



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΘΕΜΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

***«ΠΡΟΘΡΟΜΒΩΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΚΑΚΟΗΘΕΙΑ ΠΑΧΕΩΣ ΕΝΤΕΡΟΥ»***

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΒΑΡΛΑΣ ΗΛΙΑΣ

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 10060

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο – ΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ.....	1
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	2
1.2 Δομή και λειτουργία αιμοπεταλίων.....	2
1.3 Σχέση αιμοπεταλίων-καρκίνου.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο – ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο – ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο – ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ (MPs).....	8
4.1 Μηχανισμοί απελευθέρωσης των Mp.....	9
4.2 Η γένεση των αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων.....	13
4.3 Σχηματισμός των RMPs προκαλούμενος από την αιμοπεταλιακή διέγερση από αγωνιστές.....	14
4.4 Σχηματισμός των RMPs προκαλούμενος από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.....	14
4.5 Γένεση των RMPs ύστερα από έντονη και απότομη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.....	15
4.6 Παραγωγή των RMPs από αιμοπεταλιακή/μεγακαρυωτική γήρανση και απόπτωση.....	16
4.7 Παραγωγή των RMPs και αιμοπεταλιακές ανωμαλίες του κυτταροσκελετού.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο – ΚΥΣΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο – ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ-ΚΥΣΤΙΔΙΑ-ΘΡΟΜΒΩΣΗ.....	19

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο - ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΕΛΠΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	32
3.1.1 Αντιπηκτικός Παράγοντας.....	32
3.1.2 Δημιουργία Εναιωρήματος.....	34
3.1.3 Παρασκευή MPS.....	34
3.1.4 Προσθήκη Αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος.....	34
3.2 BD Trucount Tubes.....	35
3.3 Πιπετάρισμα.....	35
3.4 Ανάλυση / εξαγωγή αποτελεσμάτων.....	36
3.5 Προσθήκες Δεικτών.....	36
3.6 Κυτταρομετρία Ροής.....	38
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ.....	55

1° ΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Τα αιμοπετάλια περιγράφηκαν για πρώτη φορά ως ανεξάρτητος κυτταρικός τύπος που υπάρχει στο αίμα το 1881 από τον Giulio Bizzozero. Ο Bizzozero ήταν επίσης ο πρώτος που περιγράφει τις μορφολογικές μεταβολές των αιμοπεταλίων που αποδίδονται στην ενεργοποίησή τους και το σημαντικό ρόλο τους στο σχηματισμό θρόμβων. Επίσης περιέγραψε το σχήμα τους χαρακτηρίζοντάς τα ως δισκοειδή κύτταρα. Στη συνέχεια, ο James Homer Wright περιέγραψε τα αιμοπετάλια ως προερχόμενα από μεγακαρυοκύτταρα στον μυελό των οστών.

Πολλές αιμορραγικές διαταραχές και ασθένειες που αποδίδονται σε βλάβες στη λειτουργία των αιμοπεταλίων περιγράφηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Τα αιμοπετάλια παράγονται από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα στο ήπαρ κατά την ανάπτυξη του εμβρύου και μπορούν να παρατηρηθούν στην εμβρυϊκή κυκλοφορία τις πρώτες 8-9 εβδομάδες. Τα αιμοπετάλια αναπτύσσονται γρήγορα στις ενήλικες τιμές και η νεογνική θρομβοκυτταροπενία ορίζεται με τα ίδια κριτήρια όπως και η ενήλικη θρομβοκυτταροπενία. Στα τέλη της εγκυμοσύνης μέχρι την ενηλικίωση, η παραγωγή αιμοπεταλίων μετατοπίζεται σε μεγακαρυοκύτταρα (MKs) στον μυελό των οστών. Μόλις ωριμάσουν, τα MKs μεταναστεύουν στο αγγειακό σύστημα και απελευθερώνουν πρώιμα αιμοπετάλια στην κυκλοφορία, οδηγώντας στη διάλυση ολόκληρου του MK. Από τη στιγμή που κυκλοφορούν στην κυκλοφορία, τα πρώιμα αιμοπετάλια διασπώνται και σχηματίζουν ώριμα αιμοπετάλια που διαπερνούν την κυκλοφορία για 7-10 ημέρες πριν την εκκαθάρισή τους από τα φαγοκύτταρα στο ήπαρ και τη σπλήνα. (Claire K. S. Meikle et al,2017)

1.2 Δομή και λειτουργία αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια διαθέτουν και εμφανίζουν μια ποικιλία λειτουργικών ανοσοϋποδοχέων που ανταποκρίνονται σε ένα ευρύ φάσμα αγωνιστών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που συνδέονται με βλάβη ιστών και μόλυνση. Τα αιμοπετάλια έχουν γλυκοπρωτεΐνες (GPs) που ανιχνεύουν αγγειακές και υπο-ενδοθηλιακές δομές όπως

κολλαγόνο και άλλες εκτεθειμένες πρωτεΐνες, οι οποίες επιτρέπουν στα αιμοπετάλια να ανταποκρίνονται σε τραυματισμό. Η GPIbα και η GPVI εμπλέκονται στο σχηματισμό θρόμβων και η GPIIb/IIIa, γνωστή και ως ιντεγκρίνη αIIbβ3, είναι κρίσιμη για τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και την απόσυρση του θρόμβου. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) που περιλαμβάνουν υποδοχείς τύπου Toll (TLR) και οι υποδοχείς λεκτίνης τύπου C. Η έκφραση TLR επιτρέπει στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να δεσμεύουν τα βακτήρια. Άλλοι σημαντικοί επιφανειακοί υποδοχείς είναι οι P-σελεκτίνη και οι ιντεγκρίνες.

Οι ανωτέρω υποδοχείς αφορούν την ενεργοποίηση, όσον αφορά στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων. (Claire K. S. Meikle et al.2017)

Τα αιμοπετάλια εκτίθενται συνεχώς σε όλα τα συστατικά του πλάσματος μέσω του ανοικτού καναλιοειδούς συστήματος τους, το οποίο παρέχει έναν αγωγό για την απελευθέρωση των περιεχομένων κοκκίων και διευκολύνει την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων απαντώντας στα ερεθίσματα.

Τα ώριμα αιμοπετάλια διαθέτουν τρεις διακριτούς τύπους κυτταροπλασματικών κοκκίων: άλφα (α-) κοκκία, πυκνά (δ-) κοκκία και λυσοσωματικά (λ-) κοκκία. Αυτά τα κοκκία περιέχουν μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών μορίων με αιμοστατικές και ιδιότητες φυσιολογίας που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ή μεταφέρονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Τα α-κοκκία είναι ο πλέον άφθονος τύπος κοκκίων και περιέχουν βιοδραστικούς μεσολαβητές που περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης, παράγοντες πήξης, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες και μικροβιοκτόνες πρωτεΐνες. Τα δ-κοκκία αποθηκεύουν βιοδραστικές αμίνες (ισταμίνη και σεροτονίνη), ιόντα (ασβέστιο και φωσφορικό) και νουκλεοτίδια. (Claire K. S. Meikle et al,2017)

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αιμόσταση και την ανοσία και είναι μεταξύ των πρώτων κυττάρων για την ανίχνευση της ενδοθηλιακής βλάβης και των μικροβιακών παθογόνων που εισβάλλουν στο αίμα και τους ιστούς. Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε κατάσταση ηρεμίας χωρίς να σχηματίζουν σταθερά σύ-

μπλοκα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε περίπτωση τραυματισμού ενεργοποιούνται οι γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων GPVI και GPIIb οι οποίες αλληλεπιδρούν με εκτεθειμένο κολλαγόνο και τον παράγοντα Von Willebrand (VWF), στην υποενδοθηλιακή μήτρα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέματος προκαλούν σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ξεκινούν μία σειρά ενδοκυτταρικών αποκρίσεων που έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των σημάτων ενεργοποίησης μέσω της απελευθέρωσης των αγωνιστών αιμοπεταλίων όπως η ADP και η θρομβίνη. Σε απόκριση της ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια αλλάζουν το σχήμα τους και ο επιφανειακός υποδοχέας μεταφέρεται στο ανώτερο τμήμα του αιμοπεταλίου. Συλλογικά, αυτό οδηγεί σε περαιτέρω συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και πρόσληψη στις θέσεις βλάβης ή λοίμωξης ιστού για να δημιουργηθούν σύμπλοκα και να καλυφτεί η περιοχή τραυματισμού ή βλάβης. (Wolfgang Bergmeier, 2012)

1.3 Σχέση αιμοπεταλίων-καρκίνου

Τα αιμοπετάλια είναι κρίσιμα για την αιμοστατική και ανοσολογική λειτουργία και αποτελούν βασικούς παράγοντες στην πρόοδο του καρκίνου, τη μετάσταση και τη θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο. Τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για να διεγείρουν αντινεοπλασματικές αποκρίσεις και ενεργοποιούνται από ανοσοκύτταρα και κύτταρα όγκου.

Η ενεργοποίηση αιμοπεταλίων οδηγεί σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και κυττάρων όγκου. Τα αιμοπετάλια διευκολύνουν την πρόοδο του καρκίνου και τη μετάσταση με: **(1)** τον σχηματισμό συσσωματωμάτων με κύτταρα όγκου, **(2)** επαγωγή ανάπτυξης όγκου, μετάπτωση επιθηλίου-μεσεγχυματικού και εισβολή, **(3)** θωράκιση κυττάρων όγκου που κυκλοφορούν από ανοσολογική παρακολούθηση και θανάτωση, **(4)** διευκόλυνση πρόσδεσης και διακοπή κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, και **(5)** την προώθηση της αγγειογένεσης και της εγκατάστασης των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένες θέσεις. Τα αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται από κύτταρα όγκου προδιαθέτουν ασθενείς με καρκίνο σε θρομβωτικά συμβάντα. Τα κύτταρα όγκου και τα μικροσωματίδια που

προέρχονται από όγκους οδηγούν σε θρόμβωση με την έκκριση προπηκτικών παραγόντων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση της πήξης. Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου και στη θρόμβωση και οι δείκτες αλληλεπίδρασης αιμοπεταλίων-κυττάρων όγκου είναι πιθανοί βιοδείκτες για την πρόοδο του καρκίνου και τον κίνδυνο θρόμβωσης. (Claire K. S. Meikle et al,2017)

2° ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για τη μέτρηση μικροσωματιδίων. Παρά τους αναφερόμενους περιορισμούς αυτής της τεχνικής, τα επίπεδα MPs που μετρώνται χρησιμοποιώντας συμβατική κυτταρομετρία ροής δίνουν πολλά κλινικά σχετικά ευρήματα, όπως οι συσχετισμοί με τη σοβαρότητα της νόσου και την ικανότητα πρόβλεψης κλινικών αποτελεσμάτων. Τα ποσοτικά αποτελέσματα από MPs αιμοπεταλίων από τη συμβατική κυτταρομετρία ροής συνδέονται με τη λειτουργική ικανότητα των MPs. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια πολύτιμη τεχνική για την ποσοτικοποίηση των MPs από διαφορετικές κυτταρικές προελεύσεις. Ωστόσο, ένας συνδυασμός διαφόρων αναλυτικών τεχνικών δίνει τις πιο ολοκληρωμένες πληροφορίες σχετικά με τον ρόλο των MPs στην υγεία και τις ασθένειες.

Ο μεγαλύτερος περιορισμός είναι ότι η συμβατική κυτταρομετρία ροής δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσει MPs μικρού μεγέθους. Ανάλογα με τον τύπο κυτταρομετρου ροής, το κατώτατο όριο ανίχνευσης για τις MPs έχει εκτιμηθεί ότι είναι 0,2-0,5 μm.

Είναι πιθανό ότι τα μικρότερα κυστίδια μετρώνται με κυτταρομετρία ροής, με μια διαδικασία γνωστή ως ανίχνευση σμήνους. Λόγω του μικρού μεγέθους των κυστιδίων και της σχετικά μεγάλης διόδου στο μηχάνημα κυτταρομετρικής ροής, πολλαπλά κυστίδια μπορούν να διέλθουν από την κυψελίδα ροής και να ανιχνευθούν ταυτόχρονα. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση κυττάρων μικρού μεγέθους με κυτταρομετρία ροής, δίνει εσφαλμένη υποεκτίμηση της απόλυτης μέτρησης σε

συνδυασμό με υπερεκτίμηση της κλίμακας μεγέθους τους. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να είναι δυνατό να προσδιοριστεί κατά πόσο η ροή γίνεται κατά τη διάρκεια των μετρήσεων με τη διεξαγωγή σειράς αραιώσης και ανάλυσης γραμμικότητας των δειγμάτων.

Τα κυτταρόμετρα νέας γενιάς έχουν βελτιωμένη ανάλυση των μικρών κυστιδίων, ενδεχομένως κάτω των 0,1 μm, αυξάνοντας τη γωνία συλλογής φωτός για να διευκολύνεται η βελτιωμένη ανάλυση. Αυτό μεταβάλλει τη συλλογή του φωτός στη διασπορά, επιτρέποντας στα όργανα με μικρό μέγεθος σωματιδίων να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Η κυτταρομετρία ροής υψηλής ευαισθησίας έχει βρεθεί ότι παρέχει βελτιωμένη ανάλυση πρόσθιου σχεδιασμού, χαμηλότερο θόρυβο υποβάθρου και ανιχνεύει 8-20 φορές περισσότερα MVs από την τυπική κυτταρομετρία ροής σε δείγματα ασθενών. Η αναλογία των μικρών έως μεγάλων MPs επίσης διαφέρει ανάλογα με την κλινική κατάσταση του ασθενούς, υποδηλώνοντας ότι το μέγεθος των MVs μπορεί να παρέχει πρόσθετες βιολογικές πληροφορίες.

Ωστόσο, τα κυτταρόμετρα ροής νέας γενιάς δεν είναι ακόμη ευρέως διαθέσιμα, ιδιαίτερα σε κλινικές συνθήκες. Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, πολλές μελέτες με ποσοτικά αποτελέσματα MPs που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας μόνο συμβατική κυτταρομετρία ροής έχουν αποκαλύψει κλινικά σημαντικά ευρήματα, όπως οι συσχετισμοί με τη σοβαρότητα της νόσου και την ικανότητα πρόβλεψης κλινικών αποτελεσμάτων.

Είναι πιθανό ότι η ανίχνευση των “σμηνών” είναι αντιπροσωπευτική του συνόλου και ένας πιθανός τρόπος υποστήριξης αυτής της θεωρίας θα ήταν να προσδιοριστεί εάν ο αριθμός των MPs που μετρούνται με κυτταρομετρία ροής σχετίζεται με τη λειτουργική τους ικανότητα να μετρήσουν το σύνολο του πληθυσμού κυστιδίων. (Lisa Ayers et al ,2014).

3° ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το παχύ έντερο είναι ένα όργανο του πεπτικού συστήματος, ουσιαστικά ένας σωλήνας μήκους περίπου 1,5 μ. και διαμέτρου 7,5 εκ. Αρχίζει από την ειλεοτυφλική

συμβολή και τελειώνει στην ορθοπρωκτική συμβολή. Αποθηκεύει το περιεχόμενο του εντέρου πριν από την εκκένωσή του και απορροφά νερό, ηλεκτρολύτες, χολικά οξέα και ορισμένες βιταμίνες.

Εκκρίνει επίσης βλέννη για προστασία και λίπανση και εμπλέκεται στην μη ενζυμική, βακτηριακή πέψη της τροφής. Αποτελείται από τρία ανισομήκη τμήματα: το τυφλό με τη σκωληκοειδή απόφυση (ένα σκωληκοειδές εκκόλπωμα τμήμα αυτού) το ανιόν, εγκάρσιο και κατιόν τμήμα του κόλου, το σιγμοειδές και το ορθόν.

Το τοίχωμά του αποτελείται από τους τέσσερις ομόκεντρους χιτώνες των άλλων τμημάτων της πεπτικής οδού, έχοντας όμως ορισμένες διαφορές.

Ο μυϊκός χιτώνας από μία συνεχή έσω κυκλωτερή στιβάδα λείων μυϊκών ινών. Η έξω στιβάδα με ανόμοιο πάχος έχει τρεις, σε ίση απόσταση επιμήκεις ταινίες που ονομάζονται κολικές ταινίες, η συνεχής σύσπαση των οποίων, δημιουργεί μεταξύ των κολικών ταινιών κολικές κυψέλες ή θυλάκια. Τα εξωτερικά αυτά εκκολπώματα αποτελούν σπουδαία χειρουργικά σημεία.

Το τοίχωμα του κόλου ανάμεσα στα εκκολπώματα, εμφανίζει μηνοειδείς προσεκβολές που προβάλλουν μέσα στον αυλό του εντέρου και ονομάζονται μηνοειδείς πτυχές. Οι επιπλοϊκές αποφύσεις, ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα μόνο του κόλου, αποτελούν οι υπορογόνιες αθροίσεις λιπώδους ιστού οι οποίες κρέμονται, σχηματίζοντας εξογκώματα που μοιάζουν με σταφύλια. Από το εγκάρσιο κόλον και μετά, οι δομές είναι εμβρυϊκές καταβολές του οπίσθιου εντέρου και αιματώνονται από την κάτω μεσεντέριο αρτηρία και τους κλάδους της.(William K. et al,2011)

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί κακοήθη νεοπλασία με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στην χώρα μας αποτελώντας την τέταρτη αιτία θανάτου μετά από τους καρκίνους του πνεύμονα, προστάτη και στομάχου. Είναι μια νόσος που προσβάλλει κυρίως άτομα από 50 έως 70 ετών (15%), ενώ το ποσοστό του 8% αντιστοιχεί σε ηλικίες κάτω των 40 ετών. Η συχνότητα μεταξύ ανδρών και γυναικών δεν διαφέρει πολύ, παρόλο που υπερισχύει η ανάπτυξη του στο αντρικό φύλο, ιδιαίτερα στην περιοχή του ορθού.

Ως προκαρκινωματώδεις καταστάσεις του παχέος εντέρου θεωρούνται αρχικά, οι πολύποδες ή αδενώματα, οι οποίοι διακρίνονται σε τέσσερις ιστολογικούς τύπους, κατά σειρά συχνότητας,

- Σωληνώδη
- Σωληνολαχνωτά
- Λαχνωτά
- Ψευδοθηλώδη

Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει αλλαγή στις συνήθειες του εντέρου κυρίως στα αρχικά στάδια και κυρίως την εναλλαγή μεταξύ διάρροιας και δυσκοιλιότητας. Επίσης παρατηρείται μακροσκοπικά παρουσία αίματος στα κόπρανα και ατελείς ή τέλειος ειλεός, ενώ μικροσκοπικά η δοκιμασία Mayer κοπράνων βγαίνει πάντα θετική.

Ο Dukes διαιρεί τους κακοήθεις όγκους του παχέος εντέρου στα ακόλουθα στάδια:

Στάδιο I: Σε αυτό κατατάσσονται όγκοι που περιορίζονται στο βλεννογόνο. 90% επιβίωση.

Στάδιο II: Σε αυτό περιλαμβάνονται όγκοι που έχουν διηθήσει το έντερο σε όλο του πάχος, χωρίς όμως επέκταση στους γειτονικούς ιστούς και τους επιχώριους λεμφαδένες. 60% επιβίωση.

Στάδιο III: Εδώ έχουμε διήθηση των τοπικών λεμφαδένων. 30% επιβίωση.

Στάδιο IV: Εδώ έχουμε μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα. Η επιβίωση σ' αυτό το στάδιο πρακτικά και θεωρητικά είναι ανύπαρκτη. (Φραγκίσκη Ανθούλη-Αναγνωστοπούλου,2009)

4° ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ (Mps)

Τα κύτταρα του αίματος παράγουν μια ποικιλία μεμβρανικών μικροκυστιδίων (MP), τα οποία ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1967, και έχουν διαστάσεις από 0,1-1 μm, με προπηκτικές ιδιότητες και αποτελούνται από μία αρνητικά φορτισμένη

και πλούσια σε φωσφατιδυλοσερίνη (PS) επιφάνεια. Τα κυστίδια όπως αποκαλούνται αλλιώς είναι δομές που περιβάλλονται από μεμβρανική διπλοστοιβάδα που περικλείει ένζυμα, παράγοντες μεταγραφής και mRNA. Τα αποπτωτικά κύτταρα αποβάλλουν κυστίδια μέσω δυναμικής μεμβρανικής διόγκωσης που κατευθύνεται από τη δύναμη συστολής των κυτταροσκελετικών δομών ακτίνης-μυοσίνης. Η διέγερση προκαλείται από μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων: πρωτεασών σερίνης, φλεγμονωδών κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, επαγωγείς του οξειδωτικού στρες. (WuZH et al,2013).

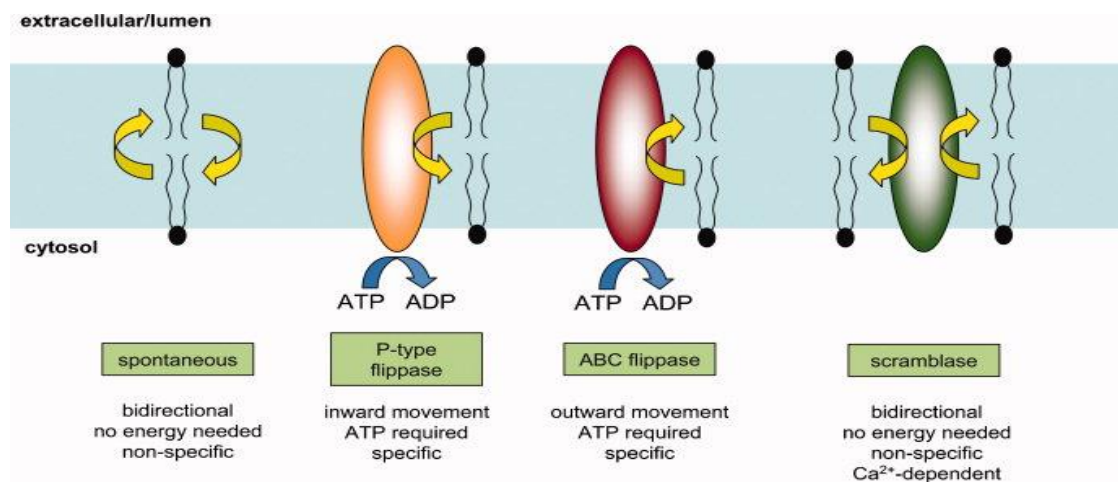
Τα αποβάλλοντα μικροκυστίδια περιέχουν μια ποικιλία βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων και πρωτεϊνών όπως: πρωτεΐνες σήματος, υποδοχείς, κυτταροσκελετού και πρωτεΐνες τελεστές, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Εκφράζουν διάφορα επιφανειακά αντιγόνα, π.χ. CD41a. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες επιφάνειας μπορεί να είναι διαφορετική από εκείνη της πλασματικής μεμβράνης του μητρικού κυττάρου, δεδομένου ότι η συμπερίληψη των πρωτεϊνικών μορίων στα κυστίδια μπορεί να είναι επιλεκτική και ρυθμίζεται από τα ερεθίσματα συγκεκριμένων αγωνιστών ή μικροπεριβάλλοντων των γονικών κυττάρων. Τα μικροκυστίδια είναι στην πραγματικότητα τα "απόβλητα" των ενεργοποιημένων ή των αποπτωτικών κυττάρων, όταν στα τελευταία αλλοιώνεται η κατανομή της φωσφολιπιδικής κυτταρικής μεμβράνης και η αρνητικά φορτισμένη PS ανακατανέμεται από την ενδοκυτταρική προς την εξωπλασματική επιφάνεια. (J.Thaler et al,2012) (Sharon Zara et al,2011)

Τα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια του πλάσματος προέρχονται κυρίως από: αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα.

4.1 Μηχανισμοί απελευθέρωσης των MP

Παρότι ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων αντιπροσωπεύει ένα φυσιολογικό φαινόμενο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα αυτά απελευθερώνονται, δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Επιπλέον, η απελευθέρωση των κυστιδίων πιστεύεται ότι είναι μια οργανωμένη διαδικασία και όχι ένα τυχαίο φαινόμενο. Τα κύτταρα μπορούν να

απελευθερώσουν κυστίδια ως απάντηση σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, και ο τύπος των κυστιδίων μπορεί να αλλάξει ανάλογα με το ερέθισμα που προκαλεί την παραγωγή τους. Η σύνθεση των δύο στοιβάδων της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας σε ένα κύτταρο είναι διαφορετική. Η φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη βρίσκονται, κυρίως, στον εξωτερικό φάκελο, ενώ τα αμινοφωσφολιπίδια και οι φωσφατιδυλεθνολαμίνες παρίστανται στον εσωτερικό φάκελο. Αυτή η κατανομή ελέγχεται από τρεις πρωτεΐνες-ένζυμα: 1) μια φλιπάση (flippase), που ελέγχει την προς τα μέσα μετατόπιση, 2) μια φλοπάση (floppase), που διευθύνει την προς τα έξω μετατόπιση και μεταφορά και 3) μια λιπιδιακή αναρριχάση (lipid scramblase), που ελέγχει την μεταφορά των φωσφολιπιδίων πάνω στην λιπιδιακή κυτταρική διπλοστοιβάδα.



Εικόνα 1: Μεταφορά των φωσφολιπιδίων πάνω στην λιπιδιακή κυτταρική διπλοστοιβάδα (Ανατύπωση από Flipping and Flopping-Lipids on the Move, Frances J. Sharom.)

Όταν το κύτταρο λαμβάνει κάποιο ερέθισμα, η συγκέντρωση του κυτταρικού ασβεστίου μπορεί να αυξηθεί, με αποτέλεσμα να ενισχύονται οι δραστηριότητες της φλοπάσης και αναρριχάσης, και μειώνεται αυτή της φλιπάσης. Ως αποτέλεσμα, χαλαίει η συμμετρία της κυτταρικής μεμβράνης, και εκτίθεται στην επιφάνεια η φωσφατιδυλοσερίνη (PS). Η μεμβράνη τελικά δημιουργεί εκβλαστήσεις που αποκόπτονται και απελευθερώνονται έτσι τα κυστίδια. Ωστόσο, η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης δεν ακολουθείται πάντα από απελευθέρωση κυστιδίων, το οποίο εξαρτάται και από το

ασβέστιο και τα επίπεδα του στο εσωτερικό του κυττάρου. Έχει αποδειχθεί, ότι η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση παίζει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση των κυστιδίων. Η διακοπή ορισμένων κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών απαιτείται κάθε φορά για την απελευθέρωσή τους. Επιπρόσθετα, τα MP απελευθερώνονται από κύτταρα που έχουν χάσει την μεμβρανική ακεραιότητα, ακόμη κι αν αυτή έχει καταστραφεί από μηχανική πίεση. Πρωτεϊνικές κινάσες, όπως η μυσίνη, εμπλέκονται στην απελευθέρωση της ελαφριάς αλυσίδας των κινασών, η οποία εμπλέκεται στην απελευθέρωση των μικροκυστιδίων από τα αιμοπετάλια με συμμετοχή του συμπληρώματος. Λόγω της ποικιλομορφίας της πλευρικής σύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης, τα κυστίδια που προέρχονται από το ίδιο κύτταρο πιθανά να έχουν διαφορετική σύνθεση. Πρωτεϊνική ανάλυση έδειξε ότι το φάσμα των πρωτεϊνών που βρέθηκαν να απελευθερώθηκαν *in vitro* από κύτταρα καλλιέργειας, επηρεάζεται εν μέρει από τους τύπους των ερεθισμάτων που χρησιμοποιούνται για επιτευχθεί η κυτταρική κυστιδοποίηση. (WuZH et al,2013)

Τα μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης (PMP), τα οποία αντιπροσωπεύουν πάνω το 90% περίπου των μικροκυστιδίων του πλάσματος σε υγιή άτομα, εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες. Ενώ έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στην επίδραση των κυστιδίων στην αγγειακή λειτουργία, λίγα είναι γνωστά για την πρωτεϊνική σύνθεσή τους. Η ανάλυση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη των μικροκυστιδίων, έχει περιοριστεί σε λίγες μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκτίθενται στα μικροκυστίδια, τα οποία μπορούν και παρακολουθούνται με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει καμία πληροφορία σχετικά με την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη.

Σε μία έρευνα του Benjamin A. Garcia et al., ανιχνεύτηκαν 578 πρωτεΐνες και ταυτοποιήθηκαν σε δείγμα που περιείχε μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης, και κατηγοριοποιήθηκαν στις ακόλουθες κατηγορίες: (α) πρωτεΐνες κυτταρικών διεργασιών (β) πρωτεΐνες μοριακών λειτουργιών (γ) υπο-κυτταρικές πρωτεΐνες.

Τα κυστίδια του πλάσματος που βρίσκονται σε αφθονία είναι αυτά της αιμοπεταλιακής προέλευσης, και συνιστούν το περίπου το 70 - 90% των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων. Τα μικροκυστίδια δρουν ως μεσολαβητές για την διακυτταρική επικοινωνία. Αυτά έχουν και μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα από μεμβρανικά, κυτταρο-

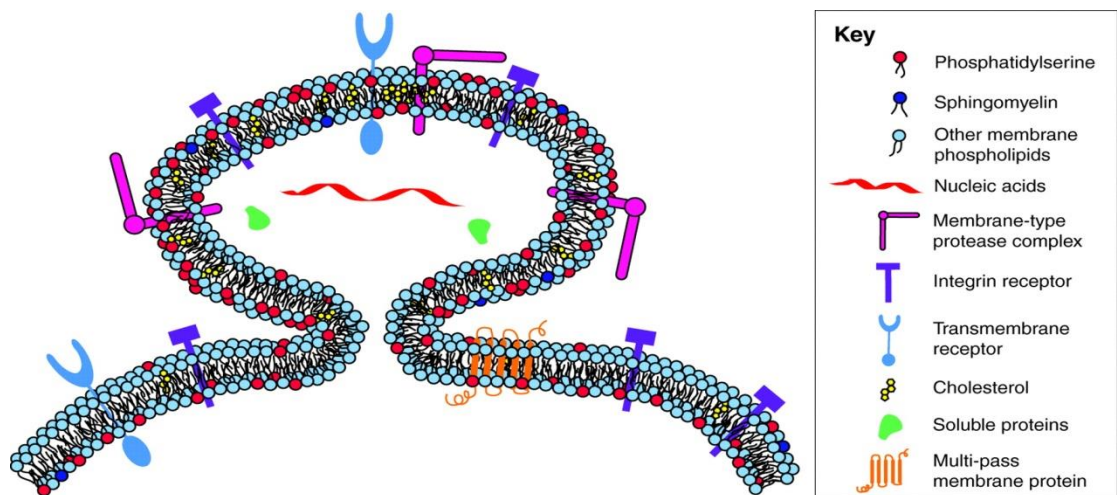
πλασματικά και πυρηνικά μόρια, που αντανακλούν το αντιγονικό πρότυπο των κυττάρων απ' όπου προήλθαν.

Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι σε υγιή άτομα το ποσοστό των μικροκυστιδίων προερχόμενων από τα αιμοπετάλια (PMPs) ανέρχεται στο 70 - 90% των κυκλοφορούντων κυστιδίων, ενώ των λευκοκύτταρων (LMPs), των ενδοθηλιακών (EMPs) και των ερυθρών αιμοσφαιριών (RMps) συμπληρώνουν το υπόλοιπο ποσοστό. Πιο πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι σε υγιή άτομα οι κύριες πηγές των MPs ήταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια, με μια κατανομή του 43% και του 38% όλων των κυστιδίων αντίστοιχα. Επίσης θεωρώντας ότι η μέγιστη συνολική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι κατά μέσο όρο στους ενήλικες 350 τ.μ., τότε είναι πιθανό τα κυστίδια που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα να κυριαρχούν στην κυκλοφορία. Το πρότυπο των κυκλοφορούντων κυστιδίων φαίνεται να αλλάζει σε νοσηρές καταστάσεις. Σε ασθενείς με κακοήθεια ανιχνεύονται κυστίδια σχετιζόμενα με καρκινικά κύτταρα (TMPs), τα οποία όταν αναλυθούν έχουν διαγνωστική και πιθανότατα θεραπευτική αξία. Ασθενείς με κακοήθεια και/ή φλεβοθρόμβωση είναι γνωστό ότι έχουν στοιχεία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, φλεγμονή των αγγείων και μία προθρομβωτική κατάσταση, και σε αυτές τις καταστάσεις έχουν αναφερθεί αυξημένα κυστίδια.

Τα κυστίδια φαίνεται να είναι υπεύθυνα για πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες. Αυτά εκφράζουν μεμβρανικά αντιγόνα, ειδικευμένα για τα κύτταρα προέλευσής τους. Αυτά τα κυτταρικά ειδικά αντιγόνα χρησιμοποιούνται για να ταυτοποιηθούν τα κυστίδια στην κυκλοφορία. Παρόλα αυτά η παρουσία ενός συγκεκριμένου κυτταροειδικού αντιγόνου για κάθε κυστίδιο δεν είναι αναγκαστικά ταυτοποίηση και του κυττάρου προέλευσής του. Είναι δυνατόν διαλυτά αντιγόνα να κυκλοφορούν στο αίμα προερχόμενα από εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο και μπορούν να προσκολληθούν σε κυστίδια που προέρχονται από διαφορετικό κυτταρικό τύπο, ή αυτά τα MPs που προέρχονται από ένα κυτταρικό τύπο μπορεί να ενωθούν με τη μεμβράνη ενός διαφορετικού κυτταρικού τύπου. Αυτά τα κύτταρα μπορούν θεωρητικά να απελευθερώσουν μετέπειτα κυστίδια που θα φέρουν ένα "θετό" αντιγόνο.

Εξίσου, οι λειτουργικές τους ιδιότητες και ο βιολογικός τους ρόλος διαφέρουν από τα κύτταρα προέλευσης. Τα κυκλοφορούντα κυστίδια που συνδέονται με τα κύτταρα μπορούν σημαντικά να εναλλάσσουν την βιολογική δραστηριότητα του κυττάρου-δέκτη, λόγω: μεταφοράς υποδοχέων που μπορούν να επάγουν την κυτταρική σηματοδότηση ή συχνότερα την μεταλλαγή, μεταφοράς γενετικής πληροφορίας (mRNA) και δευτερευόντων αγγελιοφόρων.

Τα κυστίδια έχει δειχθεί ότι μεταφέρουν mRNA για το CD81 μεταξύ λευκοκυττάρων, και τα MPs που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα που μεταφέρουν mRNA σε μονοκύτταρα. Τέτοια σύνδεση των επιφανειακών αντιγόνων των κυστιδίων με τους ειδικούς υποδοχείς των κυττάρων επιτρέπει διακυτταρική σηματοδότηση, μερικές φορές και σε απομακρυσμένα κύτταρα, όπως και επίσης άλλες διαδικασίες, όπως η εντατικοποίηση της απόπτωσης, η αλλοίωση της ανοσιακής απάντησης, η φλεγμονή, η αγγειογένεση και η πηκτικότητα. Όσο αυτές οι ιδιότητες των κυστιδίων γίνονται καλύτερα κατανοητές, μετρώντας τους ειδικούς υποδοχείς στα κυστίδια ή την δραστηριότητα που βασίζεται στα κυστίδια, και βασιζόμενοι όχι μόνο στο συνολικό αριθμό των κυστιδίων, είναι εφικτή η βαθύτερη μελέτη της παθοφυσιολογίας των ασθενειών. (Sharon Zara et al, 2011)



Εικόνα 2: Δομή μεμβρανικής διπλοστοιβαδας λιπιδίων. (Ανατύπωση από Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression, Vandhana Muralidharan-Chari, James W. Clancy, Alanna Sedgwick, Crislyn D'Souza-Schorey)

4.2. Η γένεση των αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων (PMPs)

Οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων, όπως προαναφέρθηκε, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ανιοντικών φωσφολιπιδίων, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, κατανεμημένες στο εσωτερικό περίβλημα της πλασματικής μεμβράνης. Τα ουδέτερα φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη εμπλουτίζουν την εξωτερική επιφάνεια. Η ασυμμετρία της πλασματικής μεμβράνης διατηρείται από φωσφολιπιδικούς μεταφορείς (τις αμινοφωσφολιπιδικές μεταθετάσες). Αλλαγές στην δραστηριότητα των φωσφολιπιδικών μεταφορών που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας, καταλήγουν στην φυσαλιδοποίηση των κυττάρων και την γένεση των PMPs.

4.3 Σχηματισμός των PMPs προκαλούμενος από την αιμοπεταλιακή διέγερση από αγωνιστές

Η απελευθέρωση των PMPs λαμβάνει χώρα μετά από φυσιολογική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από αγωνιστές όπως η θρομβίνη ή το κολλαγόνο. Ο ρυθμός παραγωγής τους δεν εξαρτάται μόνο από τον τύπο ή τη συγκέντρωση του αγωνιστή και, επομένως, δεν είναι ένα απλό φαινόμενο. Με την ενεργοποίηση του αγωνιστή, η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης ακολουθείται από την αποβολή των μεμβρανικών θραυσμάτων PMPs οπλισμένα με προπηκτικές ιδιότητες Στην υπόθεση πως αν υπάρξει έκθεση σε ιστικό παράγοντα, που αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή στις αντιδράσεις της πήξης του αίματος, στηρίζεται η προηγούμενη πρόταση. Αυτή είναι μια υπόθεση που αμφισβητείται ακόμα. Καθώς οι P2Y1 και P2Y12 υποδοχείς είναι σημαντικοί ρυθμιστές της πήξης του αίματος, συμβάλλοντας σε διαφορετικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων, μελετήθηκε η σχετική συμβολή αυτών υποδοχέων για το σχηματισμό των μικροσωματιδίων. Ανταγωνιστής του υποδοχέα P2Y12, αλλά όχι ανταγωνιστής και του υποδοχέα P2Y1, προκαλεί μία σημαντική μείωση στον αριθμό των μικροκυστιδίων που σχηματίζονται από την κονβουλξίνη, μία τοξίνη στο δηλητήριο ενός φιδιού, και την θρομβίνη.

4.4 Σχηματισμός των PMPs προκαλούμενος από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το συμπλήρωμα και τα συστήματα πήξης είναι στενά συνδεδεμένα, επηρεάζοντας τη δραστηριότητα ο ένας του άλλου, σε βαθμό που η ίδια η θρομβίνη μπορεί να ενεργοποιήσει την εναλλακτική οδό της συμπληρώματος. Οι Sims και Wiedmer έχουν εκτενώς διερευνήσει την παραγωγή PMPs, που προκαλείται από την έκθεση των αιμοπεταλίων σε καθαρά συστατικά του συμπληρώματος. Υπέθεσαν ότι η ανάκτηση του δυναμικού της μεμβράνης μπορεί να ακολουθείται από αποβολή PMPs που φέρουν το πόρο C5b-9, τον λεγόμενο αλλιώς σύμπλοκο μεμβρανικής επίθεσης (MAC), βασισμένοι στο ότι τα PMPs από τα αιμοπετάλια που εκτίθενται σε MAC, φέρουν κατά κύριο λόγο τα διαθέσιμα MACs. Αυτή η διαδικασία είναι εξαρτώμενη από τα εξωτερικώς κυκλοφορούντα ιόντα Ca^{2+} , τα οποία κινούνται μέσω των πόρων MAC. Ασβέστιο και καλπαΐνη, καθώς και ιονοφόρα ασβεστίου, δραματίζουν καίριο ρόλο στους MAC και την προκαλούμενη κυστιδιοποίηση (γένεση των PMPs). Τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} αυξάνονται από τα MAC ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης κινάσης ή φωσφατάσης, ενώ ο σχηματισμός των PMPs ελαττώνεται από τους αναστολείς της κινάσης ή της καλμοντουλίνης. Η παρατήρηση της αύξησης των επιπέδων των κυκλοφορούντων PMPs σε συνθήκες όπου μεσολαβεί το συμπλήρωμα στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως και στην παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία (ΠΝΑ), τεκμηριώνει την υπόθεση της γένεσης των PMP σε απόκριση και διαμεσολάβηση του συμπληρώματος στους MACs. Είναι ενδιαφέρον ότι η αναστολή του συμπληρώματος από την εκουλιζουμάμπη, ενός ισχυρού μονοκλωνικού αντίσωματος έναντι της ΠΝΑ, έχει σημαντικό αντίκτυπο στην πρόληψη της θρόμβωσης στην διαχείριση αυτής της ασθένειας, που πιθανώς σχετίζεται με την καταστολή των PMPs.

4.5 Γένεση των PMPs ύστερα από έντονη και απότομη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Όταν το αίμα υποβάλλεται σε ροή μέσω στενών τραχέων αυλών, η αυξημένη υδροδυναμική τάση ενεργοποιεί την προσκολλητική ικανότητα του παράγοντα vWF, οδηγώντας στην αντιφατικό φαινόμενο της αυξημένης ταχύτητας προσρόφησης υπό έντονες συνθήκες διάτμησης. Η δέσμευση του vWF με το GPIb οδηγεί σε μία εισροή εξωκυτταρικού ασβεστίου και προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή των PMPs. Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης κινάση C (PKC) προάγει τον σχηματισμό PMPs εξαρτώμενο από την διάτμηση. Στη μικροκυκλοφορία όταν εφαρμόζονται δυνάμεις υψηλής διάτμησης, η θρομβίνη που παράγεται στην περιοχή της αιμόστασης είναι υψίστης σημασίας για την παραγωγή των PMP. Επιπλέον, έχει σημειωθεί συσχέτιση μεταξύ της απελευθέρωσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και της γένεσης των PMPs, σε συνδυασμό με την αυξημένη συγκέντρωση του PAF κατά την απελευθέρωση των PMPs στο πλαίσιο των υψηλών διατμητικών δυνάμεων.

4.6 Παραγωγή των PMPs από αιμοπεταλιακή/μεγακαρυωτική γήρανση και απόπτωση

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωρισθεί ότι η απόπτωση λαμβάνει χώρα και στα απύρρηνα αιμοπετάλια.

Ως αποπτωτικούς δείκτες έχουμε τους εξής:

- εκπόλωση της μιτοχονδριακής εσωτερικής μεμβράνης,
- απελευθέρωση του κυτοχρώματος C,
- έκφραση οικογένειας του Bcl-2,
- ενεργοποίηση της κασπάσης-3,
- έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης,
- αιμοπεταλιακή συρρίκνωση και κυρίως τον κατακερματισμό τους σε μικροκυστίδια.

Στα εμπύρηννα κύτταρα, όπως και τα μεγακαρυοκύτταρα, διόγκωση της μεμβράνης (ή δημιουργία προεξοχής) και σχηματισμός μικροκυστιδίων παρατηρήθηκε στην απόπτωσή τους, συμβάλλοντας στην συμμετοχή του πληθυσμού των PMPs

4.7 Παραγωγή των PMPs και αιμοπεταλιακές ανωμαλίες του κυτταροσκελετού

Μετά από αγγειακή βλάβη, το σχήμα των αιμοπεταλίων τα βοηθάει να προσκολλώνται στην εκτεθειμένη και τραυματισμένη εξωκυτταρική επιφάνεια, που με τη σειρά του αυτό το φαινόμενο πυροδοτεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την συσσώρευση τους, για να σχηματίσουν ένα αιμοστατικό πώμα που σφραγίζει το τραύμα. Αλλαγές του σχήματός των αιμοπεταλίων παρατηρήθηκε δευτερογενώς ότι προκαλείται από αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού τους. Τα κύρια στοιχεία που συμμετέχουν στην ευελιξία του κυτταροσκελετού αυτού εξαρτώνται από τη βιοχημική φύση τους, καθώς και με τις συναφείς πρωτεΐνες που παρέχουν πολλαπλές λειτουργίες μέσα στο κύτταρο. Τα αιμοπετάλια έχουν ένα μεμβρανικό σκελετό με βάση τη σπεκτρίνη που συνδέεται στενά με $\alpha\text{IIb}\beta_3$, ένα κυτταροσκελετικό δίκτυο με βάση μια ακτίνη και μία περιφερειακή ζώνη μικροσωληνίσκων. Σε καταστάσεις ηρεμίας η ακεραιότητα του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού τα σταθεροποιεί ενάντια στην κυστιδιοποίηση, όπως και επίσης ενάντια στην γένεση PMPs.

Οι Nomura και Komiyama ανέφεραν το 1997 ότι η καλπαΐνη επάγει την παραγωγή PMPs. Η ενεργοποίηση της καλπαΐνης μετά από διέγερση των αιμοπεταλίων είναι γνωστό ότι μεσολαβεί στην πρωτεόλυση του κυτταροσκελετού με επακόλουθη μεμβρανική κυστιδιοποίηση και αποβολή PMPs. (Hadi Alphonse Goubran et al, 2015)

5° ΚΥΣΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Ένα κύριο χαρακτηριστικό των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων είναι η προθρομβωτική τους δραστηριότητα. Είχε ήδη αποδειχθεί από το 1967 από τον Wolf και τους συνεργάτες του ότι τα μικροκυστίδια (τότε δηλώνονταν ως "αιμοπεταλιακή σκόνη") προωθούν θρομβωτικούς σχηματισμούς. Τα μικροκυστίδια είναι προθρομβωτικά

διότι: η αρνητικά φορτισμένη και πλούσια σε PS επιφάνεια προωθεί την συσσώρευση και την μετέπειτα ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης και υψηλή προπηκτική μικροκυστιδιακή υποπληθυσμοί εκφράζουν προθρομβωτικές πρωτεΐνες όπως ο ιστικός παράγοντας και η P-σελεκτίνη γλυκοπρωτεΐνη συνδέτης-1 (PSGL-1) στην επιφάνειά τους. Η πλούσια σε PS επιφάνεια των μικροκυστιδίων έχει αναφερθεί ότι 50πλάσια με 100πλάσια πιο προθρομβωτική από την ισοδύναμη περιοχή στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και περίπου το 25% της προθρομβωτικής σημαντικότητας έχει αποδοθεί στα MPs.

Οι κυκλοφορούντες ημιπληθυσμοί μικροκυστιδίων που εκφράζουν τον ενεργοποιημένο ιστικό παράγοντα, τον κύριο μεσολαβητή του καταρράκτη της πήξης, είναι ιδιαίτερα προπηκτικοί. Τα σχετιζόμενα με τον ιστικό παράγοντα μικροκυστίδια έχει αναφερθεί ότι ανέρχονται διακριτές περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης πλούσια σε χοληστερόλη, τις λεγόμενες "λιπιδικές σχεδίες" (lipid rafts) και κατάγονται από διεγερμένα μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοπετάλια και καρκινικά κύτταρα. Επίσης ο δεσμός των MPs με τον ιστικό παράγοντα έχει αναφερθεί ότι είναι παρόν σε μια κρυπτογραφημένη μορφή στην κυκλοφορία που δεν εμπλέκεται στην πήξη του αίματος αλλά στην κυτταρική σηματοδότηση. (Gregory C. Connolly et al, 2013) Η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων είναι κατά τα άλλα μία φυσιολογική διαδικασία, με τα μικροκυστίδια να ανευρίσκονται σε κάθε άτομο. Τα επίπεδα είναι υψηλότερα στις γυναίκες και επηρεάζονται τόσο από τον έμμηνο κύκλο όσο και από τον κερκάρδιο ρυθμό.

Το επίπεδο των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της τιμής της απελευθέρωσής τους από τα κύτταρα και την κάθαρσή τους από την κυκλοφορία. Η τιμή απελευθέρωσης των μικροκυστιδίων αυξάνεται εξαιτίας διάφορων ερεθισμάτων σε διάφορες νοσηρές καταστάσεις, περιλαμβανομένων:

- της κυτταρική ενεργοποίησης ή απόπτωσης,
- της μεσολάβησης του συμπληρώματος και των κυττοκινών,
- των οξειδωτικών τραυματισμών και
- των καταστάσεων έντονου οξειδωτικού στρες.

Ο μηχανισμός της απόρριψης των μικροκυστιδίων από την κυκλοφορία είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί που οδηγούν στην κάθαρση των MPs περιλαμβάνουν:

- την δράση των φωσφολιπασών
- την φαγοκύτωση ύστερα από την έκθεση της φωσφατιδιλοσερίνης (PS)
- ή έμμεσα από οψωνισμό, προερχόμενο από την πρωτεΐνη S και το συμπλήρωμα. (Benjamin A. Garcia et al,2005)

6° ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ – ΚΥΣΤΙΔΙΑ – ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Παρά τις πρόσφατες βελτιώσεις, η κατανόηση της πρόγνωσης και της μετάστασης του καρκίνου του παχέος εντέρου παραμένει περιορισμένη. Πάνω από το 50% των ασθενών με στάδιο II και III καρκίνο του παχέος εντέρου, αναπτύσσουν υποτροπή μετά από ριζική χειρουργική επέμβαση. Πάνω από το μισό των ασθενών παρουσιάζουν μακρινή μετάσταση, η οποία αντιπροσωπεύει το 90% των σχετιζόμενων με καρκίνο του παχέος εντέρου θανάτων. Έτσι η ανάπτυξη περαιτέρω πρόβλεψης της επιβίωσης και της μετάστασης στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει σημαντική κλινική σημασία.

Οι μηχανισμοί της μετάστασης του καρκίνου έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, αλλά εξακολουθούν να παραμένουν ασαφείς. Μια τυπική απλούστευση είναι ότι η μετάσταση ακολουθεί μια ομαλή διαδοχή των γεγονότων, συμπεριλαμβανομένων ενδο - αγγείωση των γύρω ιστών, τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων μέσα και έξω - αγγείωση από το κυκλοφορικό σύστημα, και μεταστατική αποικιοποίηση σε απομακρυσμένα όργανα. Κατά τη διάρκεια αυτού του καταρράκτη της εισβολής-μετάστασης, η διάδοση των κακοήθων κυττάρων στο αίμα και η μεταφορά τους παίζουν κεντρικό ρόλο, συμπεριλαμβανομένου ενός ευρέως φάσματος κυττάρων του αίματος που σχετίζονται με αυτό όπως αιμοπετάλια, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, και σιτευτικά κύτταρα, καθώς και άλλα μη αιματογενώς σχετιζόμενα. Από τα πολλά κύτταρα του αίματος που συνδέονται με τη μετάσταση, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν κύριο ρόλο. Τα αιμοπετάλια διευκολύνουν τη μετάσταση μεσολαβώντας στη διάδοση της επιβίωσης των κυττάρων του όγκου στο σύστημα της κυκλοφορίας, εξαγγειώνοντας, και προκαλώ-

ντας αγγειογένεση στο μικροπεριβάλλον των τόπων του στόχου. Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και καρκινικών κυττάρων επιτείνει τη μετάσταση με την προώθηση επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης. Επιπλέον, η κατάσταση της θρομβοκυττάρωσης έχει συσχετισθεί με προχωρημένο στάδιο και το θάνατο για αρκετές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένης και της κακοήθειας του παχέος εντέρου, αν και με μικτά αποτελέσματα. Επίσης καμία μελέτη δεν αναφέρει τη σύνδεση μεταξύ της προεγχειρητικής κατάστασης του αριθμού των αιμοπεταλίων και τη μετάσταση του καρκίνου.

Σε έρευνα του Shaogui Wan και των συνεργατών του, αξιολογήθηκε η προγνωστική αξία του προεγχειρητικού αριθμού των αιμοπεταλίων σε ασθενείς που επρόκειτο να χειρουργηθούν για κακοήθεια παχέος εντέρου. Τα δεδομένα της έρευνας συνέκλιναν στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με εκδήλωση θρομβοκυττάρωσης, με κλινικά υψηλά επίπεδα αιμοπεταλίων ένα μήνα πριν την εγχείρηση, είχαν μια ανεπιθύμητη συνολική επιβίωση και είχαν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν μια μακρινή μετάσταση μετά την επέμβαση. Αν και αιμοπεταλιακές λειτουργίες στη μετάσταση του καρκίνου θεωρούνται πλέον, σχεδόν ύποπτες, η μελέτη των Shaogui Wan και συνεργατών του έδειξε ότι ο αριθμός των αιμοπεταλίων μπορεί να προβλέψει άμεσα την μακρινή μετάσταση σε ασθενείς με κακοήθεια παχέος εντέρου. Επειδή η κλινικά υψηλή καταμέτρηση αιμοπεταλίων έχει αναφερθεί να είναι παρούσα σε ποσοστό έως 57% των ασθενών με καρκίνο, το εύρημα της μελέτης έχει σημαντικό αντίκτυπο στον πληθυσμό με καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι προεγχειρητικές εργαστηριακές εξετάσεις αίματος διαφόρων κλινικών μεταβλητών, περιλαμβανομένου του αριθμού των αιμοπεταλίων είναι εξαιρετικά χρήσιμες και συνήθως χρησιμοποιούνται στη διαχείριση της κακοήθειας του παχέος εντέρου. Επιπλέον, ο αριθμός των αιμοπεταλίων πιθανά να χρησιμεύει ως μια οικονομικά αποδοτική και μη επεμβατική σήμανση, που θα μπορούσε να ενσωματωθεί με άλλες κλινικές μεταβλητές για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης για την επιβίωση και τη μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα αιμοπετάλια δεν είναι απλώς ένας προγνωστικός δείκτης, είναι απαραίτητα στην προώθηση της μετάστασης καρκίνου. Έτσι, παραμένει ένα σημαντικό ζήτημα, ως προς το κατά πόσον η μείωση του προ-εγχειρητικού αριθμού των αιμοπεταλίων μπορεί να

βοηθήσει στην πρόληψη της μεταστατικής υποτροπής, μετά από χειρουργική επέμβαση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (Shaogui Wan et al.,2013).

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου κατατάσσεται ως η τρίτη πιο συχνή μορφή καρκίνου στους άντρες και τις γυναίκες παγκοσμίως. Η σχέση του με το επίπεδο των αιμοπεταλίων, και συνεπώς και των μικροκυστιδίων τους έχει συσχετιστεί σε λίγες έρευνες. Σε μια έρευνα του Eyad F. Al-Saeed και των συνεργατών του, ανιχνεύτηκε ότι τα επίπεδα των αιμοπεταλίων ήταν σημαντικά υψηλά. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων έχει αναφερθεί ότι έχει προγνωστική αξία σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του παχέος εντέρου, και τα αυξανόμενα επίπεδα των αιμοπεταλίων έχουν προταθεί ως ένας μηχανισμός της αιματογενούς εξάπλωσης των μεταστάσεων. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι, πριν την θεραπεία, τα επίπεδα των αιμοπεταλίων συσχετίζονται με φλεβική εισβολή, το μέγεθος του όγκου, και με τον ρυθμό της απόκρισης στην θεραπεία. Επίσης, οι ασθενείς με προ-θεραπευτική θρομβοκυττάρωση είχαν σημαντικά χαμηλότερη επιβίωση χωρίς υποτροπή. (Eyad F. Al-Saeed et al,2014)

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους LIU Hailiang και συν., μελετήθηκε αν η προεγχειρητική αναλογία αιμοπεταλίων-λεμφοκυττάρων έχει κάποια σημασία στην πρόγνωση των ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ασθενείς με υψηλή αναλογία αιμοπεταλίων-λεμφοκυττάρων έχουν σημαντικά χαμηλότερη συνολική πενταετία επιβίωσης, συγκριτικά με αυτούς που έχουν χαμηλή αναλογία. Η μονοπαραγοντική ανάλυση προσδιόρισε τη θέση του όγκου, το βάθος της εισβολής του όγκου, την λεμφαδενική μετάσταση, το στάδιο TMN και την αναλογία αιμοπεταλίων-λεμφοκυττάρων, ως σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την μειωμένη συνολική πενταετή επιβίωση. Η έρευνα αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η προεγχειρηματική αναλογία αιμοπεταλίων-λεμφοκυττάρων μπορεί να είναι ένας κλινικά σημαντικός βιοδείκτης για την εκτίμηση της πρόγνωσης των χειρουργήσιμων καρκίνων του παχέος εντέρου. (LIU Hailiang et al,2013)

Την παραπάνω έρευνα, έρχεται να την ενισχύσει μια άλλη από τους Ishizuka και συν., μελέτη όπου διερευνήθηκε η χρησιμότητα ενός νέου προγνωστικού συστήματος που βασίζεται στη φλεγμονή, και προκύπτει από τον συνδυασμό του αριθμού των αιμοπεταλίων και ουδετεροφίλων στην λεμφοκυτταρική αναλογία, με σκοπό την

πρόβλεψη της μετεγχειρητικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Επίσης απέδειξαν ότι αντιδραστική θρομβοκυττάρωση σχετίζεται με την επιβίωση μετά από χειρουργική επέμβαση για διάφορους τύπους καρκίνου, και για αυτό φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από το ότι:

1. Η αντιδραστική θρομβοκυττάρωση αφορά μία υπερκυτταροκιναιμία, με κύριους αντιπάλους τα καρκινικά εναντίων της αλληλεπίδρασης ξενιστή. Μεταξύ των πολλών φλεγμονωδών κυτταροκινών, η IL-6 έχει ένα σημαντικό ρόλο στην αντιδραστική θρομβοκυττάρωση, αφού είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη με μια σειρά από φυσιολογικές δράσεις, διεγείροντας όχι μόνο την ανοδική ρύθμιση της CRP, αλλά επίσης και καθοδική ρύθμιση της λευκωματίνης στο ήπαρ, καθώς και την πρωτεϊνική σύνθεση. Παρομοίως, η IL-6 έχει μία κύτταρο-πολλαπλασιαστική επίδραση, προκαλώντας τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων σε αιμοπετάλια, στον μυελό των οστών.

2. Η θρομβοκυττάρωση επίσης επάγεται από τον ίδιο τον όγκο. Γενικά, η θρομβοκυττάρωση είναι ένα χαρακτηριστικό στο 10-57% των ασθενών με κακοήθεια, έτσι μια ποικιλία νεοπλασματικών κυττάρων πιθανά να διεγείρει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), ο οποίος διεγείρει επίσης τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων. Επειδή, η επαγωγή του VEGF προάγει την ανάπτυξη των όγκων, η θρομβοκυττάρωση αντανakλά έμμεσα την εξέλιξη του όγκου. Στην πραγματικότητα, ένα υψηλό επίπεδο του VEGF βρίσκεται στον ορό, στα αιμοπετάλια και στα λευκοκύτταρα των ασθενών με κακοήθη νόσο, και συνεπώς η αιμοπεταλιακή αλληλεπίδραση με κακοήθη κύτταρα προωθεί τη μετάσταση. [42]

Το ρόλο του VEGF στην συνεκτική σχέση της καρκινογένεσης με τα αιμοπετάλια απέδειξαν και οι μελέτες των R. Salgado και συν., όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα ορού και πλάσματος του VEGF και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) από αίμα που λήφθηκε από τη μεσεντέρια φλέβα, σε ορθοκολικούς όγκους.

Βρέθηκαν ότι:

1. τα επίπεδα VEGF του ορού είναι 10 φορές υψηλότερα από ότι αυτά του VEGF του πλάσματος, σύμφωνα με τα προηγούμενα ευρήματα.
2. ο VEGF του ορού δεν προέρχεται από πρωτογενή όγκο σε αυτούς τους ασθενείς
3. Η IL-6 παραγόταν από τους όγκους, όπως φάνηκε από τα υψηλά επίπεδα IL-6 στη φλέβα τροφοδότησης του όγκου (μεσεντέρια).

Έχει αποδειχθεί ότι η αποθήκη VEGF των αιμοπεταλίων αντιπροσωπεύει τη συντριπτική πλειοψηφία των επιπέδων VEGF του ορού, και συναντάται σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο. Επικρατεί η υπόθεση ότι το υψηλότερο φορτίο VEGF αιμοπεταλίων που βρέθηκε σε ασθενείς με καρκίνο, μπορεί να οφείλεται σε μία ογκογόνο κυτταροκίνη (IL-6), που δρα ως μεσολαβητής της VEGF παραγωγής στα πρόδρομα αιμοπετάλια. (R. Salgado et al,2002)

Σε μία άλλη έρευνα των Eberhard Gunsilius και συν., βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα VEGF σε δείγματα πλάσματος, που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης από όγκο που τροφοδοτούνταν μέσω των μεσεντέριων φλεβών, σε σύγκριση με το περιφερικό αίμα, ειδικά σε ιστολογικά αδιαφοροποίητους όγκους που είναι γνωστό ότι είναι εξαιρετικά αγγειογόνοι. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την τοπική απελευθέρωση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος, είτε από τα ενεργοποιημένα θρομβοκύτταρα στο ενδοθήλιο του όγκου. Σε ασθενείς με καρκίνο, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η κατανάλωση είναι ένα πολύ γνωστό φαινόμενο. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν VEGF *in vivo*, ο οποίος μπορεί συμβάλει στα αυξημένα επίπεδά του στο πλάσμα, που παρατηρούνται σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπλέον, η κατανάλωση και η απόπτωση των αιμοπεταλίων προκαλεί αύξηση των επιπέδων θρομβοποιητίνης, η οποία διεγείρει την μεγακαρυοποίηση και αιμοπεταλιακή παραγωγή στον μυελό των οστών. Τα καινούργια σε παραγωγή αιμοπετάλια είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από εκείνα που παράγονται κατά τη διάρκεια της σταθερής κατάστασης θρομβοποίησης, με αποτέλεσμα αυξημένα VEGF αιμοπεταλιακής προέλευσης. Το εύρημα ότι η μέγιστη VEGF από αιμοπετάλια στα επίπεδα του πλάσματος, εμφανίζεται σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο ταιριάζει απόλυτα σε αυτή την υπόθεση. (Eberhard Gunsilius et al,2001)

Η συμμετοχή των υψηλών επιπέδων PMPs στην μετάσταση του καρκίνου, δεν μπορεί να αγνοηθεί, διότι συνδέεται με επιθετικούς όγκους και μειωμένη απόκριση σε θεραπείες. Η προαγγειογονική επίδραση των PMPs επιφέρεται από μονοπάτια PI3-κινάσης και ERK. Η συγκέντρωση των PMP στις θέσεις των όγκων μπορεί να είναι ασυνήθιστα υψηλή. Στον γαστρικό καρκίνο, τα επίπεδα PMPs είναι καλύτερα προβλέψιμα για μετάσταση προσδιορίζοντας τα επίπεδα της IL-6, RANTES, και VEGF. Τα PMPs του πλάσματος πιθανά να προκαλέσουν την έκκριση μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP -2 σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη, την προώθηση όγκου και εισβολή από την εύκολη οδό διέλευση τους μέσα από κολλαγόνο.

Με αυτόν τον τρόπο, η δημιουργία των PMPs επί ενός παρατεταμένου χρονικού διαστήματος πιθανά να είναι θανατηφόρα, και είναι επιτακτική ανάγκη να εκτιμηθεί καταμέτρηση τους όχι μόνο κατά τη διάρκεια νοσηρών καταστάσεων, αλλά και κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας. Στην πραγματικότητα, έχει αναφερθεί ότι η χημειοθεραπεία πιθανά να προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή MP, η οποία με τη σειρά της ενισχύει τον κίνδυνο της θρόμβωσης. Τα MPs εκφράζουν μόρια προσκόλλησης και απελευθερώνουν αυξητικό παράγοντα και MMPs, τα οποία είναι ουσιώδη για την αγγειογένεση. Αυτά τα MPs αλληλεπιδρούν με καρκινικά κύτταρα και το περιβάλλον τους, και περαιτέρω βοηθούν στην ανάπτυξη του όγκου.

Τα PMPs παίζουν ένα ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία και εκφράζουν διάφορες πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους, συμπεριλαμβανομένων:

- υποδοχέων προσκόλλησης ενδοθήλιου-αιμοπεταλίων (CD41, CD61 και CD62),
- γ-πρωτεϊνικών υποδοχέων (CXCR4 και PAR-1),
- υποδοχέων κυτταροκίνης (TNF-RI, TNF -RII, CD95)
- συνδετών (CD40L και PF-4), τα οποία πιθανά να μεταφερθούν στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον, τα PMPs προκαλούν έκφραση του mRNA των αγγειογόνων παραγόντων, όπως MMP-9, αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα, ηπατοκυτταρικό αυξητικό παράγοντα και IL-8.

Το 1983 ο Dronak και οι συνεργάτες του παρουσίασαν ότι τα μικροκυστίδια σχετιζόμενα με το PS και TF (ιστικό παράγοντα), αποτελούν απορρίμματα καρκινικών κυττάρων. Πρότειναν ότι τα κυκλοφορούντα με προθρομβωτικές ιδιότητες μικροκυστίδια ευνοούν την ανάπτυξη του όγκου λόγω του γεγονότος ότι προωθούν το ινώδες μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, παρέχοντας έτσι πλέγμα για ογκώδη αγγειογένεση. Σε έναν αριθμό μελετών, αυτή η υπόθεση έχει εγκριθεί, και ποικίλοι επιπρόσθετοι οδοί των μικροκυστιδίων-μεσολαβητών στην προαγωγή των όγκων έχουν ανακαλυφθεί. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι καρκινικά κυτταρικά απορρίμματα που εμπλουτίζονται με Fas-ligand (ή FasL ή CD95L), η οποία είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς τύπου II και ανήκει στην οικογένεια των TNF (tumor necrosis factor), εκφράζονται σε μικροκυστίδια στην κυκλοφορία, με επακόλουθο να καταστέλλεται η ανοσιακή απάντηση του ξενιστή εναντίον του όγκου. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι κυστίδια από καρκινικά κύτταρα εναλλάσσουν την λειτουργία των μη κακόηθων κυττάρων και έπειτα προωθούν τα καρκινικά κύτταρα στη μετανάστευση και την εισβολή. Ο Yu και οι συνεργάτες του παρουσίασαν δύο από τις πιο κοινές γενετικές μεταλλαγές στον άνθρωπο, τις ονομαζόμενες "απενεργοποίηση του P53" και την "μετάλλαξη της K-ράσης", οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες με την απόρριψη των σχετιζόμενων με ιστικό παράγοντα (TF) μικροκυστιδίων από καρκινικά κύτταρα. Επίσης, βρήκαν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν ότι η έκφραση του ιστικού παράγοντα από τα καρκινικά κύτταρα δεν είναι ένα απλό φαινόμενο, αλλά απαιτείται για μία πλήρη έκφραση ενός επιθετικού καρκινικού φαινότυπου (Benjamin A. Garcia et al.,2005, M. Thushara et al.,2015)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1° ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση της κυτταρικής έκφρασης και της ενδοκυτταρικής μοριακής σύστασης, σε έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό, αξιολογώντας την καθαρότητα απομονωμένων υποπληθυσμών και αναλύοντας το μέγεθος και τον όγκο των κυττάρων. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων των μεμονωμένων κυττάρων, ενώ χρησιμοποιείται εξίσου αποτελεσματικά στο πεδίο καταμέτρησης κυττάρων όπου εμπεριέχεται διαφοροποίηση πολλαπλών πληθυσμών, όπως τα δείγματα του όρου του αίματος. Οι ανοσοδοκιμασίες με κυτταρομετρία ροής βασισμένες σε σφαιρίδια έχουν τη δυνατότητα ποσοτικής και ποιοτικής μέτρησης πολλαπλών αντιγόνων ή αντισωμάτων σε μικρό όγκο βιολογικών υγρών. Η συγκεκριμένη τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεσολαβητών που εκφράζονται από τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής και της φλεγμονώδους απάντησης. Οι κυτοκίνες, οι χημειοκίνες, τα φλεγμονώδη κύτταρα και οι υποδοχείς, καθώς και ανοσοσφαιρίνες προσφέρονται συχνά ως μόρια-στόχοι για πολλαπλές αναλύσεις¹.

Η μέτρηση χρησιμοποιεί ένα εισαγόμενο δείγμα με γνωστή συγκέντρωση φθορίζοντων σφαιριδίων (beads). Το δείγμα προωθείται μέσω του κυτταρόμετρου και ρυθμίζεται να σταματήσει αφού αναλυθεί ένας προκαθορισμένος αριθμός σφαιριδίων. Επειδή η συγκέντρωση των σφαιριδίων είναι γνωστή, ο όγκος του δείγματος που αναλύεται μπορεί εύκολα να υπολογιστεί. Ο αριθμός των κυτταρικών συμβάντων μπορεί στη συνέχεια να μετρηθεί εύκολα και να προσδιοριστεί η συγκέντρωση. Διαφορετικοί πληθυσμοί εντός ενός δείγματος μπορούν να διαφοροποιηθούν με ιδιότητες διασποράς ή φθορίζουσα χρώση. Η κυτταρομετρία με την χρήση μικροσφαιριδίων διαφόρων μεγεθών ή χρωμάτων είναι η βάση πολλαπλών ανοσοδοκιμασιών. Διάφορα συστατικά του αίματος μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμασία σε έναν σωλήνα χρησιμοποιώντας πολύ μικρούς όγκους δειγμάτων. Τα σφαιρίδια που φέρουν διαφορετικούς δείκτες διαφοροποιούνται

¹Methods in Molecular Biology, vol. 378

από τα διαφορετικά τους χαρακτηριστικά. Η σύνδεση των φθοριζόντων ανιχνευτών στα κυτταρικά στοιχεία δημιουργεί το σήμα ανοσοταυτοποίησης. Μπορούν να αναγνωριστούν και να διαφοροποιηθούν ισομεγέθη σφαιρίδια υπό έναν τύπο φθορισμού, ενώ το σήμα παράγεται από προϊόντα σύζευξης που φέρουν ένα δεύτερο τύπο σήματος φθορισμού. Αυτή η έννοια είναι χρήσιμη για τη δημιουργία χαμηλής πολυπλοκότητας σφαιρίδια.

Όταν αναλύεται ένα δείγμα βιολογικού υγρού όπως το αίμα, η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της έντασης φθορισμού που παράγεται από φθορίοσημασμένα αντισώματα που ανιχνεύουν πρωτεΐνες ή συνδέτες που δεσμεύονται με συγκεκριμένα κυτταρο-συσχετισμένα μόρια. Τα διάφορα κίτς που κυκλοφορούν στο εμπόριο χρησιμοποιούν σφαιρίδια, κεχρωσμένα με μια φθοριο-χρωστική πρωτεΐνη. Η διαδικασία χρώσης περιλαμβάνει την παρασκευή ενός κυτταρικού εναιωρήματος. Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάζονται σε σωλήνες ή πλάκες μικροτιτλοδότησης με μη επισημασμένα ή επισημασμένα αντισώματα και αναλύονται στο κυτταρόμετρο ροής.

Κάθε διαφορετική ομάδα σφαιριδίων επισημαίνεται με διαβαθμισμένο επίπεδο φθορισμού αναστέλλοντας τη χρώση έτσι ώστε να μπορεί να διακρίνεται από τη μέση ένταση φθορισμού(MFI) κατά την ανάλυση. Τα ομαδοποιημένα σωματίδια συνδέονται ομοιοπολικά με αντισώματα που μπορούν να δεσμεύσουν έναν συγκεκριμένο τύπο μορίου που περιέχεται στον υπό μελέτη ορό. Μετά την απόκτηση των δεδομένων, οι καμπύλες κανονικής κατανομής καταρτίζονται σε γραφική μορφή και τα αποτελέσματα των δειγμάτων καταγράφονται στον πίνακα από το προεγκατεστημένο λογισμικό ή εξάγονται χειρόγραφα από τον εκάστοτε αναλυτή.

2° ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ

ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Καθώς εκτελείται οποιοδήποτε πείραμα κυτταρομετρίας, με σκοπό να προβλέπονται εξ' αρχής οι ασάφειες και τα σφάλματα μετρήσεων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω στοιχεία ελέγχου:

➤ **Μολυσματικότητα των δειγμάτων :**

Όλα τα δείγματα των ασθενών και γενικά τα εργαστηριακά δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται ως εν δυνάμει μολυσματικά. Κάθε πειραματιστής να τα χειρίζεται σε όλα τα εργαστηριακά στάδια σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα προσωπικής προφύλαξης και διαφύλαξης της δημόσιας υγείας. Σε αυτό το σημείο αρκεί να επεξηγηθεί ότι ως μολυσματικό δείγμα ορίζεται οποιοδήποτε δείγμα είναι ένα δυνάμει ικανό να περιέχει κάποιον μολυσματικό παράγοντα, ο οποίος δύναται να οδηγήσει σε παθολογική κατάσταση υπό λανθασμένους και πλημμελείς χειρισμούς².

➤ **Βιωσιμότητα των κυττάρων :**

Κάποια ήδη νεκρωμένα κύτταρα του δείγματος μπορούν να παράγουν σωματίδια λόγω της μη ειδικής δέσμευσης και των αυξανόμενων επιπέδων αυτοφθορισμού, οδηγώντας σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Έτσι, είναι σημαντικό να παραληφθούν αυτά τα νεκρά κύτταρα από την ανάλυση δεδομένων. Για τον σκοπό αυτό, διατίθενται στο εμπόριο αρκετοί δείκτες είναι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ νεκρών και ζωντανών κυττάρων. Οι 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD), το ιωδιούχο προπίδιο, το πυρηνικό DCS1 και το DRAQ7 είναι χρωστικές που χρησιμοποιούνται επι μη σταθεροποιημένων κυττάρων και διακρίνουν τα ζώντα από τα νεκρωμένα με χρώση και απόκλιση των νεκρών από τα ζώντα. Ακόμη, η Calcein είναι μια διαπερατή από τα κύτταρα φθορίζουσα χρωστική για τον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας. Αυτή η χρωστική υδρολύεται σε φθορίζουσα καλσεΐνη με ενδοκυτταρικές εστεράσες σε ζωντανά κύτταρα. Τα κύτταρα μπορούν να σταθεροποιηθούν αρχικά με παραφορμαλδεΐδη και στη συνέχεια να αναλυθούν με εγκυρότητα.

➤ **Αυτοφθορισμός :**

Φυσικά συστατικά κυττάρων όπως το NADPH και φλαβίνες μπορούν να αυτοφθορίζουν μετά από διέγερση με λέιζερ. Ο αυτοφθορισμός επηρεάζεται από τον κυτταρικό τύπο και τις φυσιολογικές συνθήκες, γεγονός που μπορεί να υπερκαλύπτει το ειδικό για το αντιγόνο σήμα. Για τον έλεγχο του αυτοφθορισμού σε

²Garner J.S., 1996

σχέση με μια πειραματική μέτρηση, πρέπει σε πρώτη φάση να αναλυθεί ένα δείγμα μη χρωματισμένων κυττάρων στο κυτταρόμετρο. Η επεξεργασία των κυττάρων και οι ρυθμίσεις στο μηχάνημα πρέπει να είναι όμοιες με αυτές του δείγματος. Ο αυτοφθορισμός, μπορεί να εξισορροπηθεί με τη χρήση διαφορετικού λέιζερ ή μαθηματική διόρθωση μέσω της αντιστάθμισης. Στην τελευταία περίπτωση το σήμα αυτόματου φθορισμού επεξεργάζεται ως πρόσθετο που μετράται σε έναν ειδικό ανιχνευτή και αφαιρείται.

➤ **Φασματική επικάλυψη :**

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από ένα φθοριοσημασμένο μόριο σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να ανιχνευθεί σε διαφορετικό κανάλι του κυτταρόμετρου. Επομένως, το φαινόμενο μπορεί να τροποποιήσει σοβαρά τις μετρήσεις σε ένα συγκεκριμένο κανάλι. Όταν πραγματοποιείται πείραμα κυτταρομετρίας, τα φάσματα εκπομπής των διαφόρων φθοριοχρωμάτων μπορούν να αλληλεπικαλύπτονται, με αποτέλεσμα την ανίχνευση σε διαφορετικό κανάλι (ονομάζεται επίσης διαρροή). Αυτό το φαινόμενο - που μπορεί να επηρεάσει σοβαρά τις μετρήσεις και πρέπει να ελέγχεται. Η αντιστάθμιση είναι η διαδικασία με την οποία υπολογίζεται η φασματική επικάλυψη και αφαιρείται από το συνολικό ανιχνευόμενο σήμα για να αποδώσει μια εκτίμηση της πραγματικής ποσότητας κάθε χρώσης.

➤ **Ανεπιθύμητη δέσμευση αντισώματος :**

Αυτό συμβαίνει όταν το αντίσωμα προσδένεται είτε σε επίτοπο εκτός στόχου είτε σε υποδοχέα (αλλά όχι ως αλληλεπίδραση υποδοχέα-συνδέτη), ή δεσμεύεται μέσω ενός επίτοπου ή αντιγόνου μέσω του συζευγμένου φθοροφόρου του, επομένως αφορά κάθε περίπτωση δέσμευσης αντισώματος που εμποδίζει την ορθή ερμηνεία των δεδομένων. Το σφάλμα αυτό μπορεί να προβλεφθεί μέσω διαφόρων ποιοτικών ελέγχων :

- ✓ Αρνητικού ελέγχου (έκθεση ενός κυτταρικού πληθυσμού που δεν εκφράζει το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει στις ίδιες πειραματικές συνθήκες με τον πληθυσμό της μελέτης)

- ✓ Ελέγχου ισotόπου (προσδιορισμός της μη ειδικής δέσμευσης αντισώματος με την αξιοποίηση ενός αντισώματος του ίδιου ισotύπου με το πρωτεύον, αλλά με χαρακτηριστική ειδικότητα σύνδεσης για ένα αντιγόνο που δεν υπάρχει στα υπό μελέτη κύτταρα- Alexa Fluor χρωστικές, βιοτίνη, φυκοερυθρίνη, φλουορεσκεΐνη isothocyanate (FITC) κ.α)
- ✓ Ισοκλωνικού ελέγχου (κύτταρα που σημαίνονται με το συζευγμένο αντίσωμα σε περίσσεια ταυτόσημου (Ισοκλωνικού) μη σημασμένου αντισώματος, έτσι ώστε οι ειδικές θέσεις πρόσδεσης αντισώματος ν' απορροφούνται από το μη συζευγμένο αντίσωμα)

3° ΥΛΙΚΑ & ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε την μέτρηση των μικροσωματίδιων των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους συνδυασμούς φθοριοσημασμένων αντισωμάτων. Αντίστοιχα δείγματα απομονώθηκαν κι από υγιείς εθελοντές και υπόκεινται σε συγκρίσεις, επομένως η πειραματική έρευνα και η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποτελούν πειραματική έρευνα ασθενών-μαρτύρων.

3.1 Προετοιμασία δείγματος

3.1.1 Αντιπηκτικός παράγοντας

Για την προετοιμασία του δείγματος χρησιμοποιήθηκε όρος αίματος που συλλέχθηκε από τοπικό νοσοκομείο και συντηρήθηκε με κιτρικό αντιπηκτικό. Η επιλογή του αντιπηκτικού εξαρτάται από:

- το είδος του δείγματος
- τις συνθήκες μεταφοράς του δείγματος
- τις απαιτήσεις αποθήκευσης του δείγματος
- την μέθοδο προετοιμασίας του δείγματος

Καθώς οι ιστοί και τα σωματικά υγρά (περιφερικό αίμα, μυελός των οστών, πλευριτικό και αμνιακό υγρό ή εγκεφαλονωτιαίο υγρό) δεν μπορούν να μονιμοποιηθούν με φορμαλδεΰδη ή άλλα μονιμοποιητικά υλικά, η μεταφορά τους στο εργαστήριο πρέπει να γίνεται το συντομότερο δυνατό. Σε κάθε περίπτωση, η επιλογή του αντιπηκτικού διαφέρει ανάλογα με το είδος του δείγματος³, ωστόσο περισσότερο προτιμητέα για ανάλυση στο εργαστήριο είναι τα πολύ πρόσφατα συλλεγμένα δείγματα. Οι κυριότεροι αντιπηκτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακές αναλύσεις κυτταρομετρίας τους είναι οι παρακάτω :

- EDTA (Ethylene-diaminetetraacetic acid EDTA :2mg/mL K2EDTA - σταθερότητα δείγματος : 12-24 ώρες)

Το EDTA που είναι ένας χημικός παράγοντας είναι ιδιαίτερα χρήσιμο αντιδραστήριο στις αιματολογικές εξετάσεις διότι προστατεύει τα κυτταρικά συστατικά του αίματος (μείωση ύπαρξης συσσωματωμάτων λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων). Το EDTA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όταν το δείγμα πρόκειται να υποβληθεί σε λειτουργικές δοκιμασίες, διότι δεσμεύεται το Ca^{2+} . Το κατάλληλο αντιπηκτικό για τις λειτουργικές δοκιμασίες είναι η ηπαρίνη. Δείγματα με EDTA άνω των 24 ωρών θεωρούνται μη αξιόπιστα (suboptimal), εφόσον θα έχουν μειωθεί τα κοκκιοκύτταρα (λόγω ταχείας νέκρωσης κοκκιοκυττάρων). Δείγματα που περιέχουν αντιπηκτικό εκτός του EDTA θα πρέπει να συνοδεύονται από ένα επίχρισμα περιφερικού αίματος χωρίς χρώση για μορφολογική εξέταση

- ACD (acid citrate dextrose, solution A- σταθερότητα δείγματος : έως 72 ώρες)

Το ACD είναι ένα αντιπηκτικό μείγμα κιτρικού οξέος, νατρίου και δεξτρόζης. Τα δείγματα που διατηρούνται σε ACD για την επόμενη ημέρα μπορεί να δείξουν χαμηλή βιωσιμότητα. Εάν χρησιμοποιηθεί ACD, η κατάλληλη αναλογία σωματικού υγρού με αντιπηκτικό θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην τροποποιηθεί το pH και επομένως να μειώσει την βιωσιμότητα.

- Ηπαρίνη (200U/mL σταθερότητα δείγματος :48-72 ώρες) :

³Most current edition of CLSI/NCCLS document H3 – Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture

Η ηπαρίνη είναι το πλέον διαδεδομένο αντιθρομβωτικό και προξενεί τη μικρότερη παρεμβολή στους προσδιορισμούς των διαφόρων παραμέτρων εκτός εκείνης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

3.1.2 Δημιουργία εναιωρήματος

Προκειμένου να μετρηθεί ένα δείγμα με κυτταρομετρία ροής, πρέπει να βρίσκεται υπό τη μορφή εναιωρήματος. Για τον λόγο αυτό, το δείγμα του πειράματός μας φυγοκεντρήθηκε στις 1.500 στροφές για 20 λεπτά και μετά στις 13.000 στροφές για 2 λεπτά για να παρασκευάσουμε PFP (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια). Στην συνέχεια, αυτό αποθηκεύτηκε στους -80°C .

3.1.3 Παρασκευή MPs :

Για την παρασκευή MPs, χρησιμοποιήθηκαν 250 ml PFP τα οποία επώαστηκαν σε πάγο και σε σκοτεινές συνθήκες για 60 λεπτά και μετά φυγοκεντρηθηκαν στις 20.000 στροφές για 45 λεπτά. Το δείγμα αποψύχεται πάντα σε θερμοκρασία δωματίου ($20-25^{\circ}\text{C}$)⁴.

3.1.4 Προσθήκη αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος

Για την κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων, προστέθηκε διάλυμα φωσφορικών (PBS). Το PBS είναι το ακρωνύμιο που αντιπροσωπεύει ένα ρυθμιστικό αλατούχο φωσφορικό διάλυμα. Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα είναι ένα από τα πιο κοινά ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στη βιολογική έρευνα με σκοπό να διατηρεί σταθερό το pH, ενώ μπορεί να προστεθεί φυσιολογικός ορός για την ρύθμιση της οσμωτικότητας. Άλλα ιόντα όπως Ca^{2+} ή Mg^{2+} , η γλυκόζη ή χημικοί παράγοντες όπως το EDTA μπορούν να προστεθούν με βάση τις ειδικές ανάγκες του πειράματος. Πιο αναλυτικά, στη συνολική διαδικασία κάναμε δύο διαφορετικές μετρήσεις με διαφορετικά αντισώματα. Και στις δύο χρησιμοποιήθηκαν 10 ml πλάσματος (PFP- platelet-free plasma) και 90 ml buffer PS -IX.

3.2 BD TRUCOUNT TUBES

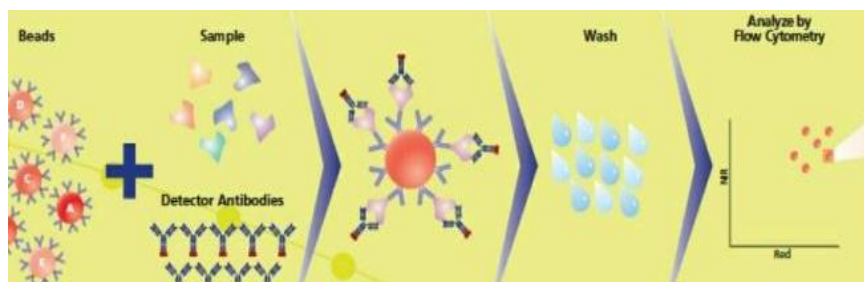
Η απαραίτητη ανάμειξη του πλάσματος με το διάλυμα και τα αντισώματα γίνεται σε ειδικά σωληνάρια. Κάθε συσκευασία έχει έναν ειδικό αριθμό μικροσφαιριδίων

⁴Zhao et al,2016

που αναγράφεται στη συσκευασία και αντιστοιχίζεται με το σειριακό αριθμό των σωληναρίων, επομένως ο αριθμός αυτός δεν πρέπει να συγχέεται ή να χάνεται.

Πολλές εταιρείες προσφέρουν ειδικά σωληνάρια με γνωστές ποσότητες σφαιριδίων ή διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σφαιριδίων. Τα σωληνάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα (εταιρείας BD, TruCOUNT tubes) περιέχουν μια γνωστή ποσότητα σφαιριδίων. Έτσι, με την προσθήκη ενός γνωστού όγκου προϊόντος σε έναν γνωστό όγκο δείγματος, διευκολύνεται ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης σφαιριδίων.

Τα σφαιρίδια χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων στο αίμα. Τα σωληνάρια BD Trucount είναι σχεδιασμένα για χρήση με *in vitro* διαγνωστικά προϊόντα όπως BD Tritest, και κατάλληλα εξοπλισμένο κυτταρόμετρο ροής. Αυτά περιέχουν ένα λυοφιλοποιημένο ίζημα στο βάθος του κάθε σωληναρίου το οποίο διαλύεται απελευθερώνοντας ένα γνωστό αριθμό φθορίζοντων σφαιριδίων. Το κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα που θα δράσει ως αντιδραστήριο και ο πλήρης όρος του αίματος προστίθεται απευθείας στον σωλήνα.



Εικόνα 3: Σύνδεση Beads, δείγματος και αντισωμάτων

Πηγή: <https://biotech.illinois.edu/flowcytometry/protocols/cytometric-bead-array>

3.3 Πιπετάρισμα (pipeting)

Είναι πολύ σημαντικό για την εγκυρότητα των μετρήσεων οι πιπέτες που θα χρησιμοποιηθούν να είναι σωστά ρυθμισμένες και ελεγμένες και να διαθέτουν τα κατάλληλα ακροφύσια. Κατά το πιπετάρισμα (pipeting) απαγορεύεται η διαστομάτος αναρρόφηση. Ενδεδειγμένες μέθοδοι σύμφωνα με τα πρωτοκόλλα προφύλαξης είναι οι παρακάτω:

-Ηλεκτρονική αναρρόφηση

- Ανάστροφη αναρρόφηση (reverse pipetting)
- Τεχνική prewetting (βρέχουμε το ρύγχος και μετά πιπετάρουμε κανονικά)
- Ρομποτικό σύστημα αναρρόφησης

Αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται λυτικός παράγοντας που περιέχει δι-αιθυλενογλυκερόλη και φορμαλδεΐδη επομένως οι χειρισμοί πρέπει να είναι πολύ προσεκτικοί για την αποφυγή πρόκλησης ατυχημάτων.

3.4 Ανάλυση/ Εξαγωγή Αποτελεσμάτων

Στη διάρκεια της ανάλυσης, ο απόλυτος αριθμός (κύτταρα / ml) των μετρούμενων κύτταρων στο δείγμα (A) μπορούν να προσδιοριστούν με τη σύγκριση των κυτταρικών συμβάντων με τα συμβάντα σφαιριδίων. Εάν το κυτταρόμετρο είναι εξοπλισμένο με το κατάλληλο λογισμικό (BD Multiset) οι μετρήσεις αποδίδονται άμεσα από το λογισμικό. Στην περίπτωση που η ανάλυση δεδομένων εκτελείται χωρίς αυτό, με την βοήθεια ενός άλλου λογισμικού (BD CellQuest Pro), απλά διαιρείται ο αριθμός των κυτταρικών συμβάντων (X) με τον αριθμό συμβάντων σφαιριδίων (Y) και στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό της συγκέντρωσης σφαιριδίων στα σωληνάρια.

(N/V, όπου N ο αριθμός των σφαιριδίων (beads) σε κάθε εξέταση ,που αναγράφεται στη συσκευασία και V ο όγκος του δείγματος)

$$A=X/Y * N/V.$$

3.5 Προσθήκες δεικτών

Στη συνέχεια προστίθενται στην πρώτη μελέτη 3ml ανεξίνης καθώς και τα αντισώματα που θα ανιχνευθούν (4ml CD 41).Στη δεύτερη μελέτη προστέθηκαν τα άλλα αντισώματα (4ml CD 142/ 4 ml CD 144, 4 ml CD 227). Έγινε ανάμιξη σε συσκευή Vortex που ενδείκνυται για την ανάδευση σωληναρίων ή φιαλιδίων με σκοπό την αποτροπή δημιουργίας συσσωματώματων. Η ανάδευση είναι ανεξάρτητη από την πίεση και εκτελείται σε κλίμακα 0-40 Hz. Στην συνέχεια, το μείγμα επωάστηκε σε σκοτεινές συνθήκες και θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Προστέθηκαν 400 ml buffer PS για να σταματήσει η αντίδραση και κάναμε τις

μετρήσεις στο κυτταρόμετρο ροής μέσα σε μία ώρα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε ανοσοφαινοτύπηση(IFU).

- **ΑΝΕΞΙΝΗ**

Η ανεξίνη είναι μια ανεξάρτητη από το ασβέστιο πρωτεΐνη που συνδέεται με φωσφολιπίδια. Έχει υψηλή συγγένεια για τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και συνδέεται με κύτταρα με εκτεθειμένη PS. Αυτή η έκθεση της PS παρατηρείται σε αποπτωτικά κύτταρα στα οποία μεταπίπτει μέσω διάχυσης από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η ανεξίνη συνδέεται με την φικοερυθρίνη (PE) και χρησιμεύει σαν ένας ευαίσθητος δείκτης για την ανάλυση των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας. Πρέπει να διατηρείται στους 4° C και να προστατεύεται από το φως⁵.

- **ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑ**

Όλα τα αντισώματα έχουν προδιαλυθεί στην συνιστώμενη ποσότητα όγκου ανά test. Τυπικά βάζουμε 1*10⁶ κύτταρα σε 100 ml δείγματος.

Το CD 142 αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως θρομβοπλαστίνη και αντιδρά με τον ιστικό παράγοντα Tissue Factor. Εκφράζεται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε διεγερμένα μακροφάγα. Ο TF αλληλεπιδρά με τον παράγοντα VII για την έναρξη του καταρράκτη της πήξης⁶.

Το CD 144 είναι το 55-7 H1. Πρόκειται για ένα αντίσωμα που αντιδρά με ένα ανεξάρτητο από το ασβέστιο επίτοπο στην καντχερίνη-5. Η καντχερίνη-5 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro και in vivo. Παίζει ρόλο στην οργάνωση των ενδοθηλιακών συνδέσεων και στον έλεγχο της διαπερατότητας του αγγειακού ενδοθηλίου⁷.

Το CD 227 είναι γνωστό και σαν MUC-1. Εκφράζεται σαν μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου 1. Ανήκει σε μια οικογένεια μουκίνης που έχει υψηλό μοριακό

⁵Casiola-Rosen et al, and van Engeland et al,

⁶Carson SD et al, Blood 1994, McComb RD et al, Am J Pathol 1991, Whittle SM et al, Thromb Res 1995

⁷Breier G. Et al, Blood, 1996, Lampugnani MG et al, J Cell Biol, 1996, Vincent PA et al, AM J Physiol Cell Physiol 2004

βάρος και μια σύνθεση αμινοξέων πλούσια σε σερίνη, θρεονίνη, προλίνη και γλυκίνη. Εκφράζεται σε φυσιολογικά και σε κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε T και B κύτταρα, μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα. Παίζει ρόλο στη λειτουργία του προστατευτικού κυτταρικού φραγμού, τη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης και τη μετάδοση πολλών σημάτων⁸.

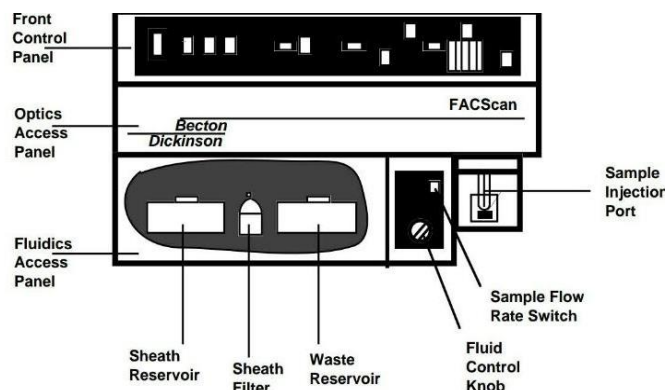
Το CD 41 είναι γνωστό και σαν ιντεγκρίνη αIIb ή αιμοπεταλιακή GPIIb. Αναστέλλει ολοκληρωτικά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που επάγεται από την επινεφρίνη, το κολλαγόνο και το ADP. Επίσης, αναστέλλει μερικώς την ενεργοποίηση που επάγεται από τη ριστοσετίνη και τη θρομβίνη⁹.

3.6 Κυτταρομετρία ροής

Για την παρούσα πειραματική διεργασία, χρησιμοποιήθηκε ένα κυτταρόμετρο ροής που να ανιχνεύει φθορισμό τριών ή τεσσάρων χρωμάτων, πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό. Ο κυτταρομετρητής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Becton Dickinson FACScan System. Βασική του λειτουργία είναι η ανάλυση των κυττάρων σε ένα ρεύμα ροής ρευστού, εν τω προκειμένω του ρευστού πλάσματος, καθώς διέρχονται διαμέσου μιας επικεντρωμένης ακτίνας λέιζερ. Ο συγκεκριμένος κυτταρομετρητής ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τυπικές ερευνητικές εφαρμογές,, ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση, ακόμη και ανάλυση κυτταρικού κύκλου DNA. Η εν λόγω συσκευή αποτελείται από μια μονάδα αισθητήρα (Εικόνα 4), μια ηλεκτρονική υπολογιστική μονάδα και διάφορα πακέτα λογισμικού. Πολλές από τις λειτουργίες του οργάνου ελέγχονται από το απαραίτητο λογισμικό

⁸Devine PL et al, Tumour Biol 1992, Xing PX et al, J Natl Cancer Inst 1992, Xing PX et al, Cancer Res 1992

⁹Knapp W. Et al., Leukocyte Typing IV 1989, Schlossman SF et al, Leukocyte Typing V 1995



Εικόνα 4: Αναπαράσταση μηχανήματος κυτταρομετρίας

Πηγή: BD FACScan System

Όπως παρατηρούμε κι από την εικόνα, το μηχάνημα μεταξύ άλλων περιέχει έναν επιλογέα για τον έλεγχο των διερχομένων εναιωρημάτων. Αυτός ο επιλογέας, επιτρέπει την επιλογή μεταξύ πέντε διαφορετικών ρευστομηχανικών : μια για την προώθηση των ρευστών από την κυψέλη ροής προς στα απόβλητα, μια για την πλήρωση της κυψελίδας ροής με υγρό υπό ελεγχόμενο ρυθμό που εμποδίζει την δημιουργία φυσαλίδων, μια για την υπερπίεση του διαύλου των ρευστών δειγμάτων και την μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος στην κυψέλη ροής, μια για την μείωση της ισχύος του λέιζερ με στόχο την ευσυντηρησία του και μια για την αναστροφή της ροής του υγρού του και την αυτοματοποιημένη έκπλυση του ρευστού από το δείγμα. Υπάρχουν τρεις επιλογές σχετικές με τον ρυθμό ροής του δείγματος :

- 12 μL δείγματος/ λεπτό
- 35 μL δείγματος/ λεπτό
- 60 μL δείγματος / λεπτό

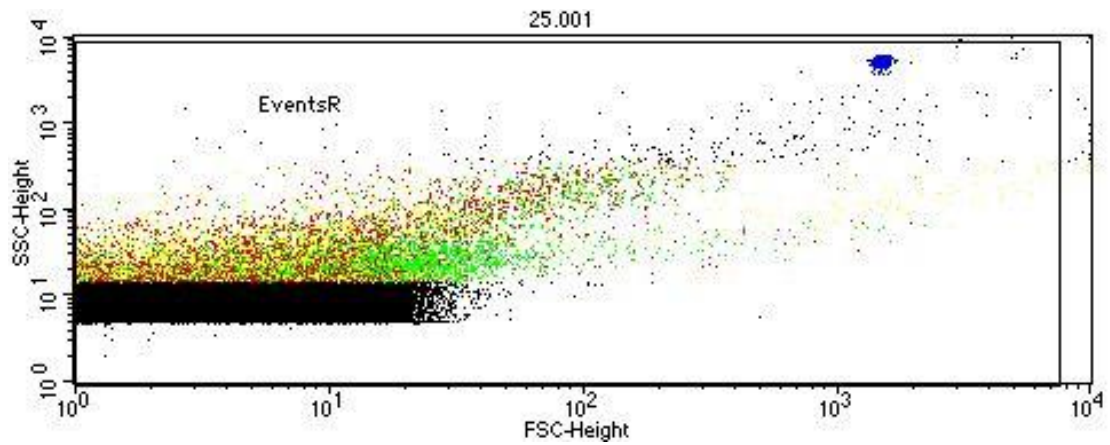
Η συσκευή περιέχει πέντε κανάλια φθορισμού και στο εγκατεστημένο λογισμικό υπάρχει η δυνατότητα προγραμματισμού γραμμικής ή λογαριθμικά συσχέτισης κατά την ανάλυση των μετρήσεων που συνδυάζονται με κάθε μια από τις επιλογές των καναλιών. Μια ακόμη παραμετροποίηση επιτρέπει τον έλεγχο των παρατιθέμενων μετρήσεων είτε του ανιχνευτή (DET) ή του ενισχυτή (AMP). Η λειτουργία του ενισχυτή αφορά την διαλογή και την απόρριψη σημάτων χαμηλότερων από την ρύθμιση κατωφλίου που αντιστοιχεί σε ένα από τα επιλεγμένα κανάλια. Έτσι,

παρέχεται μια αξιόπιστη μέθοδος για την εξάλειψη του θορύβου από μπορεί να προκληθεί από μικροσωματίδια που δεν αφορούν το μετρητικό αποτέλεσμα. Το εύρος κυμαίνεται σε ποσοστιαίες μονάδες από 0 έως 99,6 με βήμα της τάξεως του 0,1.

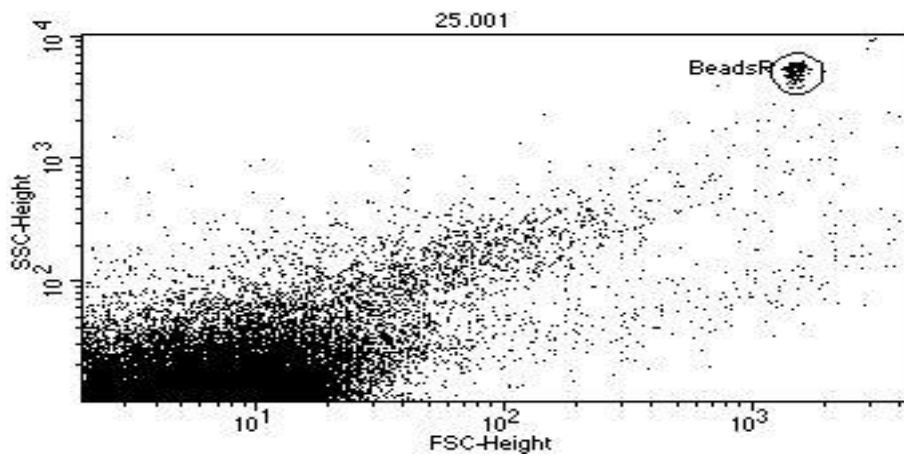
Αξίζει να σημειωθεί ότι προτού γίνει έλεγχος στα δείγματα, πάντα πρέπει να γίνεται έλεγχος με ένα control (δείγμα υγιούς εθελοντή). Επίσης, πριν και μετά το κάθε δείγμα, η συσκευή πρέπει να ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (water for injection) για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και να καθίσταται η συσκευή έτοιμη προς επόμενη χρήση. Στο τέλος των καθημερινών αναλύσεων, γίνεται πλύση με ειδικά διαλύματα rinse και clean.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται παρακάτω σε εικόνες που έχουμε συλλέξει και αφορούν τόσο τους ασθενείς, όσο και τους υγιείς εθελοντές(controls). Κάθε ομάδα εικόνων είναι ενδεικτική για διαφορετική ομάδα δοτών δείγματος, είτε πρόκειται για ασθενείς είτε υγιείς δότες.

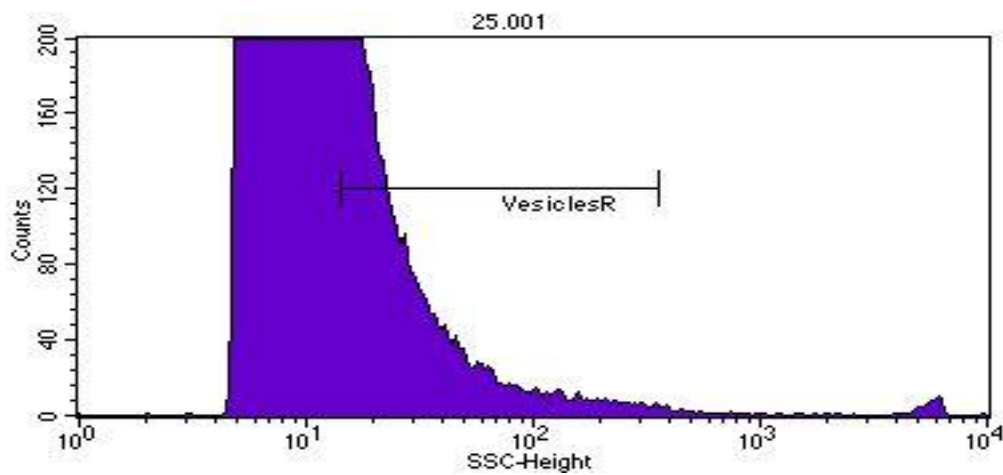
Αρχικά παρουσιάζονται αποτελέσματα που αφορούν δείγματα ορού στα οποία έχει ανιχνευθεί μικρός αριθμός αντισωμάτων, οπότε τα δείγματα αυτά χαρακτηρίζονται κυρίως αρνητικά, αλλά δεν εξάγεται ακριβές συμπέρασμα από τον αριθμό αντισωμάτων.



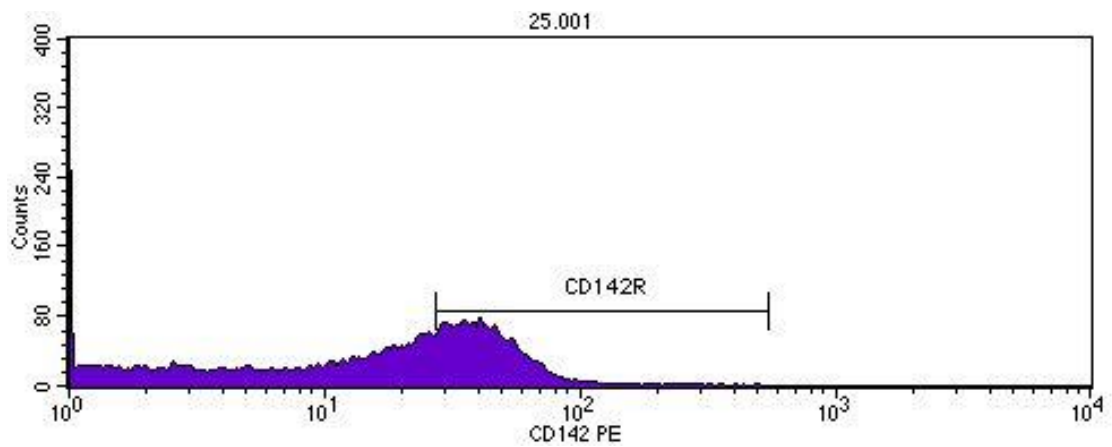
Εικόνα 1: Ολικός αριθμός συμβάντων του υπό εξέταση δείγματος.



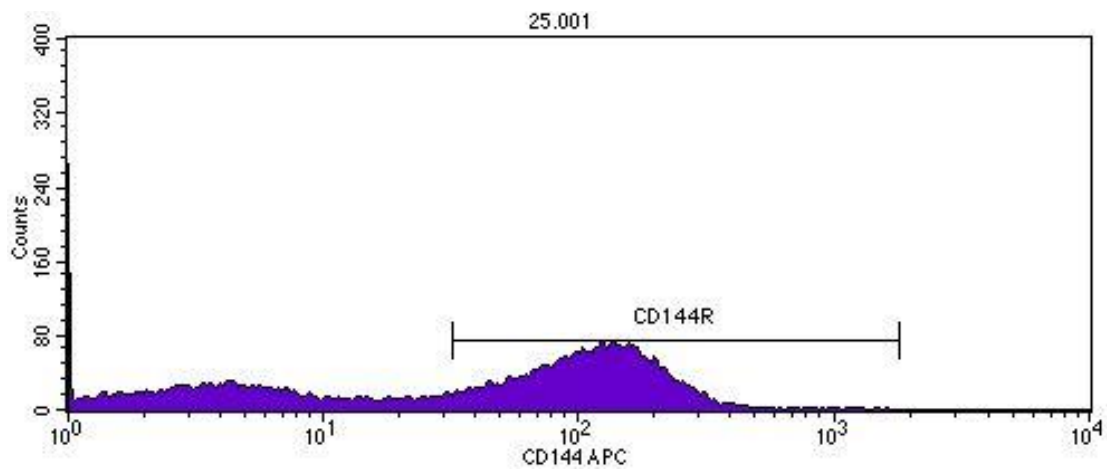
Εικόνα 2: Αριθμός beads που έχουν ανιχνευτεί στο υπό εξέταση δείγμα.



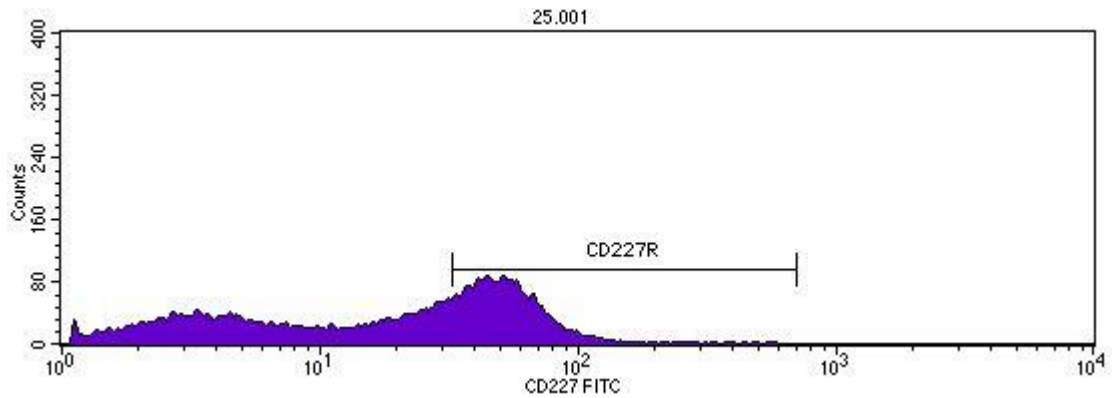
Εικόνα 3: Γραφική παράσταση του πληθυσμού μικροσωματιδίων του δείγματος και εύρος του υπό εξέταση τμήματος του πληθυσμού αυτού.



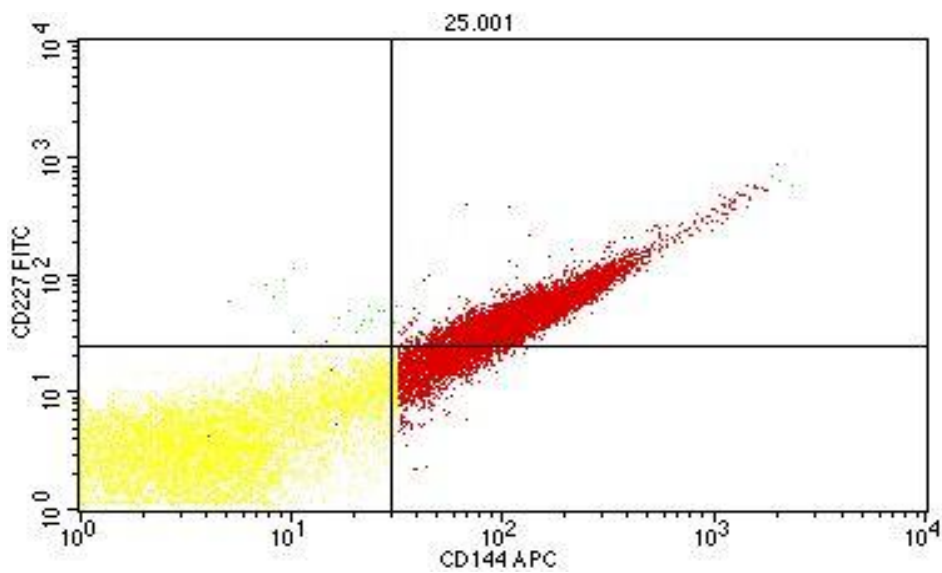
Εικόνα 4: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD142 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Θετικά θεωρούνται τα μικροσωματίδια που βρίσκονται εντός του εύρους τιμών.



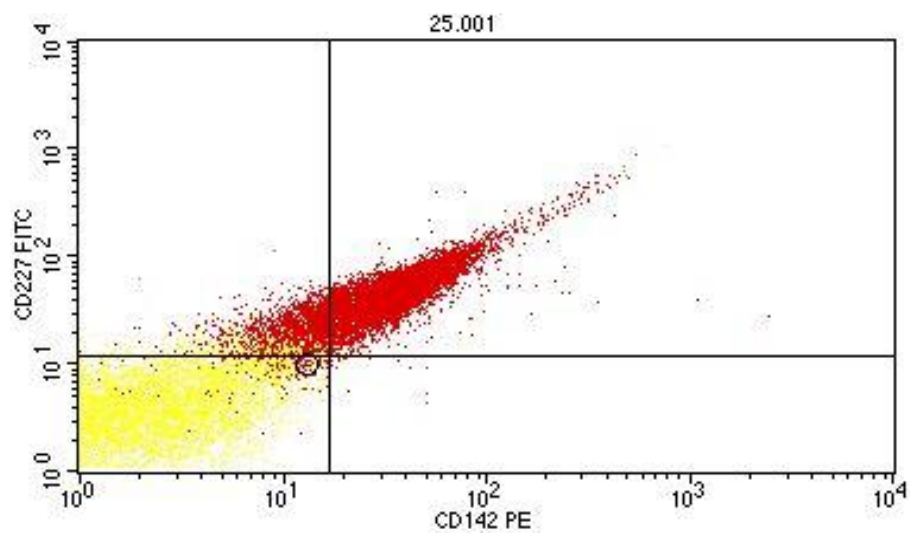
Εικόνα 5: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD144 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Θετικά θεωρούνται τα μικροσωματίδια που βρίσκονται εντός του εύρους τιμών.



Εικόνα 6: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD227 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Θετικά θεωρούνται τα μικροσωματίδια που βρίσκονται εντός του εύρους τιμών.

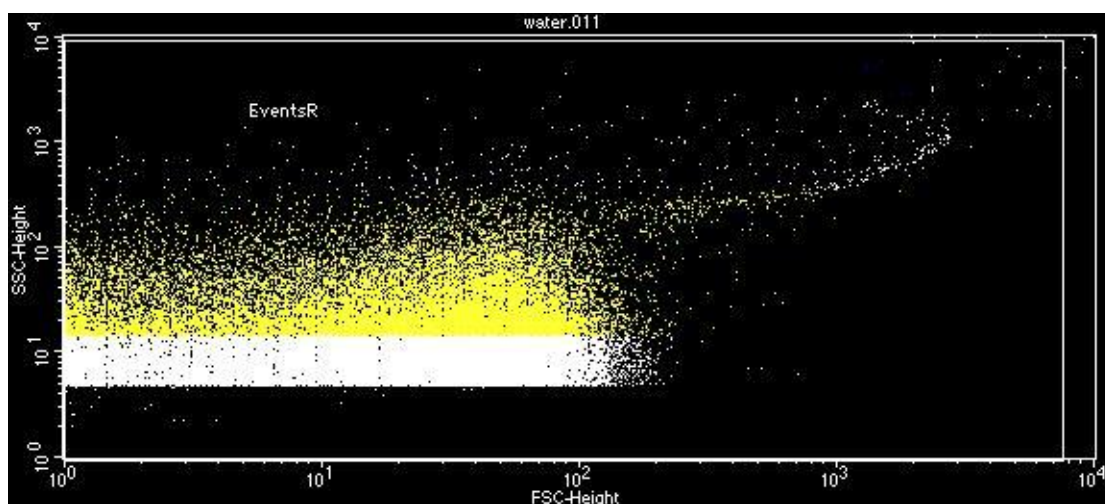


Εικόνα 7: Γραφική παράσταση των υπο εξέταση πληθυσμών και διαχωρισμός τους ανάλογα των αντισωμάτων με τα οποία έχει γίνει σύνδεση. Στο παρόν γράφημα διακρίνονται οι πληθυσμοί που έχουν συνδεθεί με τα αντισώματα CD227 και CD144.

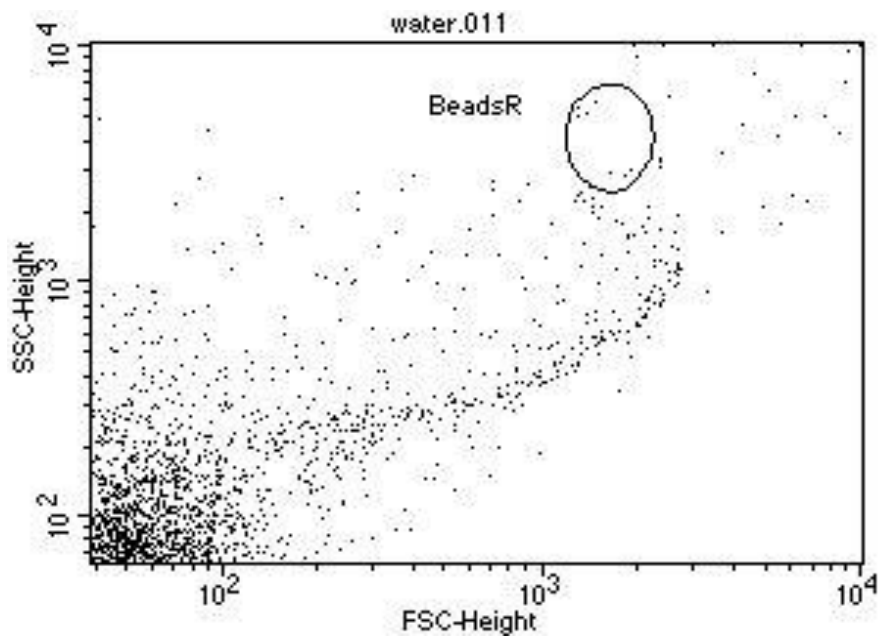


Εικόνα 8: Γραφική παράσταση των υπο εξέταση πληθυσμών και διαχωρισμός τους ανάλογα των αντισωμάτων με τα οποία έχει γίνει σύνδεση. Στο παρόν γράφημα διακρίνονται οι πληθυσμοί που έχουν συνδεθεί με τα αντισώματα CD227 και CD142.

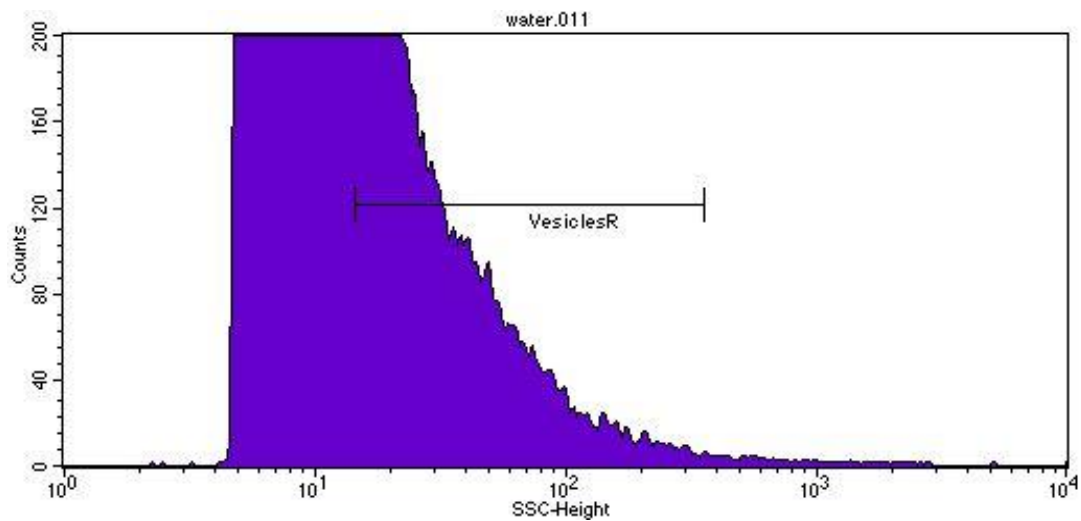
Στη συνέχεια παρουσιάζονται εικόνες που αφορούν δείγματα τα οποία είναι πλήρως αρνητικά, δηλαδή δεν έχουν ανιχνεύσιμο πληθυσμό αντισωμάτων.



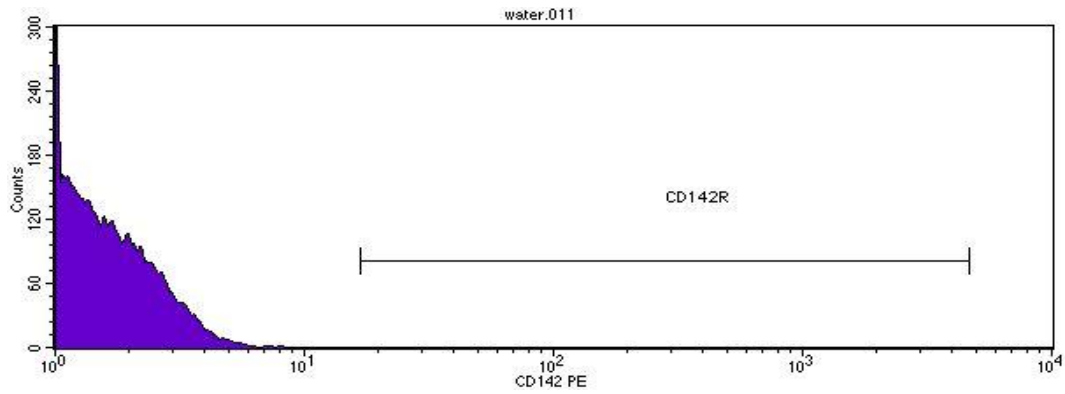
Εικόνα 9: Ολικός αριθμός συμβάντων του υπό εξέταση δείγματος.



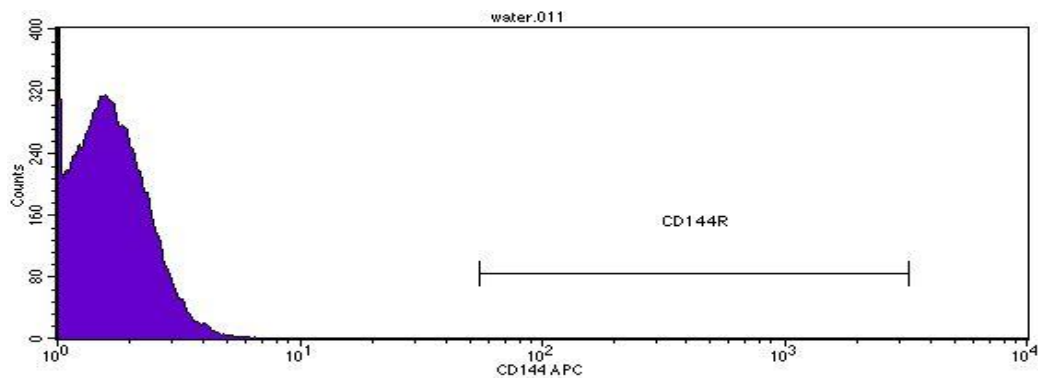
Εικόνα 10: Αριθμός Beads δείγματος και περιοχή που ανιχνεύθηκαν. Στο παρόν δείγμα είναι ελάχιστα έως μηδενικά.



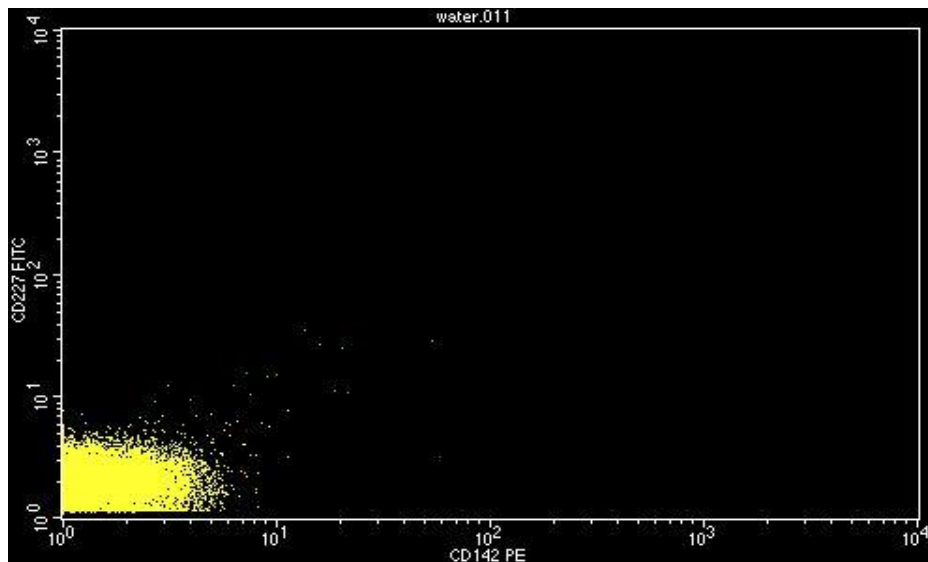
Εικόνα 11: Γραφική παράσταση του πληθυσμού μικροσωματιδίων του δείγματος και εύρος του υπό εξέταση τμήματος του πληθυσμού αυτού.



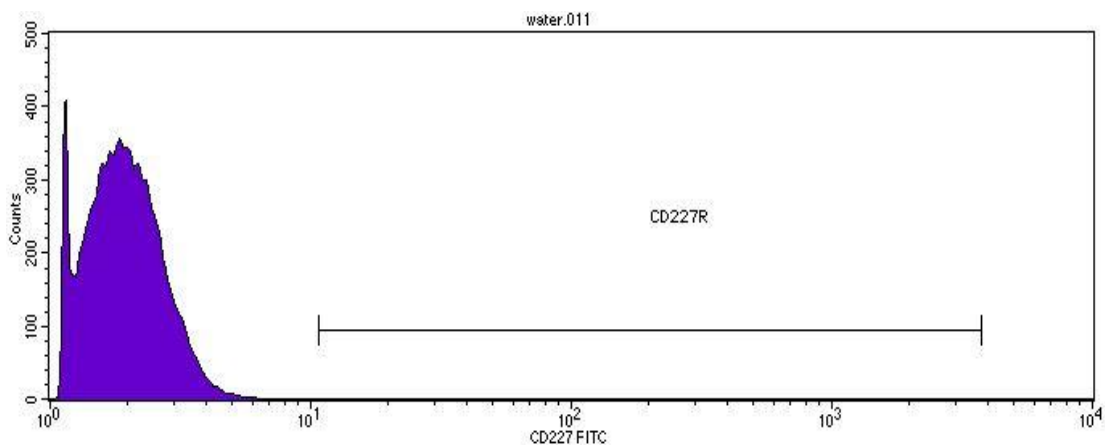
Εικόνα 12: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD142 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Στην παρούσα εικόνα όπως είναι εμφανές δεν έχουν ανιχνευτεί αντισώματα εντός του εύρους τιμών.



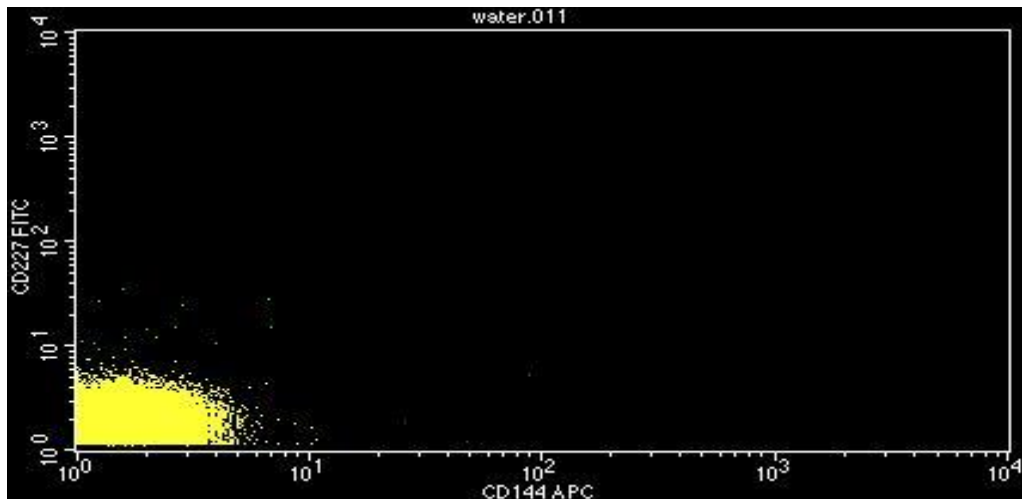
Εικόνα 13: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD144 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Στην παρούσα εικόνα όπως είναι εμφανές δεν έχουν ανιχνευτεί αντισώματα εντός του εύρους τιμών.



Εικόνα 14: Γραφική παράσταση των υπο εξέταση πληθυσμών και διαχωρισμός τους ανάλογα των αντισωμάτων με τα οποία έχει γίνει σύνδεση. Στο παρόν γράφημα δεν διακρίνονται πληθυσμοί που έχουν συνδεθεί με τα αντισώματα CD227 και CD142.

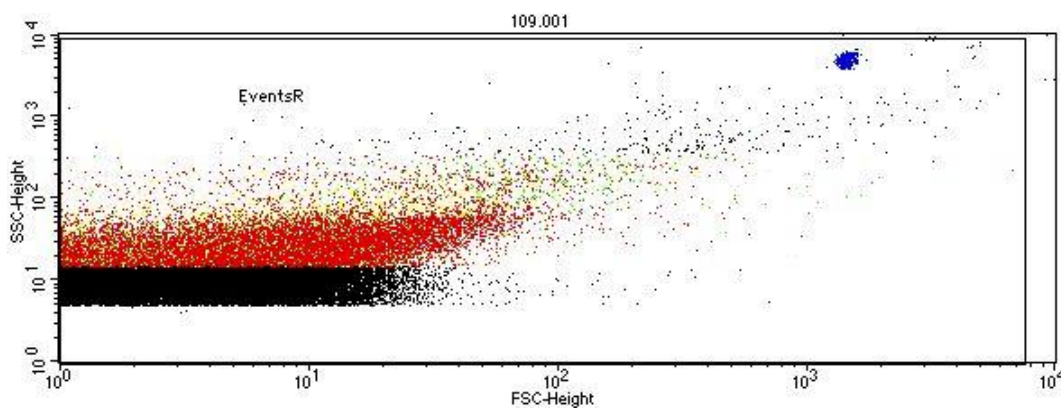


Εικόνα 15: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD227 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Στην παρούσα εικόνα όπως είναι εμφανές δεν έχουν ανιχνευτεί αντισώματα εντός του εύρους τιμών.

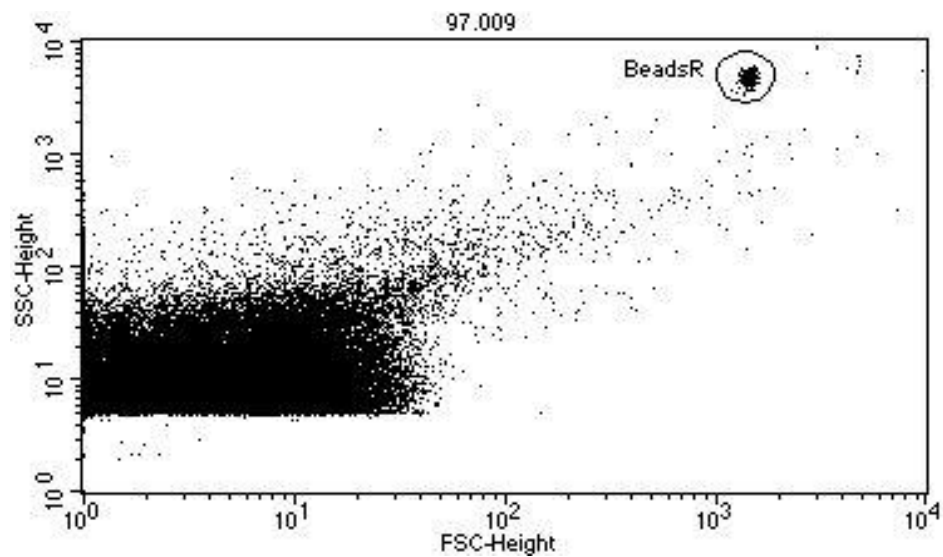


Εικόνα 16: Γραφική παράσταση των υπο εξέταση πληθυσμών και διαχωρισμός τους ανάλογα των αντισωμάτων με τα οποία έχει γίνει σύνδεση. Στο παρόν γράφημα δεν διακρίνονται πληθυσμοί που έχουν συνδεθεί με τα αντισώματα CD227 και CD144.

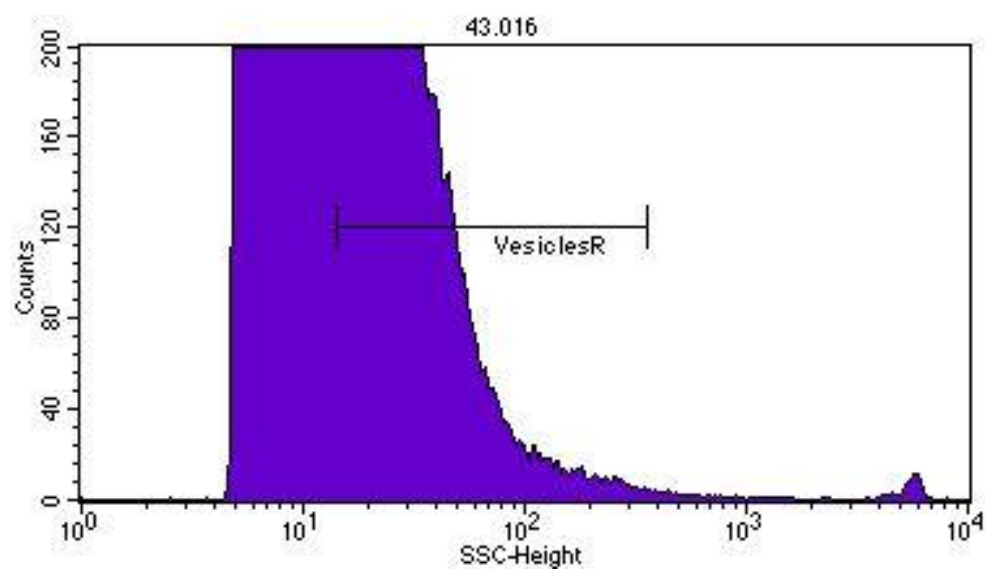
Η επόμενη ομάδα εικόνων αφορά θετικά δείγματα, όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός αντισωμάτων στον εκάστοτε ορό ασθενούς, κάτι που είναι εμφανές στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν.



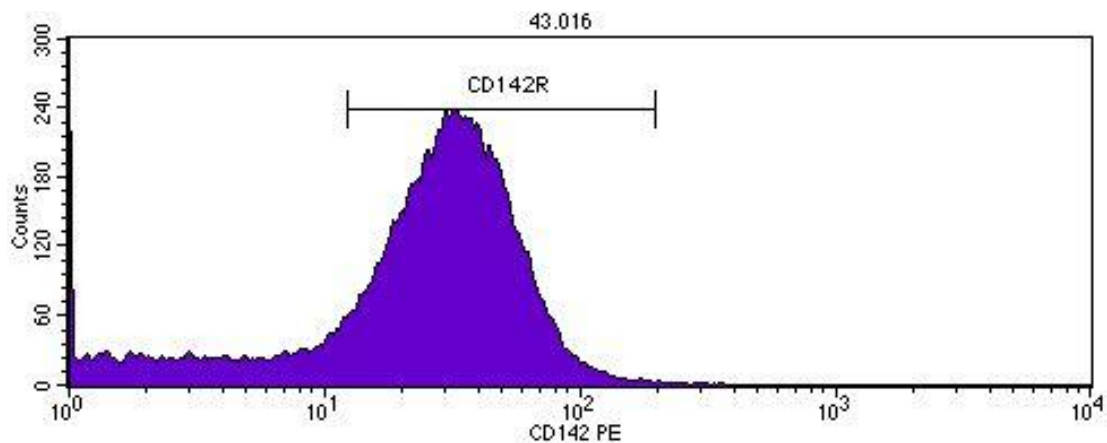
Εικόνα 17: Ολικός αριθμός συμβάντων του υπό εξέταση δείγματος.



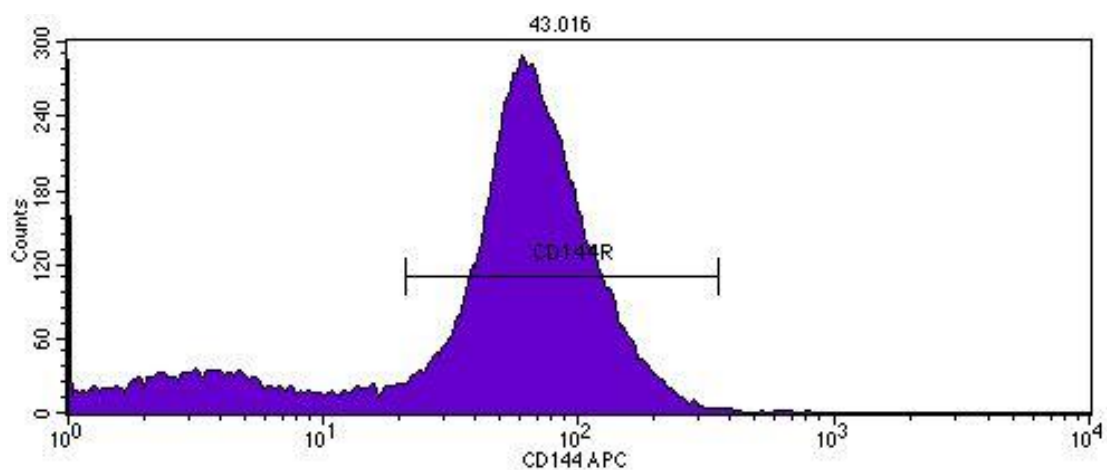
Εικόνα 18: Αριθμός Beads δείγματος και περιοχή που ανιχνεύθηκαν.



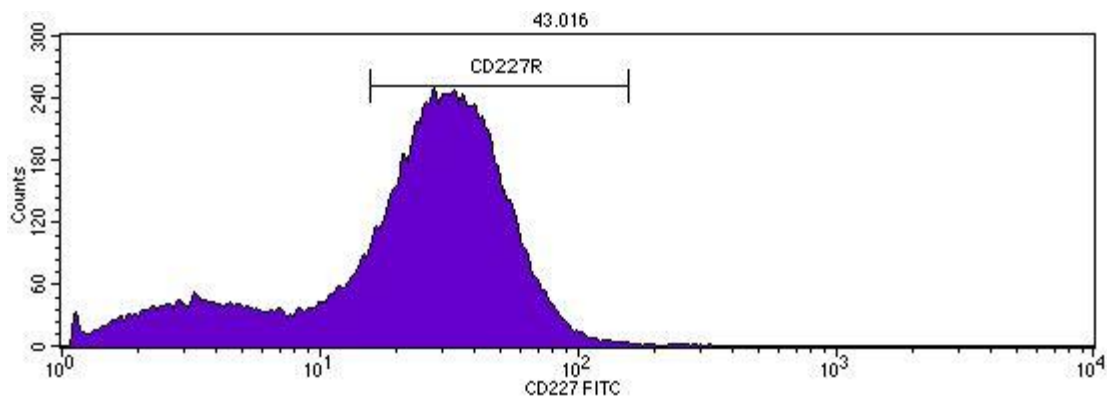
Εικόνα 19: Γραφική παράσταση του πληθυσμού μικροσωματιδίων του δείγματος και εύρος του υπό εξέταση τμήματος του πληθυσμού αυτού.



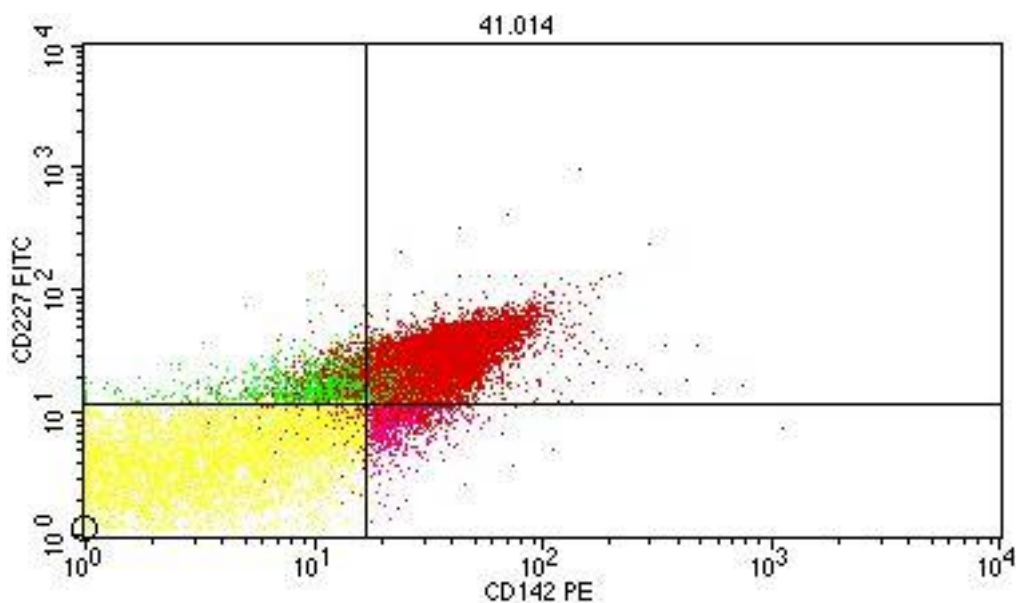
Εικόνα 20: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD142 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Στην παρούσα εικόνα όπως είναι εμφανές έχει ανιχνευτεί μεγάλος αριθμός αντισωμάτων εντός του εύρους τιμών.



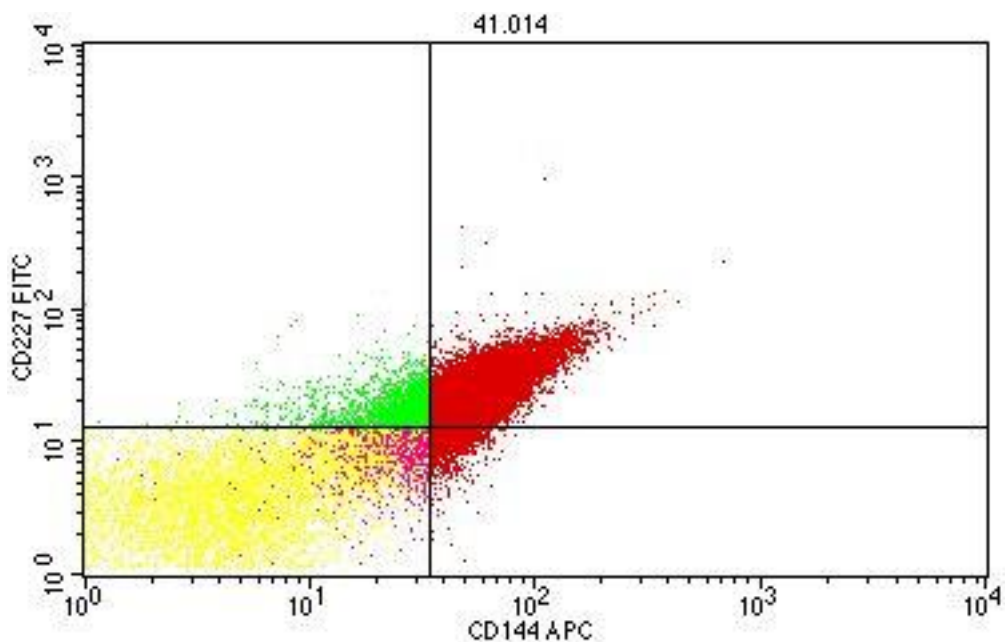
Εικόνα 21: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD144 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Στην παρούσα εικόνα όπως είναι εμφανές έχει ανιχνευτεί μεγάλος αριθμός αντισωμάτων εντός του εύρους τιμών.



Εικόνα 22: Γραφική παράσταση αντισωμάτων CD227 που ανιχνεύθηκαν και εύρος των τιμών που θεωρούνται έγκυρες. Στην παρούσα εικόνα όπως είναι εμφανές έχει ανιχνευτεί μεγάλος αριθμός αντισωμάτων εντός του εύρους τιμών.



Εικόνα 23: Γραφική παράσταση των υπο εξέταση πληθυσμών και διαχωρισμός τους ανάλογα των αντισωμάτων με τα οποία έχει γίνει σύνδεση. Στο παρόν γράφημα υπάρχει σαφής διάκριση των πληθυσμών που έχουν συνδεθεί με τα αντισώματα CD227 και CD142. Υπάρχει επίσης διακριτός πληθυσμός CD144 αντισωμάτων που αντιστοιχεί στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο (ροζ χρώμα).



Εικόνα 24: Γραφική παράσταση των υπό εξέταση πληθυσμών και διαχωρισμός τους ανάλογα των αντισωμάτων με τα οποία έχει γίνει σύνδεση. Στο παρόν γράφημα υπάρχει σαφής διάκριση των πληθυσμών που έχουν συνδεθεί με τα αντισώματα CD227 και CD144.Υπάρχει επίσης διακριτός πληθυσμός CD142 αντισωμάτων που αντιστοιχεί στο πάνω αριστερά τεταρτημόριο(πράσινο χρώμα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αντισώματα που μελετήθηκαν (CD142, CD144,CD227) έχουν παρατηρηθεί να συνδέονται με αποπτωτικά κύτταρα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, σύμφωνα με την παγκόσμια βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, τα CD142 παρατηρούνται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα CD144 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζοντας και ελέγχοντας τη διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου και τα CD227 παρατηρούνται σε μεγάλες ποσότητες σε κακοήθες επιθήλιο. Με τη χρήση της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκε η συσχέτιση της σύνδεσης των συγκεκριμένων αντισωμάτων με πληθυσμούς κυττάρων σε πάσχοντα και μη άτομα. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε αρνητικό δείγμα αποτελούμενο αποκλειστικά από νερό. Σύμφωνα με τον μεγάλο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων κατά την ύπαρξη του καρκίνου (νόσος που χαρακτηρίζεται από απόπτωση) αναμενόμενο ήταν να παρατηρηθεί έντονη ύπαρξη των αντισωμάτων σε δείγματα ασθενών.

Αρχικά, σε δείγματα όπου χαρακτηρίστηκαν αρνητικά, δηλαδή σε δείγματα με μικρό αριθμό αντισωμάτων, παρατηρήθηκε μεγάλη ετερογένεια στην κατανομή των πληθυσμών των κυττάρων και αρκετές ακραίες τιμές. Σε μέτρια ποσότητα ανιχνεύθηκαν και τα 3 αντισώματα, ενώ στα νεφελογράμματα παρατηρήθηκε ελάχιστη σύνδεση των αντισωμάτων αυτών με αποπτωτικά κύτταρα. Γνωρίζοντας πως στον οργανισμό μας υπάρχουν κύτταρα που αποπίπτουν φυσιολογικά (όπως σε περιπτώσεις κυτταρικής γήρανσης) η μικρή, αυτή σύνδεση που παρατηρείται χαρακτηρίζεται απολύτως φυσιολογική, και έτσι τα δείγματα δεν μπορούν να χαρακτηριστούν πάσχοντα. Παρατηρούνται χαμηλές τιμές και τιμές εκτός εύρους που δεν μπορούν να οδηγήσουν σε σαφή και στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα. Στην εικόνα 1 φαίνεται η συνολική εικόνα του δείγματος όπως ανιχνεύθηκε από τη μηχανήμα κυτταρομετρίας. Στην εικόνα 2 φαίνεται η ύπαρξη συσσωματώματος των beads με τα αντιγόνα του ορού και τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για το πείραμα. Στην εικόνα 3 υπάρχει γραφική παράσταση των τιμών του συνολικού πληθυσμού μικροσωματιδίων που ανιχνεύθηκαν. Στις εικόνες 4,5 και 6 υπάρχουν γραφικές παραστάσεις των τιμών των αντισωμάτων CD142, CD144 και CD227 αντίστοιχα. Στις γραφικές παραστάσεις φαίνεται και το εύρος τιμών στο οποίο γίνεται έλεγχος για κάθε αντίσωμα. Από τις εικόνες αυτές προκύπτει πως κάθε αντίσωμα ανιχνεύεται σε χαμηλές τιμές, επομένως τα δείγματα θεωρούνται κυρίως αρνητικά. Στις εικόνες 7 και 8 υπάρχουν νεφελογράμματα των πληθυσμών των ζευγών CD142-CD227 και CD144-CD227 αντίστοιχα. Στα νεφελογράμματα υπάρχει μικρή διάκριση πληθυσμών συνδεδεμένων αντισωμάτων με σωματίδια, κάτι αναμενόμενο λόγω των χαμηλών τιμών των αντισωμάτων στα δείγματα της κατηγορίας αυτής.

Όσον αφορά το αρνητικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε (νερό) παρατηρήθηκε πληθυσμός μικροσωματιδίων αλλά δεν εντοπίστηκε σύνδεση αντισωμάτων με κύτταρα, γεγονός που δικαιολογείται απόλυτα και επικυροποιεί τη σωστή λειτουργία της μεθόδου. Στις εικόνες 9 και 11 η εικόνα είναι παρόμοια με τα προηγούμενα αποτελέσματα καθώς παρουσιάζουν αποτελέσματα που αφορούν το σύνολο των σωματιδίων που ανιχνεύονται από το κυτταρόμετρο. Επειδή το δείγμα είναι αρνητικό στην εικόνα 10 δεν υπάρχει συσσωμάτωμα beads με αντιγόνα ορού

και αντισωμάτων. Στις εικόνες 12,13 και 15 οι γραφικές παραστάσεις είναι πλήρως αρνητικές και στα νεφελογράμματα στις εικόνες 14 και 16 δεν υπάρχουν καθόλου πληθυσμοί σωματιδίων συνδεδεμένων με αντισώματα.

Εξετάζοντας τα θετικά δείγματα, εντοπίστηκε σημαντική ύπαρξη συσσωματωμάτων και παρουσία πληθώρας κυττάρων. Ταυτόχρονα, οι πληθυσμοί σύνδεσης των αντισωμάτων με τα αποπτωτικά κύτταρα βρέθηκαν σε μεγάλα ποσοστά και με σαφή διάκριση των πληθυσμών ενώ παράλληλα ήταν μέσα στο επιθυμητό εύρος. Τα δείγματα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν πάσχοντα σύμφωνα με τις παρατηρήσεις των νεφελογραμμάτων. Στις εικόνες 17 και 19 τα αποτελέσματα είναι ξανά παρόμοια με τις προηγούμενες ομάδες δειγμάτων και στην εικόνα 18 υπάρχει συσσωμάτωμα μεγάλου μεγέθους. Στις εικόνες 20,21 και 22 οι γραφικές παραστάσεις έχουν πολύ υψηλές τιμές για όλα τα αντισώματα που ερευνώνται, κάτι πλήρως αναμενόμενο για δείγματα ορού ασθενών. Στις εικόνες 23 και 24 τα νεφελογράμματα έχουν πληθυσμούς συνδεδεμένων αντισωμάτων με σωματίδια εμφανώς διακριτούς και με σημαντικό μέγεθος για τον κάθε πληθυσμό.

Καταληκτικά, η πειραματική διαδικασία επιβεβαίωσε την, μέχρι στιγμής, υπάρχουσα βιβλιογραφία όσον αφορά τη συσχέτιση της σύνδεσης των CD142, CD144, CD227 αντισωμάτων με αποπτωτικά κύτταρα σε πάσχοντες από καρκίνο του παχέος εντέρου. Σαφέστατα, τα αποτελέσματα δεν χαρακτηρίζονται στατιστικά σημαντικά και για να αποδειχθεί μια τέτοια σχέση θα ήταν δόκιμο να πραγματοποιηθεί περαιτέρω διερεύνηση, μέσω της διεξαγωγής μεγαλύτερου αριθμού πειραμάτων με περισσότερα δείγματα, για την αποφυγή σφαλμάτων και τη μελέτη δειγμάτων με μεγαλύτερη ετερογένεια. Ακόμα, η μελέτη ασθενών με καρκίνο σε διαφορετικά στάδια, πιθανώς να βοηθούσε στην πιο σαφή διάκριση της σύνδεσης των αντισωμάτων με τα αποπτωτικά κύτταρα, δεδομένου πως όσο πιο προχωρημένο είναι το στάδιο του καρκίνου, τόσο μεγαλύτερος είναι ο πληθυσμός τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

1. Claire K. S. Meikle, Clare A. Kelly, Priyanka Garg, Leah M. Wuescher, Ramadan A. Ali, and Randall G. Worth, *Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective*, 2017
2. Wolfgang Bergmeier, Richard O. Hynes, *Extracellulr Matrix Proteinsin Hemostasis and Thrombosis*, 2012
3. Lisa Ayers, Paul Harrison, Malcolm Kohler, and Berne Ferry, *Procoagulant and platelet-derived micro vesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity*, 2014
4. William K. Ovalle, Patrick C. Nahirney, *Ιστολογία, Εκδόσεις "Π.Χ. Πασχαλίδης"*, Αθήνα 2011, ISBN: 978-960-489-088-0.
5. Φραγκίσκη Ανθούλη-Αναγνωστοπούλου, *Ιστοπαθολογία με Στοιχεία Ογκολογίας, Εκδόσεις "Π.Χ.Πασχαλίδης"*, Αθήνα 2009, ISBN: 978-960-399-883-9.
6. Wu ZH, Ji CL, Li H, Qiu GX, Gao CJ, Weng XS, *Membrane microparticles and diseases*, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(18):2420-7.
7. J. Thaler, C. Ay, I. Pabinger, *Clinical significance of circulating microparticles for venous thromboembolism in cancer patients*, *Hamostaseologie* 2012;32:127-131.
8. Sharon Zara, Julia A.M.Anderson, David Stirling and Christopher A.Ludlam, *Micro-particles, malignancy and thrombosis*, *British Journal of Hematology*, 2011;152:688-700.
9. Hadi Alphonse Goubran, Thierry Burnouf, Julie Stakiw, Jerard Seghatchian, *Platelet microparticle: A sensitive physiological "fine tuning" balancing factor in health and disease*, *Transfusion and Apheresis Science*, 2015.
10. Gregory C. Connolly, Charles W. Francis, *Cancer-associated thrombosis*, 2013;1: 684- 691.

11. Benjamin A. Garcia, David M. Smalley, Hyunglun Cho, Jeffrey Shananowitz, Klaus Ley, Donald F. Hunt, The Platelet Microparticle Proteome, American Chemical Society, 2005;4:1516-1521.
12. Shaogui Wan, Yinzhi Lai, Ronald E. Myers, Bingshan Li, Terry Hyslop, Jack London, Devjani Chatterjee, Juan P. Palazzo, Ashlie L. Burkart, Kejin Zhang, Jinliang Xing, Hushan Yang, Preoperative Platelet Count Associates with Survival and Distant Metastasis in Surgically Resected Colorectal Cancer Patients, J Gastrointestinal Cancer. 2013; 44(3): 293–304.
13. Eyad F. Al-Saeed, Mutahir A. Tunio, Omar Al-Obaid, Maha Abdulla, Alaa Al-Anazi, Jumanah Al-Shanifi, Leena Al-Ameer, and Tarfah Al-Obaidan, Correlation of Pre-treatment Hemoglobin and Platelet Counts with Clinicopathological Features in Colorectal Cancer in Saudi Population, Saudi J Gastroenterol. 2014; 20(2): 134–138.
14. LIU Hailiang, DU Xiaohui, SUN Peiming, XIAO Chunhong, XU Yingxin, LI Rong, Pre-operative platelet-lymphocyte ratio is an independent prognostic factor for resectable colorectal cancer, J South Med Univ, 2013; 33(1): 70-73.
15. R. Salgado, I. Benoy, E. van Marck, P. Vermeulen, L. Dirix, The importance of the VEGF-load in platelets in cancer patients, Ann Oncol, 2002;13(10):1689-1690.
16. Eberhard Gunsilius, Joerg Tschmelitsch, and Andreas. L. Petze, Correlation of Plasma and Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels with Platelet Count in Colorectal Cancer: Clinical Evidence of Platelet Scavenging?, Clin Cancer Res, 2001;7; 443.
17. M. Thushara, M. Hemshekar Basappa, K. Kemparaju, K.S. Rangappa, K.S. Girish, Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook, Clinical Reviews in Oncology/Hematology, 2015;93:149-158.
18. Brando B. et al., Cytometry 2001, Jackson Al. Et al, Manual of Clinical Laboratory Immunology, 1986

19. Garner JS, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996;17:53-80
20. Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature immunology*, 7(7), 681-685.
21. Hulspas, R., O'Gorman, M. R., Wood, B. L., Gratama, J. W., & Sutherland, D. R. (2009). Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 76(6), 355-364.
22. Mahnke, Y. D., & Roederer, M. (2007). Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clinics in laboratory medicine*, 27(3), 469-485.
23. *Methods in Molecular Biology*, vol. 378: *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* Edited by: M. Albitar © Humana Press Inc., Totowa, NJ
24. Nguyen, R., Perfetto, S., Mahnke, Y. D., Chattopadhyay, P., & Roederer, M. (2013). Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design. *Cytometry Part A*, 83(3), 306-315