φασματικών κορυφών, κανονικοποίηση και περιστολή των φασματικών δεδομένων. Τα βιολογικά δείγματα από τα οποία λαμβάνονται δεδομένα παρουσιάζουν διαφορές στις συνολικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών. Στην περίπτωση των βιολογικών υγρών, οι παράγοντες αραιώσης δεν είναι ακριβώς οι ίδιοι για κάθε δείγμα. Αυτό το πρόβλημα παρουσιάζεται πιο έντονα στα ούρα καθώς η συγκέντρωση των συστατικών τους διαφέρει ανάλογα με το ποσότητα νερού που λαμβάνεται. Παρομοίως, κατά την ανάλυση ιστού, το βάρος δεν είναι σταθερό για όλα τα δείγματα. Αυτό το γεγονός, δημιουργεί διακυμάνσεις στις

εντάσεις σήματος που αποδίδονται στην ποσότητα του υλικού που αναλύεται και στην αραίωση αντί για τις αλλαγές των μεταβολικών απεκκρίσεων. Οι μέθοδοι της κανονικοποίησης αποσκοπούν στην απομάκρυνση αυτού του φαινομένου ώστε να δημιουργηθούν συγκρίσιμα φάσματα.^{37,38}

Η διαχείριση του μεγάλου όγκου δεδομένων απαιτεί την περιστολή τους (Data Reduction) με μεθόδους όπως η τμηματοποίηση του φάσματος σε φασματικές περιοχές (spectral binning). Μετά τη διαδικασία του binning, τα φασματικά δεδομένα αποτυπώνονται σε μία μήτρα δεδομένων η οποία υπόκειται περαιτέρω σε στατιστική ανάλυση. Ο εξαγόμενος πίνακας περιέχει τόσες σειρές όσες είναι και οι διαφορετικές παρατηρήσεις (φάσματα-δείγματα) και τόσες στήλες όσες είναι και ο αριθμός των διαφορετικών μεταβλητών (χημικές μετατοπίσεις). Πριν την εφαρμογή της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης τα δεδομένα υπόκειται σε κατάλληλη μετατροπή κλίμακος (scaling) προκειμένου κάθε μεταβλητή ή κάθε μεταβολίτης ανεξάρτητα από τη φυσική αφθονία του στο εξεταζόμενο δείγμα και συνεπώς την ένταση των φασματικών κορυφών του, να έχει το ίδιο «στατιστικό βάρος» στη δημιουργία των μοντέλων. Η μετατροπή pareto αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική μετατροπής δεδομένων.³⁸

6.4.3 Στατιστική ανάλυση NMR μεταβολομικών δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων εξαρτάται από το βιολογικό ερώτημα και τον σχεδιασμό του πειράματος, επομένως, η επιλογή των μεθόδων ανάλυσης δεδομένων ποικίλλει. Οι μέθοδοι ανάλυσης αυτών των δεδομένων είναι ένα πεδίο που συνεχώς εξελίσσεται, ωστόσο υπάρχει ένα πρότυπο μεθόδων που μπορεί να ακολουθηθεί, η πολυμεταβλητή και η μονομεταβλητή στατιστική ανάλυση.³⁹

---- Μονομεταβλητή ανάλυση

Η μονομεταβλητή ανάλυση στη μεταβολομική είναι το απλούστερο στατιστικό εργαλείο, στο οποίο λαμβάνεται υπόψη μόνο μια μεταβλητή τη φορά για τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ομάδων σε ένα σύνολο δεδομένων. Ο τύπος αυτής της ανάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση μεμονωμένων μεταβολιτών.³⁹

---- Πολυμεταβλητή ανάλυση

Η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση (multivariate statistical analysis) διαχειρίζεται το σύνολο των μεταβολιτών, εντοπίζει τις διακυμάνσεις τους στα δείγματα και βρίσκει τη βέλτιστη συσχέτιση μεταξύ των πιο σημαντικών μεταβολών μεταξύ των δειγμάτων.

Η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση χρησιμοποιεί μεθόδους αναγνώρισης προτύπων. Τα εργαλεία, που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό, διακρίνονται στις μη επιβλεπόμενες (unsupervised) τεχνικές, όπως η Ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες (PCA-Principal Component Analysis), όπου ο χρήστης δεν παρέχει καμία πληροφορία που να αφορά την ταυτότητα των δειγμάτων και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό τους και στις επιβλεπόμενες (supervised), όπως η Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων με Διαχωριστική Ανάλυση (PLS-DA: Partial Least Square Regression with Discriminant Analysis), όπου οι πληροφορίες αυτές εισάγονται εκ των προτέρων με σκοπό το διαχωρισμό τους. Οι μη επιβλεπόμενες τεχνικές εντοπίζουν τάσεις, ομάδες και ακραίες τιμές, ενώ οι επιβλεπόμενες τεχνικές διακρίνουν τους μεταβολίτες, που συμβάλλουν στο διαχωρισμό (πιθανοί βιοδείκτες).³⁶ Η επικύρωση των στατιστικών μοντέλων αποτελεί μια σημαντική πτυχή οποιασδήποτε στατιστικής ανάλυσης, καθώς επιβεβαιώνει την εγκυρότητα και την αξιοπιστία τους. Ελέγχονται οι παράμετροι R² (goodness of fit) και Q² (προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου - goodness of prediction). Στις επιβλεπόμενες τεχνικές για την επικύρωση των μοντέλων χρησιμοποιούνται, επιπλέον, ο έλεγχος αναδιάταξης των αποκρίσεων (response permutation test), η διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) και η καμπύλη ROC (receiver operating characteristic curve).^{34,37}

7. Εφαρμογές NMR στην έρευνα για τον καρκίνο

7.1 Διάγνωση- Πρόγνωση-Πρόβλεψη Καρκίνου

Ίσως η καλύτερη εφαρμογή της μεταβολομικής μέχρι τώρα στη διάγνωση του καρκίνου θα μπορούσε να είναι για τον καρκίνο του μαστού. Σε αρκετές μελέτες έχουν αναλυθεί δείγματα βιοψίας μαστού με χρήση NMR και έχουν εντοπιστεί πάνω από 30 ενδογενείς μεταβολίτες στον ιστό του μαστού. Οι όγκοι μαστού, έδειξαν αξιόπιστα χαμηλά επίπεδα γλυκεροφωσφοχολίνης

καθώς και γλυκόζης σε σύγκριση με καλοήθεις όγκους ή υγιή ιστό.⁴⁰ Επιπλέον, ύστερα από εξέταση 91 δειγμάτων καρκίνου του μαστού και 48 φυσιολογικών δειγμάτων, μετά από χειρουργική εκτομή, με τη χρήση HR-MAS ¹H-NMR, ο κακοήθης φαινότυπος μπορούσε να διακριθεί αξιόπιστα από τον φυσιολογικό κ.⁴¹ Η E.Jobard και οι συνεργάτες της προσπάθησαν να εντοπίσουν μεταβολικές μεταβολές στον ορό που να σχετίζονται με προχωρημένο μεταστατικό καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με την πρώιμη τοπική νόσο. Τα αποτελέσματα διέκριναν σαφώς τα δείγματα του μεταστατικού καρκίνου από εκείνα της τοπικής νόσου με 89,8% ευαισθησία και 79,3% ειδικότητα. Ακόμα, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων οξικού οξέος, β-υδροξυβουτυρικού οξέος, γαλακτικού οξέος, πυροσταφυλικού οξέος, μαννόζης, N-ακετυλογλυκοπρωτεϊνών, γλουταμινικού οξέος, ενώ καταγράφηκε μείωση στη συγκέντρωση των μεταβολιτών ιστιδίνης, αλανίνης και βεταΐνης.⁴²

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής ασθένεια, με διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά και κλινική συμπεριφορά. Για την αξιολόγηση της κλινικής πορείας της νόσου και τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία, παράγοντες όπως το στάδιο του όγκου, τα επίπεδα των οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών (PR) ορμονικών υποδοχέων και η έκφραση του ανθρώπινου υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) λαμβάνονται υπόψη. Μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ποσοτικό HR-MAS NMR για τη συσχέτιση των επιπέδων των μεταβολιτών σε ιστό καρκίνου του μαστού με κλινικοπαθολογικούς παράγοντες, επιβίωση ή ανταπόκριση στη θεραπεία. Υψηλότερα επίπεδα μεταβολιτών που περιέχουν χολίνη βρέθηκε να σχετίζονται με ιστολογικούς προγνωστικούς παράγοντες [ER, PR, HER2, ιστολογικός βαθμός, τριπλή αρνητικότητα, Ki-67, κακή πρόγνωση]³⁶

Ο καρκίνος του προστάτη εμφανίζει ένα ξεχωριστό μεταβολικό προφίλ που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα φωσφοχολίνης και αλανίνης. Οι μεταβολομικές προσπάθειες σε αυτόν τον τομέα έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην εξέταση ιστών και εκχυλισμάτων ιστού για την καλύτερη διάκριση φυσιολογικών, καλοήθων και καρκινικών ιστών.²¹ Στο προστατικό υγρό αντρών με καρκίνο του προστάτη εμφανίζονται μειωμένα ποσοστά κιτρικού οξέος και αυξημένα σπερμίνης, σε αντίθεση με άντρες μη πάσχοντες από καρκίνο του προστάτη. Η ανίχνευση κιτρικού οξέος και σπερμίνης σε προστατικό υγρό που έγινε με ¹H-NMR συσχετίστηκε με το σύστημα βαθμολόγησης Gleason (σύστημα σταδιοποίησης καρκίνου του προστάτη).⁴⁰ Η αναφορά της ομάδας του Sreekumar ότι η σαρκοσίνη θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό βιοδείκτη,

δημιούργησε την ελπίδα για την ύπαρξη ενός μη-επεμβατικού προβλεπτικού βιοδείκτη της εξέλιξης του καρκίνου του προστη.²¹

Η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου στην κλινική πράξη πραγματοποιείται μετά από βιοψία. Ύστερα από ανάλυση ορού ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου με ¹H NMR, η επιστημονική ομάδα του Zamani πρότεινε τη μεταβολομική ανάλυση του ορού ασθενών ως προκαταρκτική εξέταση (screening). Τα αποτελέσματα κατέγραψαν διαφοροποίηση σε 6 μεταβολίτες που εμπλέκονται κυρίως στη βιοσύνθεση χολικού οξέος (πχ ταυροχολικό οξύ), στον μεταβολισμό της βιταμίνης Β6, στον μεταβολισμό του μεθανίου και στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης.⁴³ Ο Jiménez και οι συνεργάτες του ανέφεραν τη χρήση του HR-MAS NMR για την ανάλυση σε δείγματα όγκων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς και βιοψίες από γειτονικούς βλεννογόνους. Η πολυμεταβλητή ανάλυση PLS-DA των μεταβολικών προφίλ ανέδειξε διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο κατηγοριών των δειγμάτων (δείγμα όγκου-βιοψία βλεννογόνου). Τα δείγματα του όγκου χαρακτηρίστηκαν από αυξημένη συγκέντρωση χολίνης, γαλακτικού οξέος, φαινυλαλανίνης, τυροσίνης, ταυρίνης, ισογλουταμίνης και μειωμένη συγκέντρωση λιπιδίων και τριγλυκεριδίων. Επιπλέον, με βάση το μεταβολικό προφίλ διαφοροποιήθηκαν όγκοι διαφορετικών T και N σταδίων, με βάση το σύστημα σταδιοποίησης TNM.⁴⁴ Μια άλλη επιστημονική ομάδα, ανέλυσε δείγματα όγκου από ασθενείς με καρκίνο του ορθού με εφαρμογή ¹H-NMR. 16 μεταβολίτες φάνηκαν να διαφοροποιούνται σημαντικά ανάμεσα στα καρκινικά δείγματα και στα controls αλλά επιπλέον καταδείχθηκε και η συσχέτισή τους με το στάδιο του καρκίνου.⁴⁵ Τέλος, μια ακόμη έρευνα με χρήση HR MAS που πραγματοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό του μεταβολικού αποτυπώματος τόσο του όγκου όσο και φυσιολογικού ιστού πασχόντων από πρωτοπαθή καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα από τον ιστό του όγκου είναι πλουσιότερα σε ταυρίνη, γλουταμινικό οξύ, ασπαρτικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Όσον αφορά τα δείγματα από φυσιολογικό ιστό, τα αποτελέσματα έδειξαν πως περιέχουν υψηλότερη ποσότητα μυο-ινοσιτόλης και β-γλυκόζης.⁴⁶

Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα διεξάγεται πολύ μεγάλη έρευνα. Μια επιστημονική ομάδα εφάρμοσε NMR μεταβολομική μελέτη στα ούρα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και σε υγιές control group. Η ανάλυση των μεταβολικών προφίλ των ούρων με χρήση πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης διέκρινε τις δύο ομάδες με 93% ευαισθησία και 94% ειδικότητα.⁴⁷ Σε μία άλλη έρευνα εξετάστηκαν δείγματα καρκινικού ιστού και ιστού από

γειτονικό παρέγχυμα ελέγχου ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα με εφαρμογή HR-MAS NMR. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλό επίπεδο ευαισθησίας (95% καρκινικών δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά) και 100% ειδικότητα (κανένα εσφαλμένα θετικό αποτέλεσμα). Επιπλέον, κατέστη εφικτή η διάκριση των αδενοκαρκινωμάτων από τους καρκινοειδείς όγκους και τα επιδερμοειδή καρκινώματα λόγω της διαφοράς των επιπέδων κρίσιμων μεταβολιτών μεταξύ αυτών των ιστολογικών τύπων.⁴⁸ Η συνδυαστική ανάλυση καρκινικού ιστού του πνεύμονα και ορού αίματος από 93 ασθενείς με φασματοσκοπία HR-MAS ανάδειξε μεταβολικούς δείκτες ιστού και ορού που μπορούν να διαφοροποιήσουν τους τύπους και τα στάδια του καρκίνου. Το πλέον ενδιαφέρον σημείο της μελέτης εστιάζεται στη δυνατότητα να προβλεφθεί η συνολική επιβίωση του ασθενούς, μια πρόβλεψη που είναι σημαντική για τις στρατηγικές θεραπείας και που προς το παρόν δεν μπορεί να επιτευχθεί με καμία κλινική μέθοδο. Η παράταση της επιβίωση σχετίστηκε με σχετική υπερέκφραση της γλουταμίνης, της βαλίνης και της γλυκίνης και με τη σχετική καταστολή του γλουταμινικού οξέος και των λιπιδίων στον ορό.⁴⁹

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) είναι από τις μορφές καρκίνου με μεγάλη επίπτωση και θνησιμότητα καθώς δεν παρουσιάζει προειδοποιητικά σημάδια και έτσι είναι πολύ δύσκολη η ανίχνευση της πρώιμης νόσου. Η επιθετική φύση αυτού του καρκίνου σε συνδυασμό με το υψηλό μεταστατικό του δυναμικό οδηγεί σε πολύ κακή πρόγνωση.²¹ Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε, η επιστημονική ομάδα συνέκρινε με την εφαρμογή HR MAS NMR τα επίπεδα μεταβολιτών σε δείγματα όγκων HCC, και σε δείγματα παρακείμενου φυσιολογικού ηπατικού ιστού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ως διακριτούς υποψήφιους βιοδείκτες το γαλακτικό οξύ και αμινοξέα όπως γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, λευκίνη, αλανίνη, γλυκόζη, φωσφορυλοαιθυλ-αμίνη και γλυκογόνο.⁵⁰ Μια άλλη έρευνα παρατήρησε τις μεταβολές στους ενδογενείς μεταβολίτες της κίρρωσης του ήπατος (LC) και του HCC χρησιμοποιώντας δείγματα αίματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερο επίπεδο οξικού οξέος, πυροσταφυλικού οξέος, γλουταμίνης, ακετογλουταρικού, γαλακτικού οξέος, τυροσίνης, 1-μεθυλιστιδίνης και φαινυλαλανίνης, συνοδευόμενα από χαμηλότερο επίπεδο LDL, ισολευκίνης, βαλίνης, ακετοξικού οξέος, κρεατίνης, και ακόρεστων λιπιδίων σε ασθενείς με HCC.⁵¹ Σε μια παρόμοια μελέτη, οι ερευνητές συνέκριναν τα μεταβολικά προφίλ 154 κίρρωτικών ασθενών με και χωρίς HCC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φάσματα ¹H NMR ορού σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση OPLS παρείχαν μια προφανή διάκριση μεταξύ κίρρωτικών ασθενών και ασθενών με HCC. Οι διαταραχές που παρατηρήθηκαν στη διαδικασία της γλουταμινόλυσης, του κύκλου του Krebs, του φωσφολιπιδίου και της

γλυκόλυσης έχουν προοπτική στην εκτίμηση των παθολογικών ηπατικών βλαβών.⁵² Μια ακόμη μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απεικόνιση των μεταβολικών χαρακτηριστικών του πλάσματος των ασθενών με HCC. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή κατανάλωση γλυκόζης στα δείγματα των ασθενών με HCC συνοδευόμενη από αυξημένη ποσότητα ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων αερόβιας γλυκόλυσης.⁵³

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι δύσκολο να διαγνωστεί και να αντιμετωπιστεί δεδομένου ότι η χειρουργική αντιμετώπιση δεν αποτελεί αποτελεσματική επιλογή για τους περισσότερους ασθενείς, επομένως η έγκαιρη ανίχνευσή του είναι ζωτικής σημασίας για τη θεραπεία του.⁵⁴ Μελέτη που πραγματοποιήθηκε με NMR σε ορό ασθενών με καρκίνο στο πάγκρεας έδειξε ικανοποιητική διάκριση μεταξύ των ασθενών με καρκίνο και εκείνων με καλοήθεια. Η ανάλυση έδειξε υψηλότερα επίπεδα ισολευκίνης, λευκίνης και κρεατινίνης ενώ χαμηλότερες τιμές γ-υδροξυβουτυρικού οξέος, 3-υδροξυϊσοβαλερικού οξέος, γαλακτικού οξέος, τριγλυκεριδίων και τριμεθυλαμίνης-N-οξειδίου (TMAO) στον ορό των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος, σε σύγκριση με το control group. Αυτές οι μεταβολικές διαφορές θα μπορούσαν να αποτελέσουν μεταβολικούς βιοδείκτες για την πρόιμη ανίχνευση του καρκίνου του παγκρέατος.⁵⁵

NMR μεταβολομική ανάλυση σε ορό από ασθενείς με καρκινώματα νεφρικών κυττάρων (RCC) και υγιών ανθρώπων, έδειξε ότι επτά μεταβολίτες άλλαξαν σημαντικά: τα επίπεδα της αλανίνης, της κρεατίνης, της ισολευκίνης, του γαλακτικού, της λευκίνης, της βαλίνης αυξήθηκαν, ενώ το επίπεδο της χολίνης μειώθηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαταραχές αυτών των μεταβολιτών επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα ύστερα από νεφρεκτομή των ασθενών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των συγκεκριμένων μεταβολιτών είναι ειδικές για το RCC και ότι αυτοί οι μεταβολίτες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση του πρόιμου RCC καθώς και για την αξιολόγηση της μετεγχειρητικής ανάκαμψης. Αξίζει να σημειωθεί ότι με την εξέταση ρουτίνας είναι αρκετά δύσκολη η διάκριση μεταξύ καλοήθων νεφρικών όγκων από RCC. Η μη επεμβατική NMR μεταβολομική μελέτη σε ορό θα μπορούσε να λύσει αυτό το πρόβλημα.⁵⁶ Σε άλλη παρόμοια μελέτη, σε ορό ασθενών με RCC, παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις κρεατίνης, ισολευκίνης, γλουταμινικού οξέος, ορνιθίνης ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις κιτρικού, μεθανόλης, θρεονίνης γλυκίνης, ιστιδίνης, ταυρίνης και γλουταμίνης σε σύγκριση με τα υγιή controls. Αυτοί οι μεταβολίτες σχετίζονται στενά με τον κύκλο του Krebs και το μεταβολισμό αμινοξέων και λιπαρών οξέων. Επομένως, η

ανάλυση του μεταβολώματος με NMR θα μπορούσε να συμβάλει στη διάκριση καλοήθων νεφρικών όγκων από RCC.⁵⁷

Σε μια έρευνα που αφορά το πολλαπλό μυέλωμα (MM), αναλύθηκε συνδυαστικά το μεταβολικό προφίλ ορού και ούρων ασθενών και φυσιολογικών control με ¹H NMR. Τα αποτελέσματα έδειξαν συσσώρευση καρνιτίνης και / ή ακετυλοκαρνιτίνης στους ασθενείς με ενεργό πολλαπλό μυέλωμα και μετά από υποτροπή της νόσου, κάτι που μπορεί να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου. Οι δείκτες αυτοί, επομένως, θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες του πολλαπλού μυελώματος.⁵⁸

7.2 Αξιολόγηση Τοξικότητας

Στον τομέα της ογκολογίας η τοξικότητα στα φάρμακα εμφανίζεται ως σοβαρός περιορισμός της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες εμφανίζονται όταν τα φάρμακα διανέμονται σε άλλα, υγιή μέρη του σώματος στα οποία έχουν αρνητικό αντίκτυπο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υποφέρει ο ασθενής, οδηγώντας σε χαμηλότερη ποιότητα ζωής, και σε σοβαρές περιπτώσεις τερματισμό της θεραπείας. Για τον περιορισμό των τοξικών επιδράσεων στους ασθενείς συχνά χρησιμοποιούνται χαμηλότερες δόσεις του φαρμάκου, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη μη βέλτιστη δράση του.⁵⁹ Ένας άλλος τρόπος μείωσης των ανεπιθύμητων ενεργειών είναι η δημιουργία ενός πιο ειδικού φαρμάκου, του οποίου η δράση να περιορίζεται κυρίως μέσα στον όγκο. Αυτή η υψηλότερη εξειδίκευση μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση στοχευμένων φαρμάκων όπως τα theranostics ή με προφάρμακα, τα οποία να ενεργοποιούνται μόλις φτάσουν στην περιοχή-στόχο.⁶⁰ Η φαρμακομεταβολομική ή φαρμακομεταβολομική, στοχεύει στην ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών στα σωματικά υγρά ενός ατόμου, προκειμένου να προβλέψει ή να αξιολογήσει τον μεταβολισμό των φαρμακευτικών ενώσεων με στόχο την πρόβλεψη πιθανής τοξικότητας. Η καπεσιταβίνη (Capecitabine), ένα προφάρμακο της 5-φλουορακίλης, μελετήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητάς της σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, σε μη χειρουργήσιμο στάδιο. Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της μελέτης ήταν ο εντοπισμός των υποπληθυσμών με μια προδιάθεση για την εμφάνιση παρενεργειών. Η τοξικότητα προβλέφθηκε συσχετίζοντας τα μεταβολικά προφίλ πριν τη θεραπεία με τα τοξικά συμβάντα που εμφανίστηκαν μετά τη θεραπεία. Η ομάδα υψηλής τοξικότητας

εμφάνισε υψηλότερες συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων χολίνης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλων λιπιδίων χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Αντίθετα στην ομάδα που παρουσίασε χαμηλή ή καθόλου τοξικότητα η τυροσίνη βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα. Οι αλλαγές στα μεταβολικά προφίλ φαίνεται να γίνονται σταδιακά, κάτι που επιτρέπει τη μελέτη της έναρξης και της εξέλιξης της τοξικότητας του Carpecitabine.⁶¹

7.3 Αξιολόγηση ανταπόκρισης στη θεραπεία

Η χρήση της μεταβολομικής για την αξιολόγηση της επίδρασης της θεραπείας, τόσο ως προγνωστικό μέτρο αποτελεσματικότητας όσο και ως φαρμακοδυναμικός δείκτης, έχει αποδειχθεί *in vitro* τόσο για την παραδοσιακή χημειοθεραπεία όσο και για την ορμονοθεραπεία. Προ επώαση και έλεγχος του κυτταρικού εκχυλίσματος με ¹H NMR σε κυτταροκαλλιέργειες από ανθρώπινα γλοιώματα προέβλεψε επιτυχώς τον διαχωρισμό σε ανθεκτικές στα φάρμακα και ευαίσθητες στα φάρμακα ομάδες πριν από τη θεραπεία με Λομουστίνη (CCNU).⁴⁰

In vivo, η φασματοσκοπία NMR, έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της διαφοροποίησης του μεταβολισμού του όγκου κατόπιν θεραπείας με φάρμακα που ανήκουν στις νιτροζουρίες σε ποντίκια C57BL/6J στα οποία χορηγήθηκαν υποδόρια κύτταρα μελανώματος B16 και πνευμονικά καρκινικά κύτταρα Lewis (3LL). Τα δεδομένα υπέδειξαν (α) την καταστολή της *de novo* σύνθεσης νουκλεοτιδίων όπως φάνηκε από τη συσσώρευση γλυκόζης, γλουταμίνης, γλουταμινικού και ασπαρτικού, που ακολούθησε τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και της αναπαραγωγής του DNA (αυτή η απόκριση έδειξε την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου) και (β) την παραγωγή ATP από την κατανάλωση α-κετογλουταρικού στον κύκλο TCA για την επανέναρξη της *de novo* σύνθεσης νουκλεοτιδίων (αυτές οι ενεργοποιημένες μεταβολικές οδοί σηματοδοτούν διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA και την προσαρμογή στη θεραπεία). Οι θεραπείες για τον καρκίνο, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, κινούνται προς τη χρήση καινοτόμων φαρμάκων, που στοχεύουν επιλεκτικά κρίσιμες πρωτεϊνικές συνιστώσες μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η ιματινίμη, ένας εκλεκτικός αναστολέας της τυροσινικής κινάσης BCR-ABL, μειώνει τον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επάγει την απόπτωση στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML). Σε μεταβολικό επίπεδο, η ιματινίμη στερεί τα βασικά υποστρώματα που

απαιτούνται για τη σύνθεση μακρομορίων, τα οποία απαιτούνται για την κυτταρική επιβίωση. Η χρήση ^{13}C NMR επέτρεψε τη διερεύνηση των μεταβολών του μεταβολισμού της επισημασμένης με ^{13}C -γλυκόζης χορηγούμενης σε κυτταρικές σειρές θετικές στο BCR-ABL, στις οποίες πραγματοποιήθηκε αγωγή με ιματινίμη. Καταδείχθηκε δραστικά διαφοροποιημένο προφίλ του μεταβολισμού της γλυκόζης σε σχέση με τα συμβατικά κυτταροτοξικά χημειοθεραπευτικά τα οποία προκαλούν μιτοχονδριακή τοξικότητα. Το imatinib, από την άλλη, διεγείρει το μιτοχονδριακό μεταβολισμό της γλυκόζης και ελαττώνει την παραγωγή γαλακτικού (αντιστροφή του φαινομένου Warburg) με επακόλουθη μείωση πρόσληψης γλυκόζης. Η ιματινίμη οδήγησε, επίσης, σε σημαντική μείωση της φωσφοχολίνης, πρόδρομη ένωση στη σύνθεση των φωσφολιπιδικών μεμβρανών, στα ευαίσθητα στο φάρμακο κύτταρα, κάτι που συσχετίστηκε με μείωση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε ανθεκτικά BCR-ABL+ κύτταρα η μιτοχονδριακή δραστηριότητα ήταν σημαντικά μειωμένη, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος αυξημένη, η πρόσληψη της γλυκόζης σε υψηλά επίπεδα και τα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης επίσης υψηλά σε συνδυασμό με τον υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η φασματοσκοπία NMR καταγράφει τις αλλαγές στον κυτταρικό μεταβολισμό, που αντικατοπτρίζουν την πρόιμη αντίσταση σε νέες στοχευμένες θεραπείες.⁴⁰

8. Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μάζας ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων, την ποιοτική και ποσοτική αναγνώριση της σύστασης αγνώστων μιγμάτων και την ανίχνευση της παρουσίας ισοτόπων. Μπορεί να γίνει ανάλυση εκατοντάδων ενώσεων σε ένα μόνο δείγμα, καθιστώντας τη μια πολύ ισχυρή και υψηλής απόδοσης τεχνολογία.^{62, 63}

8.1 Αρχή Μεθόδου

Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του λόγου μάζας/φορτίου (m/z) των μορίων. Αυτή επιτυγχάνεται με τον ιονισμό των μορίων, τον διαχωρισμό τους σύμφωνα με το

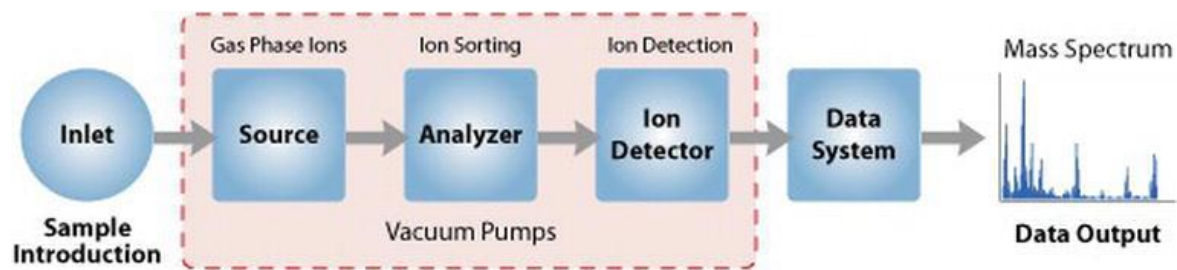
λόγο μάζας/φορτίου και τελικά, τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Τα στάδια που ακολουθούνται είναι τέσσερα: ο ιονισμός, η επιτάχυνση, η εκτροπή και η ανίχνευση.

Ο ιονισμός των μορίων πραγματοποιείται με διάφορες τεχνικές, με συνηθέστερες την ηλεκτρονιακή πρόσκρουση (Electron impact ionization, EI) με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια σε ηλεκτρικό πεδίο, τον φωτοϊονισμό (Photoionization, PI), με τη βοήθεια φωτός στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και τον χημικό ιονισμό (Chemical ionization, CI), μέσω κρούσεως με άλλα ιόντα. Μόλις ιονιστούν, τα ιόντα επιταχύνονται ώστε να έχουν όλα την ίδια κινητική ενέργεια. Στη συνέχεια, τα ιόντα εκτρέπονται από ένα μαγνητικό πεδίο σύμφωνα με τις μάζες τους. Όσο πιο ελαφριά είναι, τόσο μεγαλύτερη η εκτροπή. Η δέσμη των ιόντων που τελικά διέρχεται από τον φασματογράφο μάζας μετρείται ηλεκτρικά από τον ανιχνευτή. Το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων παράγει το φάσμα μάζας στην κατάλληλη μορφή, το οποίο παρέχει το μοριακό βάρος των ενώσεων, την ένταση του αναλυόμενου σήματος, καθώς και δομικές πληροφορίες.⁶³

8.2 Φασματογράφος Μάζας

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα: ^{62,63}

- 1) Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος (Inlet). Τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή.
- 2) Την πηγή ιονισμού (source), όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα.
- 3) Τον αναλυτή μαζών (analyzer). Εδώ, λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων, ανάλογα με το m/z τους.
- 4) Τον ανιχνευτή (ion detector), που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
- 5) Το σύστημα κενού (vacuum). Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
- 6) Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με το κατάλληλο λογισμικό.



Σχήμα 9 Οργανολογία φασματογράφου μάζας⁶³

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μάζας είναι:⁶⁴

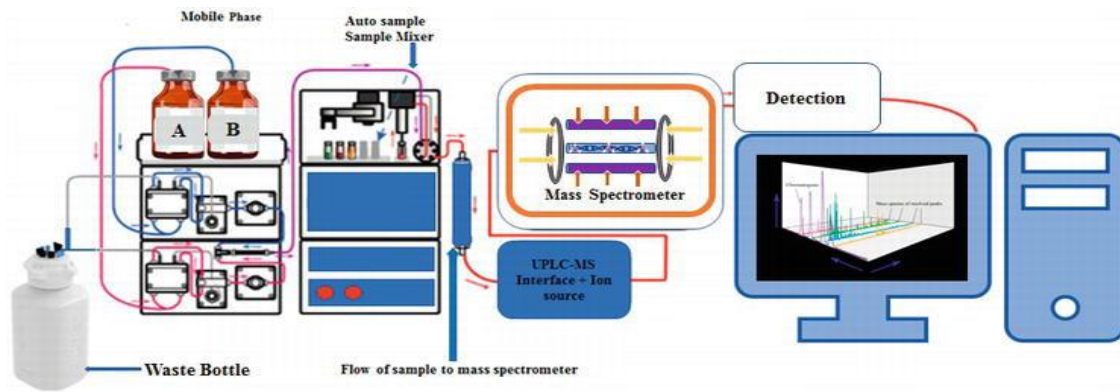
1. Αναλυτής απλής εστίασης
2. Αναλυτής διπλής εστίασης
3. Παγίδα ιόντων (Ion trap)
4. Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight, TOF)
5. Υβριδικός αναλυτής Orbitrap
6. Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)

8.3 Μέθοδος σύζευξης Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)

Πριν την ανάλυση με φασματομετρία μάζας, τα βιολογικά δείγματα θα πρέπει να διαχωριστούν. Η σύζευξη του φασματόμετρου μάζας με τη χρωματογραφία διευκολύνει αυτή τη διαδικασία και γι' αυτό, χρησιμοποιείται ευρέως στις ομικές μελέτες. Τα πλεονεκτήματα αυτής της σύζευξης είναι:⁶⁵

- Η μείωση του φαινομένου καταστολής του ιονισμού
- Ο διαχωρισμός ισομερών ενώσεων
- Η παροχή πρόσθετων σημαντικών πληροφοριών για τον χαρακτηρισμό του μεταβολίτη

- Η ακριβέστερη ποσοτικοποίηση των επιμέρους μεταβολιτών



Σχήμα 10 Σχεδιάγραμμα οργάνολογίας LC-MS⁶⁶

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI) αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας. Η τεχνική έχει ως εξής: το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο 3-5 kV. Παράλληλα με τον τριχοειδή, διαβιβάζεται αέριο για δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος από μικρές φορτισμένες σταγόνες και ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα, ιονίζοντας τις αναλυόμενες ενώσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται «εξάτμιση με ιονισμό» (ion evaporation), εντάσσεται στις μαλακές/ήπιες τεχνικές ιονισμού και παράγει μεγάλο αριθμό ιόντων, μέσω ανταλλαγής φορτίου στο διάλυμα, ενώ, συχνά, σχηματίζει μοριακά ιόντα, που βοηθούν στην αρχική ταυτοποίηση. Ο καλός χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιώνει την ευαισθησία της ανίχνευσης και επίσης, έχει ως αποτέλεσμα καλύτερη ποιότητα δεδομένων, λόγω μείωσης θορύβου.^{62,65}

8.3.1 Βήματα Μεθόδου

Παρόμοια με την τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, στην τεχνική LC-MS, τα βήματα περιλαμβάνουν τη συλλογή των δειγμάτων και την επεξεργασία τους, τη λήψη των δεδομένων, την προ-επεξεργασία τους, τη στατιστική ανάλυση και τέλος, την ερμηνεία τους. Η προετοιμασία του δείγματος, η κατάσταση του οργάνου ή το περιβάλλον λειτουργίας ενδέχεται να επηρεάσουν τα δεδομένα (πχ. μεταβολή των τιμών έντασης, μετατόπιση των τιμών m/z). Για την εκτίμηση της αναλυτικής μεταβλητότητας, συνιστάται η χρήση δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (QC) μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα.⁶⁵

--- ΠΡΟ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

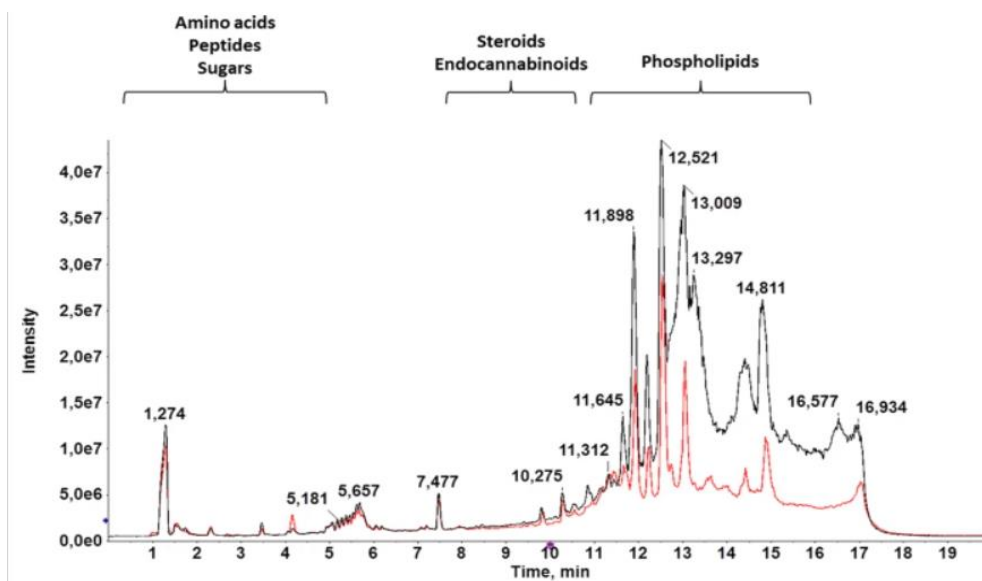
Συνήθως, ένα πείραμα LC-MS παράγει μια τεράστια ποσότητα ανεπεξεργαστων δεδομένων (raw data), για την αξιολόγηση των οποίων, κρίνεται απαραίτητη η χρήση ειδικού λογισμικού και αλγόριθμων. Ο στόχος είναι η μετατροπή αυτών των δεδομένων σε εξαγόμενα δεδομένα, που μπορούν εύκολα να υποβληθούν σε επεξεργασία με στατιστικά εργαλεία.⁷⁴ Στην προ-επεξεργασία, περιλαμβάνεται η διόρθωση της γραμμής υποβάθρου, η αναγνώριση των κορυφών του χρωματογραφήματος (peak picking), η ευθυγράμμιση των χρωματογραφικών κορυφών όλων των δειγμάτων, σύμφωνα με τον χρόνο έκλουσής τους (Peak matching and retention time alignment), η εξομάλυνση (smoothing) και η κανονικοποίηση (normalization) των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων και τέλος, η αποσύζευξη των κορυφών (deconvolution).⁶⁷

Θεωρητικά, αναμένεται ότι το φιλτράρισμα και η διόρθωση της γραμμής υποβάθρου μπορούν να βελτιώσουν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κορυφών. Η αναγνώριση των κορυφών αφορά έναν μετασχηματισμό, που επεξεργάζεται τα ακατέργαστα συνεχή δεδομένα, έτσι, ώστε κάθε ιόν να αντιπροσωπεύεται από μια κορυφή. Αυτός ο μετασχηματισμός προσφέρει δύο πλεονεκτήματα: την αφαίρεση μέρος του θορύβου στα συνεχή δεδομένα και τη μείωση της διάσταση δεδομένων, χωρίς μεγάλη απώλεια πληροφοριών. Η ευθυγράμμιση των χρωματογραφικών κορυφών όλων των δειγμάτων, σύμφωνα με τον χρόνο έκλουσής τους, επιτρέπει τη σύγκριση των μεταβολομικών δεδομένων μεταξύ των δειγμάτων. Η εξομάλυνση συμβάλλει σημαντικά στην μείωση του συστηματικού λάθους μεταξύ των μετρήσεων, αφαιρώντας την οργανολογική διακύμανση, έτσι, ώστε να επισημαίνονται οι χρήσιμες βιολογικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Η κανονικοποίηση των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων βοηθά στη μείωση της συστηματικής παραλλαγής των δεδομένων LC-MS.⁶⁵

--- ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μετά την προεπεξεργασία, τα ανεπεξεργαστα δεδομένα LC-MS συνοψίζονται σε μια λίστα κορυφών. Η στατιστική ανάλυση αποσκοπεί στην ανίχνευση των κορυφών των οποίων τα επίπεδα έντασης μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ διακριτών βιολογικών ομάδων. Η στατιστική ανάλυση, εδώ, ποικίλει και αφορά ένα σύνολο αλγορίθμων και μοντέλων, ανάλογα με τον τύπο

της ανάλυσης (στοχευμένη ή μη στοχευμένη), το δειγματοχώρο, αλλά και τις ομάδες ή υπο-ομάδες υπό σύγκριση/μελέτη.⁶⁵



Σχήμα 11 Παράδειγμα χρωματογραφήματος δείγματος ορού από υγιή μάρτυρα (HC: μαύρο) και ασθενή με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) (CRC: κόκκινο).⁶⁸

9. Εφαρμογές LC-MS στην έρευνα για τον καρκίνο

9.1 Διάγνωση-Πρόγνωση-Πρόβλεψη Καρκίνου

Μεταξύ των εφαρμογών της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με την φασματομετρία μάζας (LC-MS), χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρόγνωση του καρκίνου του οισοφάγου. Το αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου (EAC) είναι μια ασθένεια που σπάνια θεραπεύεται, καθώς δεν μπορεί να γίνει εύκολα η διάγνυσή της σε πρώιμο στάδιο. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε⁶⁹, προσδιορίστηκε το μεταβολικό προφίλ με χρήση LC-MS σε δείγματα ορού από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου, οισοφάγο Barrett's με υψηλό βαθμό δυσπλασίας (BE με HGD), σε σύγκριση με υγιή άτομα, προκειμένου να εντοπιστούν βιοδείκτες, που σχετίζονται με τα αρχικά στάδια του EAC με στόχο τη βελτίωση της πρόγνωσης. Τα ληφθέντα αποτελέσματα έδειξαν ότι αρκετοί μεταβολίτες διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών κατηγοριών δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα γαλακτικού οξέος και καρνιτίνης ήταν υψηλότερα στα δείγματα των ασθενών με EAC, συγκριτικά με των υγιών, ενώ ήταν χαμηλότερα τα επίπεδα ορισμένων

αμινοξέων (βαλίνης, λευκίνης/ ισολευκίνης, μεθειονίνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης και 5-υδροξυτρυπτοφάνης). Όσον αφορά τα δείγματα των EAC ασθενών και των ασθενών υψηλού κινδύνου (BE με HGD), η μονομεταβλητή ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι επτά μεταβολίτες διέφεραν σημαντικά. Μεταξύ των δειγμάτων των υγιών και των ασθενών υψηλού κινδύνου, που αναλύθηκαν με LC-MS, μόνο ένας μεταβολίτης βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά, το πυρογλουταμικό οξύ. Η ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι τρεις κατηγορίες δειγμάτων μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους με καλή ακρίβεια. Η επιστημονική ομάδα της Xuemei Zeng⁷⁰ ανέλυσε δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα, συγκρίνοντάς τα με δείγματα υγιών, προκειμένου να εντοπιστούν υποψήφιοι βιοδείκτες σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι ερευνητές επιβεβαίωσαν ότι η μέθοδος της LC-MS, όταν επικυρωθεί, μπορεί να είναι χρήσιμη στη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Μια άλλη επιστημονική ομάδα (Bowers et al)⁷¹ με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας ανέλυσαν το μεταβολικό προφίλ από ορό ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) με υποκείμενη ηπατίτιδα C (HCV) και το συνέκριναν με το μεταβολικό προφίλ ασθενών με ηπατίτιδα C. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά, καθώς μπόρεσαν με ακρίβεια να διακρίνουν τις δύο κατηγορίες δειγμάτων και οι διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μεταξύ ατόμων υψηλού κινδύνου (άτομα με HCV) και ατόμων με ηπατοκυτταρικό καρκίνο έδειξαν ότι είναι πιθανό να εντοπιστεί πρώιμα ο κίνδυνος της ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος στους ασθενείς με ηπατίτιδα C. Στην ερευνητική εργασία των (Zhu et al)⁷² εφαρμόστηκε στοχευμένη τεχνική LC-MS για την ανάλυση μεταβολιτών σε σειριακά δείγματα ορού για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου από είκοσι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα πάνελ πέντε μεταβολιτών (σουκινικό οξύ, N2, 2-διμεθυλγλουανοσίνη, αδενίνη, κιτρικό οξύ και 1-μεθυλογλουανοσίνη) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την παρακολούθηση της κατάστασης της νόσου αυτών των ασθενών. Μια ακόμη επιστημονική ομάδα⁷³, επικεντρώθηκε στη διαφορική διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (BC) και του καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων (RCC). Το πείραμά τους βασίστηκε στην τεχνική της LC-MS για τον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ πλάσματος ασθενών με RCC, με BC και υγιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ευδιάκριτο διαχωρισμό μεταξύ RCC και BC. Επιπλέον, βρέθηκαν οκτώ μεταβολίτες που έδειξαν καλή προγνωστική ικανότητα για τους ασθενείς με BC, RCC, καθώς και διάκριση μεταξύ των υγιών και των δειγμάτων των ασθενών.

9.2 Αξιολόγηση ανταπόκρισης στη θεραπεία

Το 2014 χορηγήθηκαν σε είκοσι παχύσαρκες γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου 850 mg μετφορμίνης, ημερησίως και έως τέσσερις εβδομάδες πριν από τη χειρουργική σταδιοποίηση, ώστε να μελετηθεί η δράση του φαρμάκου. Λήφθηκαν δείγματα ορού πριν και μετά τη θεραπεία, καθώς και δείγματα όγκου, τα οποία συλλέχθηκαν μετά τη θεραπεία και αναλύθηκαν με την τεχνική LC-MS. Η μετφορμίνη φαίνεται να προκάλεσε έντονη μετατόπιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και του γλυκογόνου στον ορό και τους όγκους των γυναικών, που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και έτσι, προτάθηκε ως μια βιώσιμη θεραπεία για τον καρκίνο του ενδομητρίου, τουλάχιστον για παχύσαρκα άτομα.⁷⁴ Σε μία άλλη έρευνα⁷⁵, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική LC-MS για τη μελέτη των μηχανισμών ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας στην πλατίνα, στον καρκίνο των ωοθηκών. Ταυτοποιήθηκαν εκατόν ογδόντα μεταβολίτες με σημαντικές διαφορές ως συνάρτηση της ευαισθησίας/ αντίστασης, εκ των οποίων οι εβδομήντα αφορούν σε αύξηση τιμών και οι εκατόν εννέα σε μείωση, στα ανθεκτικά ως προς την πλατίνα κύτταρα. Το μονοπάτι που βρέθηκε ως το περισσότερο τροποποιημένο ήταν αυτό του μεταβολισμού της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Μια ακόμη έρευνα πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της ανθεκτικότητας της δανουροβικίνης σε κυτταρικές σειρές οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL) με υπερέκφραση της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (p-gp). Ακολουθήθηκε μη-στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με χρήση LC-MS για τη συγκριτική ανάλυση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα ακολουθούσαν ένα «επανασυντονισμένο» κεντρικό μεταβολισμό με μειωμένη εξάρτηση γλουταμίνης, σε συνδυασμό με υψηλότερη «ζήτηση» γλυκόζης, μεταβλητό ποσοστό β-οξειδωσης λιπαρών οξέων και μειωμένη ικανότητα πρόσληψης παντοθενικού οξέος⁷⁶

9.3 Αξιολόγηση Τοξικότητας

Οι Posocco και συν.⁷⁷, στηριζόμενοι στο ότι η φαρμακοκινητική θα μπορούσε να είναι ένας προσβάσιμος βιοδείκτης για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας μέσω παρακολούθησης επιπέδων φαρμάκου (TDM), ανέπτυξε μια νέα επικυρωμένη μέθοδο LC-MS/ MS για την ταυτόχρονη παρακολούθηση των συγκεντρώσεων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKIs) παλμποσικλίμπη (palbociclib) και ριμποσικλίμπη (ribociclib), καθώς και του αναστολέα αρωματάσης λετροζόλη (letrozole) στο πλάσμα γυναικών με καρκίνο του μαστού, οι οποίες

λαμβάνουν το σχήμα θεραπείας palbociclib-ribociclib-letrozole. Το σχήμα αυτό, ενδείκνυται για τη θεραπεία γυναικών με θετικό για ορμονικούς υποδοχείς (HR), αρνητικό για τον υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Η ερευνητική ομάδα προτείνει τη μέθοδο ως κατάλληλη για εφαρμογή στην κλινική πράξη, για τον προσδιορισμό των ασθενών, που κινδυνεύουν από τοξικότητα, λόγω υψηλής έκθεσης ή που ενδέχεται να παρουσιάσουν μη βέλτιστη αποτελεσματικότητα, λόγω χαμηλής έκθεσης. Έτερη επιστημονική ομάδα⁷⁸ ανέπτυξε μια μέθοδο LC-MS/MS για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της ενδογενούς ουρακίλης (U), της 5,6-διϋδροουρακίλης (UH2), της 5-φθοροουρακίλης (5-FU) και της διϋδρο-5-φθοροουρακίλης (5-FUH2) στο πλάσμα. Το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη (5-FU) χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία συμπαγών όγκων. Η απόκριση στη θεραπεία με 5-FU ποικίλει, με το 10-30% των ασθενών να εμφανίζουν σοβαρή τοξικότητα, η οποία εξηγείται εν μέρει από τη μειωμένη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της διϋδροπυριμιδίνης (DPD). Η ομάδα εφάρμοσε την αναλυτική μέθοδο σε πλάσμα δέκα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, οι οποίοι ελάμβαναν θεραπεία 5-FU. Τα αποτελέσματα που έλαβαν ήταν πολύ ενθαρρυντικά, καθώς η μέθοδος αποδείχθηκε κατάλληλη, τόσο για την ανάλυση των επιπέδων της 5-FU, όσο και για την ταυτοποίηση των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας 5-FU, πριν από την έναρξη της θεραπείας με τον χαρακτηρισμό της δραστηριότητας της DPD. Επιπρόσθετα, η επιστημονική ομάδα της Yahdiana⁷⁹ πραγματοποίησε έρευνα στην οποία συμμετείχαν 30 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, οι οποίες είχαν λάβει θεραπεία με δοξορουβικίνη (doxorubicin). Στόχος της έρευνας ήταν η ανάλυση αυτών των δειγμάτων με τη μέθοδο της LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της δοξορουβικίνης και της δοξορουβικινόλης. Η δοξορουβικίνη είναι ένα κυτταροτοξικό αντιβιοτικό, τύπου ανθρακυκλίνης, που χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικός παράγοντας. Η μακροχρόνια χρήση της θα μπορούσε να συσσωρεύσει τον μεταβολίτη της, τη δοξορουβικινόλη και να προκαλέσει καρδιομυοπάθεια, λόγω της καρδιοτοξικότητάς της. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος μπόρεσε με ακρίβεια να εντοπίσει τα επίπεδα των ζητούμενων ουσιών. Στη μελέτη των (Fernández-Peralbo *et al*)⁸⁰ καταδείχθηκε ότι η μέθοδος LC-MS/MS είναι αποτελεσματική για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση φαρμακευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά. Συγκεκριμένα, η ομάδα πραγματοποίησε μελέτη για τον προσδιορισμό πακλιταξέλης (paclitaxel) σε δείγματα δεκατριών γυναικών, που έπασχαν από περιτοναϊκή καρκινωμάτωση, ύστερα από θεραπεία με υπερθερμική ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία (HIPEC). Αναλύθηκαν δείγματα ορού

και πλάσματος πριν, αμέσως μετά και μία ώρα μετά τη θεραπεία με HIPEC, ενώ βιοψίες ελήφθησαν μία ώρα πριν και μετά τη HIPEC. Η πακλιταξέλη και οι μεταβολίτες της δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα πριν από τη χημειοθεραπεία, όπως επίσης και στα δείγματα ιστού μετά τη χημειοθεραπεία, γεγονός αναμενόμενο, δεδομένου ότι η πακλιταξέλη, σχεδόν, μεταβολίζεται στον περιτοναϊκό ιστό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συγκέντρωση της πακλιταξέλης στον ορό μειώθηκε μία ώρα μετά τη θεραπεία, σε σύγκριση με τα επίπεδα, που βρέθηκαν αμέσως μετά την ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία. Τα ευρήματα υπέδειξαν τη δυνατότητα της παρακολούθησης της φαρμακοκινητικής πορείας του φαρμάκου.

10. Σύγκριση μεθόδων NMR - MS

Τόσο η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, όσο και η φασματομετρία μάζας παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους, σημειώνεται ότι η τεχνική NMR παρουσιάζει υψηλότερη αναπαραγωγικότητα απ' ό,τι η τεχνική MS. Η αναπαραγωγικότητα, εξάλλου, είναι ένα από τα θεμελιώδη πλεονεκτήματα της τεχνικής NMR. Όσον αφορά την ευαισθησία, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της φασματομετρίας μάζας, αφού με την τεχνική αυτή μπορούν να ανιχνευθούν νανομοριακές συγκεντρώσεις πολύ εύκολα. Η ευαισθησία της τεχνικής NMR είναι χαμηλή, όμως, μπορεί να διορθωθεί με πολλαπλές σαρώσεις ή/και υψηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο. Η τεχνική MS διακρίνεται από πολύ μεγάλη εκλεκτικότητα. Ιδιαίτερα σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία, αποτελεί το απόλυτο εργαλείο προς στοχευμένη ανάλυση. Αντίθετα, στην τεχνική NMR, οι αλληλεπικαλύψεις των κορυφών από πολλούς ανιχνευόμενους μεταβολίτες αποτελούν μεγάλη πρόκληση. Για τη μεγιστοποίηση του αριθμού των ανιχνευόμενων μεταβολιτών απαιτούνται διαφορετικές μέθοδοι ιονισμού στην τεχνική MS, ενώ όσον αφορά τη τεχνική NMR, αυτή επιτρέπει σχετικά γρήγορη μέτρηση, όπου όλοι οι μεταβολίτες σε ανιχνεύσιμο επίπεδο συγκέντρωσης μπορούν να παρατηρηθούν σε ένα φάσμα. Ένα ακόμα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου NMR αποτελεί η ανάκτηση του δείγματος. Η τεχνική NMR είναι μη καταστροφική και ως εκ τούτου, διάφορες αναλύσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν στο ίδιο δείγμα. Αντίθετα, η μέθοδος MS είναι καταστροφική τεχνική και επομένως, το δείγμα δεν μπορεί να ανακτηθεί. Η τεχνική NMR είναι εγγενώς ποσοτική, καθώς η ένταση του σήματος είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση του μεταβολίτη. Η ένταση της γραμμής της μεθόδου MS, συχνά, δε

συσχετίζεται με τις συγκεντρώσεις του μεταβολίτη, καθώς η αποτελεσματικότητα του ιονισμού είναι, επίσης, καθοριστικός παράγοντας. Ανάλογα με τη φασματική ανάλυση που θα πραγματοποιηθεί, συνήθως λιγότεροι από 200 μεταβολίτες μπορούν να ανιχνευθούν και να αναγνωριστούν σε μία μέτρηση με την τεχνική NMR, σε αντίθεση με την τεχνική MS, με την οποία είναι δυνατόν να ανιχνευθούν χιλιάδες διαφορετικοί μεταβολίτες και να αναγνωριστούν αρκετές εκατοντάδες. Συνοψίζοντας, η φασματοσκοπία NMR, συνήθως, επιλέγεται για την ιχνηλάτιση του ολικού μεταβολομικού προφίλ, όμως έχει το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας, γεγονός που περιορίζει τον αριθμό των ενώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν στο υπό-μελέτη σύστημα. Από την άλλη, η φασματομετρία μάζας είναι η καλύτερη τεχνική για στοχευμένες αναλύσεις παρουσιάζοντας εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία (nM-pM). Όσον αφορά το κόστος, η τεχνική NMR έχει χαμηλότερο κόστος ανά δείγμα σε σύγκριση με την τεχνική MS, παρόλο που η οργανολογία της φασματοσκοπίας NMR είναι πολύ πιο ακριβή απ' ό,τι της φασματομετρίας μάζας.^{81,82}

11. Συμπληρωματικότητα μεθόδων NMR - MS

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η φασματομετρία μάζας είναι εξαιρετικά συμπληρωματικές. Ο συνδυασμός αυτών των δύο προσεγγίσεων είναι βελτιώνει τη συνολική ποιότητα μιας μελέτης και μεγεθύνει την ερευνητική κάλυψη του μεταβολώματος.⁸⁹ Επιπλέον, η χρήση συνδυασμένων τεχνικών χημειοπληροφορικής σε σύνολα δεδομένων MS και NMR μπορεί να διευρύνει το ληφθέν πληροφοριακό περιεχόμενο. Η σύζευξη της χρωματογραφίας ή και της φασματομετρίας μάζας με NMR (LC-NMR και LC-NMR-MS) αποτελεί μια νέα προσέγγιση με εφαρμογές κυρίως στο μεταβολισμό των φαρμάκων και στη φαρμακοκινητική. Ακόμη, ο συνδυασμός των τεχνικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση ισοτοπικά επισημασμένων μεταβολιτών. Η ισοτοπική επισήμανση με χρήση tags (¹⁵N-αιθανολαμίνη) είναι μια νέα προσέγγιση στη μεταβολομική που επιτρέπει την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση αζωτούχων μεταβολιτών που περιέχουν καρβοξυλομάδες μέσω 2D ¹H-¹⁵N HSQC NMR οι οποίες κανονικά δεν ανιχνεύονται σε υδατικό διάλυμα με NMR.^{83,32}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΟΛΙΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑΣ

12. Επικύρωση Βιοδεικτών

Τα κύρια βήματα που είναι απαραίτητα, ώστε να φτάσει ένας βιοδείκτης στην κλινική πράξη είναι τρία⁸⁴:

- Επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων
- Κλινική επικύρωση του προς δοκιμή βιοδείκτη, και απόδειξη της κλινικής του σημασίας
- Κλινική Εφαρμογή

Εκτός από αυτά τα τρία βήματα, όλες οι μελέτες βιοδεικτών θα πρέπει να καταγράφονται με λεπτομερή και διαφανή τρόπο, χρησιμοποιώντας δημοσιευμένες λίστες ελέγχου και οδηγίες. Τέλος, όλες οι μελέτες βιοδεικτών, που σχετίζονται με την απόδειξη της κλινικής τους αξίας θα πρέπει να καταγραφούν πριν από την έναρξη της μελέτης.⁸⁴

12.1 Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων

Καθώς ενδέχεται να υπάρχουν πολλαπλές μέθοδοι και τεχνικές προσδιορισμού που χρησιμοποιούν διαφορετικές μορφές δειγμάτων για την ανίχνευση ενός βιοδείκτη, είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί και να επικυρωθεί κάθε μια συγκεκριμένη ανάλυση που θα χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Ο όρος «Επικύρωση βιοαναλυτικής μεθόδου» αναφέρεται στις απαραίτητες διαδικασίες, που αποδεικνύουν ότι η αναλυτική μέθοδος είναι κατάλληλη να εφαρμοστεί για το σκοπό για τον οποίο έχει αναπτυχθεί. Οι κατηγορίες επικύρωσης είναι τρεις⁸⁴:

1. Η πλήρης (Full Validation), η οποία απαιτείται κατά την ανάπτυξη μιας νέας βιοαναλυτικής μεθόδου
2. Η μερική (Partial Validation), μετά από τροποποίηση μιας, ήδη επικυρωμένης βιοαναλυτικής μεθόδου, έπειτα από αλλαγή στο όργανο ή στο λογισμικό, καθώς και κατόπιν μικρών μεταβολών στις συνθήκες προεπεξεργασίας ή αποθήκευσης του δείγματος ή στην ανάλυση

3. Η διασταυρούμενη (Cross-Validation), η οποία αποτελεί σύγκριση των παραμέτρων επικύρωσης, όταν δύο ή περισσότερες βιοαναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε μια μελέτη

Για την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων, απαιτείται ο έλεγχος ορισμένων παραμέτρων, όπως η ακρίβεια, η πιστότητα, η γραμμικότητα, η ειδικότητα/εκλεκτικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η ευαισθησία, η σταθερότητα και τέλος, η ανάκτηση.^{85,86} Η ακρίβεια αφορά την προσέγγιση της προσδιοριζόμενης τιμής ως προς την πραγματική. Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, bias) μεταξύ του μέσου όρου \bar{x} (mean) μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής μ (true/correct) της μετρούμενης ποσότητας. Το σφάλμα μίας μέτρησης έχει δύο συνιστώσες: το τυχαίο σφάλμα ($x_i - \bar{x}$) (random error), όπου x_i μεμονωμένη μέτρηση και το συστηματικό σφάλμα ($\bar{x} - \mu$) (bias).^{85,86} Ως πιστότητα ορίζεται η προσέγγιση των επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών του ίδιου δείγματος μεταξύ τους. Δηλαδή, ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των μεμονωμένων αποτελεσμάτων των δοκιμών, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται επανειλημμένα σε πολλά δείγματα. Υπολογίζεται, μετρώντας μια σειρά πρότυπων δειγμάτων ή με την ανάλυση σειράς δειγμάτων πολλαπλών δειγματοληψιών από ομοιογενή παρτίδα. Από τη μετρούμενη τυπική απόκλιση (SD) και τις μέσες τιμές, υπολογίζεται η ακρίβεια ως σχετική τυπική απόκλιση. Υποσύνολο της πιστότητας αποτελεί η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα. Με τον όρο επαναληψιμότητα εννοούμε το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Με το όρο αναπαραγωγιμότητα εννοούμε το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων μετρήσεων, που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή, διαφορετική συσκευή, ίδιο ή διαφορετικά εργαστήρια, και/ή διαφορετικούς χρόνους.⁸⁵ Η εκλεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η ικανότητά της να μετρά με ακρίβεια, μόνο αυτό για το οποίο αναπτύσσεται, ανεξάρτητα από την παρουσία παρεμβολών, που αναμένεται να υπάρχουν στο δείγμα. Στην πράξη, ελέγχεται η παρουσία/απουσία παρεμποδίσεων σε τυφλά δείγματα, υποστρώματα, που δεν περιέχουν το εξεταζόμενο βιομόριο. Ως ευαισθησία χαρακτηρίζεται η ικανότητα της μεθόδου να αντιλαμβάνεται μικρές μεταβολές της συγκέντρωσης ή της απόλυτης ποσότητας και εκφράζεται με την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.^{85,86} Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) ορίζεται ως το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης παραμέτρου, που μπορεί να προσδιορισθεί αξιόπιστα. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation) αποτελεί την ελάχιστη

συγκέντρωση προσδιοριζόμενης ουσίας, που μπορεί να διακριθεί από τη μηδενική συγκέντρωση. Η μελέτη της σταθερότητας είναι μια σημαντική παράμετρος, καθώς τις περισσότερες φορές τα δείγματα δεν αναλύονται αμέσως. Έτσι, επιβάλλεται να ελέγχεται η μέθοδος για τη σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Αυτό συμβαίνει, γιατί το δείγμα μπορεί να αλλοιωθεί πριν την ανάλυση, είτε στο στάδιο επεξεργασίας ή καθαρισμού του δείγματος, είτε ακόμα και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Έτσι, ο έλεγχος της σταθερότητας του συστατικού στο βιολογικό υπόστρωμα πρέπει να γίνεται σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης και σε διάφορα στάδια: κατά τη δειγματοληψία, κατά την αποθήκευση του δείγματος και κατά την ανάλυση.⁸⁷

Η αναγκαιότητα για επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων προέρχεται από την ανάγκη συμμόρφωσης ως προς τις απαιτήσεις της Νομοθεσίας και των διάφορων Κανονιστικών Επιτροπών. Έτσι, διεθνείς οργανισμοί, όπως οι FDA (Food Drug Administration), EMA (Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων) και ICH (International Conference on Harmonization), καθώς και διεθνώς αναγνωρισμένες φαρμακοποιίες, όπως η Διεθνής Φαρμακοποιία (Ph Int), η Αμερικανική Φαρμακοποιία (USP), η Ιαπωνική (JP), η Ευρωπαϊκή (EP) και η Βρετανική (BP), έχουν θεσπίσει οδηγίες για την επικύρωση των αναλυτικών και βιοαναλυτικών μεθόδων.⁸⁶ Άλλοι παράμετροι, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν, αποτελούν η ταχύτητα της ανάλυσης, η απόδοση δειγμάτων, η δυνατότητα αυτοματοποίησης, η ανθεκτικότητα, η φορητότητα του οργάνου, η συμμόρφωση με τις αρχές πράσινης χημείας και τέλος, το κόστος.⁸⁷

12.2 Κλινική Επικύρωση Βιοδεικτών

Το στάδιο της κλινικής επικύρωσης έχει τη μορφή κλινικής μελέτης, στην οποία αξιολογείται η ικανότητα του βιοδείκτη να παρουσιάσει σημαντικό κλινικό αποτέλεσμα. Η κλινική επικύρωση διασφαλίζει ότι τα αποτελέσματα του βιοδείκτη διαχωρίζουν επιτυχώς τα άτομα σε διαφορετικές ομάδες και αποτελεί πιο απαιτητική και πιο χρονοβόρα διαδικασία απ' ό,τι η αναλυτική επικύρωση.⁸⁸

Αρχικά, θα πρέπει να καθοριστεί το συγκεκριμένο πλαίσιο στο οποίο ο νέος βιοδείκτης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, δηλαδή για ποιόν τύπο καρκίνου και αν ο βιοδείκτης θα χρησιμοποιείται κατά τη σάρωση, τη διάγνωση, τη πρόγνωση, τη πρόβλεψη, τη θεραπεία ή την παρακολούθηση του ασθενούς. Το στάδιο αυτό έχει μεγάλη σημασία, καθώς προσδιορίζει τον πληθυσμό των ατόμων,

που θα εξεταστούν κατά τη κλινική επικύρωση. Συνεπώς, θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα από άτομα, σε σχέση με την κατάσταση της νόσου της ομάδας-στόχου, στην οποία προορίζεται να χρησιμοποιηθεί ο βιοδείκτης. Τα κριτήρια επικύρωσης καθορίζονται από τη φύση της ερώτησης, που προορίζεται να απαντήσει ο βιοδείκτης. Οι υποψήφιοι βιοδείκτες μπορούν να επικυρωθούν, εξετάζοντας τους ιστούς και τα αποτελέσματα μιας σχετικής μελέτης που έχει ήδη διεξαχθεί ή με τη διεξαγωγή μιας νέας. Εάν η μελέτη έχει ήδη διεξαχθεί ή τα δεδομένα έχουν ήδη συλλεχθεί εκτός πλαισίου κάποιας μελέτης (π.χ. αρχεία ασθενών), αυτή ονομάζεται αναδρομική. Εάν δεν υπάρχουν ακόμα διαθέσιμα τα αποτελέσματα της μελέτης και αναλυθούν αφού συγκεντρωθούν, τότε αυτή ονομάζεται προοπτική μελέτη. Μια άλλη σημαντική έννοια στον τομέα της επικύρωσης των βιοδεικτών έχει να κάνει με τα οφέλη και τα μειονεκτήματα μιας δοκιμής στο πλαίσιο της κλινικής χρήσης. Αυτή είναι γνωστή ως κλινική χρησιμότητα. Οι δοκιμές των βιοδεικτών θα πρέπει να παρέχουν κάποιο είδος οφέλους στους ασθενείς, προκειμένου να έχουν κλινική χρησιμότητα. Επιπλέον, τα οφέλη της δοκιμής θα πρέπει να υπερτερούν των μειονεκτημάτων της και να είναι εφικτή για χρήση στην κλινική πρακτική.^{84,85,88}

12.3 Κλινική Εφαρμογή Βιοδεικτών

Μετά την αναλυτική επικύρωση και την κλινική επικύρωση, ακολουθεί το στάδιο της κλινικής εφαρμογής. Αυτή η φάση περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα βασικά στοιχεία: την έγκριση ρυθμιστικών οργανισμών, την εμπορευματοποίηση, την κάλυψη από εταιρείες ασφάλισης υγείας και την ενσωμάτωση στις οδηγίες κλινικής πρακτικής.⁸⁹ Η ρυθμιστική πορεία για τους βιοδείκτες και οι δοκιμές που τους αναλύουν είναι πολύπλοκες και διαφέρουν από τη διαδικασία έγκρισης φαρμάκων και θεραπευτικών. Στις ΗΠΑ, η πορεία προς την έγκριση από τον FDA εξαρτάται από την προβλεπόμενη χρήση τους. Συχνότερα, θεωρούνται *in vitro* διαγνωστικά (IVD) προϊόντα. Ο FDA ορίζει ως *in vitro* διαγνωστικά προϊόντα τις «δοκιμές που μπορούν να ανιχνεύσουν ασθένειες, καταστάσεις, ή λοιμώξεις, που ορισμένες από αυτές χρησιμοποιούνται σε εργαστήριο ή σε άλλο επαγγελματία υγείας, ενώ άλλες προορίζονται για χρήση από τους καταναλωτές στο σπίτι».⁸⁴

Τα IVD χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με την προβλεπόμενη χρήση τους και τον κίνδυνο ως προς τους ασθενείς. Αυτά της κατηγορίας I είναι χαμηλού κινδύνου και συνήθως,

εξαιρούνται από επανεξέταση από τον FDA, προτού προχωρήσουν στην αγορά, αν και η κατασκευαστική εταιρεία πρέπει να καταχωρήσει τη δοκιμασία στο FDA. Τα IVD κατηγορίας II είναι μέτριου κινδύνου και αξιολογούνται από τον FDA μέσω της υποβολής προ-αγοράς 510 (k). Για τα IVD αυτής της κατηγορίας πρέπει να υποβάλλονται αποδεικτικά στοιχεία, που να επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για μια νόμιμα εμπορευόμενη συσκευή, σύμφωνα τον FDA. Τα IVD κατηγορίας III είναι αυτά που μπορεί να προκαλέσουν σημαντικούς κινδύνους στους ασθενείς, όταν χρησιμοποιούνται. Απαιτείται η επιβεβαίωση υποβολής αποδεικτικών στοιχείων ότι η συσκευή έχει υποστεί αναλυτική και κλινική επικύρωση και ότι είναι ασφαλές και αποτελεσματικό προϊόν για τη φροντίδα των ασθενών. Πρόσθετες ενδείξεις κλινικής χρησιμότητας δεν απαιτούνται προς το παρόν, εκτός εάν πρόκειται για συνοδούς βιοδείκτες, για τους οποίους απαιτείται η έγκριση του συνοδού θεραπευτικού. Στην Ευρώπη, οι βιοδείκτες για κλινική χρήση απαιτούν το σήμα «Conformite' Europeenne» (CE), το οποίο αντιπροσωπεύει τη δήλωση του κατασκευαστή ότι το προϊόν πληροί τις απαιτήσεις των εφαρμοστέων οδηγιών της Ευρωπαϊκής Κοινότητας. Η σήμανση CE μπορεί να ληφθεί ,είτε από αυτο-πιστοποίηση από τον κατασκευαστή ή με υποβολή στον κατάλληλο φορέα σε χώρα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ). Αν και η ΕΕ κατατάσσει αυτή τη στιγμή τα συνοδά διαγνωστικά ως συσκευές *in vitro* χαμηλού κινδύνου, βρίσκεται υπό εξέταση η νομοθεσία σχετικά με τη έγκρισή τους.⁸⁴ Οι δοκιμές θα πρέπει να διεξάγονται σε διαγνωστικά εργαστήρια πιστοποιημένα με CLIA και σύμφωνα με τους κανονισμούς. Η κάλυψη από την ασφάλιση υγείας είναι ζωτικής σημασίας για τους γιατρούς, ώστε να χορηγήσουν τις εξετάσεις, αλλά και τον πληθυσμό.⁸⁹

13. Οικονομικά Θέματα Υγείας

Η διαστρωμάτωση του πληθυσμού των ασθενών με τη χρήση συνοδών διαγνωστικών μπορεί να συμβάλλει στην οικονομία μέσω της αποφυγής θεραπείας σε ασθενείς που είναι απίθανο να επωφεληθούν. Αυτό το γεγονός μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας της θεραπείας, ανάλογα με το κόστος της διαγνωστικής εξέτασης, που σχετίζεται με τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ασθενών για θεραπεία. Τα συνοδά διαγνωστικά είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας στη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας της θεραπείας, όταν απαιτείται μια ακριβή διαγνωστική δοκιμασία ή/και όταν μόνο ένα μικρό ποσοστό των ασθενών που εξετάστηκαν αναγνωρίζονται ως επιλέξιμοι για θεραπεία.⁹⁰

Παρά αυτές τις πιθανές αποδόσεις, η επιστροφή των χρημάτων από τους ασφαλιστικούς φορείς είναι μια πρόκληση. Ενώ οι ρυθμιστικοί φορείς είναι ανοιχτοί στα φάρμακα ακριβείας, οι οργανισμοί αποζημίωσης είναι λιγότερο αποδεκτοί. Από κανονιστικής άποψης, η τρέχουσα κατάσταση είναι πολύ λεπτή, διότι οι ρυθμιστικές αρχές, οι οποίες στην πραγματικότητα εξακολουθούν να επιτρέπουν τη χρήση δοκιμών χαμηλής απόδοσης, έρχονται αντιμέτωπες με την ανάγκη εισαγωγής επικυρωμένων δοκιμών, που ανταποκρίνονται στις θεραπευτικές προσδοκίες των όλο και περισσότερα πολυάριθμων και ακριβών φαρμάκων. Οι καταστάσεις αυτές δεν μπορούν να συνεχίσουν να αγνοούνται, ενόψει της αυξανόμενης πολυπλοκότητας του θεραπευτικού σεναρίου, που οδηγείται από τη συνεχή ανακάλυψη νέων μοριακών στόχων για μια βέλτιστη θεραπεία, με στόχο, όσο το δυνατόν περισσότερο την κάλυψη των αναγκών επιλεγμένων υποπληθυσμών εντός του ίδιου νοσολογικού πλαισίου. Επομένως, εάν από τη μία πλευρά το συνοδό διαγνωστικό (CDx) που αναπτύχθηκε ταυτόχρονα με ειδικά στοχευμένο φάρμακο, αυξάνει τις ελπίδες για απόκτηση εξατομικευμένης θεραπείας, από την άλλη πλευρά θα πρέπει να βελτιωθεί η κανονιστική κατάσταση, τόσο στις ΗΠΑ, όσο και στην Ευρώπη, αλλά και παγκόσμια. Στην πραγματικότητα, το παγκόσμιο κανονιστικό πλαίσιο σχετικά με τις μοριακές διαγνωστικές δοκιμές – συμπεριλαμβανομένων των CDx - είναι επί του παρόντος μάλλον ασυνεπές και εξακολουθούν να υπάρχουν ζητήματα, σχετικά με την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα τέτοιων δοκιμών. Παρά τις διάφορες πρωτοβουλίες που έχουν αναλάβει οι ρυθμιστικές αρχές, εξακολουθεί να υπάρχει σαφής ανάγκη για μεγαλύτερες προσπάθειες, ενδεχομένως, υποστηριζόμενες από τη δημιουργία τεχνικών επιτροπών, που είναι επιφορτισμένες με τη διατύπωση υποθέσεων και προτάσεων, που αποσκοπούν στο να κάνουν το ταυτόχρονο μάρκετινγκ διαγνωστικών δοκιμών υψηλής απόδοσης, συμβατό με αυτό των φαρμάκων, των οποίων η ανάγκη και η παρουσία στην αγορά είναι πιο εμφανής καθημερινά.⁹¹

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Οι βιοδείκτες αποτελούν πολύτιμα εργαλεία ταυτοποίησης, ανεξάρτητα από την ιεραρχική τους προέλευση, για την αποκάλυψη φαινοτυπικών ιδιοτήτων σε ένα βιολογικό σύστημα. Στο πλαίσιο της ογκολογίας ακριβείας και των ομικών τεχνολογιών, η μεταβολομική δύναται να ενδυναμώσει τη μελέτη του φαινοτύπου του καρκίνου και κατά συνέπεια, τη δημιουργία συνοδών βιοδεικτών και κατ' επέκταση, συνοδών διαγνωστικών.

Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια που περιορίζουν την εισαγωγή εξατομικευμένων φαρμάκων για τον καρκίνο είναι ότι ο περιορισμένος αριθμός βιοδεικτών, που έχουν αναπτυχθεί και βρίσκεται σε κλινική χρήση, σήμερα. Βέβαια, οι εξελίξεις στο πεδίο των αναλυτικών τεχνικών στη μεταβολομική μέχρι στιγμής είναι αρκετά ικανοποιητικές. Αν και προς το παρόν, η μεταβολομική βρίσκεται στο στάδιο της έρευνας, μελλοντικά είναι πάρα πολύ πιθανό να καταφέρει να εισέλθει στην κλινική πράξη και ιδιαίτερα στο πεδίο της ογκολογίας, αφού οι τρέχουσες κλινικές μελέτες παρουσιάζονται πολύ ενθαρρυντικές.

Αν και η διαδικασία ανάπτυξης ενός κλινικά χρήσιμου βιοδείκτη είναι μια μακρά και δαπανηρή διαδικασία, η οποία απαιτεί την πολυεπιστημονική συνεργασία ακαδημαϊκών ερευνητών, νοσοκομειακών κλινικών, βιοιατρικών επιστημόνων και βιοστατιστικών, αυτά τα εμπόδια τελικά είναι μηδαμινής σημασίας, μπροστά στην ικανοποίηση της ανάπτυξης ενός νέου συνοδού διαγνωστικού για τους ογκολογικούς ασθενείς, που όχι μόνο θα ενισχύσει την ποιότητα της ζωής τους, αλλά και θα συμβάλει στην αντιμετώπιση μιας τόσο σοβαρής νόσου, όπως είναι ο καρκίνος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kamel HFM, Al-Amodi HSB. Cancer Biomarkers. In: *Role of Biomarkers in Medicine*. InTech; 2016. doi:10.5772/62421
2. Nalley C. The Role of Companion Diagnostics in Oncology Care. *Oncology Times*. 2017;39(9):24-26. doi:10.1097/01.COT.0000516748.21023.cf
3. Jakka S, Rossbach M. An economic perspective on personalized medicine. *HUGO Journal*. 2013;7(1):1-6. doi:10.1186/1877-6566-7-1
4. Rosenbaum JN, Weisman P. The Evolving Role of Companion Diagnostics for Breast Cancer in an Era of Next-Generation Omics. *American Journal of Pathology*. 2017;187(10):2185-2198. doi:10.1016/j.ajpath.2017.04.021
5. Myers MB. Targeted therapies with companion diagnostics in the management of breast cancer: Current perspectives. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2016;9:7-16. doi:10.2147/PGPM.S56055
6. FDA approves liquid biopsy NGS companion diagnostic test for multiple cancers and biomarkers | FDA. Accessed March 11, 2021. <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-liquid-biopsy-ngs-companion-diagnostic-test-multiple-cancers-and-biomarkers>
7. Bollag G, Tsai J, Zhang J, et al. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(11):873-886. doi:10.1038/nrd3847
8. Simon R. Drug-Diagnostics Co-Development in Oncology. *Frontiers in Oncology*. 2013;3:315. doi:10.3389/fonc.2013.00315
9. Jørgensen JT. The drug-diagnostic codevelopment model. In: *Companion and Complementary Diagnostics: From Biomarker Discovery to Clinical Implementation*.

- Elsevier; 2019:11-25. doi:10.1016/B978-0-12-813539-6.00002-X
10. Falconi A, Lopes G, Parker JL. Clinical trial risk reduction in non-small cell lung cancer through the use of biomarkers and receptor-targeted therapies. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15_suppl):8040-8040. doi:10.1200/jco.2013.31.15_suppl.8040
 11. Hersom M, Jørgensen JT. Companion and complementary diagnostics-focus on PD-L1 expression assays for PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2018;40(1):9-16. doi:10.1097/FTD.0000000000000460
 12. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(6):463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
 13. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*. 2012;6(2):140-146. doi:10.1016/j.molonc.2012.01.010
 14. Maruvada P, Wang W, Wagner PD, Srivastava S. Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis. *BioTechniques*. 2005;Suppl:9-15. doi:10.2144/05384su04
 15. Kamel HFM, Al-Amodi HSB. Cancer Biomarkers. In: *Role of Biomarkers in Medicine*. InTech; 2016. doi:10.5772/62421
 16. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Translational Cancer Research*. 2015;4(3):256-269. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04
 17. Araújo AM, Carvalho M, Carvalho F, Bastos M de L, Guedes de Pinho P. Metabolomic approaches in the discovery of potential urinary biomarkers of drug-induced liver injury (DILI). *Critical Reviews in Toxicology*. 2017;47(8):633-649. doi:10.1080/10408444.2017.1309638
 18. Chen Z, Li Z, Li H, Jiang Y. Metabolomics: A promising diagnostic and therapeutic implement for breast cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2019;12:6797-6811. doi:10.2147/OTT.S215628
 19. Cho WCS. *An Omics Perspective on Cancer Research*. (Cho WCS, ed.). Springer Netherlands; 2010. doi:10.1007/978-90-481-2675-0

20. Oliveira AP, Jewett MC, Nielsen J. From gene expression to metabolic fluxes. In: *Introduction to Systems Biology*. Humana Press; 2007:37-66. doi:10.1007/978-1-59745-531-2_3
21. O'Connell TM. Recent advances in metabolomics in oncology. *Bioanalysis*. 2012;4(4):431-451. doi:10.4155/bio.11.326
22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
23. Aboud OA, Weiss RH. New opportunities from the cancer metabolome. *Clinical Chemistry*. 2013;59(1):138-146. doi:10.1373/clinchem.2012.184598
24. Phan LM, Yeung SCJ, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biology and Medicine*. 2014;11(1):1-19. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001
25. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A. Mammalian cell metabolomics: Experimental design and sample preparation. *Electrophoresis*. 2013;34(19):2762-2775. doi:10.1002/elps.201200605
26. Züllig T, Zandl-Lang M, Trötz Müller M, Hartler J, Plecko B, Köfeler HC. A metabolomics workflow for analyzing complex biological samples using a combined method of untargeted and target-list based approaches. *Metabolites*. 2020;10(9):1-12. doi:10.3390/metabo10090342
27. Cortes M, García-Cañaveras JC, Pareja E, Lahoz A. Liver Transplantation Biomarkers in the Metabolomics Era. In: Springer, Dordrecht; 2017:99-128. doi:10.1007/978-94-007-7675-3_42
28. Θ. Μαυρομούστακος ι. Μ. Αρχές και εφαρμογές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην ιατρική, φαρμακευτική χημεία, βιοχημεία, χημεία τροφίμων και ποτών. Γιάννης Β. Παρισιάνος. Published 2006. Accessed March 12, 2021. <https://www.bookworld.gr/gr/book/bkid/150844/nmr-arches-kai-efarmoges-fasmatoskopias-purinikou-magnitikou-suntonismou-stin-iatriki-farmakeutiki-chimeia-biochimeia-chimeia-trofimon-kai-poton>

29. Li T, Deng P. Nuclear Magnetic Resonance technique in tumor metabolism. *Genes and Diseases*. 2017;4(1):28-36. doi:10.1016/j.gendis.2016.12.001
30. Wider G. 5.2. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer Design. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Vol 32. ; 1983:373-391. doi:10.1016/S0076-695X(08)60078-2
31. J. Ellinger J, A. Chylla R, L. Ulrich E, L. Markley J. Databases and Software for NMR-Based Metabolomics. *Current Metabolomics*. 2013;1(1):28-40. doi:10.2174/2213235x11301010028
32. Emwas AH, Roy R, McKay RT, et al. Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*. 2019;9(7). doi:10.3390/metabo9070123
33. De Castro F, Benedetti M, Del Coco L, Fanizzi FP. NMR-based metabolomics in metal-based drug research. *Molecules*. 2019;24(12). doi:10.3390/molecules24122240
34. Ranjan R, Sinha N. Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics for cancer research. *NMR in Biomedicine*. 2019;32(10):e3916. doi:10.1002/nbm.3916
35. Zhang L, Hatzakis E, Patterson AD. NMR-Based Metabolomics and Its Application in Drug Metabolism and Cancer Research. *Current Pharmacology Reports*. 2016;2(5):231-240. doi:10.1007/s40495-016-0067-9
36. Gogiashvili M, Nowacki J, Hergenröder R, Hengstler JG, Lambert J, Edlund K. HR-MAS NMR based quantitative metabolomics in breast cancer. *Metabolites*. 2019;9(2). doi:10.3390/metabo9020019
37. Shaffer RE. Multi- and Megavariate Data Analysis. Principles and Applications, I. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold and S. Wold, Umetrics Academy, Umeå, 2001, ISBN 91-973730-1-X, 533pp. *Journal of Chemometrics*. 2002;16(5):261-262. doi:10.1002/cem.713
38. Ebbels TMD, Cavill R. Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2009;55(4):361-374. doi:10.1016/j.pnmrs.2009.07.003

39. Roberts MJ, Schirra HJ, Lavin MF, Gardiner RA. NMR-based metabolomics: global analysis of metabolites to address problems in prostate cancer. Cervical, Breast and Prostate Cancer. In: iConcept Press, ed. iConcept Press; 2014:1-43.
40. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: A review. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(2):431-440. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1059
41. Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, et al. MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007;104(2):181-189. doi:10.1007/s10549-006-9400-z
42. Jobard E, Pontoizeau C, Blaise BJ, Bachelot T, Elena-Herrmann B, Trédan O. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer. *Cancer Letters*. 2014;343(1):33-41. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.011
43. Vahabi F, Sadeghi S, Arjmand M, et al. Staging of colorectal cancer using serum metabolomics with ¹H NMR spectroscopy. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017;20(7):836-841. doi:10.22038/ijbms.2017.9022
44. Jiménez B, Mirnezami R, Kinross J, et al. ¹H HR-MAS NMR spectroscopy of tumor-induced local metabolic “field-effects” enables colorectal cancer staging and prognostication. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(2):959-968. doi:10.1021/pr3010106
45. Wang H, Wang L, Zhang H, et al. ¹H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue. *Molecular Cancer*. 2013;12(1):121. doi:10.1186/1476-4598-12-121
46. Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, et al. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*. 2009;5(3):292-301. doi:10.1007/s11306-008-0151-1
47. Carrola J, Rocha CM, Barros AS, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabolomics of urine. In: *Journal of Proteome Research*. Vol 10. J Proteome Res; 2011:221-230. doi:10.1021/pr100899x

48. Duarte IF, Rocha CM, Barros AS, et al. Can nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy reveal different metabolic signatures for lung tumours? *Virchows Archiv.* 2010;457(6):715-725. doi:10.1007/s00428-010-0993-6
49. Berker Y, Vandergrift LA, Wagner I, et al. Magnetic Resonance Spectroscopy-based Metabolomic Biomarkers for Typing, Staging, and Survival Estimation of Early-Stage Human Lung Cancer. *Scientific Reports.* 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-46643-5
50. Yang Y, Li C, Nie X, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *Journal of Proteome Research.* 2007;6(7):2605-2614. doi:10.1021/pr070063h
51. Gao H, Lu Q, Liu X, et al. Application of ¹H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Science.* 2009;100(4):782-785. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01086.x
52. Nahon P, Amathieu R, Triba MN, et al. Identification of serum proton NMR metabolomic fingerprints associated with hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(24):6714-6722. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1099
53. Chen Y, Zhou J, Li J, Feng J, Chen Z, Wang X. Plasma metabolomic analysis of human hepatocellular carcinoma: Diagnostic and therapeutic study. *Oncotarget.* 2016;7(30):47332-47342. doi:10.18632/oncotarget.10119
54. Li T, Deng P. Nuclear Magnetic Resonance technique in tumor metabolism. *Genes and Diseases.* 2017;4(1):28-36. doi:10.1016/j.gendis.2016.12.001
55. Yang DO, Xu J, Huang H, Chen Z. Metabolomic profiling of serum from human pancreatic cancer patients Using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2011;165(1):148-154. doi:10.1007/s12010-011-9240-0
56. Zheng H, Ji J, Zhao L, et al. Prediction and diagnosis of renal cell carcinoma using nuclear magnetic resonance-based serum metabolomics and self-organizing maps. *Oncotarget.*

- 2016;7(37):59189-59198. doi:10.18632/oncotarget.10830
57. Falegan OS, Ball MW, Shaykhutdinov RA, et al. Urine and serum metabolomics analyses may distinguish between stages of renal cell carcinoma. *Metabolites*. 2017;7(1). doi:10.3390/metabo7010006
 58. Lodi A, Tiziani S, Khanim FL, et al. Proton NMR-Based Metabolite Analyses of Archived Serial Paired Serum and Urine Samples from Myeloma Patients at Different Stages of Disease Activity Identifies Acetylcarnitine as a Novel Marker of Active Disease. Massiah M, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56422. doi:10.1371/journal.pone.0056422
 59. Palmnas MSA, Vogel HJ. The future of NMR Metabolomics in cancer therapy: Towards personalizing treatment and developing targeted drugs? *Metabolites*. 2013;3(2):373-396. doi:10.3390/metabo3020373
 60. Jeelani S, Jagat Reddy RC, Maheswaran T, Asokan GS, Dany A, Anand B. Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2014;6(SUPPL. 1). doi:10.4103/0975-7406.137249
 61. Backshall A, Sharma R, Clarke SJ, Keun HC. Pharmacometabonomic profiling as a predictor of toxicity in patients with inoperable colorectal cancer treated with capecitabine. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(9):3019-3028. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2474
 62. Theodoridis G, Girousi S, Zachariadis G, et al. Κεφάλαιο 12 : Φασματομετρία μάζας. In: *Βιοαναλυτική Χημεία*. Εκδόσεις Κάλλιπος; 2016:1-13. <http://hdl.handle.net/11419/3677>
 63. Baghel US, Singh A, Singh D, Sinha M. Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. In: *Spectroscopic Analyses - Developments and Applications*. InTech; 2017. doi:10.5772/intechopen.70655
 64. Schaeffer-Reiss C. A brief summary of the different types of mass spectrometers used in proteomics. *Methods in Molecular Biology*. 2008;484:3-16. doi:10.1007/978-1-59745-398-1_1
 65. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW. LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*. 2012;8(2):470-481. doi:10.1039/c1mb05350g

66. Amir Ashraf S, Nazir S, Adnan M, Rashid Azaz Ahmad Azad Z. UPLC-MS: An Emerging Novel Technology and Its Application in Food Safety. In: *Analytical Chemistry - Advancement, Perspectives and Applications [Working Title]*. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.92455
67. Katajamaa M, Orešič M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158(1-2):318-328. doi:10.1016/j.chroma.2007.04.021
68. Martín-Blázquez A, Díaz C, González-Flores E, et al. Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-55952-8
69. Zhang J, Bowers J, Liu L, et al. Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by LC-MS and NMR methods. *PLoS ONE*. 2012;7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030181
70. Zeng X, Hood BL, Zhao T, et al. Lung cancer serum biomarker discovery using label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(4):725-734. doi:10.1097/JTO.0b013e31820c312e
71. Bowers J, Hughes E, Skill N, Maluccio M, Raftery D. Detection of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients: Biomarker discovery by LC-MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*.
72. Zhu J, Djukovic D, Deng L, et al. Targeted serum metabolite profiling and sequential metabolite ratio analysis for colorectal cancer progression monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(26). doi:10.1007/s00216-015-8984-8
73. Liu X, Zhang M, Cheng X, et al. LC-MS-Based Plasma Metabolomics and Lipidomics Analyses for Differential Diagnosis of Bladder Cancer and Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:717. doi:10.3389/fonc.2020.00717
74. Schuler KM, Rambally BS, Difurio MJ, et al. Antiproliferative and metabolic effects of metformin in a preoperative window clinical trial for endometrial cancer. *Cancer Medicine*. 2015;4(2):161-173. doi:10.1002/cam4.353
75. Poisson LM, Munkarah A, Madi H, et al. A metabolomic approach to identifying platinum

- resistance in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*. 2015;8(1).
doi:10.1186/s13048-015-0140-8
76. Stäubert C, Bhuiyan H, Lindahl A, et al. Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: A metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(13):8348-8359. doi:10.1074/jbc.M114.618769
77. Posocco B, Buzzo M, Poetto AS, et al. Simultaneous quantification of palbociclib, ribociclib and letrozole in human plasma by a new LC-MS/MS method for clinical application. *PLoS ONE*. 2020;15(2). doi:10.1371/journal.pone.0228822
78. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, Bühr C, Amstutz U, Largiadèr CR. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(1):7-16. doi:10.1002/bmc.2741
79. Harahap Y, Ardiningsih P, Corintias Winarti A, Purwanto DJ. <p>Analysis of the Doxorubicin and Doxorubicinol in the Plasma of Breast Cancer Patients for Monitoring the Toxicity of Doxorubicin</p>. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;Volume 14:3469-3475. doi:10.2147/DDDT.S251144
80. Fernández-Peralbo MA, Priego-Capote F, Luque de Castro MD, Casado-Adam A, Arjona-Sánchez A, Muñoz-Casares FC. LC-MS/MS quantitative analysis of paclitaxel and its major metabolites in serum, plasma and tissue from women with ovarian cancer after intraperitoneal chemotherapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;91:131-137. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.028
81. Emwas AHM. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1277:161-193. doi:10.1007/978-1-4939-2377-9_13
82. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;387(2):525-527. doi:10.1007/s00216-006-0687-8
83. Corcoran O, Spraul M. LC-NMR-MS in drug discovery. *Drug Discovery Today*.

- 2003;8(14):624-631. doi:10.1016/S1359-6446(03)02749-1
84. Duffy MJ, Sturgeon CM, Sölétormos G, et al. Validation of new cancer biomarkers: A position statement from the european group on tumor markers. *Clinical Chemistry*. 2015;61(6):809-820. doi:10.1373/clinchem.2015.239863
85. Rao TN. Validation of Analytical Methods. In: *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. InTech; 2018. doi:10.5772/intechopen.72087
86. Theodoridis G, Girousi S, Zachariadis G, et al. Κεφάλαιο 15 : Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων. In: *Βιοαναλυτική Χημεία*. ; 2016:1-11. Accessed March 12, 2021. <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/3680>
87. Raposo F, Ibelli-Bianco C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2020;129. doi:10.1016/j.trac.2020.115913
88. Horvath AR, Lord SJ, StJohn A, et al. From biomarkers to medical tests: The changing landscape of test evaluation. *Clinica Chimica Acta*. 2014;427:49-57. doi:10.1016/j.cca.2013.09.018
89. Srivastava A, Creek DJ. Discovery and Validation of Clinical Biomarkers of Cancer: A Review Combining Metabolomics and Proteomics. *Proteomics*. 2019;19(10). doi:10.1002/pmic.201700448
90. Byron SK, Crabb N, George E, Marlow M, Newland A. The health technology assessment of companion diagnostics: Experience of nice. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(6):1469-1476. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1955
91. Bernardini R, Gancitano G, Balice A, Di Mauro R, Cantarella G, Dionisi M. Personalized medicine: biomarkers and companion diagnostics. *Farmeconomia Health economics and therapeutic pathways*. 2018;19(1):21-26. doi:10.7175/fe.v19i1.1348

