ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Ηράκλειο 700 13, Κρήτη

HELLENIC REPUBLIC
UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF MEDICINE
700 13 Heraklion Crete, Greece

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ανίχνευση προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών σε ασθενείς με χειρουργημένο καρκίνο παχέος εντέρου (ΚΠΕ) που λαμβάνουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία με συνδυασμό Φλουροπυριμιδινών και Oxaliplatin.»

ΜΑΡΙΑ Ε. ΣΦΑΚΙΑΝΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ένας εν δυνάμει και υπολογίσιμος εχθρός για τον καθένα από εμάς! Ευθύνεται για τους περισσότερους θανάτους από καρκίνο στην Ευρώπη μετά από εκείνον του πνεύμονα και υπολογίζεται ότι κάθε τρία λεπτά ένας Ευρωπαίος συμπολίτης μας χάνει την μάχη από το συγκεκριμένο νόσημα. Με την εκρηκτική εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, οι θεραπευτικές πρακτικές κατά του καρκίνου πολλαπλασιάστηκαν, αναπτύχθηκαν νέα φάρμακα και νέες τεχνολογίες διάγνωσης και εντόπισης καρκινικών κυττάρων. Παρ' όλα αυτά η επιβίωση αυτών των ασθενών δεν ακολούθησε την ίδια εξελικτική πορεία. Κάτω από αυτές τις συνθήκες γεννήθηκε η ιδέα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την ολοκλήρωση της οποίας ήταν καθοριστική η συμβολή και η βοήθεια του Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας Ι. Σουγκλάκο. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Β. Γεωργούλια και Δ. Μαυρουδή για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, καθώς επίσης και τον καθηγητή Ο. Ζώρα που δέχθηκε με χαρά να είναι επιβλέπων της παρούσας διατριβής.

Οι ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσαν να μην συμπεριλάβουν από το Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Χαρά Παπαδάκη για την εργαστηριακή της συνδρομή καθώς και την Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας Μ. Τζαρδή που επέβλεψε και εκτίμησε όλα τα δείγματα των ασθενών καθώς και την ανοσοϊστοχημεία τους. Ευχαριστώ ακόμα θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη για την πολύτιμη βοήθεια του όσον αφορά τη βιοστατιστική ανάλυση και τις δημοσιεύσεις της διατριβής. Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης σε όλους τους συνεργάτες και φίλους στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, ιδιαίτερα την Μαρία Παπαδάκη για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής και την άριστη συνεργασία μας. Τέλος, ευχαριστώ τον αγαπημένο μου σύζυγο για την ανεκτίμητη συμπαράσταση και την ψυχολογική ενθάρρυνση του όλα αυτά τα χρόνια.

Στους γονείς μου για όλα όσα μου πρόσφεραν απλόχερα,

Στους γιούς μου Μανουήλ και Οδυσσέα…

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 10

1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΚΠΕ) 10

1.2 Προδιαθεσικοί Παράγοντες-Παράγοντες Κινδύνου 12

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΠΕ 14

ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΣ ΚΠΕ 16

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΚΠΕ 19

Οικογενή Σύνδρομα Αδενοματώδους Πολυποδίασης 19

Οικογενή Σύνδρομα Αρματωματώδους Πολυποδίασης 20

Κληρονομικός Μη Πολυποδιακός ΚΠΕ (HNPCC) ή Σύνδρομο Lynch 21

2.3 ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΠΕ 22

Γονιδιακές μεταλλάξεις του ΚΠΕ 23

3.1 Ογκογονίδια & Ογκοκατασταλτικά γονίδια 25

APC 25

TP53 27

KRAS- BRAF 27

PKM2: ένας ρυθμιστής του Warburg effect 30

3.2 Γονίδια Επιδιόρθωσης του DNA 33

Σταδιοποίηση του ΚΠΕ 34

Φαρμακευτική Αντιμετώπιση του ΚΠΕ. 36

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 41

Ασθενείς και Μέθοδοι 41

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ & ΤΕΧΝΙΚΕΣ 41

Εκχύλιση ΓενωμικούDNA&RNA 41

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) 42

Διαδικασία RT-qPCR 44

Ενίσχυση DNA για τα *Kras Braf* γονίδια 45

Ανίχνευση μεταλλάξεων με την μέθοδο της Αλληλούχισης και την Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στο Γενετικό Αναλυτη. 45

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ 48

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ 50

Στατιστική Ανάλυση 52

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 53

ΑΣΘΕΝΕΙΣ & ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ 53

Εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών 58

Συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1 με τα κλινικό-παθολογικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών σταδίου II-III 60

Συσχετίσεις των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με την επιβίωση. 63

Ανίχνευση της *PKM2* mRNA έκφραση στις διαφορετικές ομάδες ασθενών & συσχέτιση της με τα κλινικό-παθολογικά και εργαστηριακά αποτελέσματα. 68

Συσχετίσεις της *PKM2* mRNA έκφραση με την επιβίωση. 68

Μονοπαραγοντική και Πολυπαραγοντική Ανάλυση 69

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) είναι παγκοσμίως η 4η σε σειρά εμφάνισης και η τέταρτη σε θνησιμότητα νεοπλασία. Παρ' όλο που το 50% των ασθενών είναι δυνατόν να θεραπευτεί μόνο με το χειρουργείο, το υπόλοιπο 50% αναπτύσσει μεταστατική νόσο. Ο ρόλος της συμπληρωματικής θεραπείας στον ΚΠΕ σταδίου ΙΙΙ είναι καθιερωμένος μειώνοντας τον κίνδυνο υποτροπής από 19-40% και του θανάτου από 16-33%. Τα τελευταία χρόνια δύο μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η προσθήκη της Oxaliplatin (LOHP) στην «κλασσική θεραπεία» με 5-φλουοροουρακίλη (5-FU) μειώνει περαιτέρω τον κίνδυνο υποτροπής κατά περίπου 25% και συνοδεύεται από μια στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου θανάτου από τη νόσο σε ασθενείς σταδίου ΙΙΙ. Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί κάποιος μοριακός δείκτης που θα μπορούσε να χρησιμεύσει στον καθορισμό συγκεκριμένων υποομάδων ασθενών που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από τη θεραπεία με LOHP. Ελάχιστοι βιοδείκτες είναι διαθέσιμοι για χρήση στην κλινική πρακτική, στους οποίους περιλαμβάνονται τα ογκογονίδια *KRAS/BRAF* τα οποία προβλέπουν αντίσταση στην αντι-EGFR θεραπεία στον μεταστατικό ΚΠΕ (μΚΠΕ). Επίσης, διάφορες μετα-αναλύσεις κατέδειξαν ότι ασθενείς με μΚΠΕ και *BRAF* μεταλλάξεις έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τους *BRAF*-wt. Αντίθετα, ο προγνωστικός ρόλος των *BRAF* μεταλλάξεων δεν έχει διευκρινιστεί στους ασθενείς με ΚΠΕ σταδίου ΙΙ και ΙΙΙ που υποβάλλονται σε συμπληρωματική χημειοθεραπεία μετά από θεραπευτική εκτομή του όγκου. Πρόσφατα, η Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI) καθιερώθηκε ως ο μόνος μοριακός βιοδείκτης για την χορήγηση ανοσοθεραπείας στον ΚΠΕ, ενώ δεν έχει αναφερθεί κάποιος μοριακός δείκτης που θα μπορούσε να χρησιμεύσει σαν δείκτης ανταπόκρισης κατά τη διάρκεια της θεραπείας ("surrogate marker").

Στόχος του προτεινόμενου ερευνητικού έργου ήταν, α), η διερεύνηση συγκεκριμένων γονιδιακών υπογραφών που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου καθώς και με αντίσταση στην LOHP και του 5FU, β), να καθορίσει το προφίλ έκφρασης ανάλογα με τις μεταλλαγές των *KRAS-BRAF* καθώς και με τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), γ), να μελετηθεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται είτε με την αύξηση του μεταστατικού

δυναμικού (PKM2, NEDD9, cMYC) είτε με αντίσταση στην LOHP και στο 5FU (*ERCC1* και *TS*) και δ) να μελετήσει το γενετικό μηχανισμό απώλειας της LKB1 στον σποραδικό ΚΠΕ.

Σε παραφινοποιημένους ιστούς από χειρουργικά παρασκευάσματα 262 ασθενών με χειρουργήσιμο ΚΠΕ, 118 ασθενών με μΚΠΕ (ομάδα επαλήθευσης) πού έλαβαν LOHP και σε 104 ασθενών με μΚΠΕ που δεν έλαβαν LOHP (ομάδα ελέγχου) μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA στα γονίδια *PKM2, ERCC1, TS, cMYC* με qRT-PCR και αναλύθηκαν οι μεταλλάξεις του *KRAS* (εξώνιο 2) και η V600E του *BRAF*. Επίσης, στους ασθενείς σταδίου III ή σταδίου II υψηλού κινδύνου αναλύθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της LKB1 και η κατάσταση του MSI.
Ασθενείς με χειρουργημένο ΚΠΕ και ασθενείς με μΚΠΕ που έλαβαν Οξαλιπλατίνα με υψηλά επίπεδα PKM2 mRNA συσχετίζονται σημαντικά με μικρότερο DFS και OS και μικρότερο PFS και OS, αντίστοιχα. Σε αντίθεση, καμία σημαντική συσχέτιση δεν απεδείχθη στην επιβίωση των ασθενών με μΚΠΕ που δεν έλαβαν Οξαλιπλατίνα. Ομοίως, οι ασθενείς με απώλεια έκφρασης της LKB1 συσχετίζονται σημαντικά με μικρότερο DFS και OS. Επιπλέον, η υπέρ-έκφραση της PKM2 συσχετίστηκε με τους όγκους με μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS) και με τους πολύποδες υψηλόβαθμης δυσπλασίας. Οι μεταλλάξεις του BRAF συσχετίστηκαν σημαντικά με την υπέρ-έκφραση της PKM2 και με την απώλεια έκφρασης της LKB1. Τέλος, αναδείχθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της PKM2 και του *c-MYC* και στις τρεις ομάδες ασθενών.

Συμπερασματικά, η μελέτη αναδεικνύει την απώλεια της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1 σαν προγνωστικό βιοδείκτη και την έκφραση mRNA της PKM2 σαν προβλεπτικό βιοδείκτη ευαισθησίας στην Οξαλιπλατίνη, σε ασθενείς που μετά από κολεκτομή λαμβάνουν συμπληρωματική θεραπεία. Ωστόσο, περισσότερες μελέτες απαιτούνται ώστε να επιβεβαιωθούν οι παραπάνω υποθέσεις.

SUMMARY

Colorectal cancer remains a major cause of cancer mortality in Europe in both men and women. Despite the current high incidence and mortality, both declined the last 40 years in the Western world. Cancer prevention through screening tests and better treatment modalities are thought to be the major factors of this improvement. Furthermore, it was shown that patients with high-risk stage II and stage III colon cancer (CC) who received treatment that adhered to National Comprehensive Cancer Network guidelines had a survival benefit.

For stage III disease, combination chemotherapy with a backbone of fluoropyrimidine and oxaliplatin (FOLFOX, CAPOX) is the current standard of care, since it leads to prolongation of both disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). The results for addition of Oxaliplatin in OS and DFS for patients with stage II CC with high risk features (such as T4 tumors, obstruction or perforation and vessel invasion) showed a marginal but significant. Despite that, it has long been recognized patients' individual risk of recurrence varies widely even in patients with same stage in CC. Since today, microsatellite instability (MSI) status is the only biomarker used in daily clinical practice. Project goals and expected results are to investigate specific gene signatures related with increased risk of recurrence and death from the disease, as well as predict and assess response to the "standard adjuvant treatment" of the 5FU combined with LOHP. Secondly, to determine and develop a gene expression profile in proportion with *KRAS* and *BRAF* mutational status and likewise with Microsatellite Instability (MSI). Also, to study the expression of genes associated either with the increase of metastatic potential such as *NEDD9, PKM2, cMYC* or with resistance to LOHP and 5FU such as *ERCC1* and *TS*, respectively, in neoplasm's that present or not the LKB1 loss of expression or KRAS, BRAF mutations. Finally, to study the genetic mechanism of LKB1 loss (loss of heterozygosity) in sporadic colon cancer.

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from 262 consecutive patients with histologically confirmed stage-II/III CC (group A), 118 metastatic CRC (mCRC) patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy (group B)

and 104 mCRC patients treated with FOLFIRI (group C), were collected and the mRNA expression levels of the PKM2, ERCC1, cMYC, TS were analyzed by RT-qPCR. In addition, KRAS and BRAF mutations were analyzed by Sanger sequencing. Furthermore, the protein expression of LKB1 and MSI status analyzed, only for stage-II/III CC patients.

High *PKM2* mRNA expression was correlated with left-sided located primaries, high-grade tumors, microsatellite-stable tumors, pericolic lymph nodes involvement and *cMYC* mRNA expression. High *PKM2*mRNA expression was correlated with significantly lower Disease Free Survival (DFS) and Overall Survival in group-A patients. Similarly, *PKM2*mRNA expression was associated with significantly decreased Progression Free Survival (PFS) and OS in the group-B. In the contrary, no significant association for the *PKM2*mRNA expression has been observed with either PFS or OS in group-C. To conclude, the current study provides the evidence for the predictive significance of *PKM2*mRNA expression oxaliplatin-based treatment resistance, and the findings merits validation in a larger prospective cohort.

Last but not least, LKB1 expression loss was observed in 117 patients (group A) and correlated with right-sided located primaries, pericolic lymph nodes involvement, $BRAF^{V600E}$ mutations and *TS* mRNA expression. Patients with LKB1 expression loss experienced significantly lower DFS and OS compared to patients with LKB1expressing tumors. Multivariate analysis revealed LKB1 expression loss as independent prognostic factor for both decreased DFS and decreased OS. Therefore, loss of tumoral LKB1 protein expression constitutes an adverse prognostic factor in patients with operable CC.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΚΠΕ)

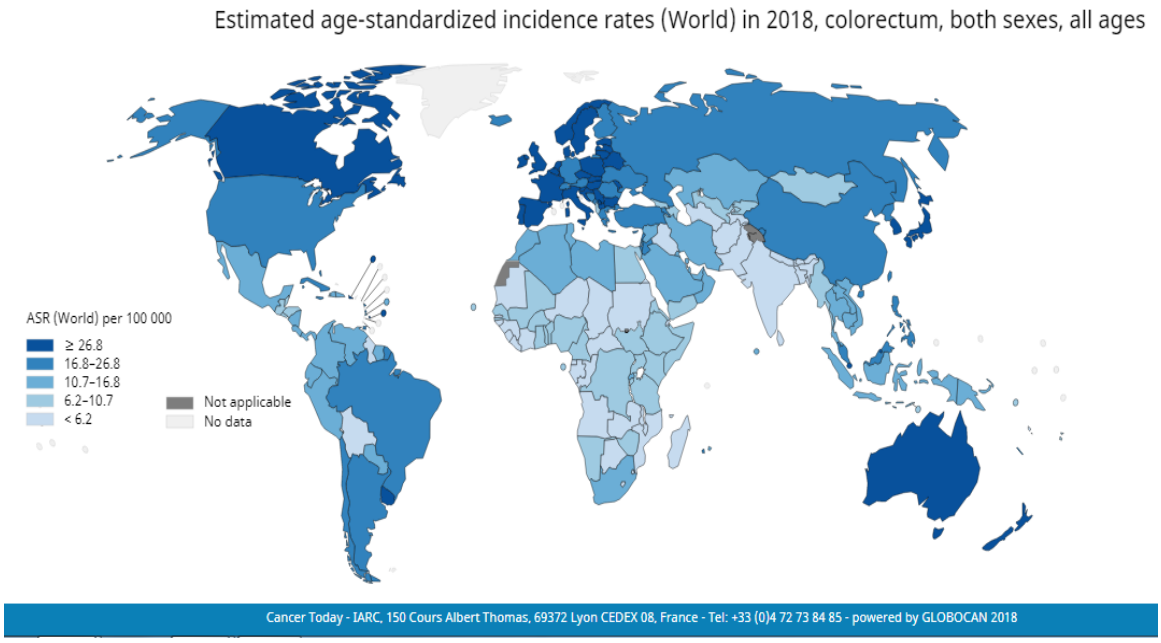
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) αποτελεί ένα από τους πιο συχνά απαντώμενους καρκίνους σε άντρες και γυναίκες και τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θνησιμότητας από καρκίνο στην Ευρώπη. Εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 40 ετών και το 2012, σε παγκόσμια κλίμακα, περισσότερα από 1.3 εκατομμύρια νέα περιστατικά και περισσότεροι από 693.000 θάνατοι αποδόθηκαν στον καρκίνος του παχέος εντέρου. Σε περίπου το 60% ασθενών αυτών, η αρχική διάγνωση πραγματοποιείται σε τελικά στάδια της νόσου που χαρακτηρίζονται από πτωχή πρόγνωση. Δεδομένου ότι η πενταετής επιβίωση για το μεταστατικό καρκίνος του παχέος εντέρου κυμαίνεται περί το 5-8%, είναι σημαντική η έγκαιρη διάγνωση βασιζόμενη είτε σε διαγνωστικές δοκιμασίες ή σε παρατήρηση των συμπτωμάτων. Παγκόσμια, η συχνότητα και η θνησιμότητα με συγκεκριμένες τιμές/χώρα είναι διαθέσιμες από τη βάση δεδομένων της WHO(Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας) Globocan (Εικ 1). Αυτές οι γεωγραφικές διαφορές που εμφανίζονται μπορεί να αποδοθούν σε διαιτητικές και περιβαλλοντικές διαφορές σε γενετικά διαφορετικούς πληθυσμούς [1] .

Η νόσος είναι σπάνια πριν την ηλικία των 40 ετών, η επίπτωσή της προοδευτικά αυξάνεται μεταξύ 40 και 50 ετών, γίνεται δε πολύ μεγαλύτερη για κάθε δεκαετία στη συνέχεια (Εικ. 2). Η νόσος παρουσιάζεται με αυξημένη επίπτωση στους άνδρες (αναλογία ανδρών/ γυναικών για καρκίνο παχέος εντέρου 1,2:1 και αναλογία ανδρών/γυναικών για καρκίνο ορθού 1,8:1. Ο μέσος κίνδυνος εμφάνισης ΚΠΕ καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου είναι 5%, με το 90% των περιπτώσεων να εμφανίζονται μετά την ηλικία των 50 ετών [2] .

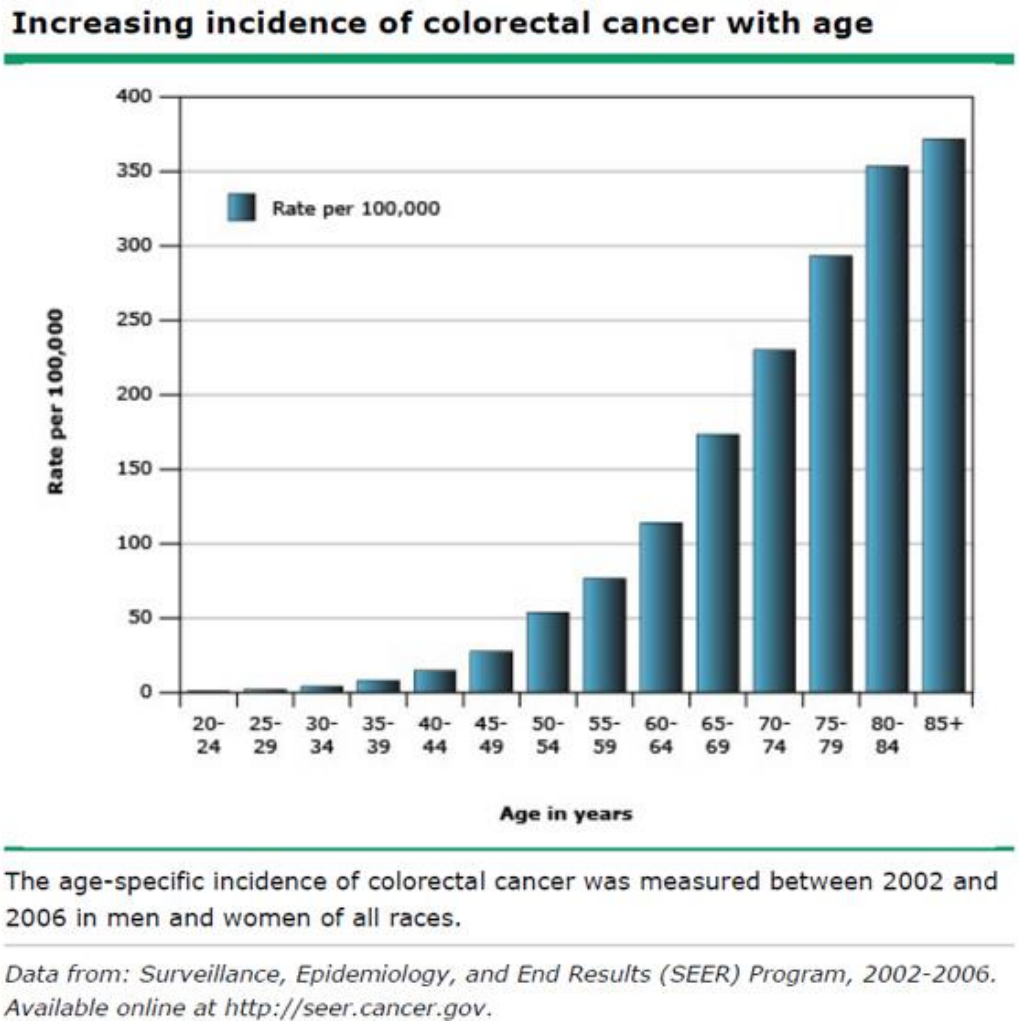
Πιο πρόσφατα δεδομένα από τη βάση δεδομένων SEER των ΗΠΑ αλλά και αρχεία νεοπλασιών από χώρες τις ΕΕ δείχνουν ότι ο ΚΠΕ και ειδικά αυτός του ορθού ιδιαίτερα αυξάνεται στις κάτω από τα 50 ηλικίες, ενώ αυτοί μειώνονται σε μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες. Επίσης υπάρχει μια αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης στον ΚΠΕ, ακόμη και στους νεαρούς ενηλίκους 20 έως 39 ετών, αν

και η απόλυτη συχνότητα στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα παραμένει πολύ χαμηλότερη από ό,τι για ενήλικες ηλικίας 50 ετών και άνω [3, 4].

Γεωγραφικές διαφορές καταγράφονται παγκοσμίως και ως προς τη συνολική επιβίωση από τη νόσο, με το μεγαλύτερο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης να καταγράφεται στις ΗΠΑ (61%) και το μικρότερο στην Κίνα (32%). Η βελτίωση αυτή του προσδόκιμου επιβίωσης στο Δυτικό κόσμο μπορεί να αποδοθεί στην ευρεία εφαρμογή στο γενικό πληθυσμό τεχνικών έγκαιρης διάγνωσης της νόσου σε πολύ πρώιμο ή ακόμη και ασυμπτωματικό στάδιο ή/και στη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των συμπληρωματικών θεραπειών, με την ανακάλυψη και κλινική εφαρμογή δραστικότερων χημειοθεραπευτικών σχημάτων [1, 3].



Εικόνα 1: *Επίπτωση ΚΠΕ Παγκοσμίως (Globocan 2018).*



Εικόνα 2: Επίπτωση ΚΠΕ ανάλογα με την ηλικία όπου φαίνεται ότι η μεγάλη ηλικία είναι μείζων παράγων κινδύνου.

1.2 Προδιαθεσικοί Παράγοντες-Παράγοντες Κινδύνου

Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ ορίζεται από την γενετική προδιάθεση και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, με την ηλικία να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου στον σποραδικό ΚΠΕ. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ-Ο αυξάνει με τη ηλικία, και πάνω από 90% των περιπτώσεων σποραδικού ΚΠΕ συμβαίνουν σε άτομα ηλικίας άνω των 50,5. Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το οικογενειακό ιστορικό και τον τρόπο ζωής. Παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής είναι [5]:

- μια διατροφή χαμηλή σε ίνες και φυλλικό οξύ και υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη, κόκκινο κρέας, επεξεργασμένο κρέας (λουκάνικα , κονσέρβες),
- η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ,
- το κάπνισμα
- η καθιστική εργασία, μειωμένη φυσική δραστηριότητα
- η παχυσαρκία
- ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 διαβήτης.

Ένας παράγοντας κινδύνου αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου χωρίς να είναι απαραίτητος ή ικανός να προκαλέσει καρκίνο. Δεν αποτελεί αιτία εμφάνισης καρκίνου από μόνος του. Ορισμένοι άνθρωποι με παράγοντες κινδύνου δεν θα εμφανίσουν ποτέ ΚΠΕ, ενώ κάποιοι άλλοι χωρίς κανένα παράγοντα κινδύνου μπορούν να αναπτύξουν. Σήμερα διαχωρίζονται δύο βασικές κατηγορίες κινδύνου, η ομάδα μμέσου κινδύνου και η ομάδα υψηλού κινδύνου:

- Ομάδα μέσου κινδύνου: Τα άτομα ηλικίας μμεγαλύτερης των 50 ετών θεωρούνται μέσου κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Μετά την ηλικία αυτή η συχνότητα της νόσου διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία ζωής. Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες, τα άτομα που δεν έχουν κανένα σύμπτωμα αλλά ανήκουν στην ομάδα μέσου κινδύνου, δηλαδή όταν η ηλικία τους είναι μεγαλύτερη από 50 έτη, πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμασία ανίχνευσης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα κάθε χρόνο και σε εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση κάθε 3 με 5 χρόνια, η σε ολική κολονοσκόπηση ανά 10ετία, αν δεν υπάρξουν ευρήματα. Όταν δεν είναι δυνατή η ολική κολονοσκόπηση πρέπει να γίνεται βαριούχος υποκλυσμός με διπλή αντίθεση.

- Ομάδα υψηλού κινδύνου: Τα άτομα με ατομικό ιστορικό πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα άτομα με οικογενειακό ιστορικό πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι ασθενείς με μακροχρόνια Ελκώδη κολίτιδα ή νόσο του Crohn. Το οικογενειακό ιστορικό μμπορεί να μας βοηθήσει να ξεχωρίσουμε τις οικογένειες που έχουν βλάβες στα γονίδιά τους, που κληρονομούνται και προδιαθέτουν στην εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ορισμένα άτομα που ανήκουν σε αυτές τις οικογένειες μμπορεί να

εμφανίσουν καρκίνο σε ποσοστό που φτάνει το 100%. Τα άτομα που ανήκουν στην ομάδα αυτή μπορεί να εμφανίσουν καρκίνο σε μικρότερη ηλικία. Τα άτομα που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου πρέπει να υποβάλλονται περιοδικά σε κολονοσκόπηση, ανάλογα με το ιστορικό τους και ανεξάρτητα από την ηλικία τους [6].

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΠΕ

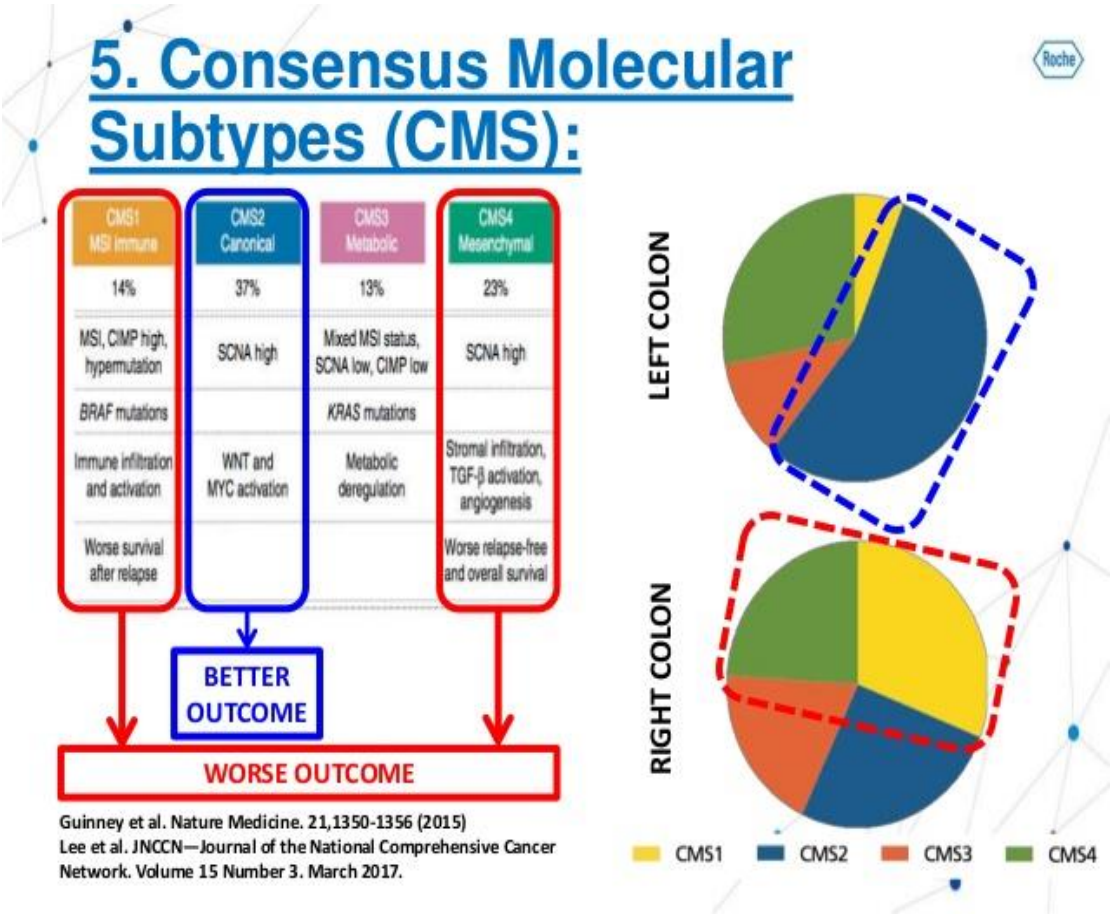
Τα πρότυπα ανάπτυξης του ΚΠΕ παγκοσμίως επιτρέπουν τη ταξινόμηση των περιστατικών, σ' αυτά που ανήκουν στη κατηγορία του κληρονομικού καρκίνου, λόγω της αυξημένης γενετικής συμβολής διαφόρων συνδρόμων και στις σποραδικές μορφές εκδήλωσης της νόσου [7, 8].

Πίνακας 1. *Σχετική συχνότητα μορφών ΚΠΕ* [7, 8]:

Σποραδικές μορφές της νόσου	75%
Οικογενειακό ιστορικό	15–20%
Κληρονομικός μη πολυποδιακός (HNPCC)	3–4%
Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP)	1%
Σύνδρομα αμαρτωματώδους πολυποδίασης	≤1%
Ελκώδης κολίτιδα	2%

Επίσης, τα τελευταία χρόνια έγινε μία μοναδική προσπάθεια από μια κοινότητα εμπειρογνωμόνων με αποτέλεσμα την μοριακή ταυτοποίηση του ΚΠΕ βάσει της έκφραση των γονιδίων τους . Η τελευταία διεθνή ομόφωνη μοριακή ταξινόμηση του ΚΠΕ είχε ως αποτέλεσμα την ταξινόμηση των περισσότερων όγκων του ΚΠΕ σε τέσσερις διακριτές βιολογικές και μοριακές κατηγορίες [9]. Η πρώτη περιλαμβάνει ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI High) και διεγερμένο ανοσοποιητικό σύστημα, η δεύτερη αφορά επιθηλιακούς όγκους με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) και ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt και της σηματοδότησης του γονιδίου Myc και σχετίζεται με καλύτερη έκβαση. Στην τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει πάλι επιθηλιακούς όγκους αλλά με χαμηλό ανοσοποιητικό και

επαναπρογραμμματισμό του μεταβολισμού του καρκινικού κυττάρου. Τέλος στην τέταρτη ομάδα αναλύθηκαν όγκοι με υπέρ-έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην επιθηλιό-μεσεγχυματική μετάβαση με αυξημένη στρωματική διήθηση και αγγειογένεση και αντοχή στη χημειοθεραπεία και έχουν την χειρότερη πρόγνωση.



Εικόνα 3: *Ταξινόμηση του ΚΠΕ με βάση τα* βιολογικά χαρακτηριστικά και τους μοριακούς υπότυπους των όγκων.

ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΣ ΚΠΕ

Με τον όρο “σποραδικό” ορίζουμε τον καρκίνο όπου το υπόστρωμα εξόρμησης του όγκου, είναι το αποτέλεσμα συσσώρευσης πολλαπλών σωματικών μεταλλάξεων, που αν και με χαμηλή διείσδυση προκαλούνται λόγω αλληλεπίδρασης τους, με παράγοντες του περιβάλλοντος, και αυτές οι μεταλλαγές τελούν υπό διερεύνηση. Περίπου το 70% των περιπτώσεων αφορά ασθενείς άνω των 60 ετών [10].

Πρόσφατα προτάθηκαν οι 3 κυριότεροι γενετικοί μηχανισμοί έναρξης και ανάπτυξης της νόσου (Εικόνα 4) οι οποίοι συνοδεύονται με διακριτά κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά και έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην πρόληψη, τις στρατηγικές έγκαιρης διάγνωσης και το θεραπευτικό σχεδιασμό της νόσου [11, 12].

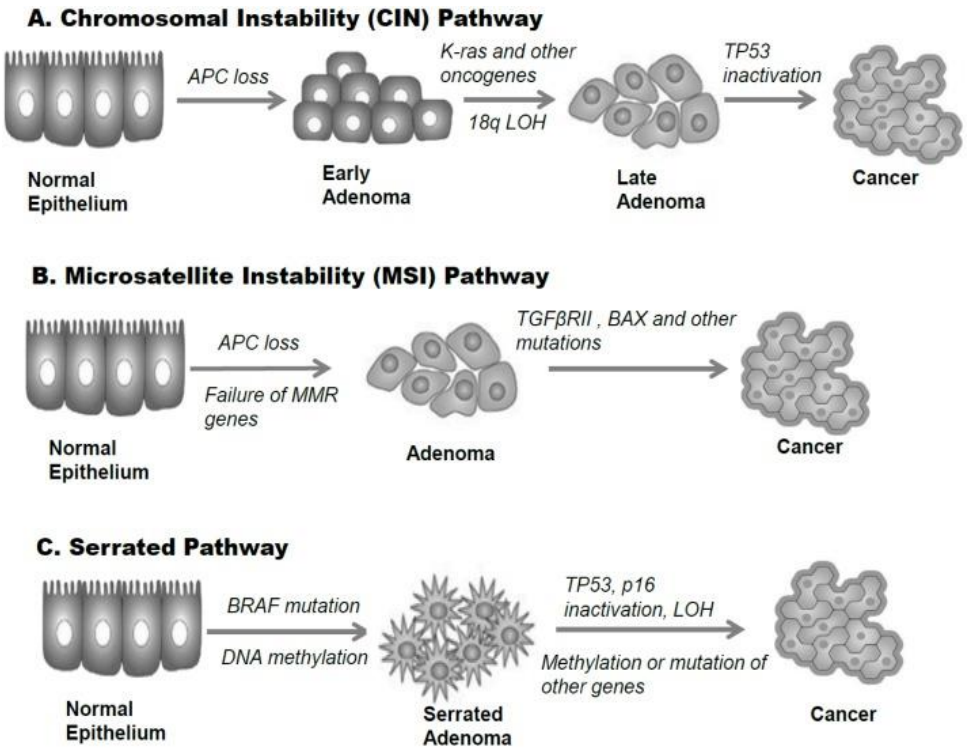
Η πρώτη οδός η οδός APC/β-κατενίνης, χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) και οδηγεί σε σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων σε μια σειρά ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η μοριακή εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά μήκος αυτής της οδού αναφέρεται ως αλληλουχία αδενώματος-καρκινώματος (Εικόνα 4). Η αλληλουχία αυτή σχετίζεται με το πρότυπο των Fearon και Vogelstein, σύμφωνα με το οποίο η πρώτη μετάλλαξη συμβαίνει στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC [13, 14]. Μεταλλάξεις στο *APC* (αλλά όχι στην κατενίνη) συνδέονται με χρωμοσωμική αστάθεια, που κάνει το κύτταρο ευαίσθητο στη δράση γονιδίων που συμβάλλουν στην πρόοδο του όγκου και την κακοήθη εξαλλαγή. Το επόμενο βήμα της καρκινογένεσης είναι η γενικευμένη υπομεθυλίωση του DNA, δηλαδή, η απώλεια μεθυλικών ομάδων του DNA είναι ένα πρώιμο γεγονός στα αδενώματα του παχέος εντέρου. Παρουσιάζεται σε μεγάλο ποσοστό των αδενωμάτων, αλλά απουσιάζει στο φυσιολογικό βλεννογόνο [14]

Η δεύτερη σημαντική μοριακή οδός καρκινογένεσης σχετίζεται με γονίδια (*hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2*) εμπλεκόμενα στους διορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Γενετική ή επιγενετική αδρανοποίηση των DNA MMR οδηγεί είτε σε απώλεια της ετερωζυγοτίας (LOH), σημειακή μετάλλαξη του εναπομείναντος αλληλίου ή ομόζυγη απάλειψη τους , είτε με υπερμεθυλίωση

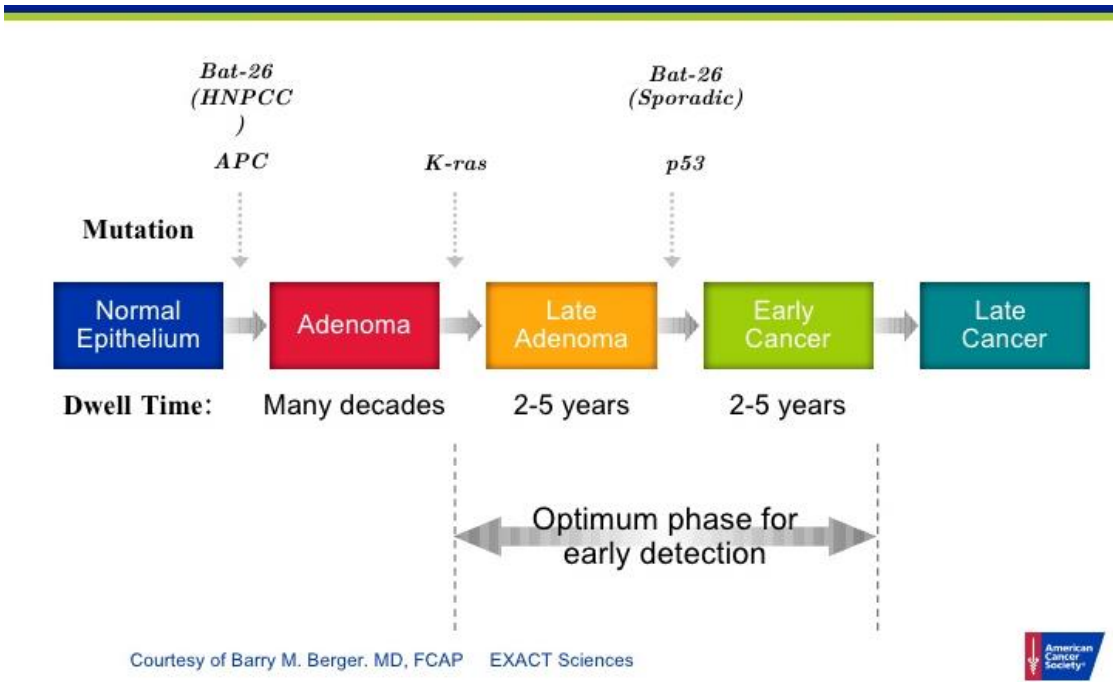
του υποκινητή του γονιδίου. Οι μεταλλάξεις. των γονιδίων αυτών προκαλούν χαρακτηριστικό φαινότυπο αποκαλούμενο μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instabillity, MSI), η οποία παρατηρείται στους περισσότερους από το 10% των σποραδικών περιπτώσεων ΚΠΕ. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (90%) οι μεταλλάξεις αφορούν τα γονίδια *hMLH1* και *hMSH2 [15]*

Η ονομασία του τρίτου μονοπατιού αποδίδεται στην πρόδρομη εμφάνιση βλαβών με οδοντωτή μορφολογία.και ξεκινάει πάντα με τη μετάλλαξη του ογκογονιδίου *BRA*F με ή χωρίς μικρό-δορυφορική αστάθεια. Η εναλλακτική αυτή οδός καρκινογένεσης οδηγεί σε υπέρ μεθυλίωση του DNA σε CpG θέσεις. Οι θέσεις CpG, ή θέσεις CG, είναι περιοχές του DNA όπου ένα νουκλεοτίδιο κυτοσίνης (C) είναι δίπλα σε ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης (G) στην γραμμική αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος του DNA. Αυτή η μετάλλαξη *BRAF* προκαλεί την ανάπτυξη των οδοντωτών πολυπόδων που είναι κυρίως μικρό- φλυκταινώδης υπερπλαστικοί πολύποδες ή άμισχοι οδοντωτοί πολύποδες. Οι πολύποδες αυτοί είναι επιρρεπείς σε μεθυλίωση των νησίδων CpG στις περιοχές υποκινητή των γονιδίων τους που οδηγεί σε επιγενετική αποσιώπηση τους. Το καλύτερα χαρακτηρισμένο γονίδιο σιγήσει μέσω αυτού του μηχανισμού είναι το *MLH1*. Αυτό το γονίδιο είναι ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων και επιγενετική αποσιώπηση του οδηγεί σε σποραδικά καρκινώματα με μικρό- δορυφορική αστάθεια (MSI) [16].

Εικόνα 4: *Βασικά Μονοπάτια Παθογένεσης του ΚΠΕ* [17]



Εικόνα 5: *Γενετικό πρότυπο ανάπτυξης ΚΠΕ.*



ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΚΠΕ

Ο κληρονομικός τύπος αποτελεί το 5% των σθενών με ΚΠΕ. Οι περιπτώσεις κληρονομικού ΚΠΕ εκδηλώνονται με δύο μορφές, πρώτον από την παρουσία πολλαπλών πολυπόδων και δεύτερον από την απουσία τους. Τα πολυποδιασικά σύνδρομα ταξινομούνται στα οικογενή σύνδρομα αδενοματώδους πολυποδίασης (FAP, σύνδρομο Gardner και σύνδρομο Cowden) και στα οικογενή σύνδρομα αρματωματώδους πολυποδίασης (Peutz-Jeguers, νεανική πολυποδίαση). Δεύτερον, ο κληρονομούμενος μη πολυποδιακός καρκίνος παχέος εντέρου (HNPCC) ή αλλιως σύνδρομο Lynch το οποίο αυξάνει σημαντικότατα τον κίνδυνο για εμφάνιση κακοήθειας στο παχύ έντερο αλλά και σε άλλα όργανα [18].

Οικογενή Σύνδρομα Αδενοματώδους Πολυποδίασης

Α.Οικογενή Αδενοματώδης Πολυποδίασης-FAP

Είναι το πλέον συχνό σύνδρομο πολυποδιάσεως, μεταδιδόμενο κατά τον επικρατούντα αυτοσωματικό χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται από πρόωρη εκδήλωση εκατοντάδων έως και χιλιάδων αδενωματωδών πολυπόδων καθ' όλη την έκταση του εντέρου. Εάν οι ασθενείς παραμείνουν χωρίς θεραπεία, αναπτύσσεται ΚΠΕ φθάνοντας στην ηλικία των 35-40 ετών. Επιπροσθέτως, υπάρχει ο κίνδυνος αναπτύξεως και άλλων κακοηθειών. Η γενετική ανωμαλία της νόσου εντοπίζεται στη γενετική μετάλλαξη του APC γονιδίου. Υπάρχουν πολλά σύνδρομα πολυποδιάσεως του εντέρου, που κάποτε εθεωρούντο χωριστές κλινικές οντότητες. Σήμερα αποτελούν μέρος ή συνιστώσα του ιδίου φαινοτυπικού φάσματος της νόσου FAP.

Τα σύνδρομα με γενετική μετάλλαξη του APC γονιδίου περιλαμβάνουν: Το σύνδρομο Gardner, μερικές οικογένειες του συνδρόμου Turcot και την ήπια μορφή αδενωματώδους πολυποδιάσεως (Attenuated FAP ή AFAP).

Το σύνδρομο **Gardner** χαρακτηρίζεται απ' ότι και η κλασσική μορφή FAP και επί πλέον από οστεώματα (ιδιαίτερα στα οστά του κρανίου και της κάτω γνάθου), οδοντικές ανωμαλίες και όγκους των μαλακών ιστών. Αυτά τα περιστατικά καταλήγουν σε θάνατο στο 8%-11% των περοπτώσεων.

Το σύνδρομο **Turcot** χαρακτηρίζεται απ' ότι και το FAP και από όγκους του ΚΝΣ (μυελοβλαστώματα). Έχουν περιγραφεί δύο τύποι: α) FAP και πολύμορφο γλοιωβλάστωμα λόγω μεταλλάξεων στο APC γονίδιο και β) καρκίνος παχέος εντέρου και αστροκύττωμα λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων επιδιόρθωσης αστοχίας βάσεων στο DNA (MMR-mismatch repair)

Η **AFAP** μορφή (Εξασθενημένο Σύνδρομο Αδενοματώδης Πολυποδίασης) χαρακτηρίζεται από μικρότερο αριθμό πολυπόδων του κόλου (μ.ο. 30-35) συγκριτικά με την κλασσική μορφή επομένως καθυστερημένη ανάπτυξη της νόσου. Οι πολύποδες τείνουν να αναπτυχθούν σε μεγαλύτερη ηλικία (36 έτη) και εντοπίζονται στο δεξιό ημιμόριο του παχέος εντέρου.

Λαμβάνοντας υπόψη το φάσμα του πολυποδιασικού συνδρόμου, ασθενείς με πολλαπλούς αδενωματώδεις πολύποδες το πιθανότερο έχουν FAP ή μία των εκδοχών της, AFAP ή MAP (MYH-associated polyposis).

Εάν ένας ασθενής, με υποψία συνδρόμου πολυποδιάσεως, υποστεί γενετικό έλεγχο και δεν έχει *APC* μετάλλαξη, θα πρέπει να γίνει έλεγχος του *MYH* γονιδίου προς αξιολόγηση του MAP, καθόσο 10-20% των ασθενών, οι οποίοι δεν έχουν μετάλλαξη του APC γονιδίου, έχουν μετάλλαξη αμφοτέρων των αλληλίων του *MYH* γονιδίου [19, 20].

Οικογενή Σύνδρομα Αρματωματώδους Πολυποδίασης

Α. Σύνδρομο Peutz-Jeguers. Πρόκειται για ένα νόσημα αυτοσωμικό επικρατές, το οποίο χαρακτηρίζεται από πολλαπλούς αρματωματώδεις πολύποδες του γαστρεντερικού σωλήνα και μελανωτικές κηλίδες του δέρματος και των βλεννογόνων Το γονίδιο που βρέθηκε να ευθύνεται χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 19 και κωδικοποιεί μία κινάση σερίνης-θρεονίνης (*STK11*). Οι αρματωματώδεις πολύποδες εντοπίζονται κυρίως στο λεπτό έντερο από πολύ μικρή ηλικία με μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου τα 50 έτη. Δημιουργούν συνήθως συμπτωματολογία απόφραξης και αιμορραγίες. Υπάρχει διαθέσιμο γενετικό τεστ σε εξειδικευμένα μοριακά εργαστήρια [21].

Β. Σύνδρομο Νεανικής Πολυποδίασης (JPS). Αυτή η σπάνια, παιδική ηλικία έναρξης της νόσου είναι ένα αυτοσωματικό κυρίαρχο διαταραχή που προκύπτει από μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια ευαισθησίας στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *SMAD4/DPC4* και *BMPR1A*. Η νόσος συνδέεται με την ανάπτυξη των πολυπόδων hamartomatous (λίγοι σε πολυάριθμες) που μπορεί να είναι παρόν σε όλη τη γαστρεντερική οδό. Άλλα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν διάρροια, αιμορραγία και εντεροπάθεια με απώλεια πρωτεϊνών. Νεανική πολυποδίαση συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα για γαστροεντερική και παγκρεατικών καρκίνων. Οι περισσότεροι ασθενείς φαίνεται να είναι σποραδικές περιπτώσεις (συμβαίνουν για πρώτη φορά σε μια οικογένεια). Ωστόσο, αυτό μπορεί στην πραγματικότητα να είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης διεισδυτικότητας (δηλαδή, η μετάλλαξη του γονιδίου αιτιολογικός είναι παρούσα σε έναν από τους γονείς, αλλά τα συμπτώματα δεν αναπτυχθεί) [22].

Γ. Σύνδρομο Cowden. Χαρακτηρίζεται από αρματωματώδεις όγκους ενδοδερμικής μεσοδερμικής και εκτοδερμικής προέλευσης καθώς επίσης και από εξεργασίες του μαστού και του θυρεοειδούς. Οι πολλαπλοί αρματωματώδεις πολύποδες του γαστρεντερικού έχουν μικρή πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής , οι οποίοι όμως δημιουργούν συμπτωματολογία απόφραξης ή αιμορραγίας από το πεπτικό. Οφείλεται σε γαμετική μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN* στο χρωμόσωμα 10. και κληρονομείται με τον αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα [23].

Κληρονομικός Μη Πολυποδιακός ΚΠΕ (HNPCC) ή Σύνδρομο Lynch

Αφορά το 5-10% όλων των καρκίνων παχέος εντέρου και ορθού. Ο κίνδυνος ΚΠΕ σε οικογένειες με HNPCC είναι 70-90% και η μέση ηλικία του ατόμου με διάγνωση ΚΠΕ είναι η ηλικία των 45 ετών. Γυναίκες με HNPCC έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο αναπτύξεως καρκίνου της μήτρας περίπου 50% των και ωοθηκών περίπου 10%. Άτομα με HNPCC έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο αναπτύξεως καρκίνο στομάχου, λεπτού εντέρου, νεφρού, μαστού. Προκαλείται από γαμετική μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια *MLH1, MSH2* και *MSH6* είναι ο πιο συχνός αιτιολογικός παράγων του HNPCC. Τα υπεύθυνα

γονίδια για την ανάπτυξη του HNPCC αποτελούν μέρος ομάδας γονιδίων που ρυθμίζουν τη διόρθωση βλαβών του DNA (mismatch repair gene) κατά τη κυτταρική διαίρεση με τις πρωτείνες που παράγουν σχετίζονται με όγκους που εμφανίζουν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H). Εάν συμβεί γονιδιακή μετάλλαξη σε ένα από αυτά τα γονίδια τότε προκύπτει αδράνεια στο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA (MMR) συνεπώς αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ. Άτομα που έχουν αυξημένο κίνδυνο αναπτύξεως HNPCC ή αυτά που έχουν αυξημένο κίνδυνο λόγω οικογενειακού ιστορικού ευεργετούνται από επισταμένο προληπτικό έλεγχο, όπως ετήσιο έλεγχο με κολονοσκόπηση αφού η έγκαιρη διάγνωση του ΚΠΕ ισοδυναμεί με δυνητική ίαση.

Για τη διάγνωση του συνδρόμου HNPCC συνιστάται η χρήση ενός συνδυασμού κριτηρίων και εξετάσεων όπως έχει ορισθεί από τα διεθνή συνέδρια του Amsterdam[4] και Bethesda[5]. Τα μεν έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία, τα δε μεγαλύτερη ειδικότητα. Σύμφωνα με αυτά:[24]

Amsterdam & Bethesda Κριτήρια
✓ Πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ασθενείς στη ίδια οικογένεια με διαγνωσμένο καρκίνο των οποίων η ιστολογική εξέταση τους κατατάσσει στους καρκίνους που συνδέονται με το σύνδρομο Lynch
✓ Πρέπει να υπάρχουν περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου ανάμεσα σε συγγενείς 1ου βαθμού σε δυο τουλάχιστον γενεές.
✓ Πρέπει σε τουλάχιστον μία από τις περιπτώσεις αυτές η διάγνωση να έχει γίνει πριν από την ηλικία των 50 ετών.
✓ Να έχει χαρακτηριστεί ο όγκος, έπειτα από βιοψία, με έλεγχο μικροδορυφορικής αστάθειας MSI.

[24, 25]

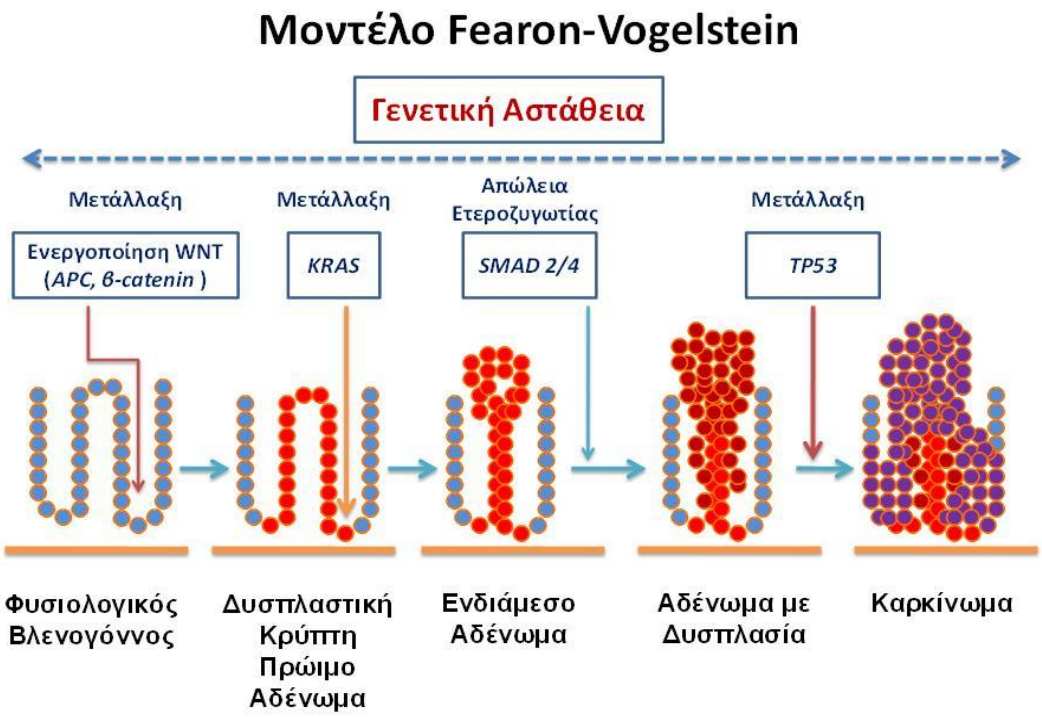
2.3 ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΠΕ

Ο οικογενής τύπος αφορά έως το 25% των ασθενών με ΚΠΕ. Οι προσβεβλημένοι ασθενείς έχουν οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ, αλλά ο συγκεκριμένος τύπος δεν εντάσσεται σε κάποιο από τα κληρονομούμενα

σύνδρομα. Εάν άτομα πρώτου βαθμού συγγενείας (γονείς, αδέλφια και παιδιά) έχουν ΚΠΕ νεότερα από 50 ετών, ο κίνδυνος αναπτύξεως ΚΠΕ διπλασιάζεται συγκριτικά με τα άτομα συνήθους κινδύνου. Αυξάνεται δε περισσότερο, όταν και άλλοι στενοί συγγενείς πάσχουν από ΚΠΕ. Ο κίνδυνος όμως αυτός είναι σημαντικά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο των κληρονομούμενων συνδρόμων [26].

Γονιδιακές μεταλλάξεις του ΚΠΕ

Γονιδιακές υπογραφές είναι υπεύθυνες για την καρκινογένεση του ΚΠΕ, τόσο σε ασθενείς με κληρονομούμενα σύνδρομα όσο και σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο. Γαμετική μετάλλαξη είναι η μετάλλαξη που συμβαίνει πρίν ή κατά τη γονιμοποίηση του ωαρίου και μεταδίδεται από τον γονέα στον απόγονο ως κληρονομικό ελάττωμα. Αντίθετα, σωματική μετάλλαξη λέμε τη μετάλλαξη που εμφανίζεται κατά την ανάπτυξη ενός ιστού ή οργάνου. Οι σωματικές ,μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό του κυττάρου καθώς φέρει τη μεταλλαγμένη γενετική πληροφορία (κλωνική εξέλιξη του κυττάρου) [27]. Το 1990, οι Fearon και Vogelstein περιέγραψαν την μοριακή βάση καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, ως μία διαδικασία πολλαπλών βημάτων, στην οποία κάθε συσσωρευμένο γενετικό συμβάν προσφέρει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα ανάπτυξης στο επιθηλιακό κύτταρο του παχέος εντέρου. Σύμφωνα με το μοντέλο Fearon και Vogelstein, απαιτούνται μεταλλάξεις του βασικού γενετικού υλικού ή σωματικές μεταλλάξεις για τον κακοήθη μετασχηματισμό, και είναι η συσσώρευση πολλαπλών γενετικών μεταλλάξεων παρά η ακολουθία τους, η οποία τελικώς καθορίζει τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου (Εικόνα 5).



<u>Εικόνα 6</u>: *Μοντέλο καρκινογένεσης του παχέος εντέρου.*

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα κυριότερα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του ΚΠΕ.

Τύπος Μετάλλαξης	**Επλεκόμενα Γονίδια**	**Τύπος Νόσου**
Γενετικός	*APC* *MMR*	FAP Lynch Syndrome
Σωματικός	<u>Ογκογονίδια</u> *Myc* *Ras* *Src* *ErbB2* <u>Ογκοκατασταλτικά</u> *P53* *APC* *DCC* <u>Γονίδια ανεπάρκειας MMR</u> *MLH1* *MSH2* *PMS1* *PMS2* *MSH6* *MSH3*	Σποραδικός

3.1 Ογκογονίδια & Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένες μορφές γονιδίων που οδηγούν τα φυσιολογικά κύτταρα σε υπερβολική ανάπτυξη και σε μετατροπή τους σε καρκινικά κύτταρα. Πρόκειται για μεταλλάξεις που αφορούν συγκεκριμένα γονίδια του κυττάρου που ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι αυτά που φυσιολογικά ελέγχουν το πόσο συχνά ένα κύτταρο θα διαιρεθεί και το βαθμό με τον οποίο θα διαφοροποιηθεί. Όταν αυτό μεταλλαχθεί, γίνεται δια παντός "διεγερμένο" και τότε το κύτταρο διαιρείται πολύ γρήγορα γεγονός που οδηγεί σε καρκίνο

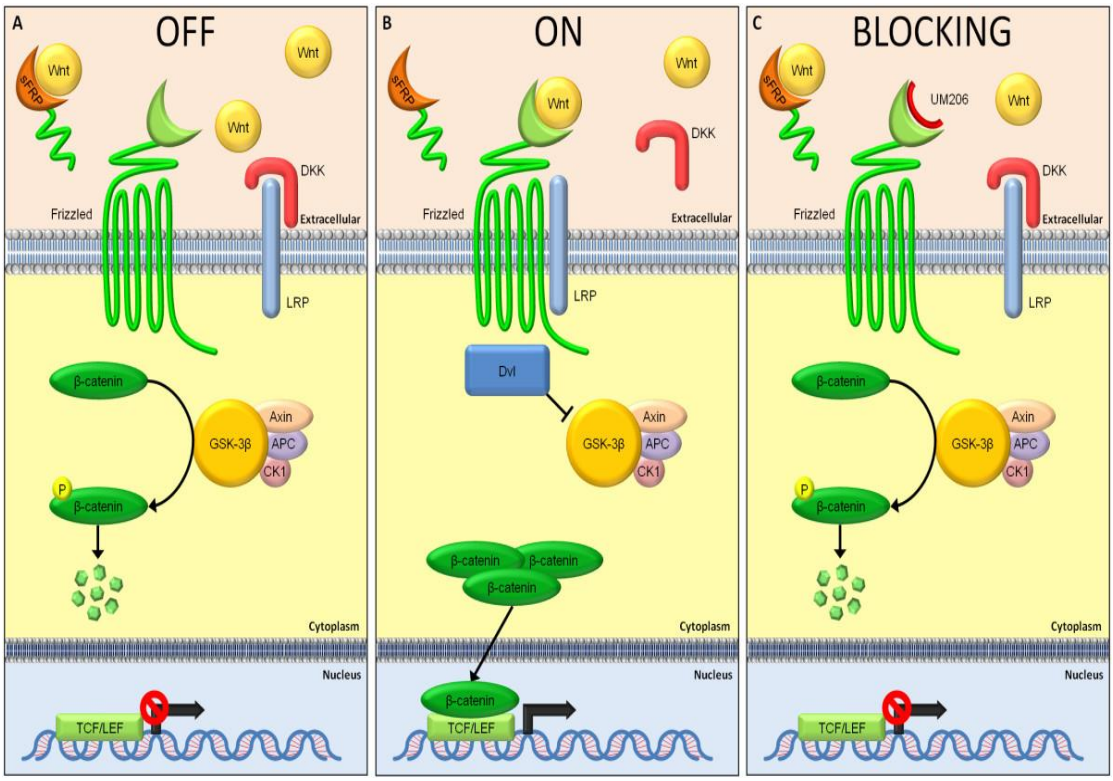
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, βοηθούν την επιδιόρθωση των λαθών του DNA και που καθορίζουν την απόπτωση των κυττάρων. Όταν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δε δουλεύουν επαρκώς, τότε τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν ανεξέλεγκτα, γεγονός που θα οδηγήσει σε καρκίνο.

Σημαντική διαφορά μεταξύ των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ότι τα πρώτα προέρχονται από την ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων, ενώ τα δεύτερα προκαλούν καρκίνο όταν είναι απενεργοποιημένα. Άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των ογκογονιδίων αναπτύσσεται από μεταλλάξεις φυσιολογικών κυτάρων (πρωτογκογονιδίων) κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου (επίκτητες μεταλλάξεις), οι διαταραχές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορούν να κληρονομηθούν [28, 29].

APC

Η ανακάλυψη του ογκοκατασταλτικού *APC* ήταν ένα μεγάλο βήμα για την κατανόηση της καρκινογένεσης του ορθοκολικού καρκίνου. Το *APC* εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου όπως στη διαφοροποίηση, προσκόλληση, πολικότητα, ανάπτυξη, μετανάστευση, απόπτωση του και τέλος στη φάση του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Εντοπίζεται στη θέση 5 του χρωμοσώματος και μαζί με την *β-κατενίνη* φαίνεται να παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στο μονοπάτι μεταγωγής σημάτων Wnt. Η

ενεργοποίηση της οδού Wnt έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την έναρξη μεταγραφικής δραστηριότητας στον πυρήνα και στην τελική έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων. Η *β-κατενίνη* είναι αυτή η οποία εισέρχεται στον πυρήνα και δίνει το εναρκτήριο σήμα για την μεταγραφική διαδικασία. Η *β-κατενίνη* βρίσκεται κάτω από τη ρυθμιστική παρέμβαση ενός συμπλέγματος πρωτεινών, τα οποία διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα την ποσότητα της στο κύτταρο. Σε αυτό ακριβώς το πρωτεινικό σύμπλεγμα βασικό ρόλο διαδραματίζει η λειτουργία του *APC*. Σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου *APC* ανευρίσκονται σε συχνότητα 60-80% των σποραδικών μορφών του ΚΠΕ. Η πλειοψηφία των κληρονομούμενων και σωματικών μεταλλάξεων του βρίσκεται στο εξώνιο 15 [30].



<u>Εικόνα 7:</u> *Φάσεις και μηχανισμοί της οδού Wnt και ο ρόλος του APC και β-κατενίνης στην απόπτωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων* [31]

TP53

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση (θεωρείται ως ο «φύλακας» του γονιδιώματος). Μεταλλάξεις του p53 παρατηρούνται περίπου στο 50% των περιπτώσεων ΚΠΕ αλλά παρά το γεγονός ότι αποτελούν αντικείμενο έρευνας από 20ετίας, ο ρόλος τους στην κλινική έκβαση των ασθενών παραμένει ασαφής. Πρόσφατα, μάλιστα, η Ευρωπαϊκή Ομάδα Καρκινικών Δεικτών (European Group of Tumor Markers- EGTM) καθώς και η ASCO συστήνουν τη μη χρησιμοποίησή τους στην προληπτική παρακολούθηση, σταδιοποίηση, επιτήρηση ή το σχεδιασμό θεραπείας για ασθενείς με ΚΠΕ [32].

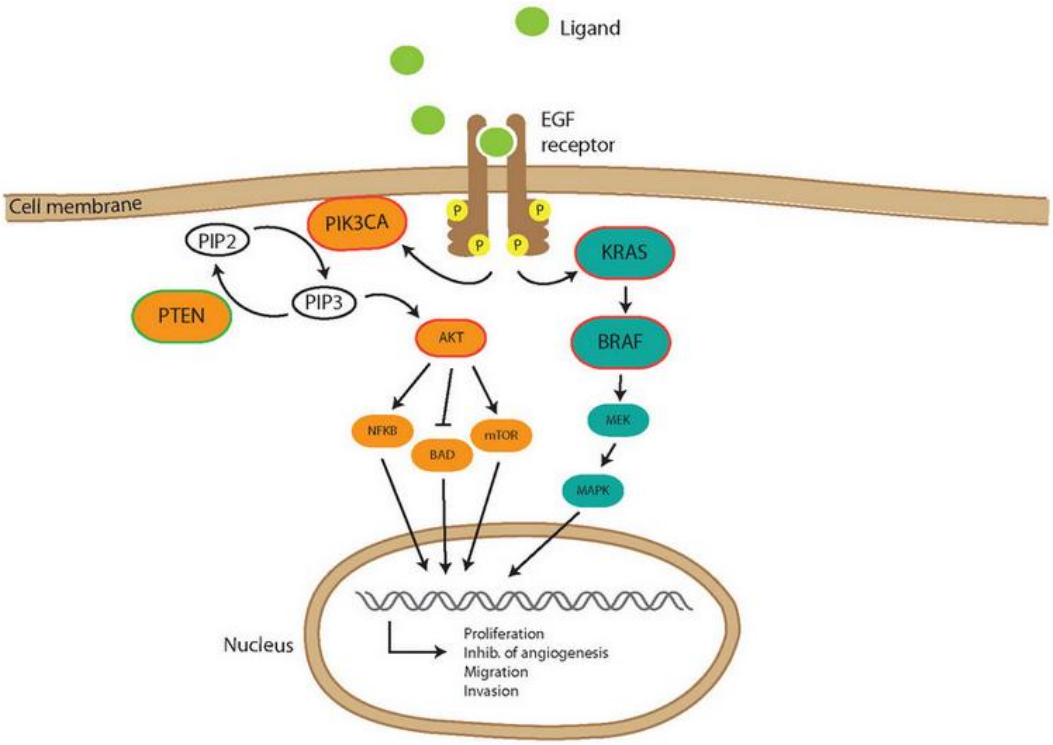
KRAS- BRAF

Το KRAS ανήκει στην οικογένεια των *RAS (K-ras, H-ras, N-ras*) πρωτο-ογκογονιδίων και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 21kDa η οποία ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, μέσω μετατροπής εξωκυττάριων σημάτων που επάγουν τη μίτωση. Η πλειονότητα των μεταλλάξεων του *KRAS* (εξώνιο 2) αφορούν τις γονιδιακές θέσεις 12 και 13, με περίπου το 70% των *Ras* μεταλλάξεων να παρουσιάζονται στο κωδικόνιο 12 και περίπου το 20% στο κωδικόνιο 13. Το KRAS (εξώνιο 2) είναι μεταλλαγμένο στο 35%-40% περίπου των καρκίνων του παχέος εντέρου (τόσο στην πρωτοπαθή όσο και στις μεταστατικές εστίες αλλά όχι στους λεμφαδένες) με αποτέλεσμα το γονίδιο να είναι συνεχώς ενεργό. Λαμβάνουν χώρα σε πρώιμη φάση της καρκινογένεσης και πιθανώς συνδέονται με το βάθος διήθησης του όγκου και με κακή πρόγνωση κυρίως σε ασθενείς σταδίου III. Περίπου ένα άλλο 10% των ασθενών που φέρουν μεταλλάξεις σε άλλες περιοχές των γονιδίων KRAS (εξώνια 3 και 4) και NRAS (εξώνια 2 , 3 & 4) [33].

Οι KRAS μεταλλάξεις μπορεί να συμβάλουν στην εξέλιξη των ορθοκολικών αδενωμάτων, αλλά σίγουρα δεν απαιτούνται για την έναρξη σχηματισμού του αδενώματος. Στους αδενωματώδεις πολύποδες, η συχνότητα των Kras μεταλλάξεων εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης. Μόνο το 10% των

αδενωμάτων κάτω του 1cm έχουν KRAS μεταλλάξεις, ενώ το 50% των αδενωμάτων άνω του 1cm έχουν μεταλλάξεις του KRAS [34].

Οι RAS πρωτείνες ενεργοποιούν απ' ευθείας μια πρωτεινική κινάση την BRAF, η οποία είναι μεταλλαγμένη στο 5% στο ΚΠΕ και σε ποσοστό πάνω από 60% στα μελανώματα [35]. Αυτές οι μεταλλάξεις σχετίζονται σε υψηλό βαθμό με την παρουσία ενός φαινότυπου υπερμεθυλίωσης CpG νησίδων. Παρόλο που η ενεργοποίηση του RAS μονοπατιού στον καρκίνο του ανθρώπου αποδείχθηκε για πρώτη φορά το 1982, οι σωματικές μεταλλάξεις του *BRAF* ανιχνεύθηκαν μόνο το 2002 [36]. Οι μεταλλάξεις του *BRAF* πρωτο-ογκογονιδίου στον ΚΠΕ προκύπτουν σε μεγαλύτερο ποσοστό (80%) λόγω της μετατροπής του αμινοξέος βαλίνη σε γλουταμινικό οξύ (GAA→GAG) στο κωδικόνιο 600 (V600E). Σε σπάνιες περιπτώσεις ανιχνεύεται η μεταλλαγή V600K λόγω μετατροπής της βαλίνης σε λυσίνη (GAA→AAG) [35].

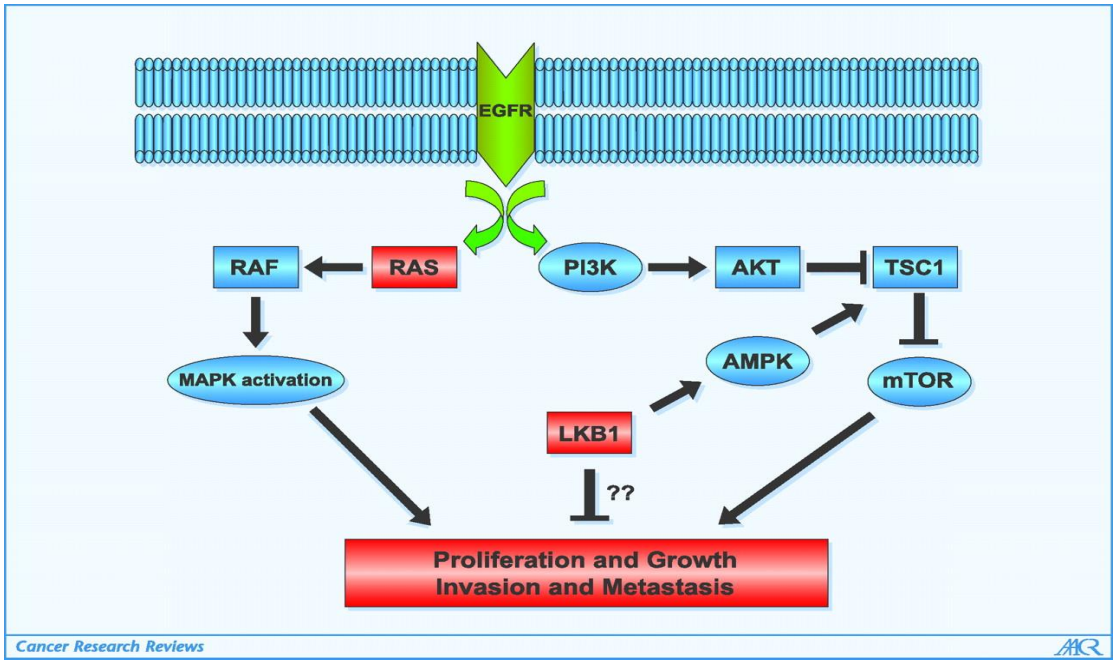


Εικόνα 8: Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) από προσδέτες προκαλεί έτερο ή ομο-διμερισμό και ενεργοποίηση της περιοχής τυροσινικής κινάσης Η ενεργοποίηση του EGFR διεγείρει πολύπλοκες ενδοκυττάριες οδούς μεταγωγής σήματος. Οι δύο κύριες οδοί μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τον EGFR είναι τα RAS – RAF – MAPK και PI3K-PTEN/PTEN/AKT μονοπάτια [37].

Οι μεταλλάξεις των παραπάνω ογκογονιδίων απορυθμίζουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση και στην αγγειογένεση, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αναστέλλουν την απόπτωση τους και προάγουν τον κίνδυνο μεταστάσεων [38]. Οι μεταλλάξεις του KRAS δεν συνυπάρχουν με μεταλλάξεις του RAF, δεδομένου ότι με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε ένα μονοπάτι μετάδοσης σήματος δεν μπορούν να συνυπάρχουν μεταλλάξεις σε περισσότερα του ενός επίπεδα (mutually exclusive) [39]. Τέλος, οι παραπάνω μεταλλάξεις αποτελούν τους σημαντικότερους βιοδείκτες για τον μεταστατικό ΚΠΕ (m CRC).

LKB1

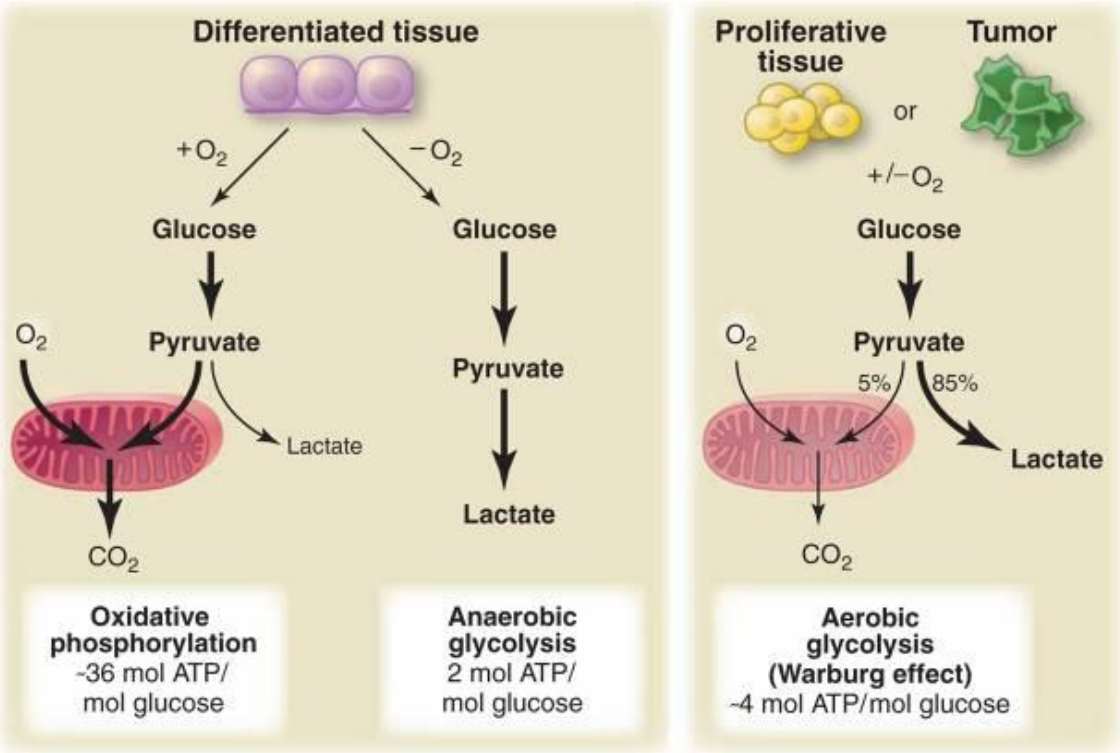
Το γονίδιο *LKB1* serine threonine κινάση (ή *STK11*) επιδεικνύει έντονη μεταβολική δράση, φωσφοριλυώνοντας την γνωστή πρωτείνη AMPK (AMP-activatedproteinkinase), μία από τις μείζονες ρυθμιστές της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει μελετηθεί εμπεριστατωμένα το ανθρώπινο γονίδιο LKB1, στο οποίο αποδίδονται σαφές ογκοκατασταλτικές δράσεις καθώς εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέουν το μεταβολισμό των κυττάρων με τον ρυθμό ανάπτυξης και την πολικότητα τους. Επιπλέον, εμπλέκεται στη καρκινογένεση μέσω αναστολή της mTOR και ενεργοποίησης του p53 [40]. Πρόσφατες έρευνες αναγνώρισαν τις μεταλλάξεις του γονιδίου LKB1 (Liver Kinase B1) στο χρωμόσωμα 19, ως κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση του συνδρόμου Peutz-Jeghers. Επομένως, η LKB1 έχει τοποθετηθεί στην έναρξη και εξέλιξη νεοπλασματικών ασθενειών. Μελέτες σε καρκίνο του πνεύμονα σε μοντέλα ποντικών, έδειξαν συνεργεία μεταξύ ενεργοποίησης του KRAS και απώλεια της LKB1 [41]. Επιπροσθέτως, σε μία μελέτη mRNA έκφρασης σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα, αυτά με απώλεια της LKB1 υπέρ-έκφραζαν τα γονίδια NEDD9 και VEGFC σε σύγκριση με αυτά με φυσιολογική LKB1 [42]



Εικόνα 9: Role of *LKB1* in the transformation of a common lung cancer progenitor cell leading to multiple *NSCLC* histologies and molecular subtypes [41].

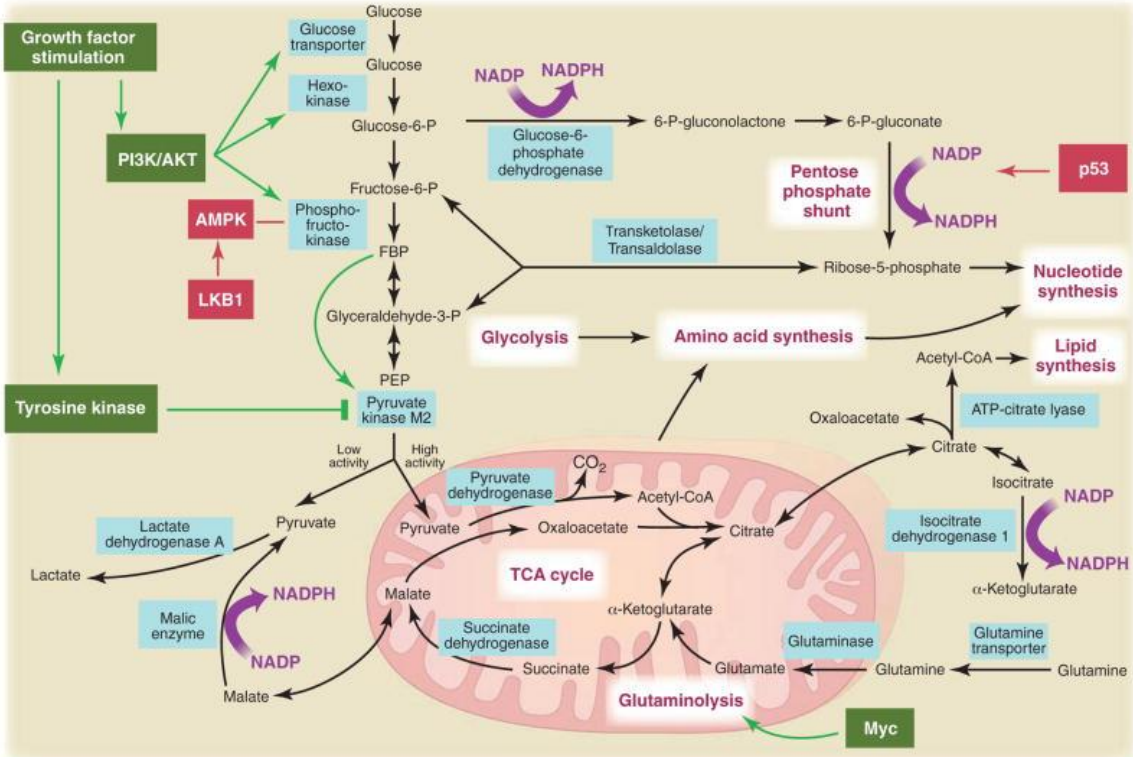
PKM2: ένας ρυθμιστής του Warburg effect

Το 1924 ο Otto Warburg ανακάλυψε ότι τα καρκινικά κύτταρα προσλαμβάνουν γλυκόζη σε μεγαλύτερους ρυθμούς από τα φυσιολογικά κύτταρα των ενήλικων ιστών και τείνουν να μετατρέπουν ένα μικρότερο ποσοστό γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ ανεξαρτήτως της διαθεσιμότητας οξυγόνου μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζετε αερόβια γλυκόλυση ή Warburg effect [43]. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου στους διαφοροποιημένους ιστούς είναι χαμηλά τότε η γλυκόζη μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται αναερόβια γλυκόλυση με αποτέλεσμα μικρότερη παραγωγή ATP συγκριτικά με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Εικόνα 10).



<u>Εικόνα 10 :</u> *Διαφορές στα μεταβολικά μονοπάτια για την παραγωγή ενέργειας υπό μορφή ATP μεταξύ διαφοροποιημένων ιστών και εμβρυϊκών κυττάρων ή όγκων [44].*

Το πλεονέκτημα που προσδίδει η αερόβια γλυκόλυση κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι ότι επιτρέπει το μεγαλύτερο μέρος των μεταβολιτών της γλυκόζης να πάρουν μέρος στην σύνθεση μακρομορίων απαραίτητων για τη δημιουργία νέων κυττάρων παρά να «καούν» σε Co2 [44]. Τα μεταβολικά μονοπάτια που είναι ενεργά στα διαιρούμενα κύτταρα ελέγχονται άμεσα από μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν γνωστά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (P13K/AKT και κινάσες τυροσίνης, Εικόνα 11).



Εικόνα 11 : *Μεταβολικά μονοπάτια που είναι ενεργά στα διαιρούμενα κύτταρα ελέγχονται άμεσα από μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν γνωστά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια* [44].

Το ένζυμο κλειδί που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να καταναλώνουν τις τεράστιες ποσότητες γλυκόζης είναι το ισοένζυμο M2 της κινάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PK-M2). Στα θηλαστικά η κινάση του πυροσταφυλικού κωδικοποιείται από δύο παράλογα γονίδια, καθένα από τα οποία υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα έτσι ώστε τέσσερις ισομορφές του ενζύμου να εκφράζονται ανάλογα τον ιστό και το στάδιο ανάπτυξης, έχοντας διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες, ενώ υπόκεινται και σε διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς [45]. Τα L και R ισοένζυμα, που προέρχονται από το γονίδιο PKLR, εκφράζονται στο ήπαρ και ερυθρά αιμοσαφαίρια αντίστοιχα [46]. Το γονίδιο PKM κωδικοποιεί τις δύο μορφές M1 και M2, συγκεκριμένα μόνο η *PKM2* φαίνεται να είναι ο ρυθμιστής του Warburg effect [47, 48]. Η PKM2 μπορεί να υπάρχει σε δύο μορφές, είτε σαν διμερής είτε σαν τετραμερής, σε αντίθεση με την PKM1 η οποία υπάρχει μόνο στη τετραμερή μορφή. Η τετραμερής μορφή (ενεργός μορφή) χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό (PEP), ενώ η

διμερής μορφή (ανενεργός μορφή) χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια με το υπόστρωμα PEP [49]. Η αναλογία μεταξύ ενεργούς τετραμερούς μορφής και ανενεργούς διμερούς μορφής καθορίζει εάν οι άνθρακες της γλυκόζης θα οδηγηθούν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης μακρομορίων ή θα χρησιμοποιηθούν για την γλυκολυτική παραγωγή ATP. Έτσι όταν η PKM2 βρίσκεται κυρίως στη διμερή μορφή της, όλα τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα πάνω από την κινάση του πυροσταφυλικού συσσωρεύονται και είναι διαθέσιμα σαν πρόδρομες ενώσεις για την βιοσυνθετική διαδικασία. Στα καρκινικά κύτταρα η διμερής μορφή υπερισχύει και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση νουκλεοτιδίων, αμινοξέων και φωσφολιπιδίων που είναι απαραίτητα για την αύξηση του όγκου [50, 51].

Επιπροσθέτως, η PKM2 φαίνεται να παίζει ρόλο την αντίσταση στη χημειοθεραπεία στον ΚΠΕ, στον καρκίνο του πνεύμονα και των ωοθηκών αν και ο ρόλος της παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. Επιπλέον, σχετικές πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της PKM2 μπορεί να αποδειχθεί προβλεπτικός δείκτης σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ που έλαβαν θεραπεία με βάση την πλατίνα [52]. Τέλος, μία μελέτη σε καρκίνο του πνεύμονα σε μοντέλα ποντικών, ανέδειξε ότι μετά από παρεμβολή του RNAi (RNA interference) με στόχο την PKM2 αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου όταν συνδυάζεται με σιπλατίνη [53] .

3.2 Γονίδια Επιδιόρθωσης του DNA

Τα γονίδια επιδιόρθωσης (DNA mismatch repair gene ‘dMMR’) παράγουν πρωτεϊνες οι οποίες ταυτοποιούν και διορθώνουν κακοσυνδυασμένες αλληλουχίες, που συμβαίνουν κατά την φάση αντιγραφής του DNA. Οι πρωτείνες αυτές είναι οι MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2. Ανωμαλίες των γονιδίων αυτών ανευρίσκονται στο 15-20% των σποραδικών καρκίνων[54]. Κατά γενικό κανόνα, οι ασθενείς με σύνδρομο Lynch έχουν μια μετάλλαξη βλαστικής σειράς σε ένα αλληλόμορφο του γονιδίου MMR, και το δεύτερο αλληλόμορφο γονίδιο είναι σωματικώς αδρανοποιημένο με σωματική μετάλλαξη, με απώλεια της ετεροζυγωτίας ή και με επιγενετική αποσιώπηση με υπερμεθυλίωση προαγωγέα. Ως αποτέλεσμα, οι ΚΠΕ σε σύνδρομο Lynch

έχουν εξασθενημένη επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων του DNA, και έτσι είναι πολύ εύκολοι στις μεταλλάξεις και έχουν έντονη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) [55]. Μικροδορυφορική αστάθεια είναι η κατάσταση που εκδηλώνεται λόγω ανεπάρκειας του συστήματος MMR Τμήματα του DNA που ονομάζονται μικροδορυφορικά, αποτελούνται από μια ακολουθία από επαναλαμβανόμενες μονάδες 1-6 ζευγών βάσεων στο μήκος και είναι ασταθή. Οι ασθενείς οι οποίοι εκφράζουν τη γονιδιακή αυτή ανωμαλία έχουν 70-80% πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου και ορθού κατά τη διάρκεια του βίου τους [56].

Σταδιοποίηση του ΚΠΕ

Η διαδικασία της «σταδιοποίησης» σε κάθε νεόπλασμα είναι η απόπειρα φωτογράφησης στη δεδομένη στιγμή της έκτασης του καρκίνου μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Ο παθολογοανατόμος, με όσες δυνατότητες του δίνουν οι διάφορες εξετάσεις, προσπαθεί να αποτυπώσει πόση είναι η νόσος μέσα στο σώμα και σε ποια σημεία βρίσκεται. Η σταδιοποίηση είναι αναγκαία για την απόφαση της θεραπευτικής αγωγής και προσφέρει μία ενδεικτική πρόγνωση. Επίσης, επιτρέπει την οργάνωση της έρευνας κατά του καρκίνου, την συγκρότηση όμοιων ομάδων μελέτης στις κλινικές έρευνες και τέλος την υποστήριξη των προληπτικών μέτρων κατά του καρκίνου. Το σύστημα σταδιοποίησης που χρησιμοποιείται σήμερα ονομάζεται TNM, το οποίο έχει το πλεονέκτημα ότι ενημερώνεται με σύγχρονα δεδομένα, έχει διεπιστημονικό σχεδιασμό και περιέχει το σύνολο των κανόνων που εξασφαλίζουν την ομοιόμορφη χρήση [57]. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του TNM ισχύουν τα παρακάτω:

Πρωτοπαθής εστία (T)

- Tx Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
- T0 Καμία ένδειξη παρουσίας πρωτοπαθούς όγκου
- Tis Καρκίνωμα in situ: Ενδοεπιθηλιακός όγκος ή όγκος που διηθεί το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria mucosae)*

- T1 Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνιο μυϊκή στιβάδα
- T2 Ο όγκος διηθεί τη μυϊκή στιβάδα
- T3 Ο όγκος διηθεί όλο το πάχος τις μυϊκής στιβάδας και εισέρχεται στους περικολικούς η περιορθικούς ιστούς
- T4a Ο όγκος διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο)
- T4b Ο όγκος διηθεί η συμφύεται με άλλα παρακείμενα όργανα η δομές (π.χ. κόλπος, προστάτης, ουροδόχος κύστη, νεφρός)

Επιχώριοι λεμφαδένες (N) ◊

- Nx Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατό να εκτιμηθούν
- N0 Χωρίς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες
- N1 Μετάσταση σε 1 έως 3 επιχωρίους λεμφαδένες
    - N1a μετάσταση σε ένα επιχώριο λεμφαδένα
    - N1b μετάσταση σε 2-3 λεμφαδένες
    - N1c δορυφόρες εναποθέσεις (deposit(s) του όγκου στον υπορογόνιο χιτώνα, η στο μεσεντέριο, ή σε μη ορογονικές επιφάνειες περικολικών η περιορθικών ιστών χωρίς μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες
- N2 Μετάσταση σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες
    - N2a μετάσταση σε 4-6 επιχωρίους λεμφαδένες
    - N2b μετάσταση σε 7 η περισσοτέρους λεμφαδένες

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

- M0 Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- Mx Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν
- M1 Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
    - M1a μεταστάσεις σε ένα μόνο όργανο (π.χ., Ήπαρ, Πνεύμονας, Ωοθήκες, μη επιχώριο λεμφαδένα)
    - M1b Μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανα/περιοχές ή το στο περιτόναιο

Στάδιο	Ορισμός	Κατηγορία
Στάδιο 0	Εντοπισμένο καρκίνωμα (insitu): ένας κακοήθης όγκος που περιορίζεται στο βλεννογόνο*, και δεν διηθεί το υποβλεννογόνιο	**Εντοπισμένος ΚΠΕ**
Στάδιο I	Ο όγκος διηθεί το υποβλεννογόνιο ή τον μυϊκό χιτώνα	
Στάδιο IIA	Ο όγκος διηθεί το ορογόνο ή τους περικολικούς ή τους περιορθικούς ιστούς	
Στάδιο IIB	Ο όγκος διηθεί κατ' επέκταση άλλα όργανα ή διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο	
Στάδιο III	Ο όγκος έχει δημιουργήσει μεταστάσεις στους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες.	
Stage IV	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα, ανεξάρτητα από το βαθμό της τοπικής διήθησης και/ή έχει εξαπλωθεί σε τοπικούς λεμφαδένες	**Προχωρημένος ΚΠΕ**

Φαρμακευτική Αντιμετώπιση του ΚΠΕ.

- Χημειοθεραπεία είναι η συστηματική χρήση φαρμάκων που στοχεύει στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων ή στην πρόκληση βλαβών σε αυτά αλλά επηρεάζει και τα υγιή (απόπτωση τριχών κεφαλής). Χορηγείται από του στόματος, με ένεση ή ενδοφλεβίως. Η χημειοθεραπεία που υποβάλλεται σε ασθενείς μετά από την χειρουργική αφαίρεση του όγκου ονομάζεται **επικουρική** ή **συμπληρωματική χημειοθεραπεία**. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι μειώνει τις πιθανότητες επανεμφάνισης καρκίνου σε αντίθεση με αυτούς που δεν υποβλήθησαν. Η χημειοθεραπεία μπορεί να γίνει και πριν από μια επέμβαση, για να συρρικνώσει τον όγκο και ονομάζεται **προεγχειρητική χημειοθεραπεία.** Στις περιπτώσεις που ο καρκίνος δεν μπορεί να θεραπευτεί η χημειοθεραπεία μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα και να βελτιώσει την ποιότητα ζωής αυτή ονομάζεται **παρηγορητική χημειοθεραπεία**.

Η θεμελιώδης βάση της χημειοθεραπείας του ΚΠΕ ανήκουν οι φθοριοπυριμιδίνες που είναι οι 5-Φθοριοουρακίλη (5-fU), η καπεσιταβίνη και η tegafur- ουρακίλη. Ανήκουν στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών τα οποία είναι μια οικογένεια φαρμάκων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του DNA και

του RNA των καρκινικών κυττάρων. Οι φθοριοπυριμιδίνες χορηγούνται συνήθως σε συνδυασμό με την λευκοβορίνη (LV), επίσης γνωστή ως φολινικό οξύ,ένα φάρμακο που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της φθοριοπυριμιδίνης. Οι φθοροπυριμιδίνες συνδυάζονται και με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως η οξαλιπλατίνα ή η ιρινοτεκάνη.

Η **οξαλιπλατίνα** (**LOHP**) είναι ένα νέας γενεάς ανάλογο της πλατίνας (diaminocyclohexane-platinumanalog). Ο μηχανισμός δράσης της LOHP είναι παρόμοιος με αυτόν της κλασσικής πλατίνας και στηρίζεται στη δημιουργία βλαβών στον DNA (DNA adducts) με συνέπεια την αναστολή της σύνθεσης του DNA. Υπάρχουν όμως σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη δραστικότητα της LOHP σε σύγκριση με την πλατίνα: i) Οι βλάβες που προκαλούνται στο DNA είναι πλέον εκσεσημασμένες και υδρόφοβες με αποτέλεσμα η αναστολή της σύνθεσης DNA να είναι εντονότερη, ii) οι βλάβες του DNA δεν αναγνωρίζονται από το σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών MMR. Παρ’ όλα αυτά όφελος από τη προσθήκη της LOHP εμφανίζει ένα μικρό υποσύνολο των ασθενών με ΚΠΕ σταδίου III που θα λάβει τη θεραπεία [58]. Υπολογίζεται ότι από τους 100 ασθενείς οι οποίοι θα θεραπευτούν με συνδυασμό 5-FU/LOHP σε 6-7 θα προληφθεί η υποτροπή λόγω της προσθήκης της LOHP [59]. Επιπροσθέτως 1-2 ασθενείς θα εμφανίσουν σοβαρή μόνιμη νευροτοξικότητα (βαθμού 3) που οδηγεί ουσιαστικώς σε λειτουργική αναπηρία [60]. Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί κάποιος μοριακός δείκτης που θα μπορούσε να χρησιμεύσει στον καθορισμό συγκεκριμένων υποομάδων ασθενών οι οποίοι θα έχουν περισσότερες πιθανότητες να ωφεληθούν από τη θεραπεία με LOHP. Επίσης, δεν έχει αναφερθεί κάποιος μοριακός δείκτης ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμεύσει σαν δείκτης ανταπόκρισης κατά τη διάρκεια της θεραπείας (“surrogate marker”).

Η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA από την LOHP γίνεται κυρίως από τα συστήματα NER (NucleotideExcisionRepair), BER (BaseExcisionRepair) και το Recombinant Repair. Πριν 10 χρόνια δημοσιεύθηκε η προγνωστική και προβλεπτική αξία της ανίχνευσης της έκφρασης του γονιδίου ERCC1 σε ασθενείς που λάμβαναν συμπληρωματική θεραπεία με Πλατίνα για χειρουργημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) [61]. Το

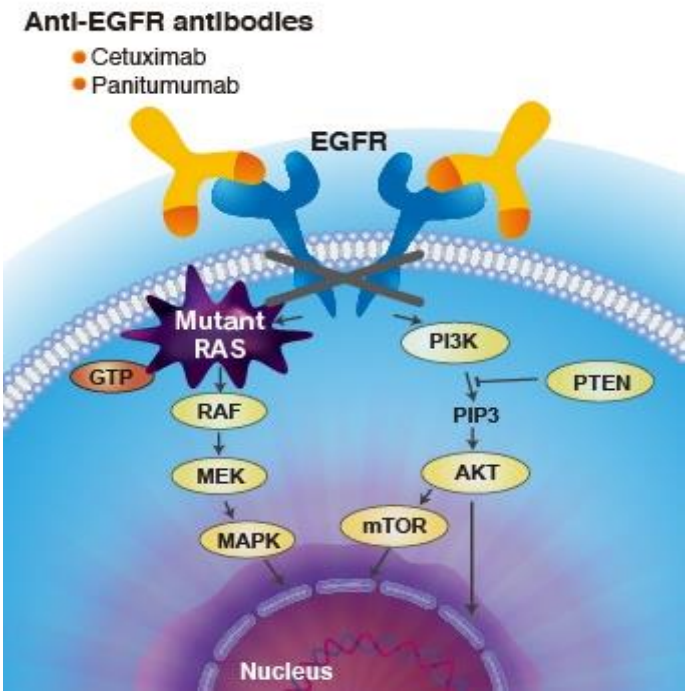
ERCC1 αποτελεί ένα από τα 16 γονίδια που εμπλέκονται στο NucleotideExcisionRepair (NER) σύστημα των βλαβών του DNA. Μαζί με την XPG διαμορφώνουν ένα τελικό σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για την εξαίρεση του λανθασμένου νουκλεοτιδίου [62]. Μικρές αναδρομικές μελέτες έχουν συσχετίσει την έκφραση του ERCC1 με αντοχή σε θεραπεία με Oxaliplatin [63]. Δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν την αντοχή στην Oxaliplatin με άλλα συστήματα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Επίσης δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που να συσχετίζουν την έκφραση του ERCC1 με την έκφραση άλλων κομβικών ενζύμων διαφορετικών συστημάτων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (όπως το XRCC2 στο BaseExcisionRepair-BER σύστημα) ή με μεταφορείς της πλατίνας όπως η ATP7b (ένζυμο μεταφοράς του χαλκού, του οποίου η ανεπάρκεια προκαλεί τη νόσο του Wilson) που έχουν συσχετισθεί με αντοχή στα πλατινούχα [64]. Επιπροσθέτως σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη, έδειξε πως ένας πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 118 του ERCC1, μπορεί να λειτουργήσει ως προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία με Oxaliplatin, σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ. Τέλος, πρόσφατες αναφορές χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες έχουν αναδείξει νέα γονίδια τα οποία πιθανόν εμπλέκονται στην αντίσταση στην LOHP [63, 65].

- Στοχευμένη Βιολογική θεραπεία ή μοριακή θεραπεία είναι η εξατομικευμένη θεραπεία και βασίζεται στην μοριακή ταυτοποίηση του καρκινικού ιστού για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Τα τελευταία 10 χρόνια χρησιμοποιούνται αυτά τα “έξυπνα φάρμακα” στοχεύοντας μόνο στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας σχεδόν ανεπηρέαστα τα φυσιολογικά. Επομένως, επιτυγχάνεται η διακοπή της ανάπτυξης του όγκου χωρίς ιδιαίτερη τοξικότητα για τον ασθενή [66]. Τα φάρμακα της στοχευμένης θεραπείας χωρίζονται σε 3 κατηγορίες [67]:

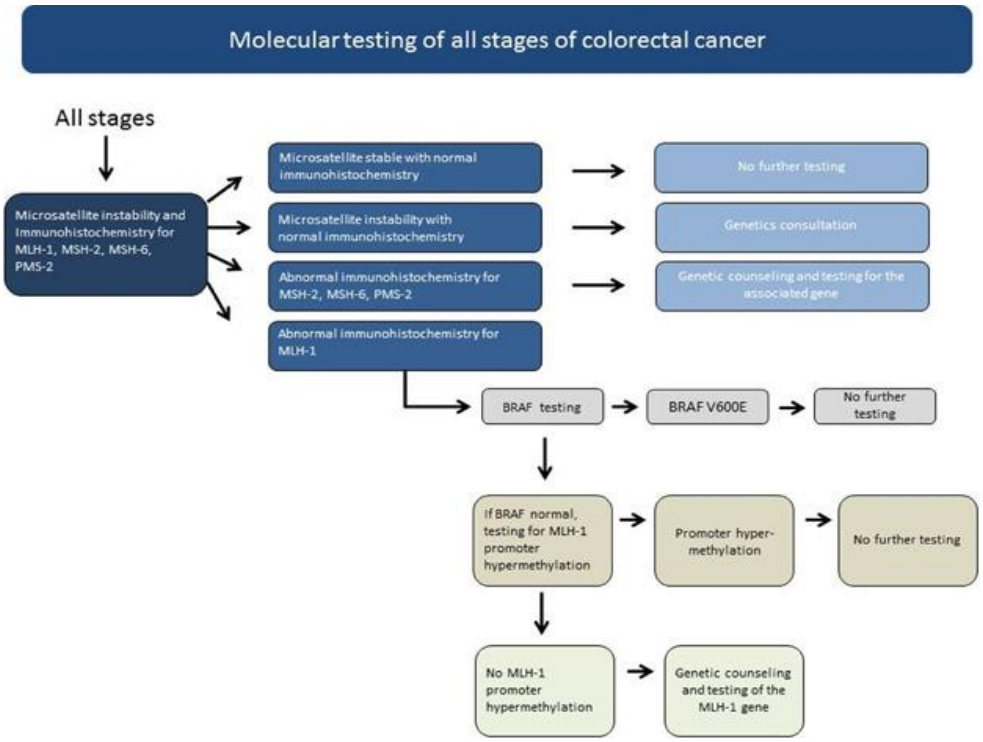
1. Μικρά Μόρια τα οποία στοχεύουν στις εσωτερικές δομές των κυττάρων και παρεμποδίζουν την ικανότητα τους να αναπτυχθούν, διαιρεθούν και να επισκευάζουν τις βλάβες τους.
2. Μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία στοχεύουν στους εξωκυττάριους υποδοχείς π.χ Cetuximab, Erbitux, Panitumumab, Vectibix

3. Τα αντιο-αγγειογενετικά φάρμακα στοχεύουν την αγγειογένεση που τροφοδοτεί με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τα καρκινικά κύτταρα πχ Bevacizuma.

Οι στοχευμένες θεραπείες με αναστολείς του EGFR έχουν αξιολογηθεί από αρκετές αναδρομικές μελέτες και απεδείχθησαν αποτελεσματικές σε ασθενείς με mCRC με όγκους φυσιολογικού τύπου (wt) *KRAS*, *NRAS* και *BRAF*. Αντί-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία έχουν εγκριθεί από τον Ευρωπαικό Οργανισμό Φαρμάκων είναι η κετουξιμάμπη (Cetuximab, Erbitux) και η παμιτουμουμάμπη (Panitumumab, Vectibix). Ο ρόλος των Kras μεταλλάξεων στην ανθεκτικότητα σε αντι-EGFR θεραπείες καταδεικνύεται καλύτερα από δεδομένα μελετών που συγκρίνουν την μονοθεραπεία με αντί-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα σε σχέση με τη βέλτιστη υποστηρικτική φροντίδα. Στην πρώτη μελέτη [68] 599 μεταστατικοί ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν cetuximab και FOLFIRI (Φλουορουρακίλη, Ιρινοτεκάνη, Λευκοβορίνη) έναντι των υπολοίπων 599 που έλαβαν μόνο FOLFIRI, σαν θεραπεία πρώτης γραμμής. Η στατιστική ανάλυση παρουσίασε, τη θεραπεία με την κετουξιμάμπη, με σημαντική βελτίωση στην ελεύθερη πρόοδο νόσου (μείωση του κινδύνου υποτροπής) ενώ δεν έδειξε διαφορά στην συνολική επιβίωση των δύο θεραπειών. Ωστόσο, σε μετα-αναλύσεις και επόμενες μελέτες καταδείχθηκε ξεκάθαρα το πλεονέκτημα της προσθήκης της κετουξιμάμπης, με στατιστικά σημαντική βελτίωση στην συνολική επιβίωση, σε ασθενείς χωρίς *KRAS* μεταλλάξεις [69, 70]. Τέλος, στην ίδια μελέτη και στη μελέτη NORDIC VII παρουσίασαν το ρόλο της μετάλλαξη V600E του *BRAF* ως κακός προγνωστικός παράγοντας . Ασθενείς με μεταλλαγμένο το *BRAF* είχαν χαμηλό ποσοστό αντικειμενικών ανταποκρίσεων και σημαντικά μικρότερη επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου και συνολική επιβίωση σε σύγκριση με εκείνους χωρίς μεταλλάξεις [70, 71]. Ο ρόλος των *BRAF* μεταλλάξεων σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με φάρμακα που στοχεύουν τον *EGFR* είναι παρόμοιος με εκείνο των *KRAS* μεταλλάξεων [72].



Εικόνα 12: *Μηχανισμός δράσης αναστολέων του EGFR.*



Εικόνα 13: *Συστημική θεραπεία για την μεταστατική νόσο στον ΚΠΕ* [73]

Ασθενείς και Μέθοδοι

Συλλέχθηκαν, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν βιοψιακά υλικά πρωτοπαθούς όγκου σε κύβους παραφίνης μονιμοποιημένους σε φορμόλη από 262 περίπου ασθενείς με ΚΠΕ σταδίου ΙΙ ή ΙΙΙ που είχαν λάβει συμπληρωματική θεραπεία με φλουοροπυριμιδίνες και LOHP ή καπεσιταβίνη και LOHP (FOLFOX ή CAPOX) στα πλαίσια μιας προοπτικής τυχαιοποιημένης μελέτης της Ελληνικής Ογκολογικής Ερευνητικής Ομάδας (Ε.Ο.Ε.Ο.). Η εργαστηριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας του Ιατρικού Τμήματος και το εργαστήριο Πάθολογικής.- Ανατομικής του ΠΑΓΝΗ. Τα εργαστηριακά αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα κλινικά δεδομένα (αντικειμενική ανταπόκριση, διάστημα έως την υποτροπή, συνολική επιβίωση) και εξήχθησαν συμπεράσματα. Παράλληλα, συλλέχθηκαν, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν 100 βιοψιακά δείγματα μεταστατικών ασθενών με ΚΠΕ θεραπευμένοι με βάση την Ιρινοτεκάνη, τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Επίσης, έχει γίνει συλλογή και ανάλυση 50 χειρουργημένων πολυπόδων 20 χαμηλού, 20 υψηλού και 10 οδοντωτού τύπου αδενώματος τα οποία επίσης χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου.

Το υλικό αξιολογήθηκε από εξειδικευμένο Παθολογοανατόμο στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής αφού επιλέγηκαν οι κύβοι παραφίνης που ήταν οι πιο αντιπροσωπευτικοί για τον όγκο από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο. Έγινε επιλογή των καρκινικών κυττάρων από τις χρωματισμένες τομές παραφίνης είτε με την βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου και την χρήση πιεζο-ηλεκτρικού-microdissector (micro-dissector Eppendorf) είτε μακροσκοπικά αν το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων ήταν >80% της επιφάνειας της τομής.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ & ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Εκχύλιση Γενωμικού DNA&RNA

Μετά την αποπαραφινοποίηση όλων των δειγμάτων ακολούθησε η απομόνωση του γενετικού υλικού τους, μετά τη διαδικασία κυτταρικής λύσης-πρωτεινικής πέψης, εκχύλισης και καθαρισμός των RNA-DNA. Η απομόνωση

του RNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Παράρτημα 1) του TrizolLS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Παράλληλα, η απομόνωση του DNA με το Epicentre Biotechnologies MasterPure Complete DNA Purification Kit. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των RNA-DNA καθώς και ο προσδιορισμός της καθαρότητα τους έγινε με τη χρήση ειδικού σπεκτροφωτόμετρου (nanodrop). Το ολικό RNA του κάθε ασθενή συντέθηκε σε συμπληρωματικού DNA (cDNA) μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης RT με το ένζυμο SuperScriptIII της Invitrogen. Το συγκεκριμένο υλικό αποτέλεσε τη βάση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) προκειμένου να γίνει η ανίχνευση των επιπέδων mRNA των γονιδίων που αναφέρονται στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Παράρτημα 1) .

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η χρήση αυτής της μεθόδου έχει ως αποτέλεσμα τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης, υπό μελέτη, περιοχής του DNA ή RNA μεταξύ πολλών άλλων. Απαραίτητη προϋπόθεση στην PCR είναι η σωστή σχεδίαση ζευγάρι εκκινητών (primers) δηλαδή οι αλληλουχίες στα άκρα (5’→3’) του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος. Η μέθοδος έχει μία σειρά διαφορετικών εφαρμογών που εκτός των άλλων εξαρτώνται και από το είδος του νουκλεϊκού οξέος. Ιδιαίτερα σημαντική για τα πειράματα της συγκεκριμένης διατριβής είναι η εφαρμογή της μεθόδου, σε RNA και cDNA (συμπληρωματικό DNA), και είναι η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μεταγράφων που έγινε με την τεχνολογία «αντίστροφη μεταγραφή-PCR» (reversetranscription) και την «PCR πραγματικού χρόνου» (RealTimePCR).

ΠΟΣΟΤΙΚΗ RealTimePCR υπερέχει της κλασσικής PCR καθώς έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης του τελικού προϊόντος πριν το τελικό σημείο και μάλιστα στην εκθετική φάση όπου υπάρχει γραμμική συσχέτιση της ποσότητας του προϊόντος με την ποσότητα του εκμαγείου (cDNAtemplate). Η ανίχνευση του προϊόντος ώστε να συσχετιστεί με την ποσότητα του εκμαγείου, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια χρωστικής και την ιδιότητα του φθορισμού.

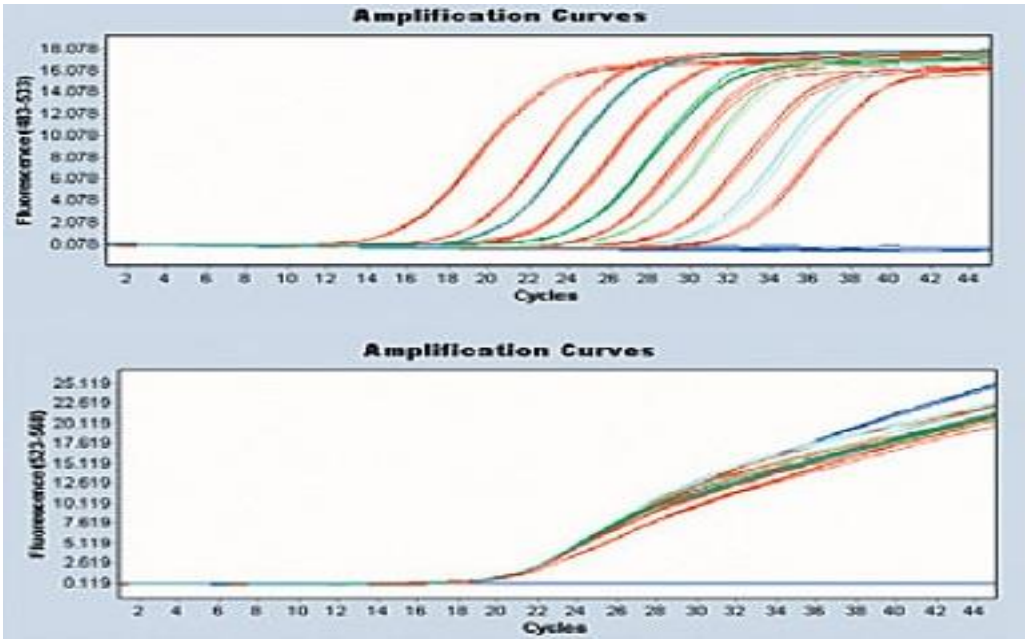
Το cDNA που παράχθηκε (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1) συμπεριλαμβανομένων και των calibrators (εμπορικό RNA από φυσιολογικό ήπαρ και πνεύμονα) και του

αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε για την RealTimePCR, για να εξεταστεί ως προς την έκφραση των γονιδίων: *ERCC1, LKB1, cMYC, NEDD9, PKM2* και*TS.* Οι calibrators αραιώνονται ώστε να έχουν συγκέντρωση 10ng/2.5μl. Το γονίδιο της β-ακτίνης και της φωσφογλυκερινικής κινάσης-1 (PGK1) επειδή έχουν γνωστό πρότυπο έκφρασης (housekeepinggenes- εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα) χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της realtime PCR ως γονίδια μάρτυρες, με τα οποία θα συγκριθούν τα πρότυπα έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων. Όλοι οι εκκινητές και ιχνηλάτες (probes) σχεδιάζονται έτσι ώστε ένας από αυτούς (κατά προτίμηση ο ιχνηλάτης) να βρίσκεται σε περιοχή σύνδεσης δύο εξωνίων, ώστε να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός γενωμικού DNA. Το Tm όλων των εκκινητών και το Tm των ιχνηλατών είναι τα ίδια για να μπορεί να γίνει η PCR για όλα τα γονίδια με την ίδια δραστικότητα στην ίδια αντίδραση. Οι εκκινητές και ανιχνευτές των γονιδίων απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα :

GENE	**ForwardPrimer**	**5'labeled(FAM)probe**	**ReversePrimer**
β-actin	**5'**-GGCACCCAGCACAATGAAG-**3'**	**5'-**TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-**3'**	5'-GCCGATCCACACGGAGTA-3'
PGK1	**5'**-GGCTGGATGGGCTTGGA-**3'**	**5'**-TGTGGTCCTGAAAGCAGCAAGAAGTATG-**3'**	**5'**-TCTGCTTAGCCCGAGTGACA-**3'**
ERCC1	**5**'-GGGAATTTGGCGACGTAATTC-**3**'	**5**'-CACAGGTGCTCTGGCCCAGCACAT-**3**'	**5**'-GCGGAGGCTGAGGAACAG-**3**'
PKM2	**5**'-GCCATAATCGTCCTCACCAAGT-**3**'	**5**'-CAGGTCTGCTCACCAGG-**3**'	**5**'-GCACGTGGGCGGTATCTG-**3**'
MYC	**5**'-GAGCCCCTGGTGCTCCAT-**3**'	**5**'-AGGAGACACCGCCCAC-**3**'	**5**'-TCATCTTCTTGTTCCTCCTCAGAG-**3**'
NEDD9	**5′**-CGTGGGTAAAAAGGTGTTCC-**3′**	**5**'-CAAACCAGCTTGTGAACCTCCAC-**3**'	**5′**-CAAGCCTCCAAACTCAGGAC-**3′**
TS	**5**'-GAATCACATCGAGCCACTGAAA-**3'**	**5**'-TTCAGCTTCAGCGAGAACCCA-GA-**3**'	**5**'-CAGCCCAACCCCTAAAGACTGA-**3**'

Διαδικασία RT-qPCR

Κάθε δείγμα εξετάζεται (τρέχει) 3 φορές για κάθε γονίδιο ώστε να ελέγχεται η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Οι συνθήκες θερμοκρασίας αντίδρασης της RT-qPCR είναι: 2 min→50ºC, 10min→95ºC και 40 θερμοκρασιακοί κύκλοι από 15sec→95ºC και 1min→60ºC. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι (baseline) θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του κατώφλι κύκλου (**Ct**) για ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης [48]. Στη συνέχεια οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος. Η σχετική έκφραση κάθε γονιδίου αναλύθηκε με τη μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης ΔΔCt στην οποία εφαρμόζεται ο τύπος: ποσότητα έκφρασης γονιδίου=$2^{-\Delta\Delta Ct}$. Στη παρούσα διατριβή ελέγχθηκε η γραμμικότητα μεταξύ της ποσοτικοποίησης των γονιδίων στόχων (*ERCC1, LKB1, cMYC, NEDD9, PKM2, TS*) και των γονιδίων αναφοράς (*β-actin* και *PGK1*) ώστε τα αποτελέσματα από τη συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων να είναι αξιόπιστα.



Εικόνα 14: Μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης στο ABI Prism 7900HT SequenceDetectionSystem.

Ενίσχυση DNA για τα *Kras Braf* γονίδια

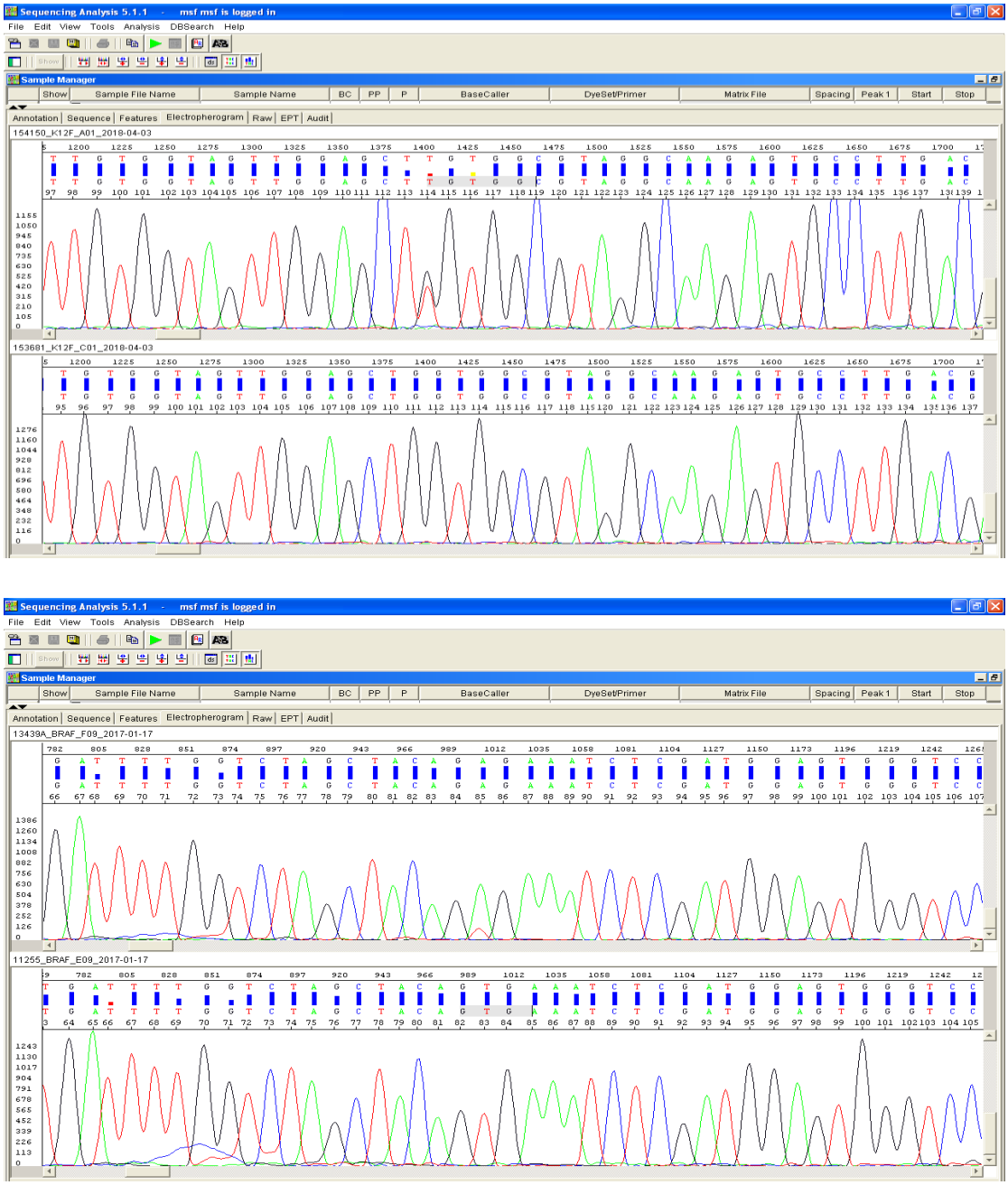
Παράλληλα το ολικό DNA ενισχύθηκε με τους κατάλληλους εκκινητές με την μέθοδο της PCR και με τη βοήθεια της αλληλούχισης κατά SangerGeneSequencing ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις του εξωνίου 2 του γονιδίου *KRAS*και του εξωνίου 15 του γονιδίου *BRAF*. Θα πρέπει να επισημανθεί εδώ ότι επειδή το υλικό της μελέτης προέρχονταν από μονιμοποιημένους σε φορμόλη ιστούς και επομένως το DNA ήταν κατακερματισμένο, χρησιμοποιήθηκε η nestedPCR (φωλιακή). Αυτή η μέθοδος έχει αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα και στηρίζεται στην διαδοχική χρήση δύο ζευγών εκκινητών, ενώ η μεγαλύτερη ευαισθησία προκύπτει από τον αυξημένο αριθμό κύκλων σε σχέση με τη συμβατική PCR. Πιο συγκεκριμένα η πρώτη αντίδραση της PCR έγινε με τους εξωτερικούς εκκινητές (external primers) ενώ στη nestedPCR χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εσωτερικών εκκινητών (internal primers), οι οποίοι βρίσκονται εσωτερικά του πρώτου ζευγαριού. Το PCR προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την δεύτερη και παράγει το αναγκαίο μικρότερο προϊόν (Παράρτημα 2).

Ανίχνευση μεταλλάξεων με την μέθοδο της Αλληλούχισης και την Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στο Γενετικό Αναλυτη.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αλληλουχία των επιλεγμένων τμημάτων των γονιδίων KRAS (εξώνιο 2) και BRAF (εξώνιο 15) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος cyclesequencing η οποία βασίζεται στην κλασσική μέθοδο Sanger (ή μέθοδος «διδεοξυαναλόγων» [75, 76]. Κατά τον Sanger η μέθοδος της PCR βασίζεται στη χρήση απολεκτικών τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε συνδυασμό με τη χρήση των τεσσάρων βάσεων (αδενίνη, κυτοσίνη, γουανίνη και θυμίνη). Τα dNTPs είναι σεσημασμένα με ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, ειδικές για το κάθε ανάλογο και η ενσωμάτωση τους στη νεοσυντιθέμενη πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα προκαλεί πρόωρο τερματισμό στη σύνθεση της. Οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση του CycleSequencing αναγράφονται στο Παράρτημα 3. Όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια περιέχονται στο BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit

(AppliedBiosystem). Επιπλέον, για καλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 ξεχωριστές αντιδράσεις, με ένα μόνο πρόσθιο ή ανάστροφο εκκινητή (όχι ζεύγος) για την αλληλούχιση και των δύο αλυσίδων του PCR προϊόντος κάθε εξωνίου.

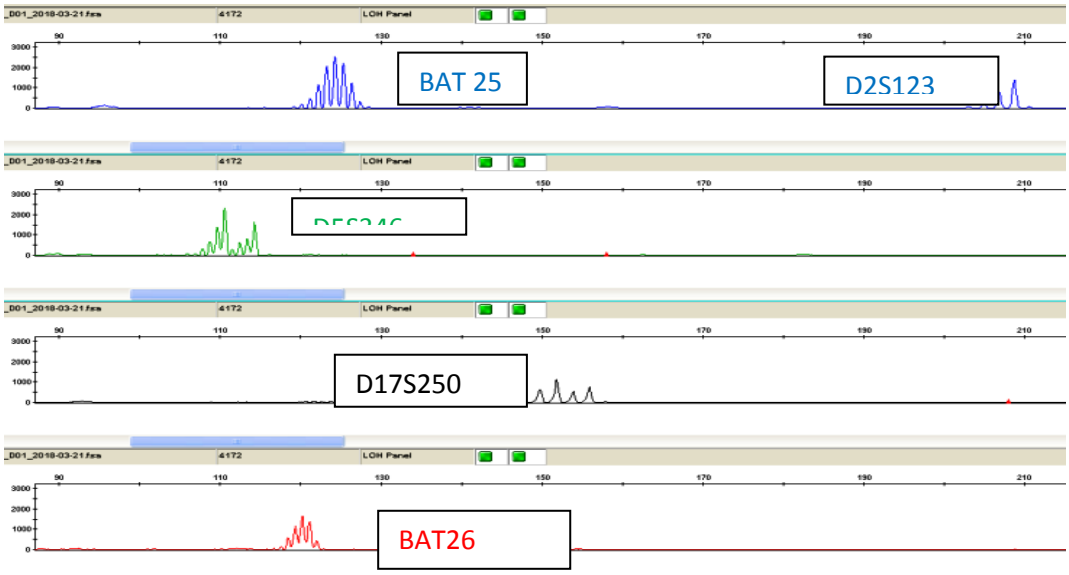
Τέλος, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων επιτυγχάνεται με τη χρήση του αυτόματου γενετικού αναλυτή αλληλουχιών (ABIPrism 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystem). Η ηλεκτροφορητική εικόνα αναγιγνώσκεται αυτόματα με τη βοήθεια δέσμης λέιζερ και τελικά η αλληλουχία των βάσεων καταγράφεται ως σύνολο έγχρωμων καμπυλών, όπου κάθε μία υποδουλώνει μία από τις τέσσερις βάσεις. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και επεξεργασία των δεδομένων γίνεται με ειδικό λογισμικό πρόγραμμα (Sequencing Analysis Software v5.4) . Τα δεδομένα (αλληλουχίες) που προκύπτουν από το πρόγραμμα διαβάζονται και συγκρίνονται με αλληλουχίες αναφοράς για να ανιχνευθεί η μετάλλαξη.



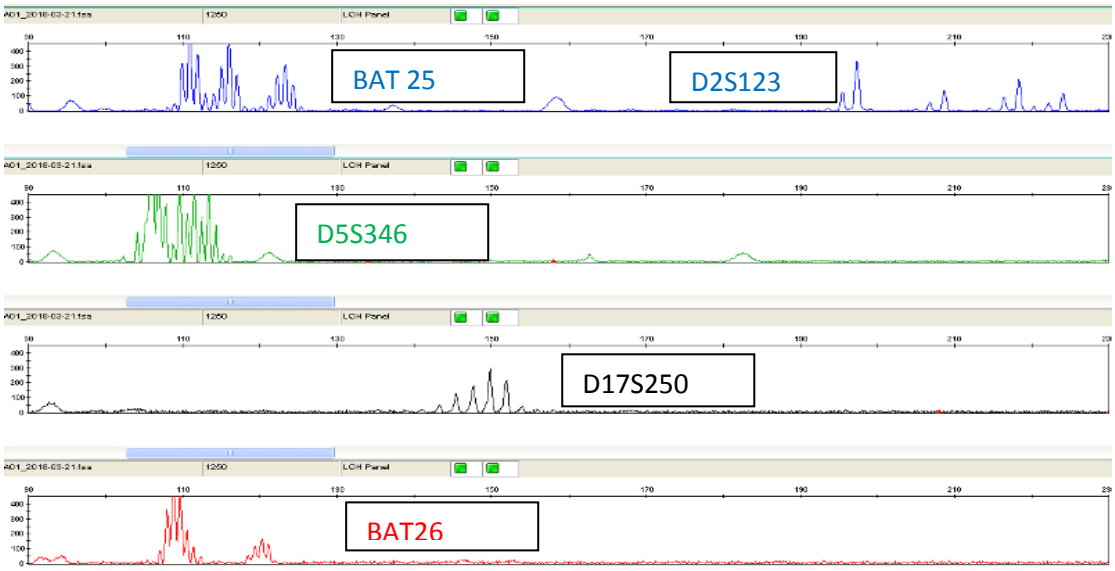
Εικόνα 15: Ηλεκτροχρωματογράφημα αντίδρασης αλληλούχισης. Το πρώτο απεικονίζει την αλληλουχία του *KRAS* με επισημασμένο το κωδικόνιο 12 που φέρει την μετάλλαξη G12C (ggt→tgt) και στο δεύτερο έχει επισημανθεί το κωδικόνιο 600 του *BRAF* που δεν φέρει τη μετάλλαξη V600E(GTG→GAG).

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ

Η ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) για κάθε ασθενή, ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας DNA προερχόμενο από το καρκινικό ιστό έναντι του DNA που εκχυλίστηκε από τον φυσιολογικό ιστό του ασθενή. Για κάθε δείγμα εξετάσθηκαν δύο μονονουκλεοτιδικοί μικροδορυφορικοί δείκτες; οι BAT25 και BAT26 και τρείς δινουκλεοτιδικοί D2S123, D5S346 και D17S250, οι οποίοι επιλέχθηκαν με βάση τη κοινή συμφωνία του 1997 στη Bethesda από το National Cancer Institute. Αρχικά το κάθε DNA πολλαπλασιάστηκε με την τεχνική της multiplex PCR παρουσία σημασμένων πρόσθιων εκκινητών με φθοριούχα μόρια (FAM, VIC, PET, LIZ). Ακολούθως, το προιόν της PCR χαρτογραφήθηκε με την μέθοδο της τριχοειδής ανάλυσης στον αυτόματο αναλυτή 3130 DNASequencer και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σύμφωνα με το πρόγραμμα GeneMapper Softwarev 4.1. Το πρωτόκολλο περιγράφεται αναλυτικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4. Ένας όγκος θεωρείται MSI-H (υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας) όταν η αστάθεια παρατηρείται σε περισσότερο από το 30-40% των υπό ανάλυση μικροδορυφόρων (2 ή περισσότεροι από τους 5 μικροδορυφόρους), MSI-L (χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας) όταν η αστάθεια παρατηρείται σε λιγότερο από το 30-40% των υπό ανάλυση μικροδορυφόρων (1 από τους 5 μικροδορυφόρους), ενώ στους όγκους μικροδορυφορικής σταθερότητας (MSS) δεν παρατηρείται αστάθεια σε κανέναν από τους υπό ανάλυση μικροδορυφόρους.



Εικόνα 16: Χαρτογράφηση φυσιολογικού DNA ασθενή.



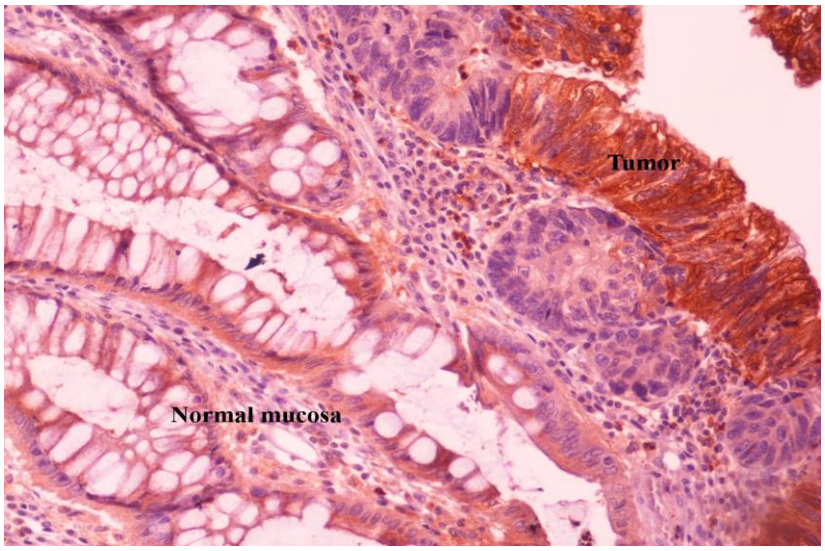
Εικόνα 17: Χαρτογράφηση καρκινικού DNA από τον ίδιο ασθενή με αστάθεια στους 4 (BAT25, BAT26, D2S123 και D5S346) από τους 5 μικροδορυφορικούς δείκτες .

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Σε τομές παραφίνης από τα block των ασθενών, έγινε ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για την έκφραση της LKB1 πρωτεΐνης. Η έκφραση της LKB1 συσχετίσθηκε με τα κλινικό-παθολογοανατομικά δεδομένα (στάδιο νόσου, υποτροπή, επιβίωση, βαθμός διαφοροποίησης). Η ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι των πρωτεϊνικών μορίων της LKB1 (πολυκλωνικό αντίσωμα σε αραίωση 1:100) (Thermo Fischer Scientific, USA) εφαρμόσθηκε σε τομές παραφίνης σύμφωνα με το σύστημα Ultra Vision Quanto Detection System και ως χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε η διαμινοβενζιδίνη (DAB). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τομή από φυσιολογικό όρχι καθώς έδειξαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της LKB1, ενώ ως αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε τομή στην οποία έχει ανοσοϊστοχημικα παραλειφθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Η αξιολόγηση της έκφρασης της LKB1 πρωτεΐνης έγινε με βάση την ένταση χρώσεως και ταξινομήθηκε σε τέσσερις κατηγορίες: 0 (απουσία χρώσης), 1 (ασθενής), 2 (μέτρια) και 3 (έντονη). Αξιολογήθηκε τόσο η κυτταροπλασματική (Εικόνα 18) όσο και η πυρηνική χρώση. Η διαδικασία για τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο περιελάμβανε τομές παραφίνης πάχους 3μm , προερχόμενες από αντιπροσωπευτικές θέσεις των καρκινωμάτων. Ακολούθως έγινε αποπαραφινοποίηση σε κλίβανο, αποπαραφίνωση σε ξυλόλη και ενυδάτωση. Στη συνέχεια οι τομές εκλπύθηκαν με νερό και με TBS, ενώ ακολούθησε αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης, έκπλυση με TBS και παρεμπόδιση της μη ειδικής χρώσης. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη αντισώματος και κατάλληλη επώαση, έκπλυση των

τομών με TBS και προσθήκη μικροπολυμερούς. Γίνεται ξανά έκπλυση με TBS και προστίθεται χρωστική και μετά από πλύσιμο με νερό, αιματοξυλίνη και επικάλυψη. Ακολουθεί η ανοσοϊστοχημική παρατήρηση και εκτίμηση στο μικροσκόπιο.

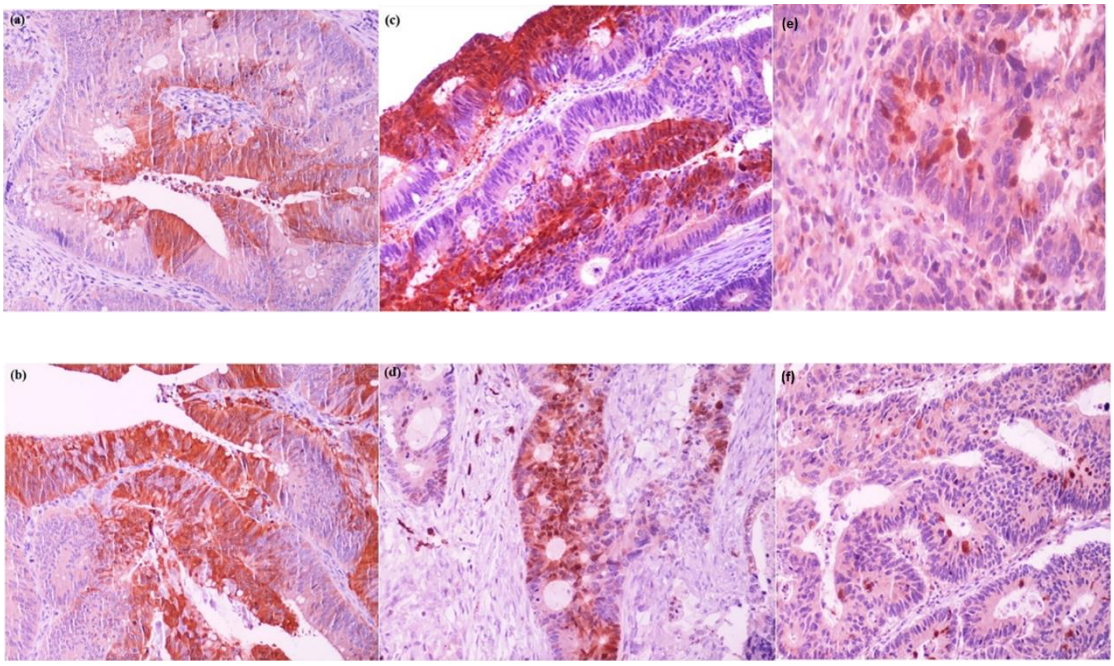
Εικόνα 18: LKB1 θετική κυτταροπλασματική έκφραση σε φυσιολογικό βλεννογόνο (score 1), έντονη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα (score 3) x200



Εικόνες 19: α&β: LKB1 κυτταροπλασματική έκφραση σε καρκινικά κύτταρα x200

γ&δ: LKB1 κυτταροπλασματική και πυρηνική έκφραση σε καρκινικά κύτταρα x200

ε&στ: Αποκλειστική πυρηνική έκφραση της LKB1 σε καρκινικά κύτταρα (e x200, f x100)



Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση της μελέτης έγινε με το εξειδικευμένο λογισμικό SPSS 20.0. υπολογισμός της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων έγινε τόσο με βάση τη διάμεση τιμή όσο και την ανάλυση σε τριτημόρια. Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη συγκρίσεων σε πίνακες 2X2 ενώ το χ^2test για μελέτη συγκρίσεων σε πίνακες μεγαλύτερους από 2X2. Η συσχέτιση της συν-έκφρασης των διαφόρων γονιδίων έγινε με βάση το spearman correlation coefficient test για μη παραμετρικές μεταβλητές: Mann-Whitney t-test χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη συσχέτισης μεταξύ συνεχών μεταβλητών (π.χ. γονιδιακή έκφραση) και κατηγορικών μεταβλητών (π.χ. φύλο, εντόπιση όγκου, είδος μεταστάσεων, αρχικό στάδιο διάγνωσης). Logistic regression ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη στατιστικά σημαντικών παραγόντων στη μονοπαραγοντική ανάλυση. Πολυπαραγοντική ανάλυση με Cox's proportional hazards πραγματοποιήθηκε για την ανάδειξη της σημαντικότητας των στατιστικά σημαντικών παραγόντων από τη μονοπαραγοντική ανάλυση σε σχέση με την ανταπόκριση, η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS- disease free survival), το διάστημα έως την υποτροπή (PFS- progression free survival) και την ολική επιβίωση (OS- overall survival). Η ελεύθερη νόσου επιβίωση, το διάστημα έως την υποτροπή και η συνολική επιβίωση των ασθενών, εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Για όλα τα test το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σαν ρ=0.05. Η ελεύθερη νόσου επιβίωση και η συνολική επιβίωση των ασθενών υπολογίστηκαν από την πρώτη ημέρα του χειρουργείου έως την πρώτη τεκμηριωμένη υποτροπή ή θάνατο αντίστοιχα. Ο χρόνος έως την πρόοδο του όγκου ορίζεται ως ο χρόνος από την έναρξη της χημειοθεραπείας έως την ημερομηνία της πρώτης τεκμηριωμένης υποτροπής από οποιαδήποτε αιτία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος log-rank για τις μεταβλητές DFS, PFS και OS για την σύγκριση των καμπυλών επιβίωσης Kaplan-Meier ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ & ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Στη μελέτη εντάχθηκαν 3 ομάδες ασθενών όπου τα κύρια δημογραφικά και κλινικό-παθολογικά χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στους πίνακες 1α, 1β και 1γ. Ο πρώτος πίνακας αναφέρεται στην ομάδα ελέγχου και περιλαμβάνει τους ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο πρώιμο χειρουργημένο ΚΠΕ (σταδίου II-III) (Ομάδα Α) οι οποίοι έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία με Οξαλιπλατίνα. Επίσης, στον δεύτερο πίνακα περιγράφονται οι ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ που έχουν λάβει χημειοθεραπεία με Οξαλιπλατίνα και αποτελούν την ομάδα επαλήθευσης (Ομάδα Β). Η ομάδα ελέγχου περιγράφεται στον πίνακα 1γ και αποτελείται από μεταστατικούς ασθενείς ΚΠΕ οι οποίοι δεν έχουν λάβει Οξαλιπλατίνα αλλά Ιρινοτεκάνη (Ομάδα Γ).

Συνοπτικά, η πλειοψηφία των ασθενών που είχαν λάβει συμπληρωματική θεραπεία με Οξαλιπλατίνα ήταν άρρενες (58%), με διάμεση ηλικία τα 67 έτη; το 65% των ασθενών είχαν εντόπιση του όγκου στο αριστερό κόλον και το 60% διαγνώσθηκε σταδίου III. Κατά τη στιγμή της ανάλυσης και μετά από ένα διάμεσο χρόνο παρακολούθησης των ασθενών 120,7 μήνες, καταγράφηκαν 71 υποτροπες και 48 θάνατοι. Ομοίως για την ομάδα επαλήθευσης, η πλειοψηφία των μεταστατικών ασθενών ήταν άρρενες (64%), με διάμεση ηλικία τα 65 έτη και η συντριπτική πλειοψηφία αυτών (93%) με PS 0-1. Ο πρωτοπαθής όγκος εντοπίστηκε κυρίως στο αριστερό κόλον στο 63% των περιπτώσεων; Ο μέσος αριθμός των μεταστατικών εστιών ήταν 1 (σε εύρος 1-4) και τα ποσοστά των μεταλλάξεων για τα γονίδια *KRAS* exon2 και *BRAF V600E* ήταν 36% και 7% αντίστοιχα. Κατά τη στιγμή της ανάλυσης και μετά από ένα διάμεσο χρόνο παρακολούθησης των ασθενών της ομάδας επαλήθευσης 49,3 μήνες, καταγράφηκαν 115 υποτροπές και 114 θάνατοι.

Τέλος, η ομάδα ελέγχου η οποία έλαβε FOLFIRI παρουσίασε ίδια χαρακτηριστικά με την ομάδα επαλήθευσης, δηλαδή η πλειοψηφία ήταν άρρενες (64%), με διάμεση ηλικία τα 65 έτη και το 75% με πρωτοπαθή εντόπιση στο αριστερό κόλον. Επίσης, ο μέσος αριθμός των μεταστατικών εστιών ήταν 1 και τα ποσοστά των μεταλλάξεων για τα γονίδια *KRAS* exon2 και *BRAF V600E* ήταν 34% και 6% αντίστοιχα. Κατά τη στιγμή της ανάλυσης

και μετά από ένα διάμεσο χρόνο παρακολούθησης των ασθενών της ομάδας επαλήθευσης 47,4 μήνες, καταγράφηκαν 94 υποτροπές και 91 θάνατοι.

Επιπροσθέτως, σε 24 δείγματα αδενώματος με υψηλού βαθμού δυσπλασία, σε 18 δείγματα αδενώματος με χαμηλού βαθμού δυσπλασία και 50 δείγματα με φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος εντέρου έγινε ανάλυση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PKM2* και ανάλυση για τις μεταλλάξεις των γονιδίων *KRAS* exon2 και *BRAF* exon15.

Πίνακας 1α: Ασθενείς σταδίου II-III: Κλινικό-παθολογικά Χαρακτηριστικά:

Δημογραφικά & Κλινικά Χαρακτηριστικά	**N** (απόλυτος αριθμός)	**%**
	262	
Μέση ηλικία, έτη (Εύρος)	67 (33-75)	
≤ 70 years	162	62
> 70 years	100	38
Φύλο		
Άρρενες	152	58
Θήλεα	110	42
Γενική Κατάσταση (ECOG)#		
0	196	75
1	66	25
Στάδιο		
IIa	90	34
IIb	14	6
IIIa	19	7
IIIb	81	31
IIIc	58	22
Βαθμός Διαφοροποίησης		
Low	160	61
High	102	39
Βλεννώδες		
Yes	59	23
No	203	77
Απόφραξη	27	10
Διάτρηση	40	15
Εντόπιση		
Αριστερά	91	35
Δεξιά	171	65

Σχήμα		
CAPOX	171	65
FOLFOX	91	35
***BRAF*^{V600E} status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	230	87.8
Μεταλλαγμένοι	13	5.0
Απροσδιόριστο	19	7.2
***KRAS* exon 2 status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	169	64.5
Μεταλλαγμένοι	82	31.3
Απροσδιόριστο	11	4.2
MMR Status		
Επάρκεια	200	76.3
Ανεπάρκεια	35	13.4
Απροσδιόριστη	27	10.3
Μέσος αριθμός διηθημένων λεμφαδένων (min-max)	15 (6-108)	
Μέσος αριθμός θετικών λεμφαδένων (min-max)	1 (0-18)	

Πίνακας 1β. Ασθενείς με μεταστατική νόσο: Κλινικό-παθολογικά Χαρακτηριστικά:

Χαρακτηριστικά	N	%
	118	
Μέση ηλικία, έτη (Εύρος)	65(35-84)	
≤ 70 έτη	77	65
> 70 έτη	41	35
Φύλο		
Άρρενες	76	64
Θήλεα	42	36
Γενική Κατάσταση ECOG#		
0-1	110	93
2	8	7
Εντόπιση		
Αριστερά	36	31
Δεξιά	82	69
Βαθμός Διαφοροποίησης		
Καλά Διαφοροποιημένο	69	59
Αδιαφοροποίητο	49	41
Αριθμός Μεταστατικών εστιών	1 (1-4)	
Μεταστατική Νόσο		
Σύγχρονη	44	37
Μετάχρονη	74	63
Θεραπευτικό Σχήμα		
FOLFOX/CAPOX	46	39
FOLFOX/CAPOX + Bevacizumab	45	38
FOLFOX/CAPOX + Cetuximab	27	23
***KRAS* exon 2 status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	76	64
Μεταλλαγμένοι	42	36
***BRAF*^{V600E} status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	110	93
Μεταλλαγμένοι	8	7

Πίνακας 1γ. Ομάδα Ελέγχου (Ασθενείς με μεταστατική νόσο που έλαβαν Ιρινοτεκάνη)

Κλινικό-παθολογικά Χαρακτηριστικά:

Χαρακτηριστικά	N	%
	104	
Μέση ηλικία, έτη (Εύρος)	65(41-79)	
≤ 70 έτη	78	73
> 70 έτη	26	27
Φύλο		
Άρρενες	66	64
Θήλεα	38	36
Γενική Κατάσταση ECOG#		
0-1	98	94
2	6	6
Εντόπιση		
Αριστερά	26	25
Δεξιά	78	75
Βαθμός Διαφοροποίησης		
Καλά Διαφοροποιημένο	60	58
Αδιαφοροποίητο	44	42
Αριθμός Μεταστατικών εστιών	1 (1-5)	
Μεταστατική Νόσο		
Σύγχρονη	30	29
Μετάχρονη	74	71
Σχήμα		
FOLFIRI	18	17
FOLFIRI + Bevacizumab	86	83
***KRAS* exon 2 status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	69	66
Μεταλλαγμένοι	35	34
***BRAF*^{V600E} status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	97	94
Μεταλλαγμένοι	7	6

Εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα εργαστηριακά αποτελέσματα των ασθενών που βασίζονται στα πειράματα που έγιναν για τη μελέτη γονιδιακής έκφρασης, για την ανάλυση των μεταλλάξεων και της μικροδορυφορικής αστάθειας καθώς επίσης και με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας όπως περιγράφονται στη Μεθοδολογία.

Από το σύνολο των δειγμάτων των ασθενών σταδίου II-III που μελετήθηκαν, στους 254 (96,7%) είχαμε αξιολογήσιμα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και συνεπώς της πρωτεϊνικής έκφρασης της *LKB1*. Όσον αφορά το κομμάτι της γονιδιακής μελέτης της παρούσας εργασίας, 247 (94,3%), 250 (95,4%), 249 (95%), 226 (86,2) και 258 (98,4) ασθενείς ενισχύθηκαν ως προς τα γονίδια *ERCC1, MYC, NEDD9, TS* και *PKM2* αντίστοιχα. Παράλληλα, σε 251 (95,8) και 246 (93,9) ασθενείς σταδίου II-III αναλύθηκαν οι μεταλλάξεις για τα γονίδια *KRAS* exon2 και *BRAF* exon15 αντίστοιχα, ενώ σε 235 (89,7%) ασθενείς αναλύθηκε επιτυχώς το σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA.

Πίνακας 2: Εργαστηριακά Αποτελέσματα σε ασθενείς σταδίου II-III

Χαρακτηριστικά	**N(262)**	**%**
***LKB1* πρωτεϊνική έκφραση**		
Αρνητική	117	44.7
Θετική	137	52.3
Απροσδιόριστη	8	3.1
***PKM2* mRNA έκφραση**		
Χαμηλή	129	
Υψηλή	129	
Απροσδιόριστη	4	1.52

***ERCC1* mRNA έκφραση**		
Χαμηλή	124	47.3
Υψηλή	123	46.9
Απροσδιόριστη	15	5.7
***MYC* mRNA έκφραση**		
Χαμηλή	125	47.7
Υψηλή	125	47.7
Απροσδιόριστη	12	4.6
***NEDD9* mRNA έκφραση**		
Χαμηλή	125	47.7
Υψηλή	124	47.3
Απροσδιόριστη	13	5.0
***TS* mRNA έκφραση**		
Χαμηλή	113	43.1
Υψηλή	113	43.1
Απροσδιόριστη	36	13.8
***BRAF*^{V600E} status**		
Αγρίου Τύπου (WT)	233	87.8
Μεταλλαγμένοι	13	5.0
Απροσδιόριστο	16	6.1

***KRAS* exon 2 μεταλλάξεις**		
Αγρίου Τύπου (WT)	169	64.5
Μεταλλαγμένοι	82	31.3
Απροσδιόριστο	11	4.2
MMR# status		
Επάρκεια	200	76.3
Ανεπάρκεια	35	13.4
Απροσδιόριστο	27	10.3

Συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1 με τα κλινικό-παθολογικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών σταδίου II-III

Απώλεια της έκφρασης της *LKB1* εκτιμήθηκε σε 117 (44,7%) ασθενείς και συσχετίσθηκε με στατιστική σημαντική διαφορά με τους εμπλεκόμενους περικολικούς λεμφαδένες (p=0,003) και με την εντόπιση του πρωτοπαθή στο δεξιό κόλον (p=0,032) (Πίνακας 3α). Αντιθέτως, η *LKB1* δεν συσχετίσθηκε στατιστικώς σημαντικά με την ηλικία, το φύλο και το βαθμό διαφοροποίησης (Πίνακας 3α). Επίσης η *LKB1* δεν συσχετίσθηκε στατιστικώς σημαντικά με τις μεταλλάξεις του *KRAS* exon 2, την Μικροδορυφορική Αστάθεια και με τα επίπεδα έκφρασης των *ERCC1, MYC* και *NEDD9*. Σημαντικό εύρημα στην ανάλυση της παρούσας εργασίας, είναι ότι η απώλεια της *LKB1* έδειξε στατιστικά σημαντική συχέτιση με την μετάλλαξη V600E του *BRAF* (p=0,024) ενώ η θετική έκφραση της *LKB1* συσχετίζεται με υπό-έκφραση του *TS* (p=0,041) (Πίνακας 3β).

Πίνακας 3α: Συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1 με τα κλινικό-παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών σταδίου II-III.

Πρωτεϊνική έκφραση της LKB1 (n=254)			
	Αρνητικοί	**Θετικοί**	***p* value**
Ασθενείς	**N (%)**	**N (%)**	
Ηλικία Διάμεση (min-max)	65 (33 - 75)	67 (37 - 75)	0.147#
Ηλικιακή Ομάδα			
≤70	72 (61.5)	86 (62.8)	0.897*
>70	45 (38.5)	51 (37.2)	
Φύλο			
Άρρενες	72 (61.5)	74 (54.0)	0.253@
Θήλεα	45 (38.5)	63(46.0)	
Αριθμός Διηθημένων Λεμφαδένων			
N0	33 (28.2)	68 (49.6)	**0.003***
N1-2	84 (71.8)	69 (50.4)	
Εντόπιση Όγκου			
Αριστερά	49 (41.9)	41 (29.9)	**0.032***
Δεξιά	68 (58.1)	96 (70.1)	
Βαθμός Διαφοροποίησης			
Χαμηλού	70 (59.8)	90 (65.7)	0.880*
Υψηλού	47 (38.5)	47 (34.3)	

Mann-Whitney test; *Pearson Chi-Square; @ Fisher's exact test;

Πίνακας 3β: Συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1 με τα εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών σταδίου II-III.

	Πρωτεϊνική έκφραση της LKB1 (n=254)		
	Αρνητικοί (n=117) **N (%)**	**Θετικοί (n=137)** **N (%)**	***p* value**
***BRAF*^{V600E} status (n=236)**	Απέτυχαν 7	Απέτυχαν 11	
WT (223)	100 (90.9)	123 (97.6)	**0.024**
Μεταλλαγμένοι (13)	10 (9.1)	3 (2.4)	
***KRAS* exon 2 (n=246)**	Απέτυχαν 6	Απέτυχαν 5	
WT (224)	70 (62.7)	91 (70.1)	0.328
Μεταλλαγμένοι (22)	41 (37.3)	41 (29.9)	
MMR# Status (n=235)	Απέτυχαν 9	Απέτυχαν 16	
Επάρκεια	96 (88.9)	99 (81.8)	0.102
Ανεπάρκεια	12 (11.1)	22 (18.2)	
***ERCC1* mRNA έκφραση (n=246)**	Απέτυχαν 4	Απέτυχαν 4	
Χαμηλή	59 (52.2)	69 (51.9)	0.609
Υψηλή	54 (47.8)	64 (48.1)	
***MYC* mRNA έκφραση (n=249)**	Απέτυχαν 2	Απέτυχαν 3	
Χαμηλή	55 (47.8)	69 (51.5)	0.612
Υψηλή	60 (52.2)	65 (48.5)	

***NEDD9* mRNA έκφραση (n=247)**	Απέτυχαν 3	Απέτυχαν 4	
Χαμηλή	58 (50.9)	64 (48.1)	0.703
Υψηλή	56 (49.1)	69 (51.9)	
***TS* mRNA έκφραση (n=226)**	Απέτυχαν 15	Απέτυχαν 13	
Χαμηλή	58 (56.9)	49 (39.5)	**0.041**
Υψηλή	44 (43.1)	75 (60.5)	

Συσχετίσεις των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με την επιβίωση.

Οι συσχετίσεις των μοριακών βιοδεικτών και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών σταδίου II-III με το Ελεύθερο Νόσου Διάστημα (DFS) και την Συνολική Επιβίωση (OS) όπως αναλύθηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier και με την Μονοπαραγοντική και Πολυπαραγοντική ανάλυση παρουσιάζονται στον πίνακα 4α, 4β και διαγράμματα 1α,1β αντίστοιχα. Ασθενείς με όγκους με απώλεια της *LKB1* σχετίζονται σημαντικά με μειωμένο DFS σε σύγκριση με αυτούς με θετική έκφραση της *LKB1* [HR:1.287 (95% ci: 1.093-1.654); p=0,021; (Πίνακας 4α και Διάγραμμα 1α)]. Επιπλέον, ασθενείς που φέρουν τις μεταλλάξεις V600E του *BRAF* στον πρωτοπαθή τους όγκο παρουσίασαν αυξημένη πιθανότητα υποτροπής συγκριτικά με τους ασθενείς που φέρουν αγρίου τύπου το *BRAF* [HR:1.976 (95% ci: 1.793-2.495); p=0,001;(Πίνακας 4α)]. Μολονότι, οι ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο KRAS exon2 στον πρωτοπαθή τους όγκο παρουσίασαν αυξημένη πιθανότητα υποτροπής συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις του KRAS exon2, η διαφορά τους ήταν οριακά στατιστικά σημαντική [HR: 1.757

(95% ci: 1.000-3.090); p=0,05; (Πίνακας 4α)]. Παρόμοια αποτελέσματα αναλύθηκαν στους ασθενείς με επάρκεια του MMR συστήματος καθώς σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με αυτούς πού φέρουν Μικροδορυφορική Αστάθεια (dMMR) στους όγκους τους [HR:1.726 (95% ci:1.289-3.514); p=0,025; (Πίνακας 4α)]. Τέλος, οι ασθενείς σταδίου III κατά τη διάγνωση σχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα πρόοδο της νόσου συγκριτικά με τους ασθενείς σταδίου II [HR: 1.803 (95% ci: 1.605-2.055); p=0,023; (Πίνακας 4α)]. Ενώ καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν παρουσίασαν οι αναλύσεις μεταξύ του mRNA έκφρασης των *ERCC1, MYC, NEDD9* και *TS* και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών όπως ηλικία, φύλο, εντόπιση και βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, ως προς το DFS (όλα τα log-rank p>0.05, Πίνακας 4α).

Σύμφωνα με τις αναλύσεις για την ολική επιβίωση (OS), οι ασθενείς με όγκους με απώλεια της *LKB1* έδειξαν σημαντικά μειωμένο OS σε σύγκριση με τους ασθενείς με θετική έκφραση της *LKB1* [HR: 1.541 (95% ci: 1.197-1.932); p=0,002; (Πίνακας 4α και Διάγραμμα 1β)]. Τα ίδια αποτελέσματα παρουσιάζονται για τους ασθενείς που φέρουν τις μεταλλάξεις V600E του *BRAF* στον πρωτοπαθή τους όγκο παρουσίασαν αυξημένη πιθανότητα θανάτου έναντι των ασθενών χωρίς την μετάλλαξη στο *BRAF* [HR: 1,624 (95% ci: 1,143-2,309); p=0,007;(Πίνακας 4α)]. Ομοίως, οι ασθενείς με επάρκεια του MMR συστήματος σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με αυτούς πού φέρουν Μικροδορυφορική Αστάθεια (dMMR) στους όγκους τους [HR:1.375 (95% ci:1.043-2.711); p=0,036; (Πίνακας 4α)]. Επιπλέον, οι ασθενείς σταδίου III κατά τη διάγνωση σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με τους ασθενείς σταδίου II [HR: 1.636 (95% ci: 1.487-2.011); p=0,023; (Πίνακας 4α)]. Τέλος, καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν παρουσίασαν οι αναλύσεις μεταξύ του mRNA έκφρασης των *ERCC1, MYC, NEDD9* και *TS* και των κλινικό-παθολογικών χαρακτηριστικών όπως ηλικία, φύλο, εντόπιση και βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, ως προς το OS (όλα τα long-rank p>0.05, Πίνακας 4α).

Η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ότι, η απώλεια της *LKB1* [HR: 1.217(95% ci: 1.074-1.812); p=0,034; (Πίνακας 4β)], οι μεταλλάξεις στο *BRAF* [HR: 1.696 (95% ci: 1.365-2.294); p=0,011;(Πίνακας 4β)], η επάρκεια στο MMR status [HR: 1,775 (95% ci: 1.343-3.011); p=0,007; (Πίνακας 4β)] και το στάδιο νόσου III [HR: 1.784 (95% ci: 1.335-2.762); p=0,006; (Πίνακας 4β)], είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας ως προς τον κίνδυνο υποτροπής. Ομοίως, η απώλεια της *LKB1* [HR: 1.467 (95% ci: 1226-2,122); p=0,019; (Πίνακας 4β)], οι μεταλλάξεις στο *BRAF* [HR: 1.961 (95% ci: 1.656-2.949); p=0,001; (Πίνακας 4β)], η επάρκεια στο MMR status [HR: 1,575 (95% ci: 1.243-3,001); p=0,018; (Πίνακας 4β)] και το στάδιο νόσου III [HR: 1.843 (95% ci: 1.356-2.623); p=0,009; (Πίνακας 4β)], συσχετίστηκαν στατιστικά με αυξημένο κίνδυνο θανάτου.

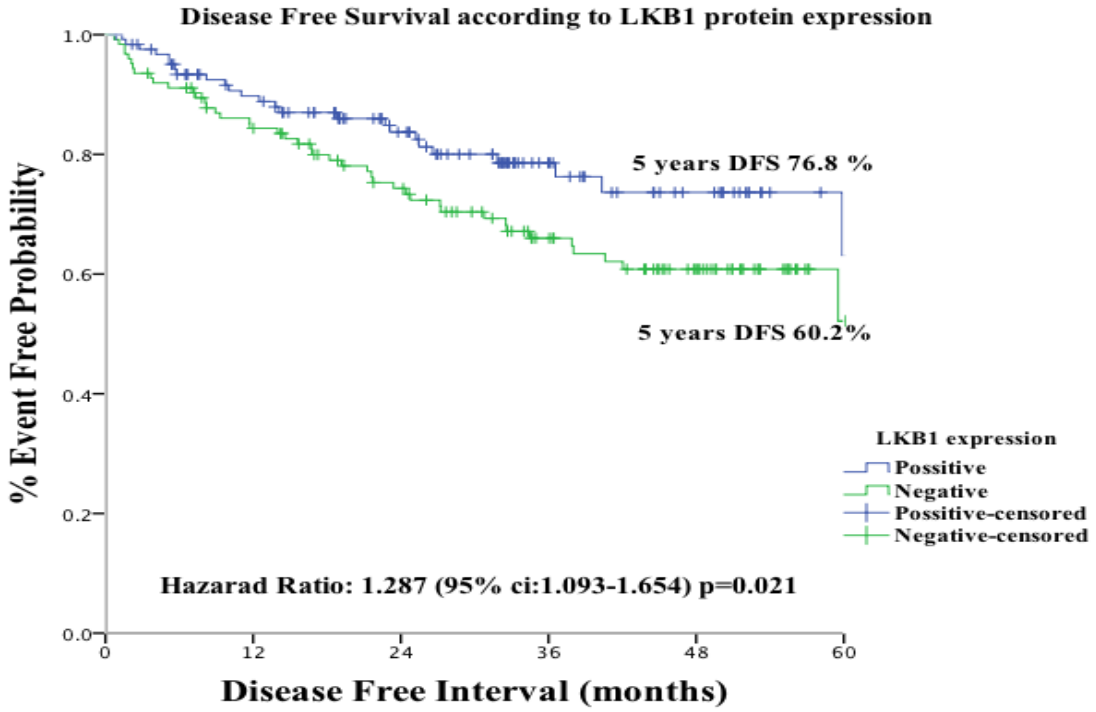
Πίνακας 4α: Μονοπαραγοντική ανάλυση ως προς το DFS και OS

	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου			***Συνολική Επιβίωση***		
	Hazard Ratio	**95% CI**	***p*-value**	**Hazard Ratio**	**95% CI**	***p*-value**
LKB1 πρωτεϊνική έκφραση (Αρν vs. Θετ)	1.287	1.093-1.654	0.021	1.541	1.197-1.932	**0.002**
***KRAS* exon2 μετάλλαξη (Mutant vs. Wt)**	1.757	1.000-3.090	0.05	1.190	0.607-2.335	0.113
***BRAF*^{V600E} mutation (Mutant vs. Wt)**	1.976	1.793-2.495	0.001	1.624	1.143-2.309	**0.007**
MMR status (Επάρκεια vs. Ανεπάρκεια)	1.726	1.289-3.514	0.025	1.375	1.043-2.711	0.036
***ERCC1* mRNA έκφραση (Υψηλή vs. Χαμηλή)**	1.164	0.610-1.570	0.930	1.003	0.558-1.802	0.993
***MYC* mRNA έκφραση (Υψηλή vs. Χαμηλή)**	1.179	0.735-1.892	0.494	1.170	0.856-1.598	0.324
***NEDD9* mRNA έκφραση (High vs. Low)**	1.070	0.634-1.219	0.343	1.068	0.601-1.895	0.823
***TS* mRNA έκφραση (High vs. Low)**	1.701	0.804-2.598	0.165	1.113	0.472-2.625	0.807
Σταδίου III vs. II	1.803	1.605-2.055	0.023	1.636	1.487-2.011	**0.03**
Εντόπιση Όγκου	1.131	0.683-1.873	0.632	1.016	0.557-1.851	0.906
Ηλικία (>70y vs. <=70y)	1.035	0.641-1.673	0.887	1.207	0.938-1.843	0.106
Φύλο (‘Αρρεν vs. Θήλεα)	1.176	0.915-1.804	0.112	1.011	0.981-1041	0.471
Βαθμός Διαφοροποίησης (Υψηλη vs. Χαμηλή)	1.061	0.872-1.201	0.722	1.108	0.536-2.209	0.781

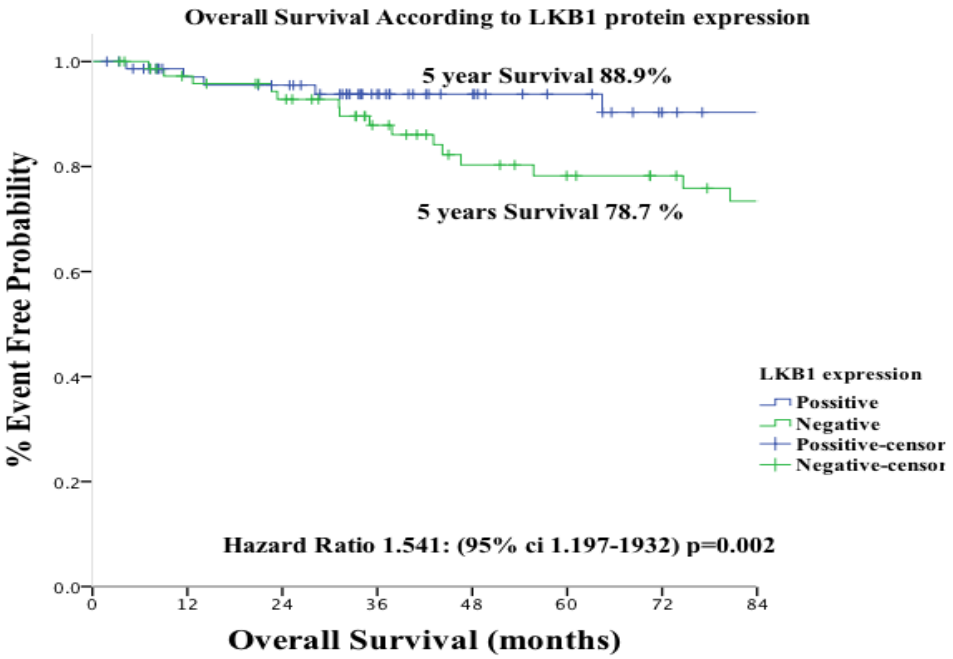
Πίνακας 4β: Πολυπαραγοντική Ανάλυση ως προς το DFS και OS.

	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου			***Συνολική Επιβίωση***		
	Hazard Ratio	**95% CI**	***p*-value**	**Hazard Ratio**	**95% CI**	***p*-value**
LKB1 πρωτεϊνική έκφραση (Αρν vs. Θετ)	1.217	1.074-1.812	0.034	1.467	1.226-2.122	0.019
***KRAS* exon2 (Mutant vs. Wt)**	1.054	0.816-1.806	0.317			
***BRAF*^{V600E} status (Mutant vs. Wt)**	1.696	1.365-2.294	0.011	1.961	1.656-2.949	0.001
MMR status (Επάρκεια vs. Ανεπάρκεια)	1.775	1.343-3.011	0.007	1.575	1.243-3.001	0.018
Σταδίου III vs. II	1.784	1.335-2.762	0.006	1.843	1.356-2.623	0.009

Διάγραμμα 1α: Καμπύλες ελεύθερης νόσου επιβίωση (DFS) σύμφωνα με την πρωτεϊνική έκφραση της LKB1.



Διάγραμμα 1β: Καμπύλες συνολικής επιβίωσης (OS) σύμφωνα με την πρωτεϊνική έκφραση της *LKB1.*



Ανίχνευση της *PKM2* mRNA έκφραση στις διαφορετικές ομάδες ασθενών & συσχέτιση της με τα κλινικό-παθολογικά και εργαστηριακά αποτελέσματα.

Στο σύνολο των όγκων και των τριών ομάδων Α, Β και Γ, η έκφραση της *PKM2* συσχετίζεται σημαντικά με την έκφραση του γονιδίου *c-MYC* (ρ^2= 0.153, ρ=0.004). Τα ίδια ευρήματα παρατηρήθηκαν όταν αναλύθηκε κάθε ομάδα ξεχωριστά όσον αφορά τη συν-έκφραση των γονιδίων *PKM2* και *c-MYC* (ρ^2= 0.236, ρ=0.002 για την Ομάδα Α; ρ^2= 0.112, ρ=0.008 για την Ομάδα Β; ρ^2= 0.112, ρ=0.008 για την Ομάδα Γ) (Πίνακας 5). Επιπλέον, η υπέρ-έκφραση της *PKM2* συσχετίστηκε τόσο με τους όγκους πού εντοπίζονται αριστερά (ρ=0.011 για την Ομάδα Α, ρ=0.003 για την Ομάδα Β, ρ=0.001 για την Ομάδα Γ) όσο και με τους όγκους με υψηλή διαφοροποίηση και στις τρείς ομάδες των ασθενών (ρ=0.001 για την Ομάδα Α, ρ=0.017 για την Ομάδα Β, ρ=0.021 για την Ομάδα Γ). Ομοίως, η υπέρ-έκφραση της *PKM2* συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με τις μεταλλάξεις του KRAS exon2 και του *BRAF*^{V600E} μόνο στους μεταστατικούς ασθενείς παχέος (ρ=0.041 και ρ=0,05 για τις μεταλλάξεις του *KRAS* exon2 για την Ομάδα Β και Γ, αντίστοιχα; ρ=0.009 και ρ=0,026 για τις μεταλλάξεις του *BRAF*^{V600E} για τις Ομάδες Β και Γ, αντίστοιχα) και όχι στους ασθενείς παχέος σταδίου II-III (ρ=0.870 και ρ=0,109 για τις μεταλλάξεις του *KRAS* exon2 και *BRAF*^{V600E} αντίστοιχα; Πίνακας 5). Τέλος, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της *PKM2* mRNA συσχετίστηκαν σημαντικά με όγκους που φέρουν επάρκεια στο MMR system (ρ=0,001), με βλεννώδη χαρακτηριστικά (ρ=0,001) και με τους όγκους πού είχαν διηθημένους λεμφαδένες (ρ=0,018) των ασθενών της ομάδας Α, αλλά τέτοιοι παράμετροι δεν είναι διαθέσιμοι στους μεταστατικούς ασθενείς (Πίνακας 5). Αντίθετα, η υπέρ-έκφραση της *PKM2* mRNA δεν ανέδειξε καμία συσχέτιση ούτε με την ηλικία ούτε με το φύλο των ασθενών (όλα οι τιμές των ρ >0,05; Πίνακας 5).

Συσχετίσεις της *PKM2* mRNA έκφραση με την επιβίωση.

Η ανίχνευση υψηλών επιπέδων έκφρασης της *PKM2* mRNA στους ασθενείς της ομάδας Α συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένο κατά 5 έτη DFS (68.6 vs 77.9%, για αυξημένη και μειωμένη *PKM2* mRNA έκφραση, αντίστοιχα; ρ=0,016, Διάγραμμα 2$^{\alpha}$) και χειρότερο κατά 5 έτη OS (75.2 vs 86.1%, για αυξημένη και μειωμένη *PKM2* mRNA έκφραση, αντίστοιχα; ρ=0,008

Διάγραμμα 2β). Παρόμοια αποτελέσματα αναδείχτηκαν στους μεταστατικούς ασθενείς της ομάδας Β όπου η υπέρ-έκφραση της *PKM2* συσχετίστηκε με μειωμένο PFS [6.7 μήνες, 95% ci: .8-7.5 μήνες) αντίθετα από την υπό-έκφραση της (9.1 μήνες 95% ci: 7.7-11.2 μήνες ρ=0,003 Διάγραμμα 3α). Τα αυξημένα επίπεδα της *PKM2* mRNA , συσχετίστηκαν επίσης με μειωμένη συνολική επιβίωση [21.9 (95% ci: 16.0-24.7) μήνες vs 30.2 (95% ci: 24.0-37.3) σε σύγκριση με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της, αντίστοιχα; ρ=0,003, Διάγραμμα 3β] πάλι στους ασθενείς της ομάδας Β. Αντίθετα αποτελέσματα ανέδειξαν οι ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής με FOLFIRI, καθώς καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε στο PFS [8.4 (95%) ci: 7.2-9.8) μήνες vs 10.2 (95% Ci: 8.4-11.9) μήνες των ασθενών με υψηλή *PKM2* mRNA έκφραση, αντίστοιχα ρ=0.445; Διάγραμμα 4α] αλλά ούτε και στη διάμεση συνολική επιβίωση [27.3 (95% ci: 23.1-31.4) μήνες vs 27.5 (95% ci: 23.4-31.6) μήνες με αυξημένη *PKM2* mRNA έκφραση, αντίστοιχα; ρ= 0.883; Διάγραμμα 4β).

Μονοπαραγοντική και Πολυπαραγοντική Ανάλυση

Στους πίνακες 6^{α},β και 7α,β καταγράφονται όλα τα αποτελέσματα από την μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση για το DFS και OS και στις τρείς ομάδες ασθενών αντίστοιχα. Η μονοπαραγοντική ανέδειξε ότι η υπέρ-έκφραση της PKM2 mRNA συσχετίζεται με μειωμένο DFS στην ομάδα Α (HR: 1.82, 95% ci: 1.21-2.96; ρ= 0.003) και με μειωμένο PFS στην ομάδα Β (HR: 1.91, 95% ci: 1.34-2.99; ρ=0.002) αλλά δεν ανέδειξε το ίδιο στην ομάδα Γ (HR: 1.06, 95% ci: 0.65-1.31; ρ= 0.769; Πίνακας 6^{α}). Ομοίως, η υπέρ-έκφραση της PKM2 mRNA συσχετίζεται με μειωμένο OS στην ομάδα Α (HR: 1.84, 95% ci: 1.29-3.26; ρ= 0.002) και στην ομάδα Β (HR: 2.12, 95% ci: 1.51-3.17; ρ=0.002) αλλά όχι στην ομάδα Γ (HR: 1.04, 95% ci: 0.58-1.24; ρ= 0.811; Πίνακας 6^{β}).

Επιπλέον, από την πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαιώθηκαν τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα του γονιδίου της PKM2 στους ασθενείς της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε την υπέρ-έκφραση της PKM2 mRNA σαν ανεξάρτητο παράγοντα για μειωμένο DFS (HR:1.88, 95% ci:.1.37-2.99; ρ=0.002) και για χειρότερο OS

(HR:1.99, 95% ci: 1.45-2.97; ρ=0.001) στους ασθενείς της ομάδας Α (Πίνακες 7α και 7β). Παράλληλα, ανεξάρτητος παράγοντας αναδείχτηκε η υπέρ-έκφραση της PKM2 mRNA για μειωμένο PFS (HR: 1.94, 95% ci: 1.38-3.32; ρ=0.001) και για χειρότερο διάμεσο OS (HR:1.94, 95% ci: 1.38-3.32; ρ=0.001) στους μεταστατικούς ασθενείς της ομάδας Β (Πίνακες 7α και 7β). Σε αντίθεση, καμία σημαντική επίδραση της υψηλής έκφρασης της PKM2 mRNA δεν παρατηρήθηκε από την παρούσα ανάλυση είτε στο PFS ή στο διάμεσο OS στους μεταστατικούς ασθενείς της ομάδας Γ (Πίνακες 7α και 7β).

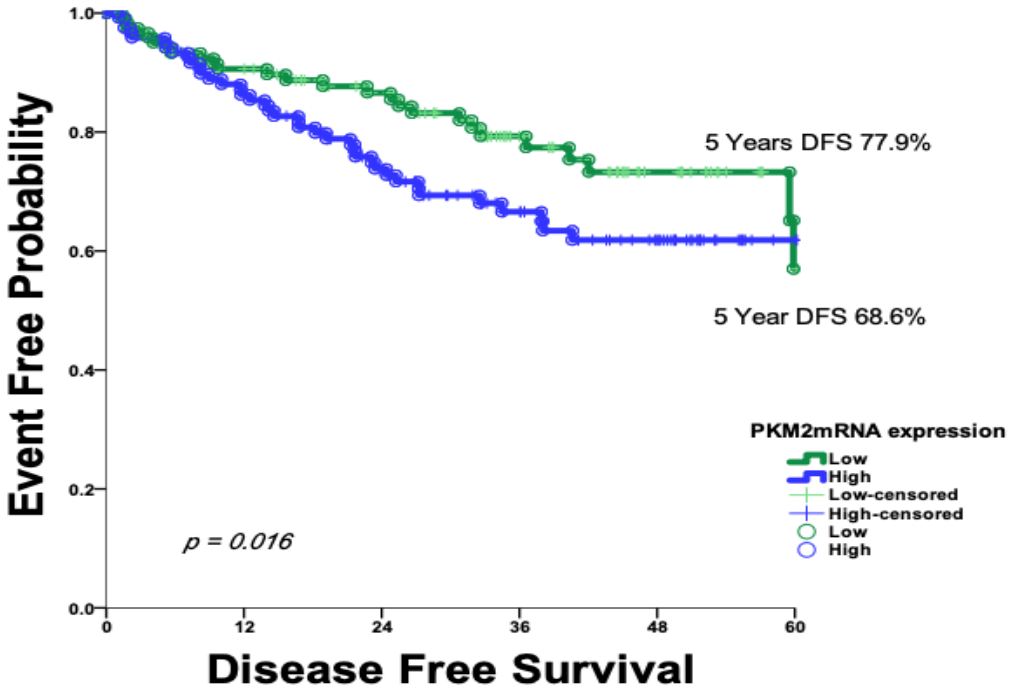
Πίνακας 5: Συσχετίσεις της *PKM2* με τα κλινικό-παθολογικά και εργαστηριακά αποτελέσματα.

***PKM2* mRNA έκφραση (n=258)**				***PKM2* mRNA έκφραση (n=118)**			***PKM2* mRNA έκφραση (n=104)**		
	Ομάδα Α Στάδιου ΙΙ-ΙΙΙ			**Ομάδα Β mCRC 1st-γραμμής Oxaliplatin**			**Ομάδα Γ mCRC 1st-line Irinotecan**		
	Low (n=129)	**High (n=129)**	***p* value**	**Low (n=11 7)**	**High (n=137)**	***p* value**	**Low (n=11 7)**	**High (n=13 7)**	***p* value**
Ασθενείς	**N (%)**	**N (%)**		**N (%)**	**N (%)**		**N (%)**	**N (%)**	
Ηλικία Διάμεση (min-max)	67 (33 - 75)	67 (37 - 75)	0.147#	65 (35-81)	65 (39-84)	0.564#	65 (44-76)	64(41-79)	0.218#
Ηλικιακή Ομάδα									
≤70	72 (45.3)	87 (54.7)	0.08@	52 (67.5)	25 (32.5)	0.499 @	47 (60.2)	31 (39.8)	0.614 @
>70	57 (57.5)	42(42.5)		28 (68.2)	13 (31.8)		15 (57.7)	11 (42.3)	
Φύλο									
Άρρενες	75 (51.0)	72(49.0)	0.669 *	49 (64.5)	27 (35.5)	0.411 *	35 (53.0)	31 (47)	0.571 *
Θήλεα	52	57(52.		31	11		21	17	

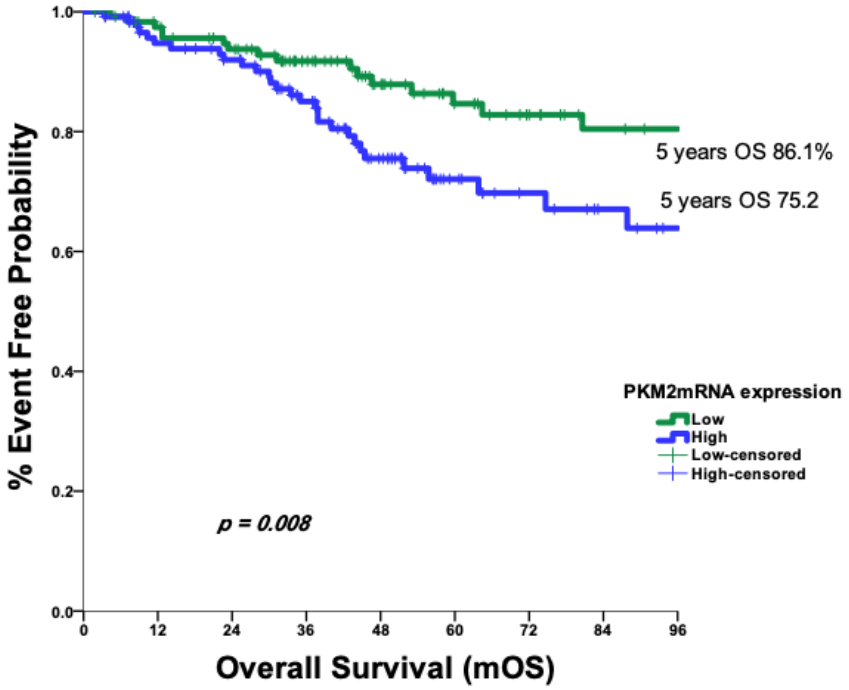
	(47.7)	3)		(73.8)	(26.2)		(55.3)	(34.7)	
Lymph Node Status									
N0	63(61.8)	39 (38.2)	**0.018 ***						
N1-2	64 (41.8)	89 (58.2)							
Εντόπιση Όγκου									
Αριστερά	55 (60.4)	36 (39.6)	**0.011 ***	24 (66.7)	12(33.3)	**0.003 ***	16 (61.5)	10 (38.5)	**0.001 ***
Δεξιά	74 (44.3)	93 (56.7)		39 (47.6)	43 (52.4)		29 (37.2)	49 (62.8)	
Βαθμός Διαφοροποίησης									
Χαμηλού	117 (74.5)	41 (25.5)	**0.001 ***	51 (73.9)	18 (26.1)	**0.017 ***	43 (71.7)	17 (18.3)	**0.021 ***
Υψηλού	12 (12.0)	88 (88.0)		8 (16.3)	41 (83.7)		7 (15.8)	37 (84.2)	
Βλεννώδες									
Ναί	40 (68.9)	18 (31.1)	0.001 *						
Όχι	89 (44.5)	111 (55.5)							
KRAS exon 2 status									
Αγρίου Τύπου	87 (51.5)	83(48.5)		47 (61.8)		0.009 *	46 (66.7)	23 (33.3)	
Μεταλλαγμένοι	40 (48.8)	42(51.2)		6 (14.3)			9 (25.7)	26 (74.3)	
Απροσδιόριστο	2	4		0					
BRAFV600E status									

Αγρίου Τύπου	112 (48.1)	117 (51.9)	74 (67.3)	0.041 *	58 (59.8)	39 (40.2)	
Μεταλλαγμένοι	8 (61.5)	5 (38.5)	1 (12.5)		1 (16.7)	6 (83.3)	
Απροσδιόριστο	9	7	0		0	0	
MMR Status			Not Done	Not Done			
Επάρκεια	88 (44)	108 (56)					
Ανεπάρκεια	29 (82.8)	6 (17.2)					
Απροσδιόριστο	12	15					

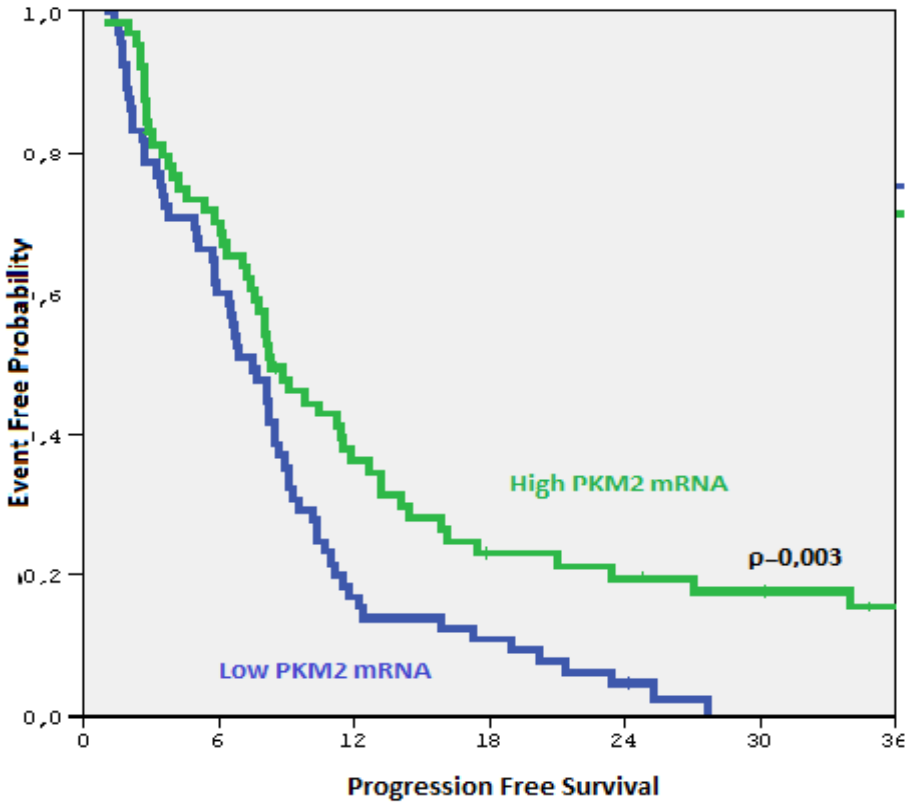
Διάγραμμα 2α



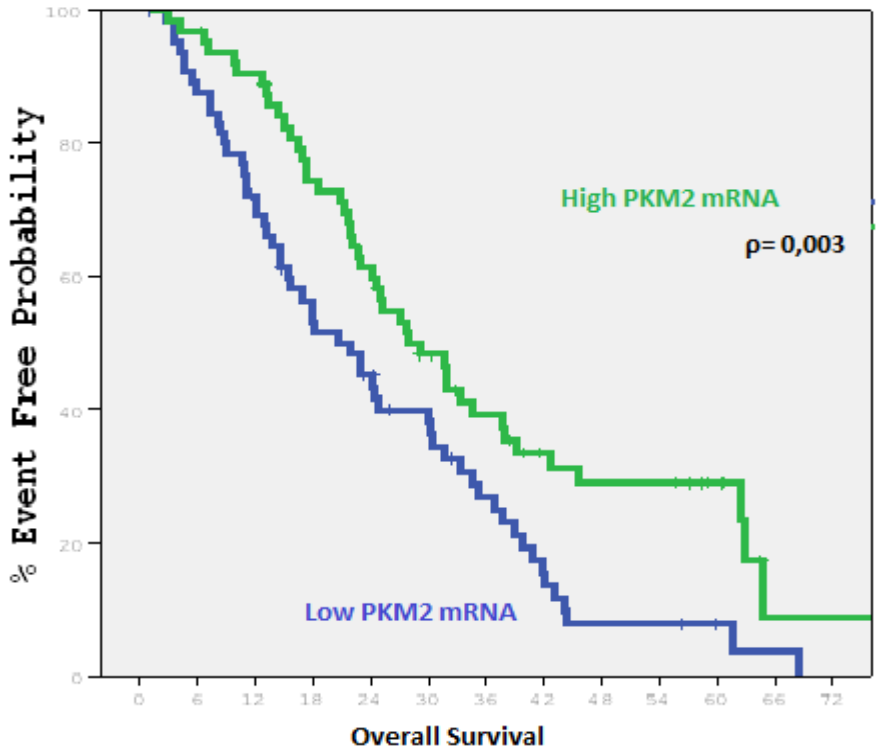
Διάγραμμα 2β



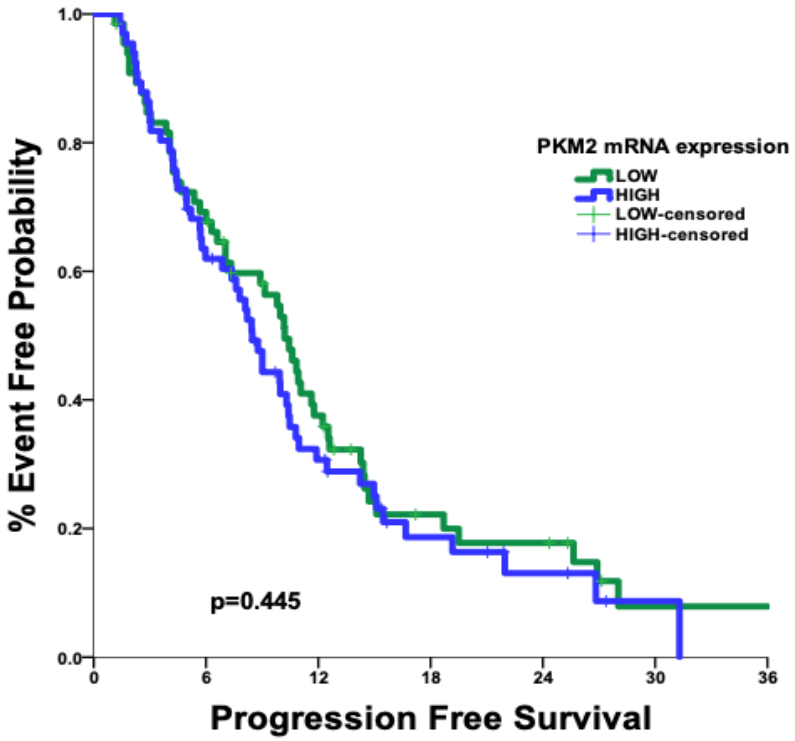
Διάγραμμα 3$^{\alpha}$



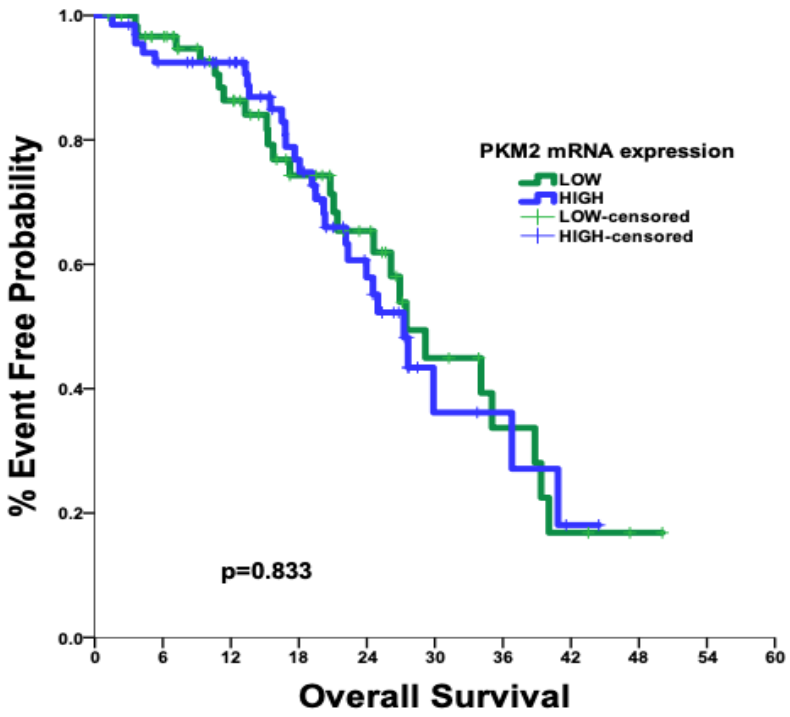
Διάγραμμα 3$^{\beta}$



Διάγραμμα 4^{α}



Διάγραμμα 4^{β}



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η θνητότητα από τον ΚΠΕ έχει μειωθεί προοδευτικά από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε πολλές άλλες δυτικές χώρες [2, 4]. Αυτή η βελτίωση στην επιβίωση μπορεί να αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, στην ανίχνευση και απομάκρυνση των πολυπόδων του παχέος εντέρου και ορθού, στην ανίχνευση της νόσου σε πρώιμο στάδιο και ιδιαίτερα στις πιο αποτελεσματικές και στοχευμένες θεραπείες [77]. Περίπου το 50% των ασθενών παχέος, σταδίου III ή υψηλού κινδύνου σταδίου II, μπορεί να αντιμετωπιστεί μόνο με χειρουργική επέμβαση και η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας μπορεί να αποτρέψει την υποτροπή σε άλλο 20-25% των ασθενών [78]. Συνιστάται συμπληρωματική χημειοθεραπεία με συνδυασμό φλουοροπυριμιδινών (5-FU) με οξαλιπλατίνη (LOHP) σε ασθενείς σταδίου III ή υψηλού κινδύνου στο στάδιο II του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επίσης, τα ίδια χημειοθεραπευτικά σχήματα Ιρρινοτεκάνη σε συνδυασμό με Οξαλιπλατίνη (CAPOX) ή φλουοροπυριμιδίνη και Οξαλιπλατίνα (FOLFOX) είναι μεταξύ των τυπικών επιλογών για τους μεταστατικούς ασθενείς παχέος εντέρου [78]. Στον ΚΠΕ έχει αναγνωριστεί από καιρό ότι τα ίδια φάρμακα προκαλούν διαφορετικές αντιδράσεις σε διαφορετικούς ασθενείς [79]. Το γενετικό υπόβαθρο του ΚΠΕ έχει μελετηθεί εκτενέστερα τα τελευταία 20 χρόνια [80] καθώς και το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογενετικής διαδικασίας στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, από φυσιολογικό βλεννογόνο έως τον καρκίνο [81]. Μέχρι σήμερα, ελάχιστοι βιοδείκτες είναι διαθέσιμοι για χρήση στην κλινική πρακτική, στους οποίους περιλαμβάνονται τα ογκογονίδια *KRAS/BRAF* τα οποία προβλέπουν αντίσταση στη θεραπεία με αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα σε μεταστατικό ΚΠΕ [82]. Επίσης, Διάφορες μετα-αναλύσεις κατέδειξαν ότι οι μεταστατικοί ασθενείς με ΚΠΕ και με *BRAF* μεταλλάξεις έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με εκείνους με *BRAF*-wt [79]. Αντίθετα, ο προγνωστικός ρόλος των *BRAF* μεταλλάξεων δεν έχει διευκρινιστεί στους ασθενείς σταδίου II και III με ΚΠΕ που υποβάλλονται σε συμπληρωματική χημειοθεραπεία μετά από θεραπευτική εκτομή του όγκου [79, 82]. Ιδανικά, οι μοριακές αναλύσεις που προκύπτουν από τον πρωτοπαθή όγκο θα πρέπει να δίνουν τη δυνατότητα στους ογκολόγους να επιλέξουν την κατάλληλη,

αποτελεσματική, μοριακά στοχευμένη και λιγότερο τοξική θεραπευτική αντιμετώπιση. Πρόσφατα καθιερώθηκε, η Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI), ως ο μόνος μοριακός βιοδείκτης για την χορήγηση ανοσοθεραπείας στον ΚΠΕ [83].

Σκοπός της παρούσας μελέτης η οποία είναι και η μεγαλύτερη αναδρομική μελέτη μέχρι σήμερα, είναι να διερευνηθεί αν συγκεκριμένες γονιδιακές υπογραφές σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου από τη νόσο καθώς και με αντίσταση στην ευρέως χορηγούμενη συμπληρωματική χημειοθεραπεία με Oxaliplatin και 5FU. Επιπλέον, καθορίστηκε το προφίλ έκφρασης ανάλογα με τις μεταλλαγές των *KRAS-BRAF* καθώς και με τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται είτε με την αύξηση του μεταστατικού δυναμικού όπως το *PKM2, cMYC, NEDD9*, είτε με αντίσταση στην οξαλιπλατίνη και στο 5FU όπως τα *ERCC1* και *TS*. Τέλος, μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση απώλειας της *LKB1* (απώλεια ετεροζυγωτίας) στον σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου.

Ο κύριος μοριακός βιοδείκτης που ξεχώρισε στην παρούσα μελέτη είναι το γονίδιο της πυροσταφυλικής κινάσης M2 (PKM2), η οποία εμπλέκεται στην αερόβια γλυκόλυση και στην κυτταρική ανάπτυξη των όγκων [84]. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για το τελευταίο στάδιο της γλυκολυτικής οδού (η οποία ξεκινάει με υπόστρωμα τη γλυκόζη και καταλήγει στην παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος) και την παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο με τη μορφή του ATP. Ο ενζυμικός χαρακτηρισμός ενός ευρέος φάσματος διαφορετικών όγκων αποκάλυψε ότι η ογκογένεση συνοδεύεται από αύξηση της συνολικής δραστηριότητας του ενζύμου της PKM2 [48, 85, 86]. Στην συγκεκριμένη μελέτη αναδείχτηκε ο ρόλος της έκφρασης της PKM2 mRNA ως προβλεπτικός παράγοντας στην έκβαση των ασθενών σταδίου II-III και των μεταστατικών ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠΕ). Οι ασθενείς με χειρουργημένο ΚΠΕ που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία CAPOX ή FOLFOX (ομάδα A) και παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PKM2 συσχετίστηκαν σημαντικά με μειωμένα ποσοστά επιβίωσης. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μετά την ανάλυση ανεξάρτητης κοορτής μεταστατικών ασθενών που έλαβαν οξαλιπλατίνα 1ης Γραμμής (ομάδα B).

Αντίθετα αποτελέσματα αναδείχτηκαν, μετά την ανάλυση της PKM2 mRNA έκφρασης, στην ομάδα ελέγχου με μεταστατικούς ασθενείς με ΚΠΕ που δεν έλαβαν οξαλιπλατίνα 1ης Γραμμής (ομάδα Γ). Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση της υπέρ-έκφρασης της PKM2 που παρουσιάζεται σε ασθενείς που δεν έλαβαν οξαλιπλατίνα, το PKM2 θα μπορούσε να θεωρηθεί μόνο ως ένας προβλεπτικός παράγοντας για τη θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνα.

Η απόκτηση αντοχής στην οξαλιπλατίνα είναι μια σύνθετη διαδικασία βασισμένη κυρίως στη μεταβολή των γονιδίων και των οδών που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης της [87]. Προηγουμένως έχει περιγραφεί αναλυτικά, ότι όπως και άλλα γλυκολυτικά ένζυμα, η πυρηνική μετατόπιση της PKM2 είναι επαρκής και αναγκαία για την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων μετά από χημειοθεραπεία με ανάλογα σωματοστατίνης ή παράγοντες που καταστρέφουν το DNA [86, 88]. Καθώς η οξαλιπλατίνα είναι σκεύασμα που καταστρέφει το DNA, παρόμοιοι μηχανισμοί πιθανώς συμβαίνουν μετά την έκθεση των καρκινικών κυττάρων στο φάρμακο. Οι Martinez-Balibrea et al., χρησιμοποίησαν μία προσέγγιση συγκριτικής πρωτεομικής ανάλυσης, συγκρίνοντας ευαίσθητες και ανθεκτικές σε οξαλιπλατίνα καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, για να εντοπίσουν πρωτείνες που σχετίζονται με την αντίσταση σε αυτό το φάρμακο. Η ανάλυση έδειξε πως τα χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA της PKM2 σχετίζονται με αντίσταση στην οξαλιπλατίνα [86]. Με τον ίδιο τρόπο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης της PKM2 σε ανθεκτικές στην σισπλατίνη καρκινικές κυτταρικές σειρές τόσο των ωοθηκών όσο και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γαστρινώματος, αντίστοιχα [89, 90]. Ο μηχανισμός με τον οποίο η χαμηλή ενεργότητα της PKM2 οδηγεί τα κύττρα σε ανθεκτικότητα στην οξαλιπλατίνα δεν είναι ακόμη γνωστός. Μία πιθανή εξήγηση πως τα χαμηλά επίπεδα της PKM2 (πιθανώς λόγω διμερισμού και χαμηλά επίπεδα έκφρασης) μπορεί να οδηγούν σε συσσώρευση γλυκολυτικών φωσφομεταβολιτών upstream της PKM2 και αυτοί οι μεταβολίτες να οδηγούν σε βιοσυνθετικές διαδικασίες προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και όχι τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο λόγω βλάβης στο γενετικό υλικό [49]. Άλλη μελέτη ανέδειξε την προβλεπτική

αξία της πυρηνικής έκφρασης της PKM2 με πτωχή πρόγνωση των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου [91, 92]. Είναι γνωστό ότι η έναρξη και η εξέλιξη της απόπτωσης εξαρτάται από την επαρκή ποσότητα ATP. Παρόλα αυτά, τα χαμηλά επίπεδα ATP που παράγονται κατά την παρουσία χαμηλής ποσότητας PKM2 μπορεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία των ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών ως ανταπόκριση στη θεραπεία με οξαλιπλατίνα.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, πρόσφατες μελέτες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και σε καρκινικές σειρές πνεύμονα αποκάλυψε ότι η αναστολή της PKM2 μέσω shRNA ή χημικών αναστολέων προκάλεσε αυξημένη ευαισθησία στην σισπλατίνη και συνεπώς την απόπτωση των κυττάρων [53, 93, 94]. Επίσης, οι Zhu *et al* ., πρότειναν ότι η PKM2 ενισχύει την χημειοευαισθησία στη σισπλατίνη, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την οδό σηματοδότησης του mTOR στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [95]. Τέλος, in vitro μελέτες, αναφέρουν πως η πτώση των επιπέδων της πρωτείνης PKM2 μετά από siRNA παρεμβολή, σχετίζεται με αντίσταση στην οξαλιπλατίνα μόνο στην καρκινική σειρά HT29, ενώ στην καρκινική σειρά HCT116 (p53 αγρίου τύπου κυτταρική σειρά) σχετίζεται σημαντικά με ευαισθησία στην οξαλιπλατίνα [96].

Η σχετική βιβλιογραφία αναφέρει επίσης, ότι τα επίπεδα PKM2 σε δείγματα κοπράνων βρέθηκαν αυξημένα κατά την εξέλιξη αδενώματος καρκινώματος. Σε ασθενείς με δυσπλαστικούς πολύποδες, τα επίπεδα PKM2 των κοπράνων τους, ήταν υψηλότερα σε εκείνα με μεγαλύτερους πολύποδες σε σύγκριση με εκείνα με μικρότερους πολύποδες ή υγιείς μάρτυρες [97]. Εκτός από τα κόπρανα, τα επίπεδα PKM2 στον ορό μπορεί επίσης να είναι χρήσιμα για τη διάκριση των κακοήθων και καλοηθών αλλοιώσεων του παχέος εντέρου ή των φυσιολογικών μαρτύρων [98]. Ομοίως στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα έκφρασης της PKM2 αξιολογήθηκαν επιτυχώς σε τρείς διαφορετικές ιστολογικές ομάδες, σε φυσιολογικό έντερο, σε αδενώματα εντέρου και δυσπλαστικά αδενώματα εντέρου. Τα ευρήματα μας, αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ υπό-έκφρασης της PKM2 τόσο με τα δείγματα

του φυσιολογικού εντέρου όσο και με τους πολύποδες χαμηλόβαθμης δυσπλασίας. Ενώ η υπέρ-έκφραση της PKM2 συσχετίστηκε με τους πολύποδες υψηλόβαθμης δυσπλασίας όπως ακριβώς και με τα καρκινικά δείγματα. Επίσης, οι πολύποδες υψηλόβαθμης δυσπλασίας συσχετίστηκαν σημαντικά με τις μεταλλάξεις V600E του BRAF. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ασθενείς με ΚΠΕ με εντόπιση στο αριστερό κόλον έχουν συσχετιστεί με καλύτερη κλινική έκβαση, αντιπροσωπεύουν όγκους πρώιμου σταδίου, με μειωμένο μέγεθος και καλής διαφοροποίησης [99] . Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση PKM2mRNA σχετίζεται με όγκους δεξιάς εντόπισης και με τους αδιαφοροποίητους όγκους και στις τρεις ομάδες των ασθενών της μελέτης, αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν, τον ρόλο της PKM2 στην κυτταρική αύξηση στον ΚΠΕ με βάση τα στοιχεία από προηγούμενες μελέτες [84, 98, 100] προσπαθήσαμε να διερευνήσαμε συσχετισμούς της έκφρασης της PKM2 με γνωστά κλινικό-παθολογικά χαρακτηριστικά, με το MSI, με τις μεταλλάξεις του *KRAS* exon 2 και του *BRAF*V600E, καθώς και με την έκφραση mRNA των *ERCC1, cMYC, NEDD9* και *TS*. Από όσο γνωρίζουμε, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη μελέτη που συσχετίζει έναν συνδυασμό όλων αυτών των παραμέτρων, ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα της ανάλυσής μας θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποτελέσουν έναν επωφελή οδηγό για την καθημερινή κλινική πρακτική.

Ένας άλλος μηχανισμός που προτείνεται για το ρόλο της *PKM2* είναι η μετατόπιση της στον πυρήνα όπου και επιτηρεί τους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και την έκφραση διαφόρων ογκογονιδίων (συγκεκριμένα των *KRAS* και *cMYC*) [101, 102]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η *PKM2* αλληλεπιδρά με τις οδούς PI3K/AKT/mTOR και Ras-MAPK με υψηλή συγγένεια [103, 104]. Η παρούσα μελέτη έρχεται σε μερική συμφωνία με τις προαναφερθείσες ενδείξεις, καθώς οι μεταλλάξεις του *BRAF*V600E και του *KRAS* εντοπίζονται σε υψηλότερο ποσοστό στους μεταστατικούς ασθενείς και των δύο ομάδων (Β και Γ) και σχετίζονται σημαντικά με υπέρ-έκφραση της PKM2mRNA αλλά όχι στους ασθενείς της ομάδας Α. Επιπλέον, σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες, τα αποτελέσματά μας δείχνουν σαφώς ισχυρή

θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της PKM2 και του γονιδίου *c-MYC* και στις τρεις ομάδες ασθενών. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της PKM2 που να σχετίζεται με την έκφραση των *ERCC1, NEDD9* και του *TS* mRNA. Τελευταίο σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης μελέτης, είναι ότι η υπέρ-έκφραση της PKM2 καταγράφηκε σημαντικά στους όγκους με μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS) και εκείνων με διηθημένους περιφερειακούς λεμφαδένες στην ομάδα Α αλλά όχι στις ομάδες Β και Γ.

Η παρούσα διδακτορική μελέτη εμπλουτίζει την προηγούμενη γνώση, αποδεικνύοντας ότι τα υψηλά επίπεδα PKM2mRNA συνδέθηκαν έντονα με την φτωχή έκβαση των ασθενών με ΚΠΕ που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με οξαλιπλατίνη και 5FU. Σύμφωνα με τα σχετικά αποδεικτικά στοιχεία από προηγούμενες μελέτες του εργαστήριό μας, έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα PKM2mRNA συσχετίστηκαν με υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) [105] και η χαμηλή έκφραση της PKM2 επέτυχε σημαντικά καλύτερο PFS και OS σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΠ) οι οποίοι υποβλήθηκαν σε θεραπεία με βάση την πλατίνη [106], αντίστοιχα.

Ένα από τα προτερήματα της παρούσας μελέτης, είναι ότι η προβλεπτική αξία της PKM2 σε πρώιμο και λειτουργικό ΚΠΕ, επικυρώθηκε με μια ανεξάρτητη μεγάλη κοορτή μεταστατικών ασθενών παχέος εντέρου που είχαν υποστεί αγωγή με την ίδια χημειοθεραπεία και με μια ομάδα ελέγχου ασθενών που έλαβαν διαφορετικό σχήμα θεραπείας. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μία ανάλυση της προγνωστικής αξίας της έκφρασης της PKM2mRNA που υποβλήθηκε σε θεραπεία με CAPOX ή FOLFOX στη μελέτη IDEA - HORG [107] βρίσκεται σε εξέλιξη προκειμένου να επικυρωθούν τα αποτελέσματα της τρέχουσας μελέτης σε μεγάλη ομάδα ασθενών που έλαβαν θεραπεία στο πλαίσιο της κλινικής δοκιμής.

Επίσης, μία μελλοντική κλινικό-εργαστηριακή έρευνα που θα πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μεταφραστικής ογκολογίας θα έχει στόχο την αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη αλληλεπίδραση μεταξύ αντιοξειδωτικής προστασίας και μεταβολισμού των καρκινικών

κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη της επίδρασης του αντιοξειδωτικού σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2 στις μεταβολικές οδούς που εξαρτώνται από την κινάση PKM2 στον ΚΠΕ θα περιλαμβάνει; Πρώτον, το ερώτημα εάν η υπερέκφραση του Nrf2 και η συνεχής ενεργοποίησή του σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου επάγει την υπερέκφραση της PKM2. Δεύτερον, θα απαντηθεί το ερώτημα εάν η υπερέκφραση του Nrf2 σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου επιδρά στη μεταγραφική ή/και μεταμεταφραστική τροποποίηση της PKM2 επάγοντας τη μετατροπή της σε διμερή μορφή. Τέλος, θα μελετηθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου (*in vitro* πειράματα) η συνέργεια των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών στην ογκογένεση, στην ανάπτυξη του όγκου αλλά και στην χημειοανθεκτικότητα. Παράλληλα, η αξιολόγηση των *in vitro* αποτελεσμάτων θα γίνει σε κλινικά δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, ενώ ως ομάδα ελέγχου θα αποτελέσουν δείγματα από αδενοκαρκινώματα πνεύμονα και ωοθηκών. Επιπλέον, θα γίνει μελέτη στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (ΚΚΚ) των ασθενών κυρίως για την μελέτη της υποκυτταρικής εντόπιση της PKM2.

Ιδιαίτερη προγνωστική αξία ανέδειξαν οι αναλύσεις της παρούσας εργασίας, όσον αφορά την απώλεια ετεροζυγωτίας της LKB1 στους χειρουργημένους ασθενείς σταδίου III και υψηλού κινδύνου σταδίου II με ΚΠΕ, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Το ανθρώπινο ογκοκατασταλτικό γονίδιο της LKB1 παίζει κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό, την πολικότητα και την αναστολή του ανώμαλου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [108, 109]. Συνεπώς, η απώλεια της LKB1 μπορεί να προωθήσει την πρόοδο του καρκίνου και να συμβάλει στην χειρότερη έκβαση των ασθενών με καρκίνο [110]. Τα ευρήματά μας δείχνουν ξεκάθαρα ότι οι χειρουργημένοι ασθενείς σταδίου III και υψηλού κινδύνου σταδίου II με ΚΠΕ και με απώλεια της έκφρασης πρωτεΐνης της LKB1 παρουσίασαν σημαντικά μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα (DFS) και μειωμένη συνολική επιβίωση (OS) σε σύγκριση με εκείνους με θετική έκφραση της LKB1. Επομένως, το κύριο εύρημα μας που προέκυψε από την τρέχουσα ανάλυση, είναι η προγνωστική σημασία της LKB1 σε αυτούς τους ασθενείς.

Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες καθώς έχει ήδη περιγραφεί ότι η απώλεια της LKB1 σχετίζεται με πτωχή κλινική έκβαση των ασθενών με καρκίνο του μαστού, με γαστρικό και με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [109-111]. Επίσης, μία πρώτη ολοκληρωμένη μετά-ανάλυση (από 14 επιλέξιμες μελέτες που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης) ανέδειξε ότι η μειωμένη έκφραση της LKB1 συσχετίστηκε σημαντικά με φτωχότερο OS σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους [112]. Προηγούμενη έρευνα έχει αποδείξει ότι η απώλεια της LKB1 σε μεταγραφικό επίπεδο, προάγει την καρκινογένεση, όχι μόνο σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα αλλά και στο ΚΠΕ [113]. Επίσης, στην μελέτη σχετικά με τον γαστρικό καρκίνο αποκάλυφθηκε ότι η απώλεια έκφραση της LKB1 σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου, με υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης , με διήθηση των λεμφαδένων και με την αγγειακή εισβολή [111]. Παρομοίως, η παρούσα εργασία ανέδειξε σημαντική συσχέτιση της απώλειας της LKB1 με ορισμένες παθολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των χειρουργημένων ασθενών με ΚΠΕ, όπως η εμπλοκή των περικολικών λεμφαδένων και η εντόπιση στο δεξιό κόλον του πρωτοπαθή όγκου. Αντίθετα, δεν αποκαλύφθηκε καμία σημαντική συσχέτιση στην έκφρασης της πρωτεΐνης της LKB1 με την ηλικία, το φύλο και με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Εξάλλου, καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν προέκυψε από τις αναλύσεις μας μεταξύ πρωτεΐνικής έκφρασης της LKB1 και τις μεταλλάξεις του εξωνίου 2 του KRAS, όπως έχει ήδη δημοσιευτεί σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα [114]. Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση μας κατέδειξε σημαντικές συσχετίσεις της απώλειας της LKB1 με την μετάλλαξη BRAFV600E.

Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσει το γενετικό μηχανισμό απώλειας της LKB1 είτε λόγω απώλεια ετεροζυγωτίας ή μεταλλάξεων στον σποραδικό ΚΠΕ. Επομένως είναι πρόκληση η ανάπτυξη μοριακής τεχνικής ικανή να ανιχνεύσει όλες αυτές τις αλλοιώσεις συνδυασμένες. Οι Sanchez-Cespedes *et al*., ανέφεραν ότι έχουν εντοπιστεί πολλοί διαφορετικοί τύποι σωματικών μεταλλαγών της LKB1 στους σποραδικούς καρκίνους περιλαμβάνοντας προσθήκη, έλλειψη, σιωπηλές μεταλλάξεις και μεταλλάξεις μετατόπισης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα

είτε την αδρανή μορφή της πρωτεΐνης [115, 116] είτε την πλήρη απουσία της πρωτεΐνης. Για να ξεπεραστεί ένας τέτοιος περιορισμός θεωρήσαμε την ανοσοΐστοχημεία (IHC) ως μια δυνητικά αξιόπιστη, απλή και οικονομικά αποδοτική μέθοδο για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1.

Ένας από τους κύριους περιορισμούς της παρούσας διδακτορικής εργασίας για τη αξιολόγηση της LKB1, ήταν η έλλειψη μίας ομάδας επικύρωσης; Μίας δηλαδή, ανεξάρτητης κοορτής ασθενών που να έχουν υποβληθεί στην ίδια χημειοθεραπεία ή όχι, προκειμένου να διασαφηνιστεί ο πιθανός προγνωστικός ή προβλεπτικός ρόλος της απώλειας έκφρασης της LKB1 στο ΚΠΕ. Συνεπώς, ο σχεδιασμός μιας ανεξάρτητης προοπτικής δοκιμής με μεγαλύτερο αριθμό υποψήφιων ασθενών, είναι μία από τις προοπτικές του εργαστηρίου Μεταφραστικής Ογκολογίας, όπου η προγνωστική ή προβλεπτική δύναμη της απώλειας έκφρασης της LKB1 θα δοκιμαστεί και θα επικυρωθεί μελλοντικά.

Περαιτέρω σημαντικά ευρήματα στην συγκεκριμένη διατριβή τα οποία υποστηρίζονται από σχετικά προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι οι ογκογόνοι βιοδείκτες όπως το KRAS, το BRAF, τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και το στάδιο III με μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής της νόσου. τα αποτελέσματά μας δείχνουν σαφώς ότι οι μεταλλάξεις BRAFV600E, οι όγκοι με επάρκεια στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (pMMR) και οι ασθενείς σταδίου III κατά τη διάγνωση σχετίζονται με χαμηλότερα DFS και OS. Αν και η έκφραση των ERCC1 και TS γονιδίων έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στον μεταβολισμό των δύο κύριων κατηγοριών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη συμπληρωματική χημειοθεραπεία του ΚΠΕ, όπως η οξαλιπλατίνα και η 5FU αντιστοίχως [117, 118], στην τρέχουσα μελέτη δεν αναδείχτηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης ERCC1 και TS mRNA και της έκβασης των ασθενών. Παρά την προηγουμένως προσδιορισμένη προγνωστική αξία του NEDD9 και του MYC σε ασθενείς με ΚΠΕ [119, 120], η τρέχουσα ανάλυση απέτυχε να αποκαλύψει οποιαδήποτε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης NEDD9 και MYCmRNA είτε με DFS είτε OS σε ασθενείς με χειρουργημένο ΚΠΕ που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία.

Συνολικώς η μελέτη αναδεικνύει την απώλεια της πρωτεϊνικής έκφρασης της LKB1 σαν προγνωστικό βιοδείκτη και την έκφραση mRNA της PKM2 σαν προβλεπτικό βιοδείκτη σε ασθενείς που μετά από κολεκτομή λαμβάνουν συμπληρωματική θεραπεία. Τα αποτελέσματα χρειάζονται περεταίρω τεκμηρίωση σε προοπτική μελέτη, ιδίως μετά τις νέες κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάρκεια της συμπληρωματικής θεραπείας. Αν επιβεβαιωθεί η υπόθεση τότε η μελέτη τους σε προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη θα τεκμηριώσει ή όχι την αξία τους.

Βιβλιογραφία

Reference List

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase* in *Globocan 2012*. 2013.
2. Fitzmaurice, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study.* JAMA Oncol, 2018. **4**(11): p. 1553-1568.
3. Jernal, A., et al., *Cancer statistics, 2010.* CA Cancer J Clin., 2010. **60**(5): p. 277-300. doi: 10.3322/caac.20073. Epub 2010 Jul 7.
4. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012.* CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
5. Beresford, S.A., et al., *Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial.* Jama., 2006. **295**(6): p. 643-54. doi: 10.1001/jama.295.6.643.
6. Billiau, A. *Ορθοκολικός Καρκίνος: ένας οδηγός για ασθενείς*

v.2013.1 2013; Available from: https://www.hesmo.gr/images/ESMO/Orthokolikos_Morfopoiimeno.pdf.

7. Al-Sohaily, S., et al., *Molecular pathways in colorectal cancer.* J Gastroenterol Hepatol., 2012. **27**(9): p. 1423-31. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x.
8. Tsakiridou, I., *Prevention and screening*

for colorectal cancer

ARCHIVES OF HELLENIC MEDICIN, 2010. **27**(2): p. 151-164.

9. Guinney, J., et al., *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer.* Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1350-6.
10. Carethers, J.M. and B.H. Jung, *Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer.* Gastroenterology., 2015. **149**(5): p. 1177-1190.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2015.06.047. Epub 2015 Jul 26.
11. Issa, J.P., *Colon cancer: it's CIN or CIMP.* Clin Cancer Res., 2008. **14**(19): p. 5939-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1596.
12. Yamagishi, H., et al., *Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers.* Chin J Cancer., 2016. **35**(1): p. 4. doi: 10.1186/s40880-015-0066-y.
13. Komarova, N.L., et al., *Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer.* Cancer Biol Ther., 2002. **1**(6): p. 685-92.
14. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers.* Nature., 1998. **396**(6712): p. 643-9. doi: 10.1038/25292.
15. Haraldsdottir, S., et al., *Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations.* Gastroenterology., 2014. **147**(6): p. 1308-1316.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.041. Epub 2014 Sep 3.

16. Leggett, B. and V. Whitehall, *Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis.* Gastroenterology., 2010. **138**(6): p. 2088-100. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.066.
17. Mundade R, I.T., Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T., *Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer.* Oncoscience, 2014. **1**(6): p. 400.
18. Gatalica, Z. and E. Torlakovic, *Pathology of the hereditary colorectal carcinoma.* Fam Cancer., 2008. **7**(1): p. 15-26. Epub 2007 Jun 13.
19. Cauchin, E., Y. Touchefeu, and T. Matysiak-Budnik, *Hamartomatous Tumors in the Gastrointestinal Tract.* Gastrointest Tumors., 2015. **2**(2): p. 65-74. doi: 10.1159/000437175. Epub 2015 Aug 6.
20. Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen, *Familial adenomatous polyposis.* Orphanet J Rare Dis., 2009. **4:22.**(doi): p. 10.1186/1750-1172-4-22.
21. Mátekovits A.E., T.-K.T., Stratigos A.I., *Κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα με δερματικές εκδηλώσεις*, in *Ελληνική Επιθεώρηση Δερματολογίας Αφροδισιολογίας*. 2006. p. 129-142.
22. Lynch, H.T., et al., *Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management.* Fam Cancer., 2008. **7**(1): p. 27-39. doi: 10.1007/s10689-007-9165-5. Epub 2007 Nov 13.
23. Bubien, V., et al., *High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome.* J Med Genet., 2013. **50**(4): p. 255-63. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101339. Epub 2013 Jan 18.
24. Vasen, H.F., et al., *Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC.* Dis Colon Rectum., 1993. **36**(1): p. 1-4.
25. Rodriguez-Bigas, M.A., et al., *A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines.* J Natl Cancer Inst., 1997. **89**(23): p. 1758-62.
26. Ricciardiello, L., et al., *Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer.* Cancer Res., 2003. **63**(4): p. 787-92.
27. Kakolyris, S., et al., *Cisplatin and irinotecan (CPT-11) as second-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer.* Lung Cancer., 2001. **34**(Suppl 4): p. S71-6.
28. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer.* N Engl J Med., 2008. **358**(5): p. 502-11. doi: 10.1056/NEJMra072367.
29. Lee Goldman, J.C.B., *Νοσολογία του Cecil*. Vol. 2. 2003: Εκδόσεις Πασχαλίδη.
30. Ε.Καστρίτης, Φ.Κ., Α. Μπάμιας, *Ο ρόλος της γενετικής οδού APC-β_κατενίνης-COX2 στον καρκίνο ουροθηλίου και θεραπευτικές προεκτάσεις.* ΒΗΜΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ, 2004. **3**(1-2): p. 37-48.
31. Hermans, K.C., E.P. Daskalopoulos, and W.M. Blankesteijn, *Interventions in Wnt signaling as a novel therapeutic approach to improve myocardial infarct healing.* Fibrogenesis Tissue Repair., 2012. **5**(1): p. 16. doi: 10.1186/1755-1536-5-16.
32. Iacopetta, B., *TP53 mutation in colorectal cancer.* Hum Mutat., 2003. **21**(3): p. 271-6.
33. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study.* Br J Cancer., 2001. **85**(5): p. 692-6. doi: 10.1054/bjoc.2001.1964.
34. Lievre, A., H. Blons, and P. Laurent-Puig, *Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer.* Oncogene., 2010. **29**(21): p. 3033-43. doi: 10.1038/onc.2010.89. Epub 2010 Apr 12.
35. Barras, D., *BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update.* Biomark Cancer., 2015. **7**(Suppl 1): p. 9-12. doi: 10.4137/BIC.S25248. eCollection 2015.

36. Dankort, D., et al., *A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors.* Genes Dev., 2007. **21**(4): p. 379-84. doi: 10.1101/gad.1516407. Epub 2007 Feb 13.
37. Yarom, N. and D.J. Jonker, *The role of the epidermal growth factor receptor in the mechanism and treatment of colorectal cancer.* Discov Med., 2011. **11**(57): p. 95-105.
38. Souglakos, J., et al., *Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer.* Br J Cancer., 2009. **101**(3): p. 465-72. doi: 10.1038/sj.bjc.6605164. Epub 2009 Jul 14.
39. Benvenuti, S., et al., *Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies.* Cancer Res., 2007. **67**(6): p. 2643-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4158.
40. Shorning, B.Y. and A.R. Clarke, *LKB1 loss of function studied in vivo.* FEBS Lett., 2011. **585**(7): p. 958-66. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.019. Epub 2011 Jan 15.
41. Shah, U., N.E. Sharpless, and D.N. Hayes, *LKB1 and lung cancer: more than the usual suspects.* Cancer Res., 2008. **68**(10): p. 3562-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6620.
42. Ji, H., et al., *LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis.* Nature., 2007. **448**(7155): p. 807-10. doi: 10.1038/nature06030. Epub 2007 Aug 5.
43. Warburg, O., *On the origin of cancer cells.* Science., 1956. **123**(3191): p. 309-14.
44. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.* Science., 2009. **324**(5930): p. 1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
45. Adem, S., V. Comakli, and N. Uzun, *Pyruvate kinase activators as a therapy target: a patent review 2011-2017.* Expert Opin Ther Pat, 2018. **28**(1): p. 61-68.
46. Noguchi, T., et al., *The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters.* J Biol Chem., 1987. **262**(29): p. 14366-71.
47. Christofk, H.R., et al., *Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein.* Nature., 2008. **452**(7184): p. 181-6. doi: 10.1038/nature06667.
48. Noguchi, T., H. Inoue, and T. Tanaka, *The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing.* J Biol Chem, 1986. **261**(29): p. 13807-12.
49. Mazurek, S., et al., *Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome.* Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 1**: p. S23-9.
50. Mazurek, S., *Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells.* Int J Biochem Cell Biol., 2011. **43**(7): p. 969-80. doi: 10.1016/j.biocel.2010.02.005. Epub 2010 Feb 13.
51. Mazurek, S., et al., *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading.* Semin Cancer Biol., 2005. **15**(4): p. 300-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.009.
52. Papadaki, C., et al., *PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to front-line platinum-based chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer.* Br J Cancer., 2014. **111**(9): p. 1757-64. doi: 10.1038/bjc.2014.492. Epub 2014 Sep 18.
53. Guo, W., et al., *Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model.* J Cancer Res Clin Oncol., 2011. **137**(1): p. 65-72. doi: 10.1007/s00432-010-0860-5. Epub 2010 Mar 25.
54. Vilar, E. and S.B. Gruber, *Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence.* Nat Rev Clin Oncol., 2010. **7**(3): p. 153-62. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.237. Epub 2010 Feb 9.

55. Boland, C.R., *Recent discoveries in the molecular genetics of Lynch syndrome.* Fam Cancer., 2016. **15**(3): p. 395-403. doi: 10.1007/s10689-016-9885-5.
56. Gatalica, Z., et al., *High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine.* Fam Cancer., 2016. **15**(3): p. 405-12. doi: 10.1007/s10689-016-9884-6.
57. Leslie H. Sobin, M.K.G., Christian Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition.* 2010.
58. Andre, T., et al., *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer.* N Engl J Med., 2004. **350**(23): p. 2343-51. doi: 10.1056/NEJMoa032709.
59. Jessup, J.M., et al., *Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: implications of race/ethnicity, age, and differentiation.* Jama., 2005. **294**(21): p. 2703-11. doi: 10.1001/jama.294.21.2703.
60. Raymond, E., et al., *Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies.* Ann Oncol., 1998. **9**(10): p. 1053-71.
61. Zhou, C., et al., *Predictive effects of ERCC1 and XRCC3 SNP on efficacy of platinum-based chemotherapy in advanced NSCLC patients.* Jpn J Clin Oncol., 2010. **40**(10): p. 954-60. doi: 10.1093/jjco/hyq071. Epub 2010 May 12.
62. Monzo, M., et al., *Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD, XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine.* Oncology., 2007. **72**(5-6): p. 364-70. doi: 10.1159/000113534. Epub 2008 Jan 17.
63. Martin, L.P., T.C. Hamilton, and R.J. Schilder, *Platinum resistance: the role of DNA repair pathways.* Clin Cancer Res., 2008. **14**(5): p. 1291-5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2238.
64. Safaei, R., *Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs.* Cancer Lett., 2006. **234**(1): p. 34-9. doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.046. Epub 2005 Nov 16.
65. Liang, J., et al., *The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer.* Cancer Chemother Pharmacol., 2010. **66**(3): p. 493-500. doi: 10.1007/s00280-009-1186-3. Epub 2009 Dec 4.
66. Suzanne Hagan, M.C.M.O., Brendan Doyle, *Targeted therapies in colorectal cancer—an integrative view by PPPM.* EPMA J., 2013. **4**(1): p. 3.
67. Society, A.C. 2018.
68. Tejpar, S., et al., *Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials.* JAMA Oncol, 2016. **10**(2565703).
69. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.* N Engl J Med., 2009. **360**(14): p. 1408-17. doi: 10.1056/NEJMoa0805019.
70. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status.* J Clin Oncol., 2011. **29**(15): p. 2011-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.5091. Epub 2011 Apr 18.
71. Tveit, K.M., et al., *Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study.* J Clin Oncol., 2012. **30**(15): p. 1755-62. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0915. Epub 2012 Apr 2.

72. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol., 2008. **26**(35): p. 5705-12. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0786. Epub 2008 Nov 10.
73. Herzig, D.O. and V.L. Tsikitis, *Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy.* J Surg Oncol., 2015. **111**(1): p. 96-102. doi: 10.1002/jso.23806. Epub 2014 Oct 8.
74. Cushman-Vokoun, A.M., et al., *Clinical utility of KRAS and BRAF mutations in a cohort of patients with colorectal neoplasms submitted for microsatellite instability testing.* Clin Colorectal Cancer, 2013. **12**(3): p. 168-78.
75. https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing, *Sanger Sequencing.*
76. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth.* Nature, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
77. Lee, B.Y. and A. Sonnenberg, *Time trends of mortality from colorectal cancer in the United States: a birth-cohort analysis.* JAMA Intern Med, 2013. **173**(12): p. 1148-50.
78. Van Cutsem, E., et al., *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer.* Ann Oncol., 2016. **27**(8): p. 1386-422. doi: 10.1093/annonc/mdw235. Epub 2016 Jul 5.
79. Ursem, C., C.E. Atreya, and K. Van Loon, *Emerging treatment options for BRAF-mutant colorectal cancer.* Gastrointest Cancer, 2018. **8**: p. 13-23.
80. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control.* Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
81. Wood, L.D., et al., *The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.* Science, 2007. **318**(5853): p. 1108-13.
82. Zhu, L., et al., *Prognostic Role of BRAF Mutation in Stage II/III Colorectal Cancer Receiving Curative Resection and Adjuvant Chemotherapy: A Meta-Analysis Based on Randomized Clinical Trials.* PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0154795.
83. Diaz, L.A., Jr. and D.T. Le, *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency.* N Engl J Med, 2015. **373**(20): p. 1979.
84. Zhou, C.F., et al., *Pyruvate kinase type M2 is upregulated in colorectal cancer and promotes proliferation and migration of colon cancer cells.* IUBMB Life, 2012. **64**(9): p. 775-82.
85. Hitosugi, T., et al., *Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth.* Sci Signal, 2009. **2**(97): p. ra73.
86. Martinez-Balibrea, E., et al., *A proteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to oxaliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines.* Mol Cancer Ther, 2009. **8**(4): p. 771-8.
87. Martinez-Cardus, A., et al., *Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer.* Mol Cancer Ther, 2009. **8**(1): p. 194-202.
88. Stetak, A., et al., *Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death.* Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1602-8.
89. Li, S.L., et al., *Quantitative proteome analysis of multidrug resistance in human ovarian cancer cell line.* J Cell Biochem, 2010. **109**(4): p. 625-33.
90. Yoo, B.C., et al., *Decreased pyruvate kinase M2 activity linked to cisplatin resistance in human gastric carcinoma cell lines.* Int J Cancer, 2004. **108**(4): p. 532-9.
91. Zhang, H.S., et al., *Tanshinone A inhibits human esophageal cancer cell growth through miR-122-mediated PKM2 down-regulation.* Arch Biochem Biophys, 2016. **598**: p. 50-6.
92. Zhang, X., et al., *Nuclear PKM2 expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.* Pathol Res Pract, 2013. **209**(8): p. 510-5.

93. Lu, W., et al., *Up-regulation of PKM2 promote malignancy and related to adverse prognostic risk factor in human gallbladder cancer.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 26351.
94. Wang, X., F. Zhang, and X.R. Wu, *Inhibition of Pyruvate Kinase M2 Markedly Reduces Chemoresistance of Advanced Bladder Cancer to Cisplatin.* Sci Rep, 2017. **7**: p. 45983.
95. Zhu, H., et al., *PKM2 enhances chemosensitivity to cisplatin through interaction with the mTOR pathway in cervical cancer.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 30788.
96. Gines, A., et al., *PKM2 Subcellular Localization Is Involved in Oxaliplatin Resistance Acquisition in HT29 Human Colorectal Cancer Cell Lines.* PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0123830.
97. Koss, K., D. Maxton, and J.A. Jankowski, *Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention.* Colorectal Dis, 2008. **10**(3): p. 244-8.
98. Cui, R. and X.Y. Shi, *Expression of pyruvate kinase M2 in human colorectal cancer and its prognostic value.* Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 11393-9.
99. Lim, D.R., et al., *Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome?* Medicine (Baltimore), 2017. **96**(42): p. e8241.
100. Dayton, T.L., T. Jacks, and M.G. Vander Heiden, *PKM2, cancer metabolism, and the road ahead.* EMBO Rep, 2016. **17**(12): p. 1721-1730.
101. Icard, P., et al., *Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer.* Trends Biochem Sci, 2019.
102. Jiang, Y., et al., *PKM2 phosphorylates MLC2 and regulates cytokinesis of tumour cells.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 5566.
103. He, C.L., et al., *Pyruvate Kinase M2 Activates mTORC1 by Phosphorylating AKT1S1.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 21524.
104. He, X., et al., *PKM2 in carcinogenesis and oncotherapy.* Oncotarget, 2017. **8**(66): p. 110656-110670.
105. Papadaki, C., et al., *PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to front-line platinum-based chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer.* Br J Cancer, 2014. **111**(9): p. 1757-64.
106. Karachaliou, N., et al., *Predictive value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPOI, TOPOmicron-IIA, TOPOIIB and C-MYC genes in patients with small cell lung cancer (SCLC) who received first line therapy with cisplatin and etoposide.* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74611.
107. Grothey, A., et al., *Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer.* N Engl J Med, 2018. **378**(13): p. 1177-1188.
108. Gan, R.Y. and H.B. Li, *Recent progress on liver kinase B1 (LKB1): expression, regulation, downstream signaling and cancer suppressive function.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 16698-718.
109. Shackelford, D.B. and R.J. Shaw, *The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 563-75.
110. Shen, Z., et al., *The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2085-90.
111. Sun, J., et al., *Decreased Expression of Tumor-suppressor Gene LKB1 Correlates with Poor Prognosis in Human Gastric Cancer.* Anticancer Res, 2016. **36**(3): p. 869-75.
112. Xiao, J., et al., *The Prognostic Value of Decreased LKB1 in Solid Tumors: A Meta-Analysis.* PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152674.
113. He, T.Y., et al., *LKB1 loss at transcriptional level promotes tumor malignancy and poor patient outcomes in colorectal cancer.* Ann Surg Oncol, 2014. **21 Suppl 4**: p. S703-10.

114. Koivunen, J.P., et al., *Mutations in the LKB1 tumour suppressor are frequently detected in tumours from Caucasian but not Asian lung cancer patients.* Br J Cancer, 2008. **99**(2): p. 245-52.
115. Calles, A., et al., *Immunohistochemical Loss of LKB1 Is a Biomarker for More Aggressive Biology in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma.* Clin Cancer Res, 2015. **21**(12): p. 2851-60.
116. Sanchez-Cespedes, M., *A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome.* Oncogene, 2007. **26**(57): p. 7825-32.
117. Donada, M., et al., *Thymidilate synthase expression predicts longer survival in patients with stage II colon cancer treated with 5-flurouracil independently of microsatellite instability.* J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(2): p. 201-10.
118. Liang, J., et al., *The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer.* Cancer Chemother Pharmacol, 2010. **66**(3): p. 493-500.
119. Lee, K.S., et al., *Favorable prognosis in colorectal cancer patients with co-expression of c-MYC and ss-catenin.* BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 730.
120. Li, P., et al., *High expression of NEDD9 predicts adverse outcomes of colorectal cancer patients.* Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(5): p. 2565-70.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (BRCA1, ERCC1, RRM1) ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.

Day 1st: *ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ MICRODISSECTED ΚΥΤΤΑΡΩΝ*

- Φυγοκέντρηση 10,000 rpm για 10min/ 4ºC. Άδειασμα της ETOH από το tube χωρίς να χάσω το pellet!
- Προσθήκη 1ml 100% ETOH(absolute). Καλή ανάδευση του tube με το χέρι.
- Φυγοκέντρηση 10,000 rpm /4ºC για 5min. Άδειασμα της ETOH από το tube χωρίς να χάσω το pellet!
- Προσθήκη 500μl 100% ETOH, Καλή ανάδευση του tube με το χέρι. Επανάληψη φυγοκέντρησης 5min.
- Άδειασμα της ETOH από το σωληνάριο με τη βοήθεια pipette αυτή τη φορά ώστε να καθαριστεί καλά.
- Αφήνουμε τα σωληνάρια σε επωαστήρα (37ºC) να στεγνώσουν καλά χωρίς να ξεραθεί το ίζημα.
- Στο στεγνό ίζημα προσθήκη 400μl Lysis Buffer (10MmTris+0.1mMEDTA+ 2% SDS + DEPCH_2O) και 30μlProteinaseK.
- Επώαση στους 55ºC με 900 rpm για μία νύχτα.

Day 2nd: *ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA*

- Προσθήκη 30 μlProteinaseK για 3 ώρες.
- Φυγοκέντρηση 16,000 rcf για 10min/ 4ºC.
- Μεταφέρω το υπερκείμενο σε 2mleppendorf (RNAsefree) αποφεύγοντας το pellet (μεμβρανών-πρωτεινών) που δημιουργήθηκε κατά την πέψη.
- Προσθήκη TrizolLS σε όγκο 3:1 (δηλ. 460μl *3=1380μl)- καλή ανακίνηση – επώαση 5 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 0.2*1.38/0.75ml χλωροφορμίου(344μl)- δυνατή ανακίνηση-επώαση 10 min στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση 16,000 rcf για 15min/ 4ºC.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων στον πάγο, προσεχτικά, ώστε να μην διαταραχθούν οι φάσεις. Μεταφορά της υδατικής φάσης (σε σωληνάριο 1,5μl, RNAsefree) αφήνοντας 2cm από τον δακτύλιο τουTrizolLS.

- Προσθήκη 1 μl γλυκογόνου (C=20-30μg) και ανάδευση για 3 min.
- Προσθήκη οξικού νατρίουσε αναλογία 1:10, ανακίνηση.
- Προσθήκη 600μlΙσοπροπανόλης**,** ανακίνηση και επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση δειγμάτων στους -80ºC για μία νύχτα .

Day 3rd:

1. Ξέπλυμα Ιζήματος

- Ξεπάγωμα, ανακίνηση και φυγοκέντρηση 16,000 rcf για 15min/ 4ºC.
- Άδειασμα της ισοπροπανόλης με προσοχή στο ίζημα!
- Προσθήκη 1ml 75% ETOH(absolute). Ανακίνηση και φυγοκέντρηση 16,000 rcf για 5min/ 4ºC.
- Άδειασμα της αιθανόλης (έχοντας πάντα οπτική επαφή με το ίζημα!)
- Προσθήκη 500μl 75% ETOH(absolute). Ανακίνηση και φυγοκέντρηση 16,000 rcf για 5min/ 4ºC.
- Καλό άδειασμα του σωληναρίου με τη βοήθεια πιπέτας ώστε να καθαριστεί εντελώς από την ETOH. Προσοχή, μην χαθεί η οπτική επαφή με το ίζημα!
- Αφήνουμε το δείγμα να στεγνώσει στους 37ºC χωρίς να ξεραθεί.
- Διαλυτοποίηση του δείγματος με 10μlDEPCH_2O, αναδεύοντας τακτικά για 5'.

2. Επώαση με DNAse για την απομάκρυνση γενωμικούDNA.

- Προσθήκη 1μlDNaseBuffer + 1μlDNase σε κάθε δείγμα (το ένζυμο τοποθετείτε πάντα σε πάγο)
- Επώαση για 30 λεπτά στους 37ºC.
- Χορήγηση 2μlInactivator (διακοπή δράσης DNase), τακτική ανάδευση για 3-4 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση 12,000 rcf για 2min/ 4ºC.
- Μεταφορά υπερκειμένου (V=12,5μl) σε καθαρό σωληνάριο 1,5ml.
- Φυγοκέντρηση 12,000 rcf για 2min/ 4ºC.

3. Χρήση Σπεκτροφωτόμετρου (Nanodrop) για μέτρηση του RNA

4. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA(cDNA) μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης(RT):V συνολικού μίγματος= 20μl, V δείγματος= 11μl, V αντίδρασης (ολιγονουκλεοτίδια+εξαμερή) =2μl,Vενζύμου=7μl (FSBuffer+DDT+SSIII+RNaseout)

cDNA	Δείγμα ασθενούς	Εμπορικό RNA πνεύμονα	Εμπορικό RNA ήπατος	RT-
RNA(μl)	C =225ng	1μl (1000ng)	1μl (1000ng)	0
DEPC H_2O (μl)	11μl-V_{RNA}	10μl	10 μl	11 μl

Η ποσότητα του mRNA, σε κάθε ασθενή, για αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA, υπολογίζετε με βάση την τελική συγκέντρωση RNA που απαιτείται για την ενίσχυση του cDNA των γονιδίων στόχων (ERCC1, MYC, LKB1, PKM2, NEDD9, TS) και του γονιδίου αναφοράς (β-actin, PGK) που ολοκληρώνεται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

1. Αλληλουχίες εκκινητών για τα κωδικόνια 12/13 του KRAS και συνθήκες της PCR:

KRAS12_F	5'	ACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTAT	3'	**exon 2**
KRAS12_EXR	5'	TGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC	3'	
KRAS12_INR	5'	GGTCCTGCACCAGTAATATGC	3'	

program KNRAS-F Βέλτιστες Συνθήκες 1ης PCR

	ºC	Time	
Denaturation	96	15 min	
Denaturation	96	20 sec	X30
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	1 min	
FinalExtension	72	7 min	

program KNRAS-N Βέλτιστες Συνθήκες 2ης PCR

	ºC	Time	
Denaturation	96	15 min	
Denaturation	96	15 sec	X40
Annealing	58	30 sec	
Extension	72	1 min	
FinalExtension	72	7 min	

2. Συγκεντρώσεις και όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR:

First PCR for KRAS Component	**V (μl)**	**Nested single PCR for KRAS** **V (μl)**
DNA template		2(DNA from 1st PCR)
10x buffer	1	2
External primers (F+R) (3μM each)*	1	2
MgCl2 (50mM)	0,3	0,6
dNTPs (10mM)	0,2	0,4
Platinum Taq Polymerase 5u/λ (invitrogen)	0,15	0,2
H20	3,35	12,8
	totalvolume 10μl	totalvolume 20μl

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

1. Βέλτιστες συνθήκες Cycle Sequencing

1st Denaturation	96ºC	1 min	1 κυκλός
2nd Denaturation	96ºC	10sec	25 κύκλοι
Annealing	50ºC	5sec	
Extension	60ºC	4min	

2. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων του CycleSequencing

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA εκμαγείο	3μl
5x Buffer	0.6μl
Primer (Forward or Reverse)	2 μl (200nμ)
V3.1 Sequencing Mix	1μl
ddH2O	1.4μl
Total Volume	10μl

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

1. Αλληλουχίες σημασμένων εκκινητών και βέλτιστες συνθήκες τηςPCR:

BAT-25.Forward	5’ 6-FAM-TTCGCCTCCAAGAATGTAAGT 3’
BAT-25.Reverse	5’ TCTGCATTTTAACTATGGCTC 3’
BAT-26.Forward	5’ PET-TGACTACTTTTGACTTCAGCC 3’
BAT-26.Reverse	5’ AACCATTCAACATTTTTAACCC 3’
D5S346.Forward	5’ VIC-ACTCACTCTAGTCATAAATCGGG 3’
D5S346.Reverse	5’ AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT 3’
D2S123.Forward	5’ 6-FAM-AAACAGGATGCCTGCCTTTA 3’
D2S123.Reverse	5’ GGACTTTCCACCTATGGGAC 3’
D17S250.Forward	5’ NED-GGAAGAATCAAATAGACAAT 3’
D17S250.Reverse	5’ GCTGGCCATATATATATTTAAACC 3’

PCR program MSI			
1st Denaturation	95ºC	2 min	1 κυκλός
2nd Denaturation	95ºC	30sec	35 κύκλοι
Annealing	55ºC	30sec	
Extension	72ºC	30sec	
Extension	72 ºC	7min	

2. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της PCR για MixA και MixB

Αντιδραστήρια Mix A	**Συγκεντρώσεις**
DNA εκμαγείο	2μl
5x Buffer	1 μl
Primers Bat25+BAT26(5μM)	1.2 μl each
Primers D2S123 + D5S346	1μ Meach
$MgCl_2$	0.5μl
dNTPs	0.2 μl
Platinum Taq	0.15 μl
ddH2O	1.75μl
Total Volume	10μl
ΑντιδραστήριαMixB	Συγκεντρώσεις
DNA εκμαγείο	2μl
5x Buffer	1 μl
Primers D17S250 (10μM)	1μl each
$MgCl_2$	0.5μl
dNTPs	0.2 μl
Platinum Taq	0.15 μl
ddH2O	5.15μl
Total Volume	10μl

3. Προκειμένου να τρέξουν στον αυτόματο αναλυτή 3130 DNA Sequencer για την ανίχνευση του MSI προσθέτουμε 1,2 μl από τα PCR προϊόντα MixA και MixB σε πηγαδάκι του 96άρι πιάτου αφού έχουμε ήδη βάλει φορμαμίδιο (10 μl) και τον μάρτυρα των μεγεθών gene Scan LIZ-500 Size Standard της Applied Biosystem (0.375μl) για κάθε δείγμα ξεχωριστά.