



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ

Εκτίμησης μοριακών παραγόντων σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου που έχουν λάβει θεραπεία πρώτης γραμμής και συσχέτιση τους με την ανταπόκριση στην θεραπεία και την επιβίωση

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διονύσιος Ι. Παπαδάτος-Πάστος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

Επιβλέπων

Βασίλειος Γεωργούλιας (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Συμβουλευτική Επιτροπή

Βασίλειος Γεωργούλιας (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Δημήτριος Μαυρουδής (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Μαρία Τζαρδή (Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής)

Εξεταστική Επιτροπή

Βασίλειος Γεωργούλιας (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Δημήτριος Μαυρουδής (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Γεώργιος Σαμώνης (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Γεώργιος Χαλκιαδάκης (Καθηγητής Χειρουργικής)

Ευστάθιος Σταθόπουλος (Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής)

Μαρία Τζαρδή (Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής)

Ιωάννης Σουγκλάκος (Λέκτορας Παθολογίας-Ογκολογίας)

στους γονείς μου,
στη γυναίκα μου Γεωργία,
στην Αδερφή μου Μαριέττα,
στο νεογέννητο Γιάννη...

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ	ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
1	Εισαγωγή – Θεωρητικό μέρος	6
1.1	Επιδημιολογία ορθοκολικού καρκίνου (ΟΚΚ)	7
1.2.1	Οικογενή σύνδρομα αδеноματώδους πολυποδίασης	8
1.2.2	Οικογενή σύνδρομα αμαρτωματώδους πολυποδίασης	8
1.2.3	Κληρονομικό μη-συσχετιζόμενο με πολυποδίαση καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC)	9
1.2.4	Οικογενής τύπος ΟΚΚ	10
1.3	Πρόληψη – έγκαιρη διάγνωση	11
1.4	Σταδιοποίηση ΟΚΚ και ιστοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες	12
1.5	Προτεινόμενες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του ΟΚΚ	17
1.6	Προβλεπτικοί και προγνωστικοί μοριακοί παράγοντες στον ΟΚΚ	21
1.6.1	Το μοριακό μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ELK	22
1.6.2	Μικροδορυφορική αστάθεια του DNA (micro satellite instability - MSI)	27
1.6.3	Κυτταρική διαίρεση – ο ρόλος της κυκλίνης (cyclin D1)	28
1.7	Στόχοι διδακτορικής διατριβής	30
2	Πειραματικό μέρος	31
2.1	Επιλογή ασθενών – σχεδιασμός μελέτης	32
2.1.1	Δημογραφικά – χαρακτηριστικά ασθενών	32

2.2	Ανοσοϊστοχημική μελέτη	33
2.2.1	Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης	33
2.2.2	Ανοσοϊστοχημική μελέτη των πρωτεϊνών MLH1, MSH2 και Cyclin D1	36
2.3	Μοριακές τεχνικές – προσδιορισμός κατάστασης γονιδίου BRAF και του MSI	39
2.3.1	Απομόνωση καρκινικών κυττάρων	39
2.3.2	Αποπαραφινποίηση	41
2.3.3	Κυτταρική λύση – πρωτεϊνική πέψη	42
2.3.4	Εκχύλιση και καθαρισμός του RNA (RNA extraction)	43
2.3.5	Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA και προσδιορισμός της καθαρότητάς του με χρήση ειδικού φασματοφωτομέτρου	46
2.3.6	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR)	47
2.3.7	Ποσοτική real-time PCR και κλασσική PCR(αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)	51
2.4	Στατιστική ανάλυση	55
3	Αποτελέσματα - Συζήτηση	56
4	Περίληψη	75
5	Summary	81
6	Βιβλιογραφία	86

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Επιδημιολογία Ορθοκολικού Καρκίνου (ΟΚΚ)

Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περίπου ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις ΟΚΚ, γεγονός που τον καθιστά τον τρίτο σε συχνότητα καρκίνο παγκοσμίως.¹ Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) καταγράφηκαν 146970 νέες περιπτώσεις και 49920 θάνατοι από ΟΚΚ το 2009.² Η πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι σποραδικοί καρκίνοι, δηλαδή δεν σχετίζονται με κάποιο κληρονομικό σύνδρομο ή προϋπάρχουσα νόσο. Κατά συνέπεια ο ΟΚΚ αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία.

Παράγοντες κινδύνου για τον ΟΚΚ είναι η ηλικία, το φύλο, το ιστορικό πολυπόδων του εντέρου, περιβαλλοντικοί παράγοντες (Πίνακας 1)³ αλλά και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Η διάρκεια και η έκταση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου επίσης αυξάνουν τον κίνδυνο.^{4,5} Επιπλέον της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, διάφορα κληρονομικά σύνδρομα αυξάνουν την επίπτωση του ΟΚΚ. Για παράδειγμα, το σύνδρομο Lynch, επίσης γνωστό και ως κληρονομικό μη-συσχετιζόμενο με πολυποδίαση καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC), συναντάται σε έναν στους 300 ασθενείς με ΟΚΚ. Άλλα σύνδρομα στα οποία ο ΟΚΚ εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι στο γενικό πληθυσμό είναι η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (1/7000) και η ΜΥΗ-σχετιζόμενη πολύποση (1/18000). Συνολικά, το 6% των περιπτώσεων ΟΚΚ σχετίζονται με κάποιο σύνδρομο.⁶

Περιβαλλοντικοί παράγοντες
Κόκκινο κρέας
Δίαιτα πλούσια σε λιπαρά
Περιορισμένη λήψη φυτικών ινών στη διατροφή
Σακχαρώδης διαβήτης
Κάπνισμα
Υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ
<i>Πίνακας 1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο ΟΚΚ</i>

Αναλυτικά οι κληρονομικοί τύποι ΟΚΚ διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) στα σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολυπόδων και β) στα σύνδρομα στα οποία οι πολύποδες απουσιάζουν. Τα σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη πολυπόδων διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες α) στα οικογενή σύνδρομα αδενωματώδους πολυποδίασης και β) στα οικογενή σύνδρομα αμαρτωματώδους πολυποδίασης. Ο κληρονομικός καρκίνος του εντέρου που δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη πολυπόδων είναι γνωστός ως μη-πολυποσικός ΟΚΚ.

1.2.1 Οικογενή σύνδρομα αδενωματώδους πολυποδίασης

Η επιφάνεια του εντέρου ασθενών με οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση καταλαμβάνεται από εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες πολύποδες που θα εξελιχθούν σε καρκίνωμα εάν δεν αντιμετωπιστούν κατάλληλα. Έχει υπολογιστεί ότι συνήθως οι ασθενείς αναπτύσσουν πολύποδες στην ηλικία των 25 ετών ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου είναι τα 42 έτη. Η γενετική διαταραχή στο παραπάνω σύνδρομο είναι η μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 5 (5q21-22 θέση APC) του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου APC (adenomatous polyposis coli). Η ενδοσκόπηση του παχέος εντέρου είναι η προτεινόμενη μέθοδος παρακολούθησης των ασθενών και ενδείκνυται να πραγματοποιείται για πρώτη φορά στη νεαρή εφηβική ηλικία. Η ολική κολεκτομή είναι η θεραπεία εκλογής. Ηπιότερη κλινικά μορφή του παραπάνω συνδρόμου αποτελεί το εξασθενημένο σύνδρομο αδενωματώδους πολυποδίασης που χαρακτηρίζεται από το μικρότερο αριθμό πολυπόδων που αναπτύσσονται στο παχύ έντερο και την καθυστερημένη ανάπτυξη ΟΚΚ σε σχέση με την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση. Τέλος, στο σύνδρομο Gardner, επιπλέον των εντερικών πολυπόδων, εμφανίζονται οστώματα, επιδερμοειδείς κύστες, δερμοειδείς όγκοι, ενώ στο σύνδρομο Turcot οι εντερικοί πολύποδες συνδυάζονται με όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος (γλοίωμα, μυελοβλάστωμα).

1.2.2 Οικογενή σύνδρομα αμαρτωματώδους πολυποδίασης

Υπάρχουν τρία γνωστά σύνδρομα οικογενούς αμαρτωματώδους πολυποδίασης. 1) Το σύνδρομο Peutz-Jeghers, το οποίο σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης

καρκινώματος στον παρακείμενο ή υπερκείμενο των πολυπόδων βλεννογόνο αλλά και καρκινώματα σε άλλα όργανα όπως ο μαστός, οι ωοθήκες, το πάγκρεας, τα χοληφόρα, ο θυρεοειδής, ο πνεύμονας καθώς και στην εμφάνιση μελαγχρωματικών κηλίδων στους βλεννογόνους και στο δέρμα. Η μέση ηλικία διάγνωσης ΟΚΚ ή γαστρικού καρκίνου είναι τα 50 έτη. 2) Το σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης στο οποίο πολύποδες αναπτύσσονται σε όλο το γαστρεντερικό σωλήνα σε νεαρή ηλικία, και 3) το σύνδρομο Cowden στο οποίο οι ασθενείς εμφανίζουν αμαρτωματώδεις όγκους στο δέρμα, στους βλεννογόνους, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στον θυρεοειδή αδένα και σε άλλους ιστούς.

1.2.3 Κληρονομικό μη-συσχετιζόμενο με πολυποδίαση καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC)

Η γενετική μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης της αταίριαστης σύνδεσης βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA (mismatch repair genes – MMR) οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων του παχέος εντέρου που εμφανίζουν μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability – MSI-H). Τα σημαντικότερα γονίδια που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση είναι τα MLH1, MSH2 και MSH6. Στη μεγάλη πλειοψηφία (90%) των περιπτώσεων κληρονομικού μη-συσχετιζόμενο με πολυποδίαση καρκίνωμα, ΟΚΚ οι γενετικές μεταλλάξεις εντοπίζονται στα γονίδια MLH1 και MSH2. Άτομα με HNPCC έχουν περίπου 80% κίνδυνο να αναπτύξουν ΟΚΚ στη διάρκεια της ζωής τους με μέση ηλικία διάγνωσης τα 61 έτη. Η διάγνωση του συνδρόμου γίνεται με τη βοήθεια των κριτηρίων του Amsterdam (Πίνακας 2) ή/και με τη μοριακή εξέταση για μεταλλάξεις στα γονίδια MMR.

Κριτήρια Amsterdam I	Κριτήρια Amsterdam II
Τρία ή περισσότερα μέλη οικογένειας, ένα εκ των οποίων είναι πρώτου βαθμού συγγενής [^] των άλλων δύο, με επιβεβαιωμένη διάγνωση ΟΚΚ.	Τρία ή περισσότερα μέλη οικογένειας, ένα εκ των οποίων είναι πρώτου βαθμού συγγενής των άλλων δύο, με HNPCC σχετιζόμενους καρκίνους ^{^^} .
Δύο διαδοχικές προσβεβλημένες γενιές.	Δύο διαδοχικές προσβεβλημένες γενιές.
Ένας ή περισσότεροι ΟΚΚ, διαγνωσμένοι πριν την ηλικία των 50 ετών.	Ένας ή περισσότεροι HNPCC σχετιζόμενοι καρκίνοι, διαγνωσμένοι πριν την ηλικία των 50 ετών.
Αποκλεισμός FAP.	Αποκλεισμός FAP.
[^] Γονέας, παιδί ή αδελφός. ^{^^} ΟΚΚ, ενδομητρίου, στομάχου, λεπτού εντέρου, χοληφόρων, νεφρικής πυέλου, ουρητήρων.	
Πίνακας 2. Κριτήρια Amsterdam I και II.	

1.2.4 Οικογενής τύπος ΟΚΚ (κοινή οικογενειακή προδιάθεση για καρκίνωμα του παχέος εντέρου)

Αφορά το 25% των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό ΟΚΚ που όμως δεν εντάσσεται σε ένα από τα προαναφερθέντα οικογενή σύνδρομα. Είναι γνωστό ότι η ύπαρξη ενός συγγενή πρώτου βαθμού με ΟΚΚ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΟΚΚ 1.7 φορές σε σύγκριση με τον κίνδυνο του γενικού πληθυσμού.

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά την επιβίωση ασθενών με ΟΚΚ. Αυτό οφείλεται σε πέντε παράγοντες: (α) τη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο λόγω των αποτελεσματικότερων μεθόδων πρόληψης, (β) τις αποτελεσματικότερες θεραπείες, (γ) την επιλογή ασθενών που έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας με συγκεκριμένες θεραπευτικές μεθόδους, (δ) τη βελτίωση χειρουργικών τεχνικών και (ε) την εφαρμογή συμπληρωματικής θεραπείας σε ασθενείς σταδίου III ή υψηλού κινδύνου σταδίου II.

1.3 Πρόληψη – έγκαιρη διάγνωση:

Ο πρώτος από τους παράγοντες που σχετίζονται με την καλύτερη επιβίωση ασθενών με ΟΚΚ είναι οι μέθοδοι δευτερογενούς πρόληψης ή έγκαιρης διάγνωσης.⁶ Ο στόχος των μεθόδων έγκαιρης διάγνωσης (screening) είναι η διάγνωση της νόσου σε πρώιμο στάδιο όταν δεν έχουν αναπτυχθεί μεταστάσεις ή όταν ακόμα ο όγκος βρίσκεται σε προκαρκινικό στάδιο. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος επιτήρησης είναι το guiac-based faecal occult blood test. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη λήψη κοπράνων και την εξέτασή τους στο μικροσκόπιο για ίχνη αίματος. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι έχει χαμηλή ευαισθησία που σημαίνει ότι μεγάλος αριθμός πασχόντων δε θα διαγνωσθεί σωστά. Τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι όταν η τεχνική αυτή γίνεται κάθε δύο χρόνια μειώνεται η θνητότητα του ΟΚΚ κατά 16%.⁷ Τρόποι να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι (α) η χρήση του homekit, με το οποίο ο ασθενής συλλέγει δύο δείγματα κοπράνων, τρεις συνεχόμενες φορές και (β) η χρήση ανοσοϊστοχημείας, η οποία όμως μειώνει την ειδικότητα της μεθόδου.⁸

Μία άλλη τεχνική έγκαιρης διάγνωσης του ΟΚΚ είναι η σιγμοειδοσκόπηση. Η σιγμοειδοσκόπηση επιτρέπει τον έλεγχο του σιγμοειδούς, του ορθού και του πρωκτού, περιοχές όπου αναπτύσσονται το 60% των καρκίνων και των αδενωμάτων του παχέος εντέρου. Η δυνατότητα λήψης βιοψιών κατά τη διάρκεια της σιγμοειδοσκόπησης για την ιστολογική διάγνωση της νόσου είναι ένα από τα πλεονεκτήματά της. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι με τη χρήση της σιγμοειδοσκόπησης μειώνεται η επίπτωση αλλά και η θνητότητα από ΟΚΚ κατά 60-80%.^{9, 10} Στις ΗΠΑ προτείνεται η πραγματοποίηση μίας σιγμοειδοσκόπησης κάθε πέντε χρόνια σε ασθενείς άνω των πενήντα ετών.¹¹ Επιπλέον, η εισαγωγή της χρήσης της στην κλινική πρακτική μία και μόνο φορά σε ασθενείς εξήντα ετών μελετάται στην Ευρώπη.^{12, 13}

Η κολonosκόπηση ενδείκνυται για τον έλεγχο μεγαλύτερου μέρους του παχέος εντέρου εφόσον η σιγμοειδοσκόπηση δείξει αδενώματα ή προκαρκινικές αλλοιώσεις στο έντερο. Χρειάζεται μεγαλύτερη προετοιμασία του εντέρου σε σχέση με την σιγμοειδοσκόπηση, ενώ ελλοχεύει ο κίνδυνος περισσότερων και σοβαρότερων επιπλοκών, όπως διάτρηση εντέρου,

αιμορραγία, λοιμώξεις κ.α.¹¹ Στις ΗΠΑ προτείνεται μία φορά κάθε δέκα χρόνια μετά τη συμπλήρωση 50 χρόνων ηλικίας, μολονότι δε μειώνει το ρίσκο καρκίνου του εγγύς παχέος εντέρου σημαντικά.^{14, 15}

Η υπολογιστική τομογραφία – κολονογραφία (computerized tomography-colonography), του εντέρου είναι μία τεχνική εναλλακτική της κολονοσκόπησης, αλλά η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω του ότι δεν είναι εφικτή η λήψη βιοψιών και εκθέτει τον ασθενή σε ακτινοβολία.^{8, 16} Επιπλέον, είναι μία αρκετά ακριβή εξέταση και συνεπώς είναι δύσκολο να εφαρμοστεί μαζικά στον πληθυσμό.¹⁷

Μελλοντικά, η ανίχνευση DNA με γενετική μεταλλαγή στο αίμα ή σε κόπρανα, καθώς και εξελιγμένες απεικονιστικές τεχνικές υπόσχονται καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την έγκαιρη ανίχνευση του ΟΚΚ.^{18, 19} Συμπερασματικά, δεν υπάρχει ακόμα μία ικανοποιητικά αποτελεσματική μέθοδος ή συνδυασμός μεθόδων για την έγκαιρη διάγνωση του ΟΚΚ. Ο συνδυασμός αποτελεσματικότητας και χαμηλού κόστους μένει να βρεθεί μέσα από μεγάλες, πολυκεντρικές, τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες.²⁰

1.4 Σταδιοποίηση ΟΚΚ και ιστοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες

Το σύστημα σταδιοποίησης που χρησιμοποιείται περισσότερο στον ΟΚΚ είναι το TNM (Πίνακας 3, σελίδα 16). Το TNM ενημερώνεται διαρκώς, έχει διεπιστημονικό σχεδιασμό και ένα περιεκτικό σύνολο κανόνων που εξασφαλίζουν την ομοιόμορφη χρήση. Επιπλέον του συστήματος ταξινόμησης TNM, υπάρχουν και τα συστήματα κατά Dukes και κατά MAC που βασίζονται στο TNM (Πίνακας 4).

Η πρόγνωση αλλά και η θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς με ΟΚΚ βασίζεται τόσο στο στάδιο της νόσου όσο και στα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά του όγκου. Στην ιστολογική έκθεση του χειρουργικού παρασκευάσματος πρέπει να αναφέρονται οι απαραίτητες πληροφορίες. Συγκεκριμένα:

(α). Το βάθος διήθησης ή επέκταση του όγκου στο τοίχωμα του παχέος εντέρου (T)

(β). Ο αριθμός ανευρεθέντων και διηθημένων λεμφαδένων (N). Προτείνεται ο ελάχιστος αριθμός λεμφαδένων που πρέπει να εξετάζονται για τον ακριβή προσδιορισμό του σταδίου του ΟΚΚ να είναι δώδεκα.^{21,22}

(γ). Προεγχειρητικά επίπεδα καρκινο-εμβρυικού αντιγόνου (CEA). Έχει δειχτεί ότι ασθενείς με αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα CEA, έχουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλά επίπεδα CEA.²²

(δ). Βαθμός διαφοροποίησης του όγκου. Η ιστολογική διαφοροποίηση του καρκινώματος κατά Compton και συνεργατών γίνεται με βάση το ποσοστό των αδενικών σχηματισμών (<50 και <50%) και διακρίνονται σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας και υψηλού βαθμού κακοήθειας.²³ Η πλειονότητα των συστημάτων κατατάσσουν τους όγκους σε 3 ή 4 κατηγορίες (Βαθμός κακοήθειας 1: όγκοι υψηλής (καλής) διαφοροποίησης, Βαθμός 2: μέτριας διαφ/σης, Βαθμός 3: χαμηλής διαφ/σης, Βαθμός 4: αδιαφοροποίητοι όγκοι). Ενδεχομένως, η εφαρμογή μίας ταξινόμησης 2 βαθμίδων (χαμηλού βαθμού κακοήθειας για όγκους υψηλής (καλής) και μέτριας διαφοροποίησης, και υψηλού βαθμού κακοήθειας για χαμηλής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητους όγκους), να πλεονεκτεί όπως αναφέρεται στη μελέτη των Compton και συνεργατών.²³

(ε). Κατάσταση των εγγύς, απομακρυσμένων και περιμετρικών ορίων εκτομής. Η απόσταση μεταξύ του ορίου του μαλακού ιστού και του όγκου πρέπει να εκτιμάται σε όλο το τμήμα του ιστολογικού παρασκευάσματος που δεν καλύπτεται από περιτόναιο. Το οπίσθιο περιμετρικό όριο ορίζεται ως η απόσταση του όγκου από το εν τω βάθει χειρουργικό όριο στην περιοχή του ορθού όπου δεν υπάρχει περιτόναιο (mesorectal). Σε καρκινώματα του ορθού πρέπει να γίνεται περιγραφή της ολικής ή μη αφαίρεσης του μεσοορθού. Η ολική αφαίρεση του μεσοορθού φαίνεται να μειώνει το ποσοστό υποτροπής του καρκινώματος του ορθού. Θεωρείται: -Πλήρης αφαίρεση όταν η επιφάνεια του είναι λεία, ομαλή, χωρίς ελλείμματα ή με έλλειμμα που να μην υπερβαίνει τα 5mm. -Μέτρια όταν αναγνωρίζεται η κυρία μάζα του μεσοορθού αλλά η επιφάνεια του είναι ανώμαλη ή το μεσοορθό έχει την μορφή κώνου με την κορυφή του προς το άπω χειρουργικό όριο. -Τέλος ατελής όταν υπάρχουν μεγάλα ελλείμματα με αποτέλεσμα την παρουσία ανώμαλων περιμετρικών ορίων εκτομής ή και παρουσία περιοχών με ορατό το μυϊκό τοίχωμα. Επίσης περιγραφή του περιμετρικού ορίου εκτομής (απόσταση σε χιλιοστά). Η διήθηση του περιμετρικού ορίου εκτομής παίζει σημαντικό ρόλο στην υποτροπή του καρκινώματος του ορθού.²⁴ Ο

κίνδυνος τοπικής υποτροπής είναι αυξημένος όταν ο όγκος βρίσκεται λιγότερο από ένα ή δύο χιλιοστά (mm) από την επιφάνεια του παρασκευάσματος που δεν καλύπτεται από περιτοναϊκή μεμβράνη. Σε περιπτώσεις που ο όγκος βρίσκεται εγγύτερα των 2mm τότε το περιφερικό όριο της εκτομής είναι θετικό.

(στ). Διήθηση αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων. Η διήθηση αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων είναι ανεξάρτητος παράγοντας κακής πρόγνωσης.^{24,25}

(ζ). Περινευρική διήθηση. Η παρουσία περινευρικής διήθησης σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Ειδικότερα για ασθενείς με ΟΚΚ σταδίου II κατά Dukes, εκείνοι οι ασθενείς που ο όγκος τους είχε περινευρική διήθηση έχουν μία σημαντικά μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση (PFS) σε σύγκριση με εκείνους, που δεν έχουν.²⁶⁻²⁸

(η). Ελεύθερες εστίες καρκινώματος. Εξωλεμφαδενικές καρκινικές εναποθέσεις. Καρκινικές εναποθέσεις στον υπο-ορογόνο ιστό, μεσεντέριο ή στους περικολικούς και περιορθικούς ιστούς που δεν καλύπτονται από περιτόναιο είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας.²⁹⁻

³²

(θ). Μικρο-δορυφορική αστάθεια του γενετικού υλικού (micro-satellite instability high, MSI-H). Βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού αναγνωρίζονται από λανθασμένη ακολουθία νουκλεοτιδίων (σφάλματα αντιγραφής). Τα σφάλματα αντιγραφής αναγνωρίζονται από αλλαγές (αστάθεια) σε κληρονομούμενα πρότυπα απλών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (μικροδορυφόροι) που απαντώνται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος. Όταν οι αλλαγές αυτές είναι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% των μικροδορυφορικών δεικτών που εξετάζονται τότε οι όγκοι έχουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H). Αντιθέτως, όταν οι αλλαγές είναι σε ποσοστό μικρότερο του 30% οι όγκοι χαρακτηρίζονται ως MSI-low (MSI-L) ή micro-satellite stable (MSS). Οι MSI-H όγκοι φαίνεται να έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με MSI-L και MSS όγκους.³³

(ι). Μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS είναι προβλεπτικές για την ανταπόκριση σε μονοκλωνικά αντισώματα αντί-EGFR.³⁴⁻³⁵

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε και η προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ) στο αίμα. Η ύπαρξη ΚΚΚ στο αίμα προ-εγχειρητικά είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας.³⁶

Συμπερασματικά, τα υπάρχοντα εργαλεία για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αλλά και την πρόγνωση του ασθενούς με ΟΚΚ είναι σημαντικά. Σε πολλές περιπτώσεις όμως είναι ανεπαρκή και δεν αναγνωρίζουν ασθενείς που δεν θα έχουν όφελος από νεότερες αντι-καρκινικές θεραπείες. Το αποτέλεσμα είναι η επιβάρυνση των ασθενών με σημαντικές παρενέργειες αλλά και το μεγάλο κόστος της θεραπείας χωρίς ουσιαστικό όφελος. Υπάρχει άμεση ανάγκη για εμπλουτισμό των υπάρχοντων προγνωστικών και προβλεπτικών παραμέτρων με καινούργιους δείκτες, κάτι που η παρούσα διατριβή πραγματεύεται.

Πρωτοπαθής εστία (T)	
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Απουσία στοιχείων πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα ενδοεπιθηλιακό ή ενδοβλεννογόνο (in-situ)
T1	Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνο χιτώνα
T2	Ο όγκος διηθεί τον μυικό χιτώνα
T3	Ο όγκος ξεπερνά το μυικό χιτώνα και διηθεί τον υπο-ορογόνο ιστό ή τους μη καλυπτόμενους από περιτόναιο περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς
T4a	Ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο
T4b	Ο όγκος προσκολλάται ή διηθεί άλλα όργανα ή δομές
Επιχώριοι λεμφαδένες (N)	
Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Απουσία επιχώριας λεμφαδενικής μετάστασης
N1	Μετάσταση σε έναν έως τρεις λεμφαδένες
N1a	Μετάσταση σε ένα περιοχικό λεμφαδένα
N1b	Μετάσταση σε δυο ή τρεις περιοχικούς λεμφαδένες
N1c	Καρκινική εναπόθεση στον υπο-ορογόνο ιστό, μεσεντέριο ή στους μη-καλυπτόμενους από περιτόναιο περικολικούς ιστούς, χωρίς μετάσταση σε περιοχικούς λεμφαδένες
N2	Μετάσταση σε τέσσερις ή περισσότερους λεμφαδένες
N2a	Μετάσταση σε τέσσερις μέχρι έξι λεμφαδένες
N2b	Μετάσταση σε επτά ή περισσότερους περιοχικούς λεμφαδένες
Απομακρυσμένη μετάσταση (M)	
Mx	Η απουσία απομακρυσμένης μετάστασης δεν μπορεί να προσδιοριστεί
M0	Απουσία απομακρυσμένης μετάστασης
M1	Παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης
M1a	Παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης σε ένα όργανο (π.χ. ήπαρ, πνεύμονας)
<i>Πίνακας 3. Σύστημα σταδιοποίησης ΟΚΚ κατά TNM</i>	

ΣΤΑΔΙΟ	T	N	M	DUKE'S	MAC
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1-N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1-N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Κάθε T	Κάθε N	M1a	-	-
IVB	Κάθε T	Κάθε N	M1b	-	-

Πίνακας 4. Σταδιοποίηση ΟΚΚ κατά συστήματα Duke's και MAC

1.5 Προτεινόμενες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του ΟΚΚ.

Επιπλέον των σύγχρονων μεθόδων πρόληψης και έγκαιρης διάγνωσης, οι θεραπευτικές επιλογές για τον ΟΚΚ σε προχωρημένο στάδιο συνεχώς εξελίσσονται με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη επιβίωση και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των πασχόντων. Η χειρουργική εξαίρεση του όγκου παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας. Η εξέλιξη των χειρουργικών τεχνικών, όπως η λαπαροσκόπηση με τη χρήση μικροκάμερας, προσφέρουν αποτελεσματικότερη εξαίρεση του όγκου και επιπλέον, λιγότερες επιπλοκές και μικρότερο χρόνο νοσηλείας σε σύγκριση με παλαιότερες, συμβατικές μεθόδους.³⁷⁻³⁹ Ακόμη έχει διαπιστωθεί ότι η εξαίρεση μεταστάσεων από το ήπαρ ή/και τον πνεύμονα, όπου αυτή είναι δυνατή, αυξάνει τα ποσοστά 5ετούς και 10ετούς επιβίωσης των ασθενών.⁶

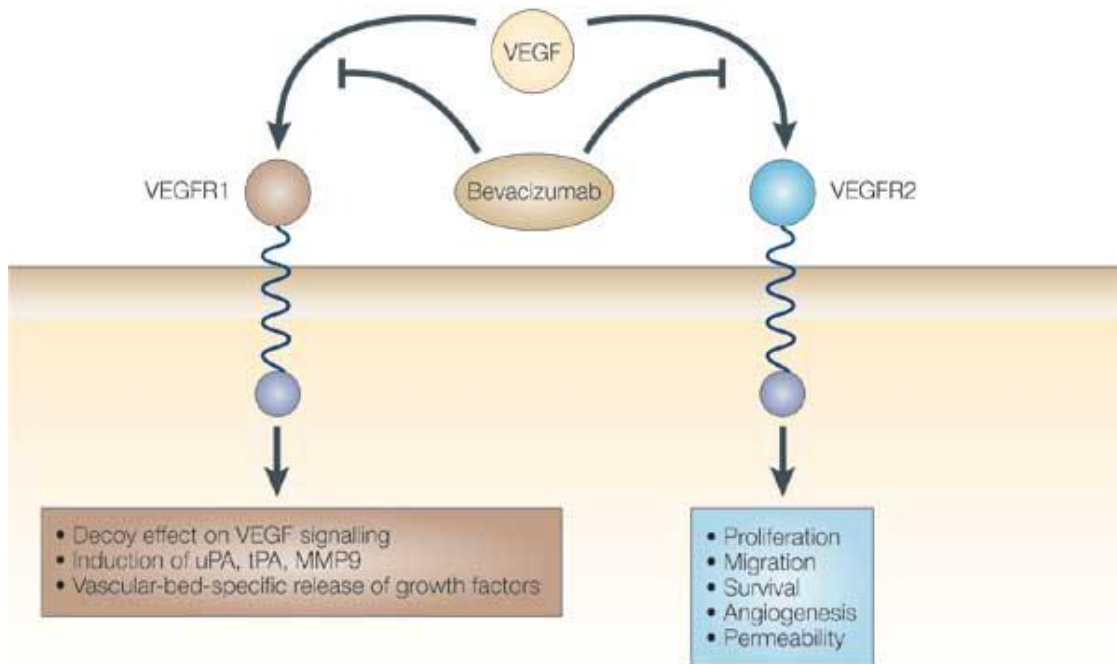
Χημειοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί (α) προ-εγχειρητικά, για τη σμίκρυνση των όγκων και τη χειρουργική τους εξαίρεση⁴⁰, (β) μετεγχειρητικά, ως συμπληρωματική θεραπεία για την αντιμετώπιση της μικροσκοπικής νόσου και τη μείωση του ρίσκου επανεμφάνισης του καρκίνου⁴¹ και (γ) για τη θεραπεία της μεταστατικής, μη χειρουργήσιμης νόσου. Η ενδοφλεβίως χορηγούμενη φλουορο-ουρακίλη (5FU) αποτελεί

το χημειοθεραπευτικό φάρμακο εκλογής για πολλές δεκαετίες. Όταν η 5FU χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με νεότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως η ιρινοτεκάνη (CPT-11) ή/και οξαλιπλατίνη (LOHP) τότε αυξάνεται η προσδοκώμενη διάμεση επιβίωση από 12 μήνες (μονοθεραπεία με 5FU) σε περίπου δύο χρόνια (συνδυασμός φαρμάκων).⁴² Η χρησιμοποίηση ταυτόχρονα και των τριών προαναφερθέντων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ενδείκνυται όταν στόχος είναι η σμίκρυνση των όγκων και η μετατροπή τους από μη χειρουργήσιμους σε χειρουργήσιμους.⁴³ Επιπλέον ασθενείς με καρκίνο του ορθού με διηθημένους λεμφαδένες που λαμβάνουν τον συνδυασμό 5FU και ακτινοβολίας (ακτινο-χημειοθεραπεία) προεγχειρητικά έχουν μειωμένο ρίσκο τοπικής υποτροπής σε σύγκριση με ασθενείς που λαμβάνουν ακτινο-χημειοθεραπεία μετεγχειρητικά.⁴⁴

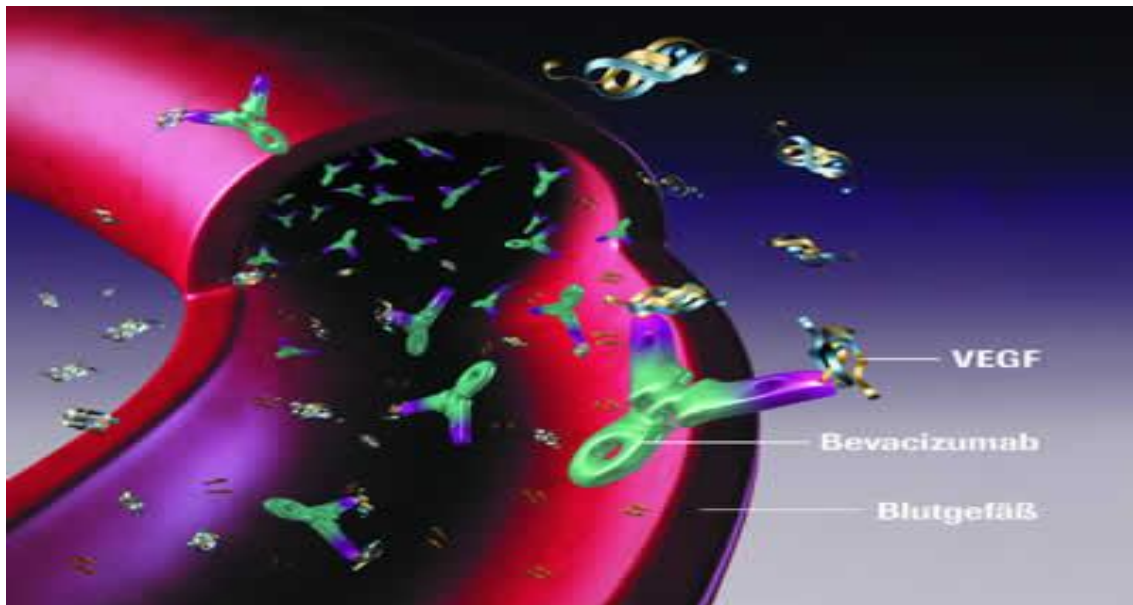
Μεγάλη πρόοδος στη φαρμακευτική αντιμετώπιση του ΟΚΚ έχει σημειωθεί με την ανάπτυξη και χρησιμοποίηση μίας νέας κατηγορίας φαρμάκων, των στοχευμένων θεραπειών. Οι στοχευμένες θεραπείες εμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων αναστέλλοντας ζωτικές τους λειτουργίες. Συγκεκριμένα, αναστέλλουν τη λειτουργία καρκινικών κυττάρων επηρεάζοντας λίγο έως καθόλου τα φυσιολογικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία επηρεάζουν όλα τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα, χωρίς να διακρίνουν τα υγιή από τα καρκινικά.

Το Bevacizumab (BEV) ήταν το πρώτο φάρμακο από την κατηγορία των στοχευμένων θεραπειών που έλαβε έγκριση για τη θεραπεία του μεταστατικού ΟΚΚ από τις αρμόδιες αρχές των ΗΠΑ (Food and Drug Administration - FDA). Πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αδρανοποιεί τον αυξητικό παράγοντα αγγειακού επιθηλίου (VEGF) (Εικόνα 1). Το VEGF είναι απαραίτητο για τη δημιουργία νέων αγγείων (αγγειογένεση), τα οποία προάγουν την ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου (Εικόνα 2). Το BEV, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με LOHP και 5FU, επιμηκύνει την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό ΟΚΚ που είχαν λάβει άλλη θεραπεία στο παρελθόν.⁴⁵ Άγνωστο παραμένει εάν η συνέχιση του BEV και μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας είναι επωφελής. Επιχειρήματα κατά της συνέχισης του BEV μετά τη χημειοθεραπεία είναι (α) η χαμηλή του αντικαρκινική δράση όταν χρησιμοποιείται μόνο του (χωρίς συνδυασμό με

χημειοθεραπεία)⁴⁵ και (β) η πιθανότητα επιπλοκών όπως η διάρρηξη εντέρου και η αυξημένη πιθανότητα αιμορραγίας αν και νεότερες μελέτες δείχνουν ότι είναι ασφαλές.⁴⁶

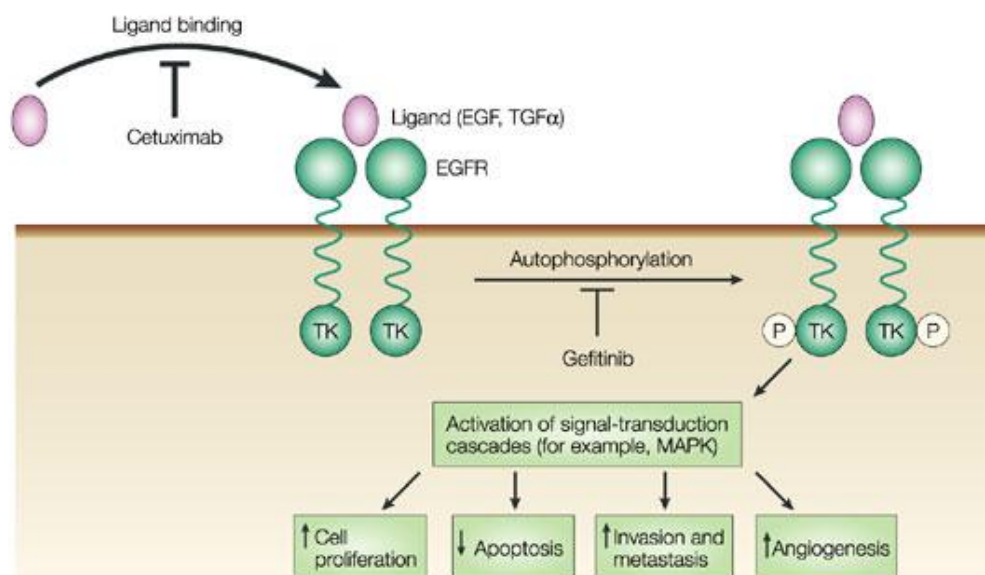


Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης του bevacizumab



Εικόνα 2. Το VEGF προάγει την αγγειογέννηση

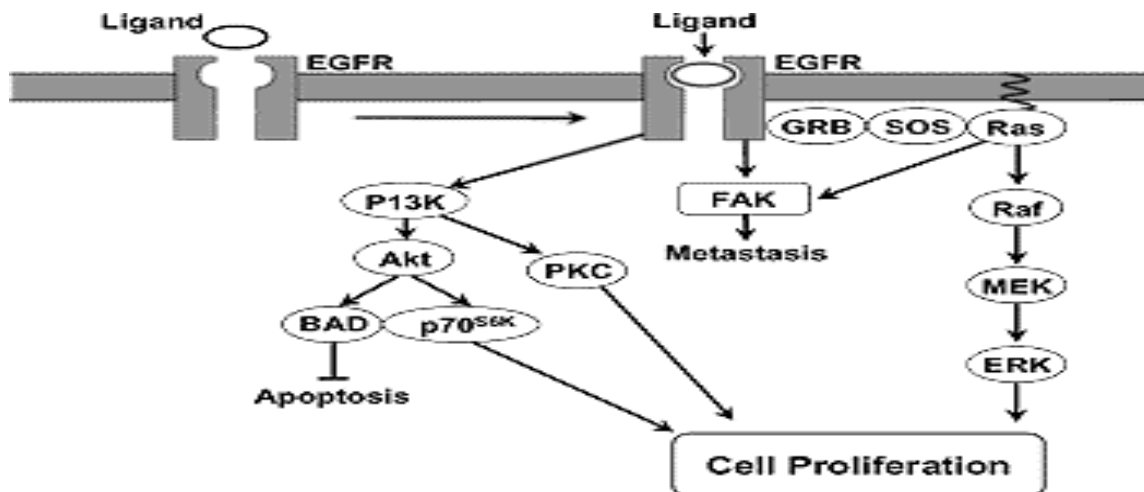
Ένα ακόμα μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του μεταστατικού ΟΚΚ είναι το Cetuximab (CET). Το CET προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR) με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του. Ο EGFR όταν είναι ενεργοποιημένος προάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και κατά συνέπεια, την επιβίωση και ανάπτυξη του όγκου. Ο EGFR, όπως και άλλοι υποδοχείς που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, ενεργοποιεί μία σειρά ενδοκυτταρικών αλληλουχιών που (α) βοηθάνε το καρκινικό κύτταρο αποτρέποντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, (β) αυξάνουν την ικανότητα του να μεταναστεύσει σε άλλα σημεία του σώματος με συνέπεια την ανάπτυξη μεταστάσεων και (γ) συμβάλλουν στην ανάπτυξη νέων αγγείων (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης του EGFR

Μία από τις ενδοκυτταρικές αλληλουχίες που ενεργοποιείται από τον EGFR είναι το μοριακό μονοπάτι των RAS-RAF-MEK-ERK, το οποίο προάγει την κυτταρική διαίρεση (Εικόνα 4). Το RAS είναι μια οικογένεια G πρωτεϊνών που αποτελείται από τρία μέλη, το KRAS, το HRAS και το NRAS. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η κατάσταση ενεργοποίησης του KRAS είναι προβλεπτικός παράγοντας για την ανταπόκριση στη θεραπεία με CET.⁴⁷ Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που έχουν το wild-type KRAS (wt-KRAS) (wild type –

φυσιολογικό) έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να ωφεληθούν από τη θεραπεία με αντί-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα σε σύγκριση με ασθενείς που έχουν υποστεί μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS (m-KRAS).⁴⁸ Ο αποδεδειγμένος ρόλος του KRAS ως προβλεπτικού παράγοντα οδήγησε στην υπόθεση ότι και άλλα μέλη του μοριακού μονοπατιού, ενδεχομένως, να έχουν προβλεπτική ή προγνωστική αξία σε ασθενείς με ΟΚΚ. (εικόνα 4)



Εικόνα 4. Ενδοκυττάριο μονοπάτι RAS-RAF

Στην παρούσα διατριβή θα μελετηθεί ο ρόλος της BRAF, πρωτεΐνης που συμμετέχει στο ίδιο μοριακό μονοπάτι με την KRAS όπως φαίνεται στην εικόνα 4 και άλλων μοριακών δεικτών ως προγνωστικών ή προβλεπτικών δεικτών στη θεραπεία ασθενών με ΟΚΚ.

1.6 Προβλεπτικοί και προγνωστικοί μοριακοί παράγοντες.

Έχουν γίνει προσπάθειες για την ανεύρεση προβλεπτικών και προγνωστικών μοριακών παραγόντων σε αρκετά καρκινώματα όπως για παράδειγμα στο μαστό. Είναι γνωστό ότι η έκφραση των οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών (PR) υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη καρκινικών κυττάρων του μαστού είναι προβλεπτική στη θεραπεία με αναστολείς των παραπάνω υποδοχέων, όπως η ταμοξιφένη (TAM)⁴⁹ και αναστολείς της αρωματάσης, όπως η αναστροζόλη (ANA).⁵⁰ Ομοίως, η υπερέκφραση του HER2 υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη κυττάρων καρκίνου του μαστού λειτουργεί ως προβλεπτικός παράγοντας στη θεραπεία με το αντίσωμα-αναστολέα του HER2, Trastuzumab (TRA)⁵¹

καθώς και στη θεραπεία με το μικρομοριακό αναστολέα των EGFR και HER2, Lapatinib (LAP).⁵² Στις δύο παραπάνω περιπτώσεις η έκφραση των ER και PR όπως και η υπερέκφραση του HER2 στην κυτταρική μεμβράνη καρκινικών κυττάρων έχουν μεγάλη αξία στην επιλογή της θεραπείας για ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Αντίστοιχα, οι προγνωστικοί μοριακοί παράγοντες κατατάσσουν ασθενείς με τον ίδιο τύπο καρκίνου σε ομάδες υψηλής ή χαμηλής επιβίωσης. Η αξία των προγνωστικών παραγόντων έγκειται στο ότι αναγνωρίζονται υπο-ομάδες ασθενών οι οποίοι δεν χρειάζονται θεραπεία ή αντιστοίχως υπο-ομάδες ασθενών που χρειάζονται πιο εντατική θεραπεία. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ότι ασθενείς με ΟΚΚ σε στάδιο κατά Dukes B, δεν ωφελούνται από συμπληρωματική χημειοθεραπεία όταν έχουν υψηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) στο γενετικό τους υλικό (DNA).⁵³

Στην παρούσα διατριβή θα διερευνηθεί η χρήση μοριακών παραγόντων ως προβλεπτικοί ή/και προγνωστικοί παράγοντες σε ασθενείς με μεταστατικό ΟΚΚ. Συγκεκριμένα θα μελετηθούν η μικρο-δορυφορική αστάθεια του DNA (microsatellite instability – MSI), η κατάσταση ενεργοποίησης της πρωτεΐνης BRAF και η έκφραση της κυκλίνης D1, μίας πρωτεΐνης με κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στην συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί ο συσχετισμός τους με την αναταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό ΟΚΚ.

1.6.1 Το μοριακό μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK

Ο EGFR είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας που αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα το οποίο ενώνεται με διάφορα ligands, και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με καταλυτική δράση. Η ένωση του ligand με το εξωκυττάριο τμήμα έχει ως αποτέλεσμα ο υποδοχέας να δημιουργεί διμερή που με τη σειρά τους οδηγούν στη φωσφορυλίωση της τυροσινικής κινάσης. Η φωσφορυλιωμένη πλέον τυροσινική κινάση ενεργοποιεί διάφορα ενδοκυττάρια μοριακά μονοπάτια. Ένα από τα μοριακά μονοπάτια που έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών είναι το RAS-RAF-MEK-ERK.

Οι RAS είναι οικογένεια από πρωτεΐνες που δεσμεύουν μόρια δι- και τριφωσφορικής γουανίνης με τρία κυρίως μέλη (α) HRAS, (β) NRAS και (γ) KRAS, τα οποία ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των G πρωτεϊνών.⁵⁴ Η πρωτεΐνη KRAS βρίσκεται είτε στην ανενεργή μορφή

της (wt-KRAS) είτε στην μόνιμα ενεργοποιημένη-μεταλλαγμένη μορφή της. Για να ενεργοποιηθεί το wt-KRAS απαιτείται ερέθισμα από εξωκυττάριους αυξητικούς παράγοντες. Έλλειψη ερεθίσματος αφήνει το wt-KRAS σε μή ενεργή μορφή. Ογκογενετικές μεταλλάξεις της KRAS έχουν τη δυνατότητα να τη διατηρούν σε ενεργή μορφή χωρίς την ύπαρξη ερεθίσματος.⁵⁴ Πράγματι, τέτοιες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο 30% των καρκίνων, ενώ ειδικότερα για τον καρκίνο του παγκρέατος και τον ΟΚΚ τα ποσοστά αυτά ανέρχονται σε 90% και 40-45%, αντίστοιχα.^{55,56} Οι περισσότερες μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη KRAS είναι σημειακές μεταλλάξεις στις θέσεις 12,13,61 στις οποίες εδράζονται στα εξώνια 1 και 2. Οι μεταλλαγμένες KRAS πρωτεΐνες είναι ανθεκτικές και δεν απενεργοποιούνται οδηγώντας το κύτταρο σε κατάσταση μή ελεγχόμενου πολλαπλασιασμού. Οι ογκογενετικές ιδιότητες των παραπάνω μεταλλάξεων έχουν τεκμηριωθεί σε προκλινικές μελέτες.⁵⁷⁻⁵⁹ Επιπλέον των μεταλλάξεων, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης KRAS μπορεί να έχει επίσης ογκογενετικές ιδιότητες. Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με καρκίνο του μαστού και υπερέκφραση της RAS έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς που την δεν υπερεκφράζουν.^{58,59}

Η συχνότητα της μετάλλαξης του γονιδίου RAS σε διάφορους καρκίνους κίνησε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών να μελετήσουν ουσίες που θα μπορούσαν να αναστείλουν την λειτουργία του και συνεπώς να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς. Αρκετές στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί προς αυτή την κατεύθυνση, όπως (α) ουσίες που αναστέλλουν την ενεργοποίηση των διαφόρων εξωκυττάριων υποδοχέων που ενεργοποιούν την RAS, όπως το CET, (β) ουσίες που επιδρούν στην παραγωγή της RAF είτε σε επίπεδο DNA είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης και, τέλος (γ) ουσίες που αναστέλλουν το μοριακό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την RAS, για παράδειγμα το ERK ή τη RAF, την πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από το KRAS.^{56,60-62} Επιπλέον, η RAF μπορεί να είναι ενεργοποιημένη ανεξάρτητα από το RAS, για παράδειγμα όταν έχει υποστεί μετάλλαξη.⁶³ Υπάρχουν τρεις τύποι RAF πρωτεΐνης ονομαστικά η ARAF, BRAF και CRAF. Η πρωτεΐνη ARAF υπερεκφράζεται σε ουρογεννητικούς ιστούς, η BRAF σε νευρικό και αιματοποιητικό ιστό και η CRAF στους περισσότερους ιστούς.⁶⁴

Μεταλλάξεις του γενετικού υλικού των RAF πρωτεϊνών, όπως σημειακές μεταλλάξεις, αφαιρέσεις και πολλαπλασιασμοί είναι μερικοί από τους λόγους που οι RAF πρωτεΐνες

είναι υπερενεργές. Τέτοιες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε ασθενείς με μελάνωμα και πιο πρόσφατα σε ασθενείς με ΟΚΚ. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις των RAF γονιδίων σπάνια (αν όχι ποτέ) συμπίπτουν με μεταλλάξεις στη RAS στον ίδιο ασθενή. Η ύπαρξη υπερενεργών RAF πρωτεϊνών σε διάφορους όγκους την καθιστά ένα ενδιαφέρον στόχο για την παραγωγή νέων φαρμακευτικών ουσιών που θα αναστέλλουν τις παραπάνω πρωτεΐνες.⁶⁴

Ειδικότερα, στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF, μεταλλάξεις αλλαγής του νοήματος (missence mutations) με την αντικατάσταση της βαλίνης από το ασπαρταμικό οξύ στην εξηκοσιοστή θέση της αμινοξικής αλυσού (V600E), η οποία βρίσκεται στην περιοχή της κινάσης της BRAF, ευθύνεται για περισσότερες από το 80% των μεταλλάξεών της. Επιπλέον της ύπαρξης της V600E σε ιστούς ορθοκολικού καρκίνου, αυτή βρίσκεται και σε ιστούς από μελάνωμα και καρκίνο του θυρεοειδούς.⁶⁵⁻⁶⁶ Σε μία αναδρομική μελέτη σε ασθενείς με σποραδικό ΟΚΚ η συχνότητα της μετάλλαξης V600E ήταν 8% και βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το διάστημα ελεύθερο νόσου (progression free survival - PFS) και την συνολική επιβίωση.⁶⁷ Ομοίως, σε μία άλλη μελέτη οι ερευνητές έδειξαν ότι η μετάλλαξη του BRAF στην θέση V600E (m-BRAF) συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς που έλαβαν αντισώματα έναντι του υποδοχέα EGFR.⁶⁸

Το πιο γνωστό από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην ογκολογία και έχει δράση έναντι του μεταλλαγμένου BRAF είναι το Sorafenib (SOR). Το SOR είναι ένας ισχυρός μικρομοριακός αναστολέας πολλών τυροσινικών κινασών και ειδικότερα (α) των κινασών των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου τύπου 1, 2 και 3 (VEGFR 1,2,3), (β) των κινασών των υποδοχέων του προερχόμενου από αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα τύπου β (PDGFR-β), και (γ) της κινάσης του BRAF.⁶⁹

Το SOR έχει λάβει έγκριση από την FDA και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) για τη χρησιμοποίησή του στην θεραπεία του νεφροκυτταρικού και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η έγκριση δόθηκε βασιζόμενη στα αποτελέσματα μίας μεγάλης, πολυκεντρικής, κλινικής μελέτης φάσης III.⁷⁰ Η μελέτη αυτή ανέλυσε την επιβίωση και την ανταπόκριση στην θεραπεία 769 ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνο που έλαβαν SOR. Τα αποτελέσματα όπως δημοσιεύτηκαν έδειξαν μείωση στο ρίσκο επιδείνωσης της νόσου

κατά 56%. Ειδικότερα, η PFS ασθενών που έλαβαν SOR (ομάδα Α) ήταν διπλάσια σε σχέση με αυτή ασθενών (ομάδα Β) που έλαβαν το εικονικό (placebo) φάρμακο (5.6 μήνες και 2.8 μήνες αντίστοιχα). Η επιβίωση ασθενών στην ομάδα Α ήταν καλύτερη σε σχέση με την επιβίωση στους ασθενείς στην ομάδα Β, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.⁷⁰

Το μελάνωμα είναι ένας από τους κακοήθεις όγκους στους οποίους η πρωτεΐνη BRAF είναι συχνά υπερενεργοποιημένη.⁶⁵ Βασιζόμενοι στο παραπάνω γεγονός, ερευνητές δοκίμασαν τη χρησιμοποίηση του SOR σε ασθενείς με μελάνωμα. Συγκεκριμένα, σε μία κλινική μελέτη φάσης II το SOR είχε μη αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς κανένας ασθενής δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία και η PFS ήταν μόλις 2.8 μήνες.⁷¹ Σε μία πιο πρόσφατη κλινική μελέτη φάσης III, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάστηκαν στο διεθνές συνέδριο της Αμερικάνικης Εταιρίας Κλινικής Ογκολογίας (ASCO) το 2010, το SOR δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία σε ασθενείς με μελάνωμα. Η ομάδα ασθενών που έλαβε SOR σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία δεν είχε κανένα πλεονέκτημα σε σχέση με την ομάδα ασθενών που έλαβε μόνο χημειοθεραπεία.⁷² Τέλος, το SOR δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με temozolamide (TEM) σε μία κλινική μελέτη φάσης II. Τα αποτελέσματα όπως και στις προηγούμενες προσπάθειες δεν ήταν ενθαρρυντικά αν και οι ερευνητές αναφέρουν ότι πρέπει να γίνουν μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες για να υπάρχουν ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού SOR και TEM σε ασθενείς με μελάνωμα. Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι η δραστηριότητα του SOR ήταν ανεξάρτητη της κατάστασης της BRAF (μεταλλαγμένη ή όχι) στους ιστούς των ασθενών.⁷³

Μερικοί από τους λόγους για τους οποίους το SOR δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα στην θεραπεία ασθενών με μελάνωμα είναι (α) Το SOR είναι αναστολέας της BRAF και η αντικαρκινική του δράση ασκείται κυρίως μέσω της αντι- νεοαγγειογενετικής δράσης του, (β) αναστολή της BRAF μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση άλλων μοριακών μονοπατιών που αναλαμβάνουν να διατηρούν τις λειτουργίες της BRAF στο κύτταρο.

Μελέτες με νέα φάρμακα-αναστολείς της λειτουργίας της m-BRAF έχουν παράγει ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη θεραπεία ασθενών με μελάνωμα. Πιο συγκεκριμένα, ο

αναστολέας του BRAF με την κωδική ονομασία PLX4032 (Vemurafenib –VEM) είχε εντυπωσιακά αποτελέσματα σε μελέτη φάσης Ι.⁷⁴ Στην φάση επέκτασης της μελέτης, από τους 32 ασθενείς που συμμετείχαν οι 24 παρουσίασαν μερική συρρίκνωση του όγκου (PR) και δύο ασθενείς παρουσίασαν εξαφάνιση της μακροσκοπικής νόσου (complete response - CR). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά πραγματοποιούνται σήμερα μεγαλύτερες μελέτες του PLX4032.⁷⁴

Τα αποτελέσματα της μελέτης των Flaherty και συνεργατών συνοδεύτηκαν από μια παρατήρηση που προκάλεσε προβληματισμό στους ερευνητές. Συγκεκριμένα το 25% των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη παρουσίασαν προκαρκινικές αλλοιώσεις του δέρματος (κερατοακανθώματα) ενώ ένας μικρότερος αριθμός ασθενών εμφάνισε πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος. Και στις δύο περιπτώσεις οι δερματικές αλλοιώσεις υποχώρησαν με την διακοπή του υπό μελέτη φαρμάκου.⁷⁴ Τρεις προκλινικές μελέτες επιχείρησαν να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό βασιζόμενες στην παρατήρηση ότι μολονότι φάρμακα αναστολείς του μεταλλαγμένου BRAF, όπως το PLX4032, απενεργοποιούν το μοριακό μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK, σε κάποιες περιπτώσεις ενεργοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια την καρκινογένεση. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK από φάρμακα αναστολείς του μεταλλαγμένου BRAF γίνεται πιο συχνά σε κύτταρα όγκων με μετάλλαξη στο KRAS αλλά χωρίς μετάλλαξη στο BRAF (wt BRAF).

Άλλοι αναστολείς της BRAF που δοκιμάζονται σε κλινικές μελέτες που συμμετέχουν ασθενείς με ΟΚΚ παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Τίτλος μελέτης	Ουσία	Κατάσταση μελέτης
<i>A Study of RO5212054 (PLX3603) in Patients With BRAF V600-mutated Advanced Solid Tumours</i>	Επιλεκτικός αναστολέας του V600 BRAF	Recruiting
<i>A Phase I Study of Oral LGX818 in Adult Patients With Advanced or Metastatic BRAF Mutant Melanoma</i>	Επιλεκτικός αναστολέας του V600 BRAF	Recruiting (ασθενείς με ΟΚΚ θα εντασσονται στη μελέτη στο δεύτερο σκέλος της (expansion arm))
<i>Study of XL281 in Adults With Solid Tumors</i>	Αναστολέας πολλαπλών raf κινασών όπως BRAF, CRAF και της V600 BRAF μετάλλαξης	Recruiting
<i>Πίνακας 5. Κλινικές μελέτες σε εξέλιξη με μόρια αναστολείς του μεταλλαγμένου BRAF που συμπεριλαμβάνουν ασθενείς με ΟΚΚ</i>		

Συμπερασματικά, το μοριακό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη BRAF είναι συχνά ενεργοποιημένο σε ασθενείς με κακοήγη νόσο, αλλά ο ρόλος του σε ασθενείς με ΟΚΚ δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της πρωτεΐνης BRAF όσον αφορά τον προγνωστικό της ρόλο σε συνδυασμό με άλλους μοριακούς δείκτες.

1.6.2 Μικρο-δορυφορική αστάθεια του DNA (micro satellite instability-MSI)

Η φυσική εξέλιξη του ΟΚΚ δεν είναι ίδια σε όλες τις περιπτώσεις. Αντίθετα, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην επιβίωση ασθενών με ΟΚΚ ίδιου σταδίου και ίδιου βαθμού κακοήθειας. Πράγματι, μοριακή ανάλυση των όγκων έδειξε ότι υπάρχει ανομοιογένεια στο γενετικό υλικό σε μακροσκοπικά όμοιους όγκους. Έχουν αναδειχτεί μοριακοί παράγοντες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν είτε για την επιλογή ασθενών σε κατάλληλες θεραπείες -προβλεπτικοί παράγοντες- είτε ως προγνωστικοί παράγοντες. Ένας από τους πιο πολλά υποσχόμενους μοριακούς παράγοντες ή δείκτες, είναι η μικρο-δορυφορική αστάθεια του DNA (MSI-H). Περίπου το 15% των περιπτώσεων σποραδικού ΟΚΚ χαρακτηρίζεται ως microsatellite instability-high (MSI-H).⁷⁵ Οι όγκοι με MSI-H έχουν μεταλλαγμένα, μη λειτουργικά γονίδια επιδιόρθωσης βάσεων του DNA (defective mismatch repair πρωτεΐνες -d-MMR) ενώ όγκοι με MSI-S ή MSI-L (micro-satellite stable και microsatellite low) έχουν λειτουργικά γονίδια επιδιόρθωσης βάσεων του DNA (p-MMR).⁷⁶ Το MMR είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA. Όγκοι με d-MMR πιο συχνά βρίσκονται κοντά στο ανιόν κόλον, είναι βλενωδείς, χαμηλής διαφοροποίησης και έχουν σημαντική λεμφοκυτταρική διήθηση.⁷⁷ Ακόμη, σε αντίθεση με τους p-MMR όγκους οι οποίοι είναι συχνά ανευπλοειδικοί, οι d-MMR διατηρούν την διπλοειδική τους κατάσταση.⁷⁷ Το μοριακό υπόστρωμα των d-MMR όγκων δημιουργείται από την μειωμένη έκφραση αρκετών γονιδίων. Έλλειψη των πρωτεϊνών MLH1, MSH2 και MSH6 είναι ο πιο συχνός λόγος που ένα κύτταρο γίνεται d-MMR.⁷⁸ Η υπερμεθυλίωση της προαγωγού αλληλουχίας του γονιδίου hMLH1 (hypermethylation of promoter region of gene) ευθύνεται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων για την έλλειψη των προαναφερθεισών πρωτεϊνών.⁷⁸

Η προγνωστική αξία του MSI και κατά επέκταση του MMR έχει διερευνηθεί σε πλήθος μελετών. Πολλές αναδρομικές μελέτες και μία μετα-ανάλυση έχουν δείξει ότι ασθενείς με

d-MMR έχουν καλύτερη επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς με p-MMR με ΟΚΚ ίδιου σταδίου.⁷⁹ Η μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε 32 μελέτες με 7.642 ασθενείς. Μελέτες που δεν ανέφεραν διάμεση επιβίωση δεν συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ασθενείς με d-MMR έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με ασθενείς με p-MMR.⁷⁹

Η χρήση του MSI ως προβλεπτικού δείκτη έχει εφαρμογή σε ασθενείς που λαμβάνουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία (adjuvant). Τα δεδομένα, όμως, είναι αντικρουόμενα. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με MSI-H (ομάδα Α) δεν ωφελούνται από την συμπληρωματική χημειοθεραπεία σε σύγκριση με ασθενείς που είναι MSI-L/S (ομάδα Β). Αυτό αμφισβητείται από άλλες μελέτες οι οποίες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών η, ακόμα, ότι οι ασθενείς της ομάδας Α έχουν μεγαλύτερο όφελος. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα ήταν προϊόντα μη τυχαιοποιημένων μελετών. Πρόσφατα, μια μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε τέσσερις τυχαιοποιημένες μελέτες, έδωσε σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την προβλεπτική χρησιμότητα του MSI. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές έδειξαν ότι ασθενείς με στάδιο ΟΚΚ Dukes Β και MSI-H, δεν οφελούνται από συμπληρωματική θεραπεία με 5FU. Μία ακόμη μελέτη που συμπεριέλαβε δείγματα ιστών από 2141 ασθενείς με ΟΚΚ και έδειξε ότι μόνο ασθενείς με στάδιο νόσου ΙΙΙ είχαν όφελος όταν έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία σε σχέση με ασθενείς που απλά μπήκαν σε πρωτόκολλο παρακολούθησης της νόσου.⁸⁰

1.6.3 Κυτταρική διαίρεση - Κυκλίνη D (Cyclin D)

Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε τέσσερα στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι το στάδιο αδράνειας του κυττάρου (G1), στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA (S), το τρίτο στάδιο (G2), και στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του κυττάρου σε δύο κύτταρα με μία διαδικασία που ονομάζεται μίτωση (M).⁸¹ Η φάση G1 είναι το σημείο στάσης για κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται παραμένοντας σε αυτή την κατάσταση μέχρι να λάβουν το ερέθισμα για να αρχίσει η διαδικασία πολλαπλασιασμού. Η μετάβαση της κατάστασης του κυττάρου από την φάση G1 στην επόμενη φάση S καθορίζεται από δύο οικογένειες πρωτεϊνών τις κυκλίνες D και E.⁸¹ Η οικογένεια των κυκλινών D έχει τρία μέλη, τις κυκλίνες D1, D2 και D3. Οι D κυκλίνες ενώνονται με τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες (cyclin- dependent kinases – CDK),

σχηματίζοντας ετεροδιμερή ολοένζυμα που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma protein – Rb) καθιστώντας την ανενεργή και επιτρέποντας, έτσι, στο κύτταρο να περάσει από την φάση G1 στην φάση S αρχίζοντας τις διαδικασίες πολλαπλασιασμού του.⁸¹

Ειδικότερα, η κυκλίνη D1 έχει αυξημένη ευαισθησία σε ερεθίσματα αυξητικών παραγόντων. Η έκφραση της έχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πολλών ειδών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των αιμοποιητικών, των μυοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων.⁸² Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της κυκλίνης D1 εξαρτάται από την ενεργοποίηση ογκογενετικών μονοπατιών όπως για παράδειγμα μεταλλάξεις του RAS-RAF-ERK.⁸³ Πράγματι, σε προκλινικές μελέτες με γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, τα οποία δεν είχαν κυκλίνη D1, διαπιστώθηκε ότι τα ζώα είχαν λιπώδες ήπαρ, δυσπλασίες στο μαζικό ιστό και δυσλειτουργούντα μακροφάγα κύτταρα.⁸⁴ Ανάλυση διαγονιδιοματικών ποντικών που είχαν υποστεί γενετική εξάλειψη μηχανισμών απαραίτητων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έδειξαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα αναφορικά με τον ρόλο της κυκλίνης D1. Συγκεκριμένα, τα ποντίκια ήταν ανθεκτικά στην καρκινογένεση από μεταλλαγμένη RAS πρωτεΐνη.⁸⁵

Η κλινική εφαρμογή της κυκλίνης D1 δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Πολλές μελέτες συσχετίζουν την έκφραση της κυκλίνης D1 με την ανταπόκριση στην θεραπεία ή την επιβίωση ασθενών με ΟΚΚ αλλά τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα. Οι Bahnassy και συνεργάτες δημοσίευσαν ευρήματα σύμφωνα με τα οποία η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 σχετίζεται με χαμηλότερη επιβίωση.⁸⁶ Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης των Holland και συνεργατών που δείχνει ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση.⁸⁷ Ένας από τους λόγους για τους οποίους ενδεχομένως οι παραπάνω μελέτες δεν είχαν ομοφωνία στα αποτελέσματά τους να οφείλεται στο ότι ήταν μικρές και αναδρομικές μελέτες. Μία μεγάλη κλινική μελέτη, που συμπεριέλαβε 602 ασθενείς, έδειξε ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 συνδέεται με ευνοϊκή επιβίωση.⁸⁸ Επιπλέον, έδειξε ότι το παραπάνω αποτέλεσμα είναι ανεξάρτητο από άλλες μεταβλητές όπως το MSI και το BRAF status. Στα μειονεκτήματα της μελέτης συμπεριλαμβάνονται το ότι δεν αναφέρονται οι προηγούμενες θεραπείες και ειδικότερα

ποιός είναι ο προγνωστικός ρόλος της κυκλίνης D1 σε ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση την 5FU.⁸⁸

1.7 Στόχοι της μελέτης

Οι θεραπευτικές επιλογές για τον μεταστατικό ΟΚΚ έχουν αυξηθεί την τελευταία δεκαετία αλλά η αντιμετώπιση των ασθενών με ΟΚΚ αποτελεί ακόμα πρόκληση για τους παθολόγους-ογκολόγους. Τα τελευταία χρόνια η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας μας βοήθησε να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς της καρκινογένεσης και να κάνουμε άλλο ένα βήμα προς την εξατομίκευση της θεραπείας σε ασθενείς με ΟΚΚ. Με την χρήση μοριακών μεθόδων, συγκεκριμένα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time-PCR), μπορούμε να ταυτοποιήσουμε την ύπαρξη της μετάλλαξης V600E στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ογκογενετική πρωτεΐνη BRAF. Με την ίδια τεχνική και χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες εγκεκριμένους από την ογκολογική κοινότητα, μπορούμε να αναδείξουμε την κατάσταση του όγκου όσον αφορά την μικροδορυφορική αστάθεια και να την κατατάξουμε σε τρεις κατηγορίες: (α) MSI-H, (β) MSI-L και (γ) MSS όπως περιγράψαμε παραπάνω. Επιπλέον έχουμε την δυνατότητα να διερευνήσουμε την ύπαρξη ή όχι, σε δείγματα καρκινικών ιστών, πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των βάσεων του γενετικού υλικού αλλά και της πρωτεΐνης cyclin D1 που συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να αποσαφηνιστεί η κλινική χρησιμότητα της μετάλλαξης στη θέση V600E του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF, σε συνδυασμό με την έκφραση της κυκλίνης D1 και του MSI και να γίνει η συσχέτιση τους με την ανταπόκριση στην θεραπεία και την επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό ΟΚΚ που έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση την 5FU.

2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Επιλογή ασθενών - σχεδιασμός μελέτης

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 144 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο μεταστατικό ΟΚΚ με ιστολογικό υλικό κατάλληλο για μοριακή ανάλυση. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία για μεταστατικό ΟΚΚ στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου από τον Ιανουάριο του 2002 μέχρι τον Δεκέμβριο του 2006.

Η μελέτη έλαβε την έγκριση της Επιστημονικής Επιτροπής και την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το βιολογικό τους υλικό για ερευνητικούς σκοπούς.

2.1.1 Δημογραφικά-χαρακτηριστικά ασθενών

Αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των ασθενών που εντάχθηκαν στην μελέτη παρατίθενται στον Πίνακα 6

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ (σύνολο ασθενών 144)	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
Μέση ηλικία σε έτη (δακύμανση)	64 (23-81)	
<65 ετών	76	53
>65 ετών	68	47
Φύλο		
Άνδρες	82	57
Γυναίκες	62	43
Στάδιο νόσου στην διάγνωση		
I-III	82	57
IV	62	43
Ανατομική θέση όγκου		
Παχύ έντερο	105	73
Ορθό	39	27
Αριθμός θεραπειών	Μέση τιμή: 3	
Βαθμός κακοήθειας		
I-II	107	74
III	37	26
Συμπληρωματική θεραπεία		
Ναί	58	40
Όχι	86	60
Μεταστασεκτομή		
Ναί	21	15
Όχι	123	85

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη

Όλοι οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε απεικονιστικό έλεγχο που περιλάμβανε αξονική τομογραφία θώρακος, άνω και κάτω κοιλίας πριν και κατά την διάρκεια της

χημειοθεραπείας. Η παρακολούθηση των ασθενών έγινε στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου.

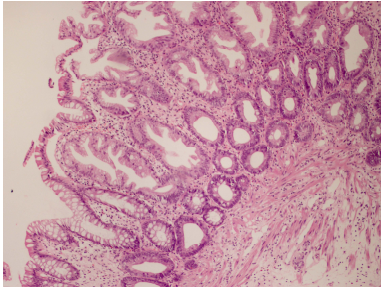
2.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Χρησιμοποιήθηκε αρχειακό υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο ασθενών οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής για προχωρημένο ή μεταστατικό ΟΚΚ με βάση το 5FU, στα πλαίσια προοπτικών κλινικών μελετών της Ελληνικής Ογκολογικής Ερευνητικής Ομάδας. Το υλικό αξιολογήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Παν. Νοσοκομείου Ηρακλείου, και επιλέχθηκαν οι κύβοι παραφίνης που ήταν πιο αντιπροσωπευτικοί για τον όγκο από εξειδικευμένο Παθολογο-ανατόμο (Κα Μ. Τζαρδή).

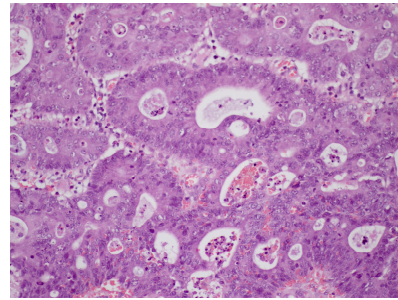
2.2.1 Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης είναι μία από τις συνηθέστερες και πιο διαδεδομένες ιστολογικές χρώσεις που χρησιμοποιούνται στην παθολογική ανατομία. Χρησιμοποιείται για τον χρωματισμό ιστολογικών τομών παραφίνης οι οποίες έχουν δημιουργηθεί νωρίτερα με την βοήθεια ειδικού μικροτόμου. Η χρώση αυτή πραγματοποιείται με τον συνδυασμό δύο επιμέρους χρωστικών, της αιματοξυλίνης και της ηωσίνης.

Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται προέρχονται από την χημεία χρωμάτων ενδυμάτων και μπορούν να προσκολληθούν στις κυτταρικές δομές λόγω φορτίου ή άλλων δυνάμεων. Πρόκειται για έγχρωμα, ιονιζόμενα οργανικά μόρια που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με δομές συντονισμού. Τα μόρια αυτά, απορροφούν φωτόνια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ενώ αφήνουν ελεύθερα τα υπόλοιπα φωτόνια που διαπερνώντας τα μόρια αυτά τους προσδίδουν χαρακτηριστικό χρώμα. Ανάλογα με το είδος του χρωμοφόρου μορίου που φέρει μία χρωστική το χρώμα είναι διαφορετικό. Η αιματοξυλίνη δεσμεύεται από τα βασεόφιλα/όξινα μέρη του κυττάρου όπως τον πυρήνα, προσδίδοντας έντονο μωβ-μπλε χρώμα. Αντίθετα, η ηωσίνη δεσμεύεται από τα οξεόφιλα/βασικά μέρη χρωματίζοντας με ιώδες-ερυθρό χρώμα τις υπόλοιπες κυτταρικές δομές.



Εικόνα 5α Υπερπλαστικός πολύπους παχέος



Εικόνα 5β Αδενοκαρκίνωμα

Το διχρωματικό αποτέλεσμα επιτρέπει την μικροσκοπική παρατήρηση του ιστού που υπάρχει στην τομή της αντικειμενοφόρου πλάκας (Εικόνα 5α και 5β). Είναι έτσι δυνατόν να εντοπιστούν οι μη φυσιολογικές κυτταρικές δομές και, κατά συνέπεια, να διαχωριστούν τα καρκινικά από τα μη καρκινικά τμήματα του ιστού που ενδιαφέρει τις εργασίες του παθολογο-ανατομικού εργαστηρίου. Η μέθοδος της χρώσης που ακολουθήθηκε για τους σκοπούς της εργασίας αυτής, είναι η ακόλουθη:

Υλικά-συσκευές:

- Κλίβανος θέρμανσης
- Ειδική απαγωγός για την αποφυγή επαφής με πτητικές ουσίες
- Πλαστικοί φορείς αντικειμενοφόρων πλακών με λαβή για την μεταφορά τους και τον εμβαπτισμό τους στα απαραίτητα διαλύματα
- Γυάλινα σκεύη για την τοποθέτηση των υγρών διαλυμάτων εμβαπτισμού
- Ξυλόλη για την διαύγαση των ιστών
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 95%
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
- Απεσταγμένο νερό
- Αιματοξυλίνη (Sigma-Aldrich Mayer's hematoxylin solution)
- Ηωσίνη αραιώσης 0.5%w/v (Riedel-de-Haen Eosin Y disodium salt purum for microscopy M=691.85g/Mol)
- Απορροφητικό χαρτί

- ✦ Τομές παραφίνης με έγκλειστο ιστό τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Μέθοδος:

Από τους κύβους παραφίνης κόβονται τομές πάχους 3 mm και τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

- ✦ Αρχικά, ο κλίβανος προθερμαίνεται ώστε να επιτύχουμε θερμοκρασία 50-55°C. Τοποθετούνται έπειτα σε αυτόν οι αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες έχουν προηγουμένα τοποθετηθεί στους πλαστικούς φορείς. Αφήνουμε τις τομές στον κλίβανο για διάστημα 6-10 λεπτών, διάστημα επαρκές για να λιώσει ελαφρά η παραφίνη και να διευκολυνθεί η περαιτέρω διαδικασία χωρίς όμως να υπερθερμανθεί και να ξεκολλήσει η τομή. Είναι πολύ σημαντικό για να είναι επιτυχής η χρώση, οι χρόνοι που αναφέρονται στην διαδικασία αυτή να τηρούνται με ακρίβεια.
- ✦ Ακολουθεί το στάδιο της ενυδάτωσης του με διαδοχικές εμβάπτισεις σε φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης αφού πρώτα οι τομές εμβαπτιστούν σε ξυλόλη:
 - Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 6 λεπτά
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 1 λεπτό
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 95% για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 70% για 30 δευτερόλεπτα
 - Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό (αιθανόλη 0%)
- ✦ Εμβάπτιση στην αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα ώστε να χρωματιστούν οι πυρήνες
- ✦ Ξεπλύματα με απεσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί η μη δεσμευμένη αιματοξυλίνη
- ✦ Εμβάπτιση στην ηωσίνη για 1 λεπτό ώστε να χρωματιστούν τα οξεόφιλα.
- ✦ Απαλλαγή από την μη δεσμευμένη ηωσίνη και, ακολούθως, αφυδάτωση εκ νέου ακολουθώντας τα κατωτέρω βήματα:
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 95% για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 95% για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 95% για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 30 δευτερόλεπτα
- ✦ Τέλος ακολουθεί διαύγαση σε ξυλόλη με εμβάπτιση για 1-2 λεπτά

- Οι τομές στεγνώνουν ελεύθερες και αποθηκεύονται στις ειδικές καρτέλες μεταφοράς τους έως την παρατήρησή τους και την επεξεργασία τους για απομόνωση επιθυμητών δομών με την βοήθεια μικροσκοπίου-microdissector.

2.2.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των πρωτεϊνών MLH1, MSH2 και κυκλίνης D1

Υλικά-συσκευές:

- Κλίβανος θέρμανσης
- Ειδική απαγωγός για την αποφυγή επαφής με πτητικές ουσίες
- Πλαστικοί φορείς αντικειμενοφόρων με λαβή για την μεταφορά τους και τον εμβαπτισμό τους στα απαραίτητα διαλύματα
- Γυάλινα σκεύη για την τοποθέτηση των υγρών διαλυμάτων εμβαπτισμού
- Ξυλόλη για την διαύγαση των ιστών
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 95%
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
- Απεσταγμένο νερό
- Αιματοξυλίνη(Sigma-Aldrich Mayer's hematoxylin solution)
- Απορροφητικό χαρτί
- Τομές παραφίνης με έγκλειστο ιστό τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Διάλυμα TBS (Tri-Buffered Saline). Το διάλυμα προκύπτει από την ανάμειξη των ακόλουθων υλικών: 200 αποσταγμένου νερού, 500 1M Tris.Cl με PH 7.4 και 300 5M NaCl.
- Σύστημα ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης Ultra-Vision LP Large Volume Detection System AP Polymer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Μέθοδος:

Από τους κύβους παραφίνης κόβονται τομές πάχους 3 mm και τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

- ✦ Αρχικά, ο κλίβανος προθερμαίνεται ώστε να επιτύχουμε θερμοκρασία 50-55°C. Τοποθετούνται έπειτα σε αυτόν οι αντικειμενοφόροι που έχουν τοποθετηθεί στους πλαστικούς φορείς. Αφήνουμε στον κλίβανο τις τομές για διάστημα 6-10 λεπτών, διάστημα επαρκές για να λιώσει ελαφρά η παραφίνη και να διευκολυνθεί η περαιτέρω διαδικασία χωρίς όμως να υπερθερμανθεί και να ξεκολλήσει η τομή.
- ✦ Ακολουθεί το στάδιο της ενυδάτωσής του με διαδοχικές εμβάπτισεις σε φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης αφού πρώτα οι τομές εμβαπτιστούν σε ξυλόλη:
 - Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 6 λεπτά
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 1 λεπτό
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 95% για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε αιθανόλη 70% για 30 δευτερόλεπτα
 - Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό (αιθανόλη 0%)

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης Ultra-Vision LP Large Volume Detection System AP Polymer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Αναλυτικά:

Το διάλυμα Α τοποθετείται πάνω στο αποπαραφινωμένο και κατάλληλα επεξεργασμένο (με την διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω) πλακίδιο που φέρει την τομή και επωάζεται για 7 λεπτά.

Το πλακίδιο στεγνώνει επιμελώς και τοποθετείται το διάλυμα του συγκεκριμένου αντισώματος. Αναλυτικά:

- ✦ **Αντίσωμα MLH1** (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) σε διάλυμα 1:50 με αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό. Χρόνος επώασης 60 λεπτά (Εικόνα 6)
- ✦ **Αντίσωμα MSH2** (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) σε διάλυμα 1:50 με αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό. Χρόνος επώασης 60 λεπτά (Εικόνα 7)
- ✦ **Αντίσωμα CyclinD1** (Neomarker, Fermtont, CA, USA) σε διάλυμα 1:25 με αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό . Χρόνος επώασης 60 λεπτά

Αφού παρέλθει ο απαιτούμενος χρόνος επώασης για το κάθε αντίσωμα τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα TBS (Tris-Buffered Saline) και τοποθετείται το διάλυμα Β όπως αναφέρεται στο κιτ ανίχνευσης AP-POLYMER. Ο χρόνος επώασης είναι 20 λεπτά.

Τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα TBS και τοποθετείται το διάλυμα Γ όπως αναφέρεται στο κιτ ανίχνευσης AP-POLYMER. Ο χρόνος επώασης είναι 30 λεπτά.

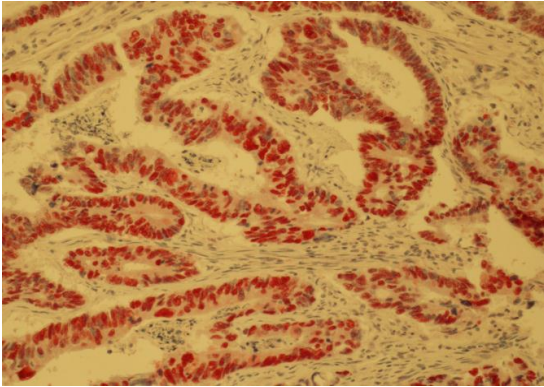
Στην συνέχεια, παρασκευάζεται η χρωστική χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ταμπλέτα που βρίσκεται στο κιτ ανίχνευσης AP-POLYMER με την αραιώσή της σε 5ml φυσιολογικό ορό. Ακολουθεί επώαση του πλακιδίου με την χρωστική για 5 λεπτά και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται δύο επιπλέον φορές. Στη συνέχεια, τα πλακίδια με τις τομές βάφονται με την χρωστική αιματοξυλίνη με την προαναφερθείσα διαδικασία.

Μετά το πέρας τις διαδικασίας τα πλακίδια καλύπτονται με προφυλακτική μεμβράνη και μεταφέρονται για την παρατήρηση με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

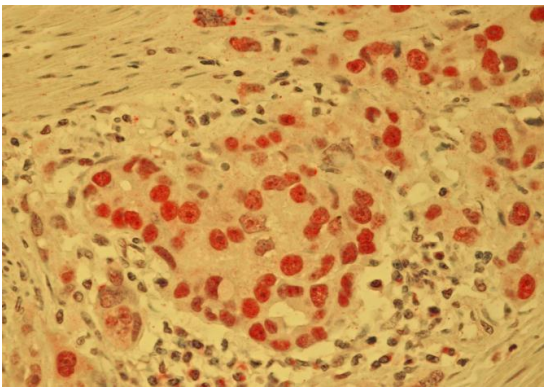
Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι ως δείκτες θετικής χρώσης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης MLH1, MSH2 χρησιμοποιήθηκε η πυρηνική χρώση λεμφοκυττάρων και των στρωματικών κυττάρων στα δείγματα των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν (internal controls). Αντίστοιχα, ως δείκτες θετικής χρώσης για την Cyclin D1 χρησιμοποιήθηκε ιστός από ασθενή με λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (Mantle cell lymphoma). Σε όλες τις περιπτώσεις, δείκτης αρνητικής χρώσης ήταν ιστός από τα δείγματά μας ο οποίος παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία χωρίς όμως την χρήση του υπό εξέταση αντισώματος.

Στην περίπτωση της χρώσης με MLH1 ή MSH2 το δείγμα χαρακτηριζόταν αρνητικό όταν η πυρηνική χρώση δεν ήταν εμφανής.

Στην περίπτωση της χρώσης με Cyclin D1 το δείγμα υπερέκφραζε την συγκεκριμένη πρωτεΐνη στις περιπτώσεις που (α) >50% των καρκινικών κυττάρων είχαν τουλάχιστον ασθενή χρώση Cyclin D1 ή (β) >20% των καρκινικών κυττάρων είχαν μεσαία ή έντονη χρώση CyclinD1. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η χρώση χαρακτηριζόταν ως αρνητική.



Εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημική χρώση
MLH1.



Εικόνα 7. Ανοσοϊστοχημική χρώση
MSH2.

2.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ BRAF ΚΑΙ ΤΟΥ MSI

2.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα αρχικά στάδια προετοιμασίας έγιναν όπως περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.2.1

Η επιλογή των καρκινικών κυττάρων από τις χρωματισμένες τομές, έγινε με την βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου και τη χρήση πιεζο-ηλεκτρικού-microdissector (Eppendorf, εικόνα 8). Ο μικροτόμος αυτός φέρει δύο βραχίονες οι οποίοι προσαρμίζονται στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Στην άκρη του ενός βραχίονα προσαρμόζεται νυστερίδιο το οποίο μέσω του βραχίονα συνδέεται με πηγή εκπομπής υπερήχων. Ο έτερος βραχίονας

συνδέεται με ρύγχος αναρρόφησης. Και οι δύο βραχίονες συνδέονται στη συνέχεια με

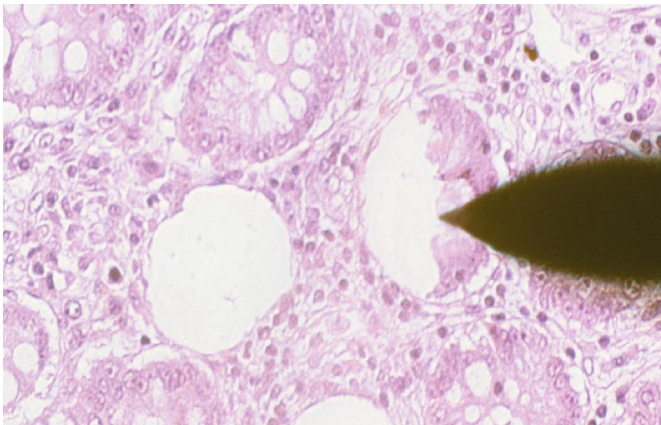
Εικόνα 8.

Πιεζοηλεκτρικός
microdissector Eppendorf



μικροχειριστήρια (joystick).

Ο χειριστής μέσω των μικροχειριστηρίων επιλέγει και κόβει τα καρκινικά κύτταρα με το νυστερίδιο και τα αναρροφά με το ρύγχος. Το μικροσκόπιο συνδέεται μεσω CCD κάμερας με υπολογιστή για λήψη φωτογραφιών για λόγους διασφάλισης της ποιότητας (παρακολούθηση χειριστή από πλέον πεπειραμένο προσωπικό). (εικόνα 9) Τα κύτταρα που έχουν απομονωθεί συλλέγονται σε σωληνάρια τύπου eppendorf και ακολουθεί η επεξεργασία τους για να απο-παραφινοποιηθούν με την διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 9. Λειτουργία
πιεζοηλεκτρικού
microdissector Eppendorf

2.3.2 ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η έγκλειση των ιστών σε κύβους παραφίνης για την μονιμοποίηση- διατήρηση τους απαιτεί το πρωταρχικό βήμα της οποίας επεξεργασίας του ιστού που ακολουθεί να είναι η από- παραφινοποίησή του. Η απο-παραφινοποίηση σε κύτταρα που έχουν απομονωθεί από τομή έγινε σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

Υλικά-συσσκευές:

- Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
- Μηχάνημα φυγοκέντρησης (erppendorf centrifuge)
- Πιπέτα συλλογής υγρών χωρητικότητας 1000μl και ρύγχη

Μέθοδος:

Η απο-παραφινοποίηση κυττάρων που προηγείται της περαιτέρω επεξεργασίας τους όπως η κυτταρική λύση, είναι σύντομη εξαιτίας της μικρότερης ποσότητας παραφίνης που φέρουν σε σχέση με τις τομές. Τα τοποθετημένα σε αιθανόλη δείγματα, φυγοκεντρούνται σε 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθεί μία πλύση με απόλυτη 100% αιθανόλη. Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 10.000 rpm στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται και ακολουθεί άλλος ένας κύκλος πλύσης-φυγοκέντρησης απομόνωσης της κυτταρικής πελέτας. Εξαιρετικής σημασίας είναι να αποφευχθεί κατά το δυνατόν η απώλεια κυττάρων κατά τη διαδικασία αυτή καθώς και η πλήρης αφαίρεση της αιθανόλης, η οποία αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνάσης και, ως εκ τούτου, της πρωτεϊνικής πέψης.

2.3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΥΣΗ- ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΕΨΗ

Η κυτταρική λύση είναι ένα απαραίτητο στάδιο προκειμένου να απομονωθούν νουκλεϊκά οξέα για περαιτέρω μελέτη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται ένα ειδικό διάλυμα λύσης και μία ενζυμική πρωτεϊνάση. Για την λύση κυττάρων, που έχουν απομονωθεί επιλεκτικά από τομή παραφίνης με διαδικασία microdissection και έχουν απο-παραφινολογηθεί, ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

Υλικά-συσκευές:

- Σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml
- Σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml όπου περιέχονται τα από-παραφινολογημένα κύτταρα, απαλλαγμένα από την αιθανόλη της από-παραφινολογίας.
- Διάλυμα λύσης (10mM Tris, 0,1mM EDTA, 2% SDS)
- Ένζυμο πρωτεϊνάσης: Proteinase k (Qiagen, USA)(>600 mAU/ml, 20 mg/ml, διάλυμα)
- Πιπέτα συλλογής υγρών χωρητικότητας 1000μl και ρύγχη
- Θερμική συσκευή επώασης με ανάδευση (erpendorf thermomixer comfort)

Μέθοδος:

Παρασκευάζεται το διάλυμα λύσης σε τελικό όγκο αντίστοιχο του αριθμού των κυτταρικών δειγμάτων, υπολογίζοντας όγκο 400 μl για κάθε σωληνάριο-δείγμα. Προστίθεται στα σωληνάρια τα οποία περιέχουν τα κύτταρα προς λύση, 400 μl από το διάλυμα λύσης και κατόπιν 30 μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml). Τα δείγματα τοποθετούνται στην θερμική συσκευή επώασης σε θερμοκρασία 60°C με ανάδευση για την διευκόλυνση της πλήρους ενζυμικής λύσης για 16 τουλάχιστον ώρες (overnight). Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε τα κύτταρα στα οποία προστέθηκε το διάλυμα λύσης και το ένζυμο να είναι απαλλαγμένα

από την αιθανόλη με την οποία προηγουμένως απο-παραφινοποιήθηκαν, επειδή αυτή είναι ανασταλτικός παράγοντας της ενζυμικής δράσης της πρωτεΐνάσης K.

2.3.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA (RNA EXTRACTION)

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων από τους ιστούς και ο καθαρισμός τους, είναι απαραίτητα βήματα για την μελέτη τους. Ο διαχωρισμός τους βασίζεται στον φαινολικό παράγοντα Trizol LS. Το αντιδραστήριο αυτό, είναι μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Χρησιμοποιείται ευρέως για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από ιστούς και από βιολογικά υγρά. Είναι τοξικό για αυτό η χρήση του γίνεται με προσοχή σε απαγωγό χημικών αερίων (hood).

Υλικά-συσκευές:

- Ισοπροπανόλη
- Χλωροφόρμιο
- Αιθανόλη 75% παρασκευασμένη με DEPC νερό (νερό κατεργασμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό εστέρα)
- Γλυκογόνο (Roche 20mg/ml)
- Οξικό νάτριο
- Σωληνάρια τύπου erpendorf
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Μηχάνημα φυγοκέντρησης (erpendorf centrifuge)

Μέθοδος:

Αρχικά, απαλλάχθηκαν τα λυμένα από το ένζυμο της πρωτεΐνάσης κύτταρα, από τις ακαθαρσίες της λύσης. Προς τούτο, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό σε 12.000 rpm στους 4°C. Ακολουθεί προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου (όγκος 430μl) σε σωληνάρια χωρητικότητας 2ml σύμφωνα με το στάδιο της λύσης που προηγήθηκε. Προστίθεται περίπου τριπλάσιος όγκος Trizol (≈1200μl) και μετά από προσδεκτική

ανάδευση με το χέρι, τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η πλήρης αποσύνδεση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.

Στην συνέχεια, προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία: 0.2ml χλωροφόρμιο/1ml Trizol και ακολουθεί πολύ καλή ανακίνηση των δειγμάτων τα οποία και επωάζονται για 2-3 λεπτά στους 4°C (πάγο). Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία δύο φάσεων: μία οργανική στο κάτω μέρος του σωληναρίου και μία υδατική στο επάνω μέρος. Το RNA, χάρη στο χλωροφόρμιο συγκεντρώνεται μόνο στην υδατική φάση η οποία και συλλέγεται με προσοχή σε καθαρό σωληνάριο, φροντίζοντας να μην μείνουν ίχνη της οργανικής. Ακολουθεί η προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, καλής ανάδευσης και επώασης για 5 λεπτά σε πάγο. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 12.000 g για 8 λεπτά στους 4°C.

Μετά την συλλογή της υδατικής φάσης σε καθαρά σωληνάκια, προστίθενται 2.5μl γλυκογόνου για κάθε δείγμα (50μg συνολικά). Το γλυκογόνο, συγκεντρώνει και κλείνει στην ζελατινώδη υφή του το RNA. Ακολουθεί προσθήκη οξικού νατρίου σε όγκο ίσο με το 1/10 του υπάρχοντος στα δείγματα. Το οξικό νάτριο, σε 1 λεπτό περίπου κατακρημνίζει τα νουκλεϊκά οξέα. Τέλος, προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία 1/1 (v/v) με τον όγκο της υδατικής φάσης. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε θερμοκρασία -80°C για 16 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η κατακρήμνιση.

Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 12.000g για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA σχηματίζεται σε ζελατινώδη πελέτα η οποία εκπλένεται δύο φορές με αιθανόλη 75% (κάθε μία από τις οποίες ακολουθήθηκε από ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12.000g για 5 λεπτά στους 4°C). Η αιθανόλη έχει την ιδιότητα να αφαιρεί τις προσμίξεις του RNA σε άλατα που υπάρχουν. Μετά από την τελευταία φυγοκέντρηση, αφαιρείται και η τελευταία αιθανόλη όσο το δυνατόν ακριβέστερα και αφήνονται οι πελέτες να στεγνώσουν.

ΧΡΗΣΗ DNAase ΠΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ DNA

Στο σημείο αυτό, η απομόνωση του RNA έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, στην περίπτωση που η μοριακή μελέτη που θα ακολουθήσει επηρεάζεται από την ύπαρξη DNA, που μέρος του

επίσης απομονώθηκε με την παραπάνω διαδικασία (κυρίως DNA χαμηλού μοριακού βάρους), απαιτείται η απαλλαγή από αυτό. Η ανάγκη αυτή υπήρξε στην παρούσα εργασία. Χρησιμοποιήθηκε έτσι, το ένζυμο της DNAάσης το οποίο θραυματοποιώντας το DNA, το καθιστά ανενεργό και «αόρατο» στις επόμενες μοριακές τεχνικές.

Υλικά-συσσκευές:

- DEPC νερό
- DNAάση (rDNase I συγκέντρωσης 2 units/μl) (Ambion, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα DNAάσης (10X DNase buffer, Ambion)
- Παράγοντας απενεργοποίησης της DNAάσης (DNAase inactivation reagent, Ambion)
- Σωληνάκια τύπου erpendorf
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Μηχάνημα φυγοκέντρωσης (erpendorf centrifuge)
- Θερμική συσκευή επώασης

Μέθοδος:

Αρχικά, διαλυτοποιείται η πελέτα σε 10 μl νερό. Προστίθεται, στην συνέχεια, σε κάθε δείγμα, 1 μl του ρυθμιστικού διαλύματος και 1 μl του ενζύμου. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Προστίθενται 2 μl από τον παράγοντα απενεργοποίησης ο οποίος αφήνεται να δράσει 3-4 λεπτά με ελαφριά ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά, σε 10.000g στους 4°C. Με αυτό τον τρόπο, ο παράγοντας απενεργοποίησης ο οποίος έχει λευκή μορφή και ρητινώδη υφή, μένει στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Συλλέγεται σε καθαρό σωληνάριο το μέρος που φέρει το RNA. Ο λόγος απομάκρυνσης της ρητίνης είναι ότι επηρεάζει την μετέπειτα μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA στην φασματοφωτομετρική συσκευή.

2.3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ



Η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί και επίσης να καθοριστεί ο βαθμός ύπαρξης άλλων προσμίξεων. Αυτό μπορεί να γίνει με την βοήθεια ειδικής φασματοφωτομετρικής συσκευής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η συσκευή Nanodrop spectrophotometer, η οποία επιτρέπει τους παραπάνω υπολογισμούς σε εξαιρετικά μικρούς όγκους διαλυμάτων με επαρκή ακρίβεια.

Η συσκευή αυτή, προσδιορίζει μεταξύ άλλων, 3 σημαντικές τιμές. Πρόκειται για α) την συγκέντρωση του RNA του μετρούμενου διαλύματος σε ng RNA/μl διαλύματος, β) την τιμή του λόγου 260/280 και γ) την τιμή του λόγου 260/230. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260 nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης, απορροφούν στα 260 αλλά και στα 280 nm όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα. Σε γενικές γραμμές, για να θεωρείται ένα δείγμα καθαρό θα πρέπει η απορρόφηση στα 260 να είναι σχεδόν διπλάσια αυτής στα 280. Ο λόγος δηλαδή απορρόφησης: OD 260/OD 280 όπου OD (optical density), πρέπει να είναι κατά το δυνατόν πλησιέστερα στο 2, ενώ ελάχιστο όριο αξιοπιστίας (εμπιστοσύνης στο ότι η ποσότητα που μετρήθηκε αφορά νουκλεϊκά οξέα και όχι κάτι άλλο), τίθεται το 1.6. Στα 230 nm απορροφούν κυρίως άλατα και ανόργανες ενώσεις οπότε πραγματοποιείται και ο έλεγχος αυτός.



Η διαδικασία της μέτρησης στην συσκευή είναι πολύ απλή και αυτοματοποιημένη. Ποσότητες διαλύματος όγκου 1-2 μl «φορτώνονται» στην ειδική επιφάνεια της συσκευής με την μορφή σταγόνας (drop) και ακολουθεί η μέτρηση και η εμφάνιση των αντίστοιχων παραμέτρων. Βασικό σημείο της διαδικασίας, είναι ο «μηδενισμός» της συσκευής πριν από την έναρξη των μετρήσεων, χρησιμοποιώντας σταγόνα νερού απαλλαγμένη από νουκλεάσες και νουκλεϊκά οξέα.

Υλικά συσκευής:

- Συσσκευή φασματοφωτομέτρησης Nanodrop και εγκατάσταση προγράμματος συσκευής σε Η/Υ
- Πιπέτα και ρύγχη
- Απορροφητικό χαρτί (kim wipes) με λεία επιφάνεια και υφή
- Σωληνάριο με DEPC νερό (κατά προτίμηση εκείνο με το οποίο έγινε η επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας του RNA).



Μέθοδος:

Τοποθετήθηκε ποσότητα 1,5 μl DEPC νερού στην ειδική επιφάνεια της συσκευής και ενεργοποιείται η έναρξη των μετρήσεων. Μετά από καθαρισμό της επιφάνειας μέτρησης, επαναλαμβάνεται το φόρτωμα νερού για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση blanc δηλαδή η μέτρηση που «μηδενίζει» την συσκευή θεωρώντας τιμή 0 αυτή που προκύπτει από την μέτρηση αυτή και υπολογίζοντας τις επόμενες που θα ακολουθήσουν σύμφωνα με αυτή. Η διαδικασία αυτή, διασφαλίζει ότι αν στο νερό με το οποίο αραιώθηκε το RNA υπήρχε «μόλυνση» σε νουκλεϊκά οξέα, αυτή δεν θα συνυπολογιστεί. Ακολουθούν οι υπόλοιπες, κανονικές μετρήσεις μετρώντας με προσοχή ποσότητα 1,5 μl από την επιφάνεια του RNA. Μεταξύ των μετρήσεων των δειγμάτων στο nanodrop γινόταν μέτρηση και 1,5 μl DEPC νερού. Αυτό διασφαλίζει ότι η επιφάνεια της μέτρησης, απαλλάσσεται αποτελεσματικότερα από το προηγούμενο RNA οπότε δεν επηρεάζεται η τιμή της επόμενης.

2.3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA ή RNA μεταξύ πολλών άλλων. Η βασική προϋπόθεση στην μέθοδο, είναι οι αλληλουχίες στα άκρα του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος να είναι γνωστές. Η PCR, πρακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε δείγμα περιέχει νουκλεϊκά οξέα. Έτσι είναι δυνατή στην περίπτωση βιολογικών υγρών, φρέσκων ή παραφινωποιημένων ιστών, κατεψυγμένων ιστών, ευκαρυωτικών ή

προκαρυωτικών κυττάρων, ακόμη και σε «αρχαία» δείγματα που μπορεί να φέρει στο φως η Παλαιοντολογία.

Η μέθοδος, έχει μία σειρά διαφορετικών εφαρμογών που εκτός των άλλων εξαρτώνται και από το είδος του νουκλεϊκού οξέως. Έτσι, ο πολλαπλασιασμός γενωμικού DNA χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA, την εύρεση μεταλλάξεων, την αλληλούχηση, σε συγκριτικές μελέτες, στον προσδιορισμό αλληλόμορφων, στην διάγνωση και την μελέτη της πορείας ασθενών κλπ. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ποσοτική PCR και, επίσης, ενδιαφέρον έχει η εφαρμογή της στην εγκληματολογία και στην πιστοποίηση της πατρότητας. Μερικές από τις εφαρμογές της μεθόδου σε RNA ή cDNA (συμπληρωματικό DNA) είναι η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μεταγραφών που γίνεται με την PCR πραγματικού χρόνου ή Real Time-PCR, η σύγκριση μεταγραφικών προτύπων, η κλωνοποίηση ακέραιου cDNA, η in situ-PCR και άλλες.

Ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος, γίνεται σε επαναλαμβανόμενους χρονικά, πανομοιότυπους κύκλους μετά από το πέρας των οποίων κάθε φορά, διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγράφων του προηγούμενου κύκλου. Ισχύει η σχέση $N=N_0 \cdot (1+\alpha/100)^n$ όπου N ο θεωρητικός αριθμός αντιγράφων σε κάθε κύκλο, N_0 ο αρχικός αριθμός τους και n ο αριθμός των κύκλων. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει θερμοκρασιακές διακυμάνσεις υψηλής ή λιγότερο υψηλής θερμοκρασίας κατά τις οποίες οι έλικες των νουκλεϊκών οξέων ανοίγουν ή κλείνουν αντίστοιχα. Η διαδικασία δεν συνεχίζεται επ' άπειρον καθώς η αντίδραση αυτή επηρεάζεται από περιοριστικούς παράγοντες όπως ο χρόνος ζωής του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, η επάρκεια ποσότητας και ποιότητας εκκινητών και ελεύθερων νουκλεοτιδίων και άλλοι.

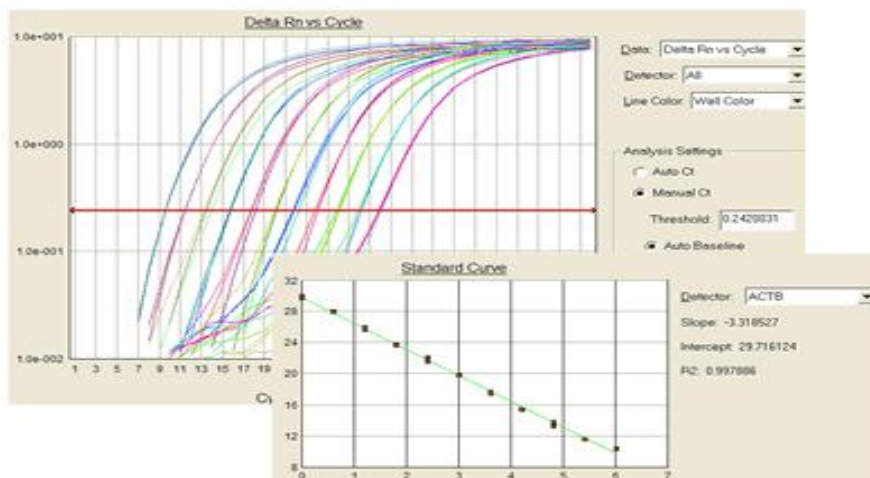
Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δύο εφαρμογές της τεχνολογίας PCR. Πρόκειται για την «αντίστροφη μεταγραφή-PCR» (reverse transcription PCR) ή rt-PCR και την «PCR πραγματικού χρόνου» (real time-PCR).

Στην rt-PCR, αφού γίνει απομόνωση ολικού RNA, απομακρύνεται το γενωμικό DNA με DNAση και ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή του με oligo-dT, τυχαία εξαμερή ή ειδικούς εκκινητές. Τέλος, ακολουθεί η PCR στο cDNA προϊόν η οποία είναι ειδική για κάθε γονίδιο στόχο.

Στην κλασική PCR, η ανίχνευση του προϊόντος γίνεται στο τελευταίο σημείο. Στις ποσοτικές συγκρίσεις η ακρίβεια είναι μικρή, όπως και η ευαισθησία, δεν υπάρχει αυτοματοποιημένη εξαγωγή αριθμητικών αποτελεσμάτων και απαιτούνται στάδια μετά το τέλος της μεθόδου πράγμα που την καθιστά χρονοβόρο και επιρρεπή σε μολύνσεις. Τα παραπάνω δημιούργησαν την ανάγκη μίας PCR με μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης πριν το τελικό σημείο και μάλιστα στην εκθετική φάση όπου υπάρχει γραμμική σχέση της ποσότητας του προϊόντος με την ποσότητα του εκμαγείου. Η ανίχνευση του προϊόντος, ώστε να συσχετιστεί με την ποσότητα του εκμαγείου, έγινε χάρη σε χρωστικές και την ιδιότητα του φθορισμού. Η τροποποιημένη αυτή PCR ονομάστηκε real time-PCR.

Η ποσοτικοποίηση στην real time-qPCR γίνεται με την μελέτη των C_q (quantification cycles). Ως C_q ορίζεται ο κλασματικός αριθμός κύκλων όπου ο φθορισμός μίας αντίδρασης τέμνει την γραμμή-όριο (threshold). Η γραμμή αυτή τοποθετείται στην έναρξη της εκθετικής φάσης της PCR λίγο πάνω από την εικόνα του background, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της καμπύλης πολλαπλασιασμού στην αντίδραση αυτή. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να είναι σχετική ή απόλυτη. Στην σχετική ποσοτικοποίηση, η τελευταία γίνεται σύμφωνα με μία δεδομένη ποσότητα αναφοράς. Η απόλυτη γίνεται με δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς μεταξύ του δεκαδικού λογαρίθμου της ποσότητας του DNA και των C_q για διαδοχικές γνωστές ποσότητες cDNA. Η κλίση της ευθείας δίνει την απόδοση ενώ το R² πρέπει να προσεγγίζει την τιμή 1.

Η RT-qPCR χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια, εξαλείφει στάδια επεξεργασίας μετά την PCR, υπάρχει μικρός χρόνος της αντίδρασης και γίνονται μαζικές αναλύσεις. Έτσι, η RT-qPCR χρησιμοποιείται σε πλήθος εφαρμογών όπως η μελέτη ιικού και μικροβιακού φορτίου, η μέτρηση των αντιγράφων περιοχών DNA σε γονιδιώματα, η διάκριση αλληλομόρφων και πολυμορφισμών και σε ποσοτικές μελέτες γονιδιακής



έκφρασης.

Ανάστροφη Μεταγραφή

Υλικά-συσκευές:

- Συσκευή rt-PCR θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler)
- Σωληνάρια τύπου erpendorf
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Σωληνάρια ενωμένα σε οκτάδες μικρού μεγέθους
- dNTPs
- Τυχαίοι εκκινητές (random primers)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
- DTT
- Απενεργοποιητής RNAσών (RNase out)
- Ένζυμο αντίδρασης (superscript III)
- DEPC νερό
- Εμπορικό RNA για χρήση ως ρυθμιστών αντίδρασης (calibrator (Liver, Breast, UPE))

Μέθοδος:

RNA σε καθαρή μορφή (συνολικού όγκου 50ng/γονίδιο), απαλλαγμένο από γενωμικό DNA τοποθετείται σε ειδικά σωληνάρια σε DEPC νερού και συνολικού όγκου 10 μl. Ένα δείγμα μόνο με νερό DEPC/οκτάδα (δείγμα RT-) και χωρίς RNA χρησιμοποιείται σαν αρνητικός μάρτυρας σε επόμενους χειρισμούς όπως η ηλεκτροφόρηση ή η Real Time-PCR. RNA από φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, προκειμένου να γίνει εκτίμηση της ανάστροφης μεταγραφής και ποσοτικοποίηση των γονιδίων του ενδιαφέροντος, χρησιμοποιούνται σαν ρυθμιστές της αντίδρασης (calibrators). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως calibrators 3 διαφορετικά εμπορικά RNA (liver, breast, lung) σε ποσότητες: Liver: 1μg (1μl Liver+ 9 μlDEPC), Lung: 1μg (1μl Liver + 9 μl DEPC) και Breast ((1μl Liver + 9 μl DEPC).

dNTPs (500 μM για κάθε dNTPs) και τυχαίοι εκκινητές (random primers) (εξαμερή) (250ng random hexamers) ανά αντίδραση αναμειγνύονται και 2 μl από αυτό προστίθεται σε κάθε

δείγμα RNA καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή για 5 λεπτά στους 65°C.

Μία ποσότητα 0.7 μl από ένα δεύτερο μίγμα, το οποίο αποτελείται από 4μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 1 μl 0.1 M DTT (10mM ανά αντίδραση), 1μl Rnase out (32.6 Units ανά αντίδραση) και 1 μl superscript III προστίθεται μετά από 5 λεπτά σε κάθε δείγμα και ακολουθούν οι επόμενοι κύκλοι με θερμοκρασίες κατάλληλες για την δράση του ενζύμου (65°C για 5 λεπτά, 25°C για 10 λεπτά, 42°C για 50 λεπτά, 70°C για 15 λεπτά). Το cDNA αποθηκεύεται στους -80oC έως την πραγματοποίηση της real time-PCR.

2.3.7 ΠΟΣΟΤΙΚΗ REAL TIME PCR ΚΑΙ ΚΛΑΣΣΙΚΗ PCR (RT-qPCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

Υλικά-συσσκευές:



- Συσκευή Real Time-PCR με το κατάλληλο λογισμικό σε υπολογιστή ABPrism 7900
- Πλαστικά «πιάτα» υποδοχής δειγμάτων (plates)

Εικόνα 10. ABI PRISM 7900 Sequence Detection System

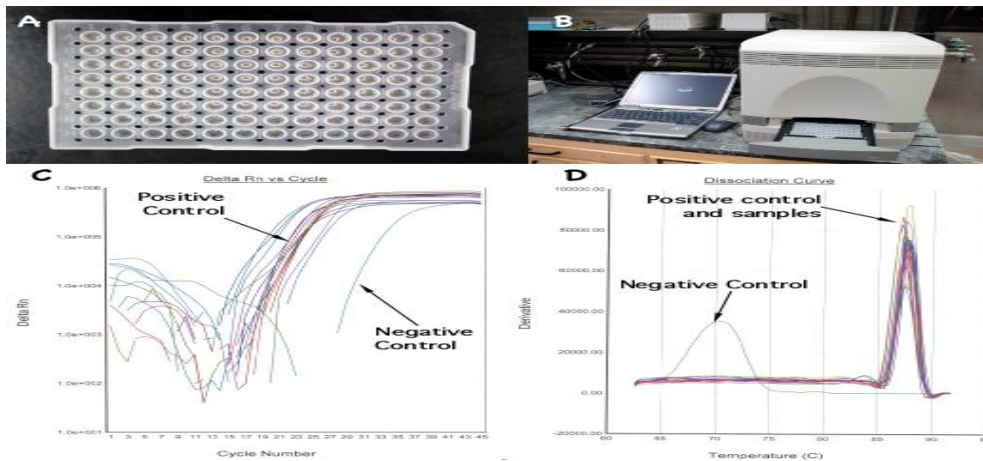
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Σωληνάκια ενωμένα σε οκτάδες μικρού μεγέθους
- Μίγμα ποσοτικής PCR (Qiagen real time PCR mix)
- Εκκινητές των γονιδίων που θα εξεταστούν (10 μM)
- Ανιχνευτές (probes) των γονιδίων που θα εξεταστούν
- DEPC νερό

Μέθοδος:

Για την ποσοτική real time PCR, τοποθετούνται 12,5 μl αντίδρασης, που αντιπροσώπευει ένα ξεχωριστό δείγμα, στις ειδικές υποδοχές. Από τον όγκο αυτό, 10 μl είναι το συνολικό μείγμα της αντίδρασης και 2,5 μl το cDNA που χρησιμοποιείται. Το συνολικό μείγμα παρασκευάζεται υπολογίζοντας 6,25 μl μείγματος ποσοτικής PCR (2x Taqman Master Mix), 1,25 μl από κάθε έναν από τους 2 εκκινητές (1μM ανά αντίδραση), 0,50 μl από κάθε έναν από τους 2 probe (0.33μM ανά αντίδραση) και 0,75 μl νερού για κάθε δείγμα.

Κάθε δείγμα cDNA συμπεριλαμβανομένων και των calibrators και του αρνητικού μάρτυρα της rt-PCR εξετάστηκε ως προς την έκφραση των γονιδίων: *BRAFV600E*, *BRAF* και *B-ACTIN* (β-ακτίνη). Το γονίδιο της β-ακτίνης, επειδή έχει γνωστό πρότυπο έκφρασης, χρησιμοποιείται συχνά στην μέθοδο της real time-PCR σαν γονιδίου-μάρτυρας με το οποίο θα συγκριθούν τα πρότυπα έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων. Οι calibrators αραιώνονται ώστε να έχουν συγκέντρωση 10ng/2,5μl. Επίσης, εξετάστηκαν δείγματα RNA των ασθενών ώστε από τον μηδενικό πολλαπλασιασμό τους στην real time-PCR να επιβεβαιωθεί ότι τα εξεταζόμενα cDNA ήταν απαλλαγμένα από μόλυνση με γενωμικό DNA εξωγενούς προέλευσης που ίσως προστέθηκαν κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

Κάθε δείγμα εξετάστηκε για κάθε γονίδιο 3 φορές σε 3 διαφορετικές υποδοχές του ειδικού πιάτου ώστε να ελέγχεται η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Οι αραιώσεις των δειγμάτων έγιναν με τρόπο ώστε να επαρκεί το υλικό του cDNA για όλες τις θέσεις-αντιδράσεις. Η διαδικασία του «φορτώματος» στο ειδικό πιάτο (plate) των μειγμάτων της αντίδρασης και των cDNA έγινε σε συνθήκες που να αποτρέπουν κατά το δυνατόν τις μολύνσεις των δειγμάτων από το εξωτερικό περιβάλλον και μεταξύ τους και επίσης σε χαμηλή θερμοκρασία. Μετά το «φόρτωμα» των επιθυμητών δειγμάτων, ακολούθησε η real time-PCR. Ο θερμοκρασιακός κύκλος είναι: 50° C για 2 λεπτά, 95 ° C για 10 λεπτά, 95° C για 15 δευτερόλεπτα και 60° C για 1 λεπτό.



Από τις τιμές C_q της έκφρασης που υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα, ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων (της σχετικής έκφρασης κάθε γονιδίου) με την μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ στην οποία εφαρμόζεται ο τύπος: ποσότητα έκφρασης γονιδίου = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Στην μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης είναι απαραίτητη πριν από την έναρξη της μελέτης, η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εκκινητών και του ιχνηθέτη. Ελέγχεται η γραμμικότητα μεταξύ της ποσοτικοποίησης των γονιδίων στόχων και του γονιδίου αναφοράς (β -ACTIN) ώστε τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από την συγκριτική μελέτη της έκφρασης να είναι αξιόπιστα.

Όλοι οι εκκινητές και ανιχνευτές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε ένας από αυτούς (κατά προτίμηση ο ανιχνευτής) να βρίσκεται σε περιοχή σύνδεσης δύο εξωνίων για να αποφεύγεται ο πολλαπλασιασμός του γενομικού DNA. Οι ανιχνευτές ήταν σημασμένοι με φθοριούχα μόρια (FAM) στο 5' άκρο και με τον αναστολέα τους (TAMRA) στο 3' άκρο. Το T_m όλων των εκκινητών και το T_m των ανιχνευτών ήταν τα ίδια για να μπορεί να γίνει η PCR για όλα τα γονίδια με την ίδια δραστικότητα στην ίδια αντίδραση. Το T_m των ανιχνευτών σχεδιάστηκε να είναι 10°C υψηλότερο από αυτό των εκκινητών για να διευκολυνθεί η πρόσδεση τους στο υπόστρωμα. Για την κατασκευή τους επιλέχθηκε η τεχνολογία MGB που δίνει υψηλό T_m με μικρότερο εύρος βάσεων ώστε να επίτευχθεί όσο το δυνατόν μικρότερο προϊόν (amplicon). Τέλος, διενεργήθηκε έρευνα στη βάση BLAST για να τεκμηριωθεί η ειδικότητα των εκκινητών και των ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν.

Οι εκκινητές και ανιχνευτές των γονιδίων ήταν:

B-ACTIN: πρόσθιος εκκινητής: 5'- GGC-ACC-CAG-CAC-AAT-GAA-G-3' οπίσθιος εκκινητής: 5'-GCC-GAT-CCA-CAC-GGA-GTA-CT-3' Ανιχνευτής: 5'-FAM-TCA-AGA-TCA-TTG-CTC-CTC-CTG-AGC-GC-TAMRA-3'

BRAF: πρόσθιος εκκινητής '5-CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA-3'', οπίσθιος εκκινητής '5-ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGATG-3' Ανιχνευτής μεταλλαγμένης BRAF: 5-FAM-TAGCTACAGaGAAATC-TAMRA-3', ανιχνευτής μη-μεταλλαγμένης (wild-type) BRAF: 5-VIC-CTAGCTACAGtGAAATC-TAMRA-3'

Για την ανίχνευση μικροδορυφορικής αστάθειας χρησιμοποιήθηκε κλασσική PCR. Κάθε δείγμα cDNA εξετάστηκε ως προς την έκφραση των γονιδίων: BAT-25at 4q12, BAT-26 at 2p16, D2S123 at 2p16-p21, D5S346 at 5q21-q22, D17S250 at 17q11.2-q12, D18S58 at 18q22-q23, D18S61 at 18q22. Τα πρώτα πέντε γονίδια είναι οι προτεινόμενοι δείκτες μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA (MSI) από το Εθνικό Ογκολογικό Ινστιτούτο των ΗΠΑ (National Cancer Institute – NCI) ενώ το έκτο και έβδομο γονίδιο έχουν προταθεί από ανεξάρτητους ερευνητές ως επιπλέον δείκτες MSI. Στον πίνακα 6 περιγράφονται οι εκκινητές των πέντε πρώτων δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας.

Μοριακός Δείκτης	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής
BAT25	TCG-CCT-CCA-AGA-ATG-TAA-GT	TCT-GGA-TTT-TAA-CTA-TGG-CTC
BAT26	TGA-CTA-CTT-TTG-ACT-TCA-GCC	AAC-CAT-TCA-ACA-TTT-TTA-ACC
D2S123	AAA-CAG-GAT-GCC-TGC-CTT-TA	GGA-CTT-TCC-ACC-TAT-GGG-AC
D5S346	ACT-CACTCT-AGT-GAT-AAA-TCG-GG	AGC-AGA-TAA-GAC-AAG-TAT-TAC-TAG
D17S250	GGA-AGA-ATC-AAA-TAG-ACA-AT	GCT-GGC-CAT-ATA-TAT-ATT-TAA-ACC

Πίνακας 6. Πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές των πέντε μοριακών δεικτών για τον προσδιορισμό μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA όπως προτείνονται από το NCI (National Cancer Institute) των ΗΠΑ.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν δύο φορές ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Για να χαρακτηριστεί ένα γονίδιο με μικροδορυφορική αστάθεια έπρεπε να υπάρχει αλλαγή στον γενετικό του κώδικα (προσθήκη ή διαγραφή βάσης από τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες) που να έχει ως αποτέλεσμα ένα καινούργιο γονίδιο-προϊόν. Εάν περισσότερα από το 30% (τρεις ή περισσότεροι δείκτες) των εξεταζόμενων δεικτών είχαν μικροδορυφορική αστάθεια τότε το δείγμα χαρακτηριζόταν ως MSI-H. Σε περίπτωση που το δείγμα είχε λιγότερους από τρεις δείκτες (<30%) με μικροδορυφορική αστάθεια τότε χαρακτηριζόταν ως MSI-L ή MSS.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Συσχετισμοί μεταξύ της κατάστασης της BRAF (ύπαρξη μετάλλαξης ή όχι), της μικροδορυφορικής αστάθειας, της έκφρασης της πρωτεΐνης Cyclin D1 και των υπόλοιπων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του Fisher's exact test για κατηγορικές μεταβλητές ή logistic regression για συνεχείς μεταβλητές. Το διάστημα χωρίς επιδείνωση της νόσου (progression free survival – PFS) υπολογίστηκε από την ημερομηνία έναρξης της θεραπείας πρώτης γραμμής μέχρι την ημερομηνία που διαπιστώθηκε επιδείνωση της νόσου με απεικονιστικό έλεγχο. Αντίστοιχα, η επιβίωση υπολογίστηκε από την ημερομηνία διάγνωσης της μεταστατικής νόσου μέχρι τον θάνατο του ασθενούς από ΟΚΚ. Η Kaplan-Meier μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί το ποσοστό των ασθενών στο οποίο δεν παρατηρήθηκε επιδείνωση της νόσου στο διάστημα της παρακολούθησής τους. Συσχετισμοί ανάμεσα στους προγνωστικούς παράγοντες την PFS και την μέση επιβίωση προσδιορίστηκαν με την χρήση των Cox proportional hazards regression models. Όλες οι αναφερόμενες τιμές σημαντικότητας (p-value) είναι διπλής κατεύθυνσης, μη προσαρμοσμένες για πολλαπλές αναλύσεις.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν τα 64 χρόνια και το 57% ($n=82$) ήταν άνδρες. Ο διάμεσος χρόνος από την αρχική διάγνωση ΟΚΚ μέχρι τη διάγνωση της μεταστατικής νόσου ήταν 19.3 μήνες (95% CI 14.6-20.3) ενώ ο διάμεσος χρόνος από τη διάγνωση της μεταστατικής νόσου μέχρι την έναρξη της θεραπείας ήταν 0.8 μήνες (95% CI 0.5-1.1). Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη έλαβαν χημειοθεραπεία για μεταστατική νόσο με βάση το 5FU με ή χωρίς μονοκλωνικά αντισώματα (Πίνακας 7). Την περίοδο που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση 132 από τους 144 ασθενείς είχαν αποβιώσει (92%) εκ των οποίων οι 128 (98%) λόγω επιδείνωσης της νόσου τους, 2 ασθενείς (1.5%) λόγω τοξικότητας της θεραπείας και, τέλος, 2 (1.5%) από άλλες αιτίες.

Θεραπεία 1 ^{ης} γραμμής	Αριθμός ασθενών ($n=144$)	%
FOLFOX + BEV	33	23
FOLFOX + CET	9	6
FOLFOXIRI	67	46
FOLFIRI	27	19
FOLFOX	8	6
Θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη (1 ^η γραμμή)	117	82
Θεραπεία με βάση την ιρινοτεκάνη (1 ^η γραμμή)	94	65
BEV + χημειοθεραπεία (1 ^η γραμμή)	33	23
Θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη	128	89
Θεραπεία με βάση την ιρινοτεκάνη	123	85
BEV + χημειοθεραπεία	74	51
CET + χημειοθεραπεία	69	48
Αριθμός ασθενών που έλαβαν οξαλιπλατίνη, ιρινοτεκάνη και 5FU κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους	126	87
Αριθμός ασθενών που έλαβαν οξαλιπλατίνη, ιρινοτεκάνη, 5FU BEV και CET κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους	65	45

Πίνακας 7. Ανάλυση των θεραπειών που έλαβαν οι ασθενείς της μελέτης. FOLFOX: συνδυασμός οξαλιπλατίνης, 5FU, φολινικό οξύ, FOLFIRI: συνδυασμός ιρινοτεκάνης, 5FU, φολινικό οξύ, FOLFOXIRI: συνδυασμός οξαλιπλατίνης, ιρινοτεκάνης, 5FU, φολινικό οξύ

Σαραντα-οκτώ ασθενείς (33%) έλαβαν θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα CET, από τους οποίους οι 11 το έλαβαν ως θεραπεία πρώτης γραμμής ενώ οι υπόλοιποι 37 ασθενείς σαν δεύτερη και άνω γραμμή. Η κατάσταση του KRAS (μεταλλαγμένο m-KRAS, η χωρίς μετάλλαξη, wt-KRAS), ήταν γνωστή σε 42 από τους 48 ασθενείς. Από τους 42 ασθενείς οι 13 (31%) είχαν m-KRAS. Οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS (m-KRAS) είχαν wt-BRAF και αντίστοιχα ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF (m-BRAF) είχαν wt-KRAS. Σε καμία περίπτωση δεν βρέθηκε ασθενής με μετάλλαξη και στα δύο γονίδια ταυτόχρονα. Η ύπαρξη μετάλλαξης στο KRAS είναι προβλεπτική για τη χαμηλή ανταπόκριση στη θεραπεία με CET όπως φάνηκε από την σημαντικά μικρότερη διάρκεια του PFS ($p=0.045$) και τη σημαντικά μικρότερη επιβίωση ($p=0.007$) στους ασθενείς αυτούς. Ομοίως, ασθενείς με μετάλλαξη στο BRAF (m-BRAF) είχαν σημαντικά μικρότερη διάρκεια PFS ($p=0.05$) και σημαντικά μικρότερη επιβίωση ($p=0.004$). Συνολικά, ύπαρξη μετάλλαξης είτε στο KRAS είτε στο BRAF σχετίζεται με σημαντικά μικρότερο PFS ($p=0.013$) και σημαντικά μικρότερη επιβίωση ($p=0.003$) σε ασθενείς που έλαβαν CET. Η μετάλλαξη στο BRAF γονίδιο παραμένει προγνωστική για το PFS ($p=0.003$) και την επιβίωση ($p=0.001$) στον πληθυσμό των ασθενών που δεν έλαβαν CET σε κανένα στάδιο της θεραπείας τους. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αλλά και τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 (σελίδα 60).

Μετάλλαξη στην θέση V600E στο γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη BRAF βρέθηκε σε 12 (8%) ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι 22 (15%) ασθενείς είχαν ελλατωματικό σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (χαρακτηρίστηκαν ως MSI-H ή d-MMR όταν χρησιμοποιήθηκε RT-PCR ή ανοσοϊστοχημεία αντίστοιχα) σε αντίθεση με το υπόλοιπο 85% του πληθυσμού που χαρακτηρίστηκε ως MSI-L ή proficient mismatch repair system (p-MMR). Διαπιστώθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ασθενών που φέρουν μετάλλαξη στην πρωτεΐνη BRAF και ταυτόχρονη ύπαρξη ελλατωματικού συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (MSI-H). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στην BRAF είχε το 45% των ασθενών με MSI-H ενώ μόνο το 1.6% των ασθενών με MSI-L ή MSS είχε μετάλλαξη στην BRAF ($p<0.001$). Ασθενείς που είχαν ταυτόχρονα μεταλλαγμένη BRAF και MSI-H στους όγκους τους είχαν σημαντικά μικρότερο PFS (3.1 μήνες vs 11.4 μήνες, $p<0.008$) και διάμεση

επιβίωση (14.5 vs 35.5 μήνες) σε σχέση με ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως MSI-S ή είχαν wt- BRAF αντίστοιχα (Πίνακας 8).

	MSI-H, n=22 (15%)		MSI-L/MSS, N=122 (85%)		
Σύνολο ασθενών (n=144)	n (%)	Διάμεση τιμή (σε μήνες)	n (%)	Διάμεση τιμή (σε μήνες)	p-value
Διάστημα ελεύθερο νόσου μετά ΧΜΘ 1^{ης} γραμμής					
Μεταλλαγμένο (mutant) BRAF (n=12)	10 (45)	3.1	2 (1.6)	1.6	0.003 ^a
BRAF wt (n=132)	12 (55)	11.4	120 (98.4)	9.7	0.2 ^β
p-value		0.008 ^γ		<0.001 ^δ	
Μέση επιβίωση					
Μεταλλαγμένο (mutant) BRAF (n=12)	10 (45)	14.5	2 (1.6)	2.6	0.05 ^α
BRAF wt (n=132)	12 (55)	35.5	120 (98.4)	30.2	0.4 ^β
p-value		0.004 ^γ		<0.001 ^δ	
<i>Πίνακας 8. Συσχέτιση της κατάστασης του γονιδίου BRAF με την μικροδορυφορική αστάθεια. MSI= μικροδορυφορική αστάθεια του DNA, (α) MSI-H BRAF mutant vs MSS BRAF mutant, (β) MSI-H BRAF wt vs MSS BRAF wt, (γ) MSI-H BRAF mutant vs MSI-H BRAF wt (δ) MSS BRAF mutant vs MSS BRAF wt</i>					

Η διάμεση περίοδος χωρίς επιδείνωση του καρκίνου (PFS) ήταν 9.5 μήνες (95% CI: 8.4-10.8) ενώ και η διάμεση επιβίωση (OS) ήταν 31.5 μήνες (95% CI: 26.4-37.7). Η διάμεση επιβίωση ασθενών με μετάλλαξη της BRAF στην θέση V600E (ομάδα Α) και wt-BRAF (ομάδα Β) ήταν 14 και 30 μήνες αντίστοιχα ($p < 0.001$). Επιπλέον, το PFS ήταν 2.7 μήνες για την ομάδα Α και 9.8 μήνες για την ομάδα Β ($p < 0.001$).

Η μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστικά σημαντικούς συσχετισμούς μεταξύ του PFS (διαστήματος ελεύθερου νόσου) μετά την συμπλήρωση της 1^{ης} γραμμής χημειοθεραπείας με (α) όγκους χαμηλής διαφοροποίησης ($p = 0.001$), (β) μετάλλαξη BRAF στην θέση V600E ($p < 0.001$) και (γ) μη πραγματοποιήσιμη μεταστασεκτομή ($p < 0.001$).

Επιπλέον, η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε συσχετισμό της διάρκειας επιβίωσης (OS) με (α) όγκους υψηλού βαθμού ιστολογικής κακοήθειας ($p < 0.001$), (β) μετάλλαξη BRAF στην

θέση V600E ($p<0.0001$), (γ) μεταστασεκτομή ($p<0.03$) και (δ) το σύνολο των χημειοθεραπειών που έλαβαν οι ασθενείς ($p<0.02$).

			PFS μετά την 1 ^η γραμμή θεραπείας			Διάμεση επιβίωση		
Παράμετρος	n=144	%	Μέση τιμή (σε μήνες)	HR (95% CI)	p-value	Μέση τιμή (σε μήνες)	HR (95% CI)	p-value
Μέση ηλικία (διακύμανση)	64 (23- 81)							
<65 έτη	76	53	9.7	1.3 (0.9- 1.8)	0.1	32.2	1.1 (0.8- 1.7)	0.5
>65 έτη	68	47	8.1			29.3		
Φύλο								
Άνδρες	82	57	8.9	1.3 (0.9- 1.8)	0.2	30.2	1.2 (0.8- 1.7)	0.5
Γυναίκες	62	43	10.3			32.1		
Στάδιο κατά τη διάγνωση								
I-III	82	57	9.4	1.1 (0.7- 1.7)	0.9	31.3	1.4 (0.8- 2.3)	0.2
IV	62	43	8.1			32.1		
Ανατομική θέση όγκου								
Παχύ έντερο	105	73	9.8	1.3 (0.6- 2.6)	0.5	29.8	1.7 (0.7- 4.6)	0.3
Ορθό	39	27	10.4			31.9		
Αριθμός γραμμών ΧΜΘ	Μέση τιμή 3							
1						29.8		
2						34.8	0.8 (0.5- 1.5)	0.6
3						44.2	0.4 (0.2- 0.0)	0.02
Βαθμός κακοήθειας								
1-2	107	74	12.2	2.0 (1.2- 3.2)	0.001	39.2	2.7 (1.6- 4.4)	0.001
3	37	26	7.6			23.8		
Συμπληρωματική θεραπεία								
Ναί	58	40	9.5	1.2 (0.6- 2.5)	0.5	31.6	1.1 (0.6- 1.8)	0.9
Όχι	86	60	10.2			31.4		
Μεταστασεκτομή								
Ναί	21	15	24.2	0.5 (0.2- 0.7)	<0.001	48.7	0.6 (0.2- 0.9)	0.03
Όχι	123	85	9.1			31.4		
BRAF								
Μετάλλαξη	12	8	2.7	2.9 (1.6- 5.4)	<0.001	14.0	4.3 (2.3- 8.2)	<0.001
Wild-type	132	92	9.8			30.3		
MSI								
MSI-H	22	15	9.7	1.0 (0.7- 1.7)	0.8	21.3	1.3 (0.8- 2.1)	0.3
MSI-S / MSS	122	85	10.4			30.2		
Cyclin D1								
Υπερέκφραζεται	26	18	8.3	0.8 (0.5- 1.4)	0.1	21.7	1.1 (0.6- 1.8)	0.7
Εκφράζεται	63	44	9.1			29.1		
Δεν εκφράζεται	55	38	11.5			30.3		

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά ασθενών – αποτελέσματα μονοπαραγοντικής ανάλυσης

Η κυκλίνη D1 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο 18% ($n=26$) των ασθενών, να έχει ασθενή έκφραση στο 44% ($n=63$) και να μην εκφράζεται σε 55 ασθενείς. Η ύπαρξη μετάλλαξης στο γονίδιο BRAF συσχετίστηκε και με την έκφραση της κυκλίνης D1. Ειδικότερα, η κυκλίνη βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο 58% στους όγκους ασθενών με μετάλλαξη του BRAF (BRAF V600E) και στο 14% στους όγκους ασθενών χωρίς μετάλλαξη του BRAF (wt-BRAF) αντίστοιχα ($p<0.001$).

Η πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι το BRAF V600E και ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το PFS (HR 2.8, 95% CI: 1.4-5.7, $p=0.004$ και HR 2.0, 95% CI 1.3-3.2, $p=0.001$, αντίστοιχα) και για OS (HR 5.3, 95% CI: 2.5-11.3, $p<0.001$ και HR 2.6, 95% CI: 1.6-4.4, $p<0.001$, αντίστοιχα). Επιπλέον, η μεταστασεκτομή και ο αριθμός προηγούμενων χημειοθεραπειών είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το PFS και το OS (Πίνακας 10).

	Hazard ratio (HR)	95% CI	p-value
PFS			
BRAF μετάλλαξη (ναί /όχι)	2.8	(1.4-5.7)	0.004
Βαθμός κακοήθειας (3 vs 1-2)	2.0	(1.3-3.2)	0.001
Μεταστασεκτομή (ναί /όχι)	0.5	(0.3-0.8)	0.004
Διάμεση επιβίωση			
BRAF μετάλλαξη (ναί /όχι)	5.3	(2.5-11.3)	<0.001
Βαθμός κακοήθειας (3 vs 1-2)	2.6	(1.6-4.4)	<0.001
Μεταστασεκτομή (ναί /όχι)	0.6	(0.3-0.9)	0.02
Αριθμός γραμμών χημειοθεραπείας (πρώτη γραμμή / >δύο γραμμές)	0.4	(0.2-0.7)	0.009
<i>Πίνακας 10. Συσχέτιση προγνωστικών παραγόντων με PFS (διάστημα χωρίς επιδείνωση νόσου μετά την 1^η γραμμή χημειοθεραπείας) και μέση επιβίωση (OS)</i>			

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ΟΚΚ είναι ο τέταρτος σε συχνότητα καρκίνος παγκοσμίως και είναι η αιτία για 500.000 θανάτους από καρκίνο ετησίως.⁸⁹ Οι στοχευμένες θεραπείες αποτελούν μία καινούργια, ελπιδοφόρα προσθήκη στα υπάρχοντα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του ΟΚΚ. Η θεωρία πίσω από τις στοχευμένες θεραπείες δεν είναι καινούργια. Το 5FU, ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται πολλές δεκαετίες σε ασθενείς με ΟΚΚ, εξελίχθηκε ως στοχευμένη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει τη λειτουργία της θυμιδικής συνθετάσης (thymidilate synthase-TS) ένα ένζυμο-κλειδί στη σύνθεση του γενετικού υλικού (DNA). Το μειονέκτημα του 5FU είναι ότι έχει μικρή ειδικότητα, δηλαδή επηρεάζει τη σύνθεση του DNA και των υγιών ιστών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η δοσολογία του και, κατ' επέκταση, η δραστικότητά του να περιορίζεται από τις παρενέργειές του.

Η αλματώδης ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας βοήθησε να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς καρκινογέννησης του ΟΚΚ. Η αναγνώριση ενδοκυττάρων μοριακών μονοπατιών που προάγουν την ανάπτυξη του καρκινικού κυττάρου οδήγησε στη δημιουργία νέων φαρμακευτικών ουσιών που στοχεύουν στην αναστολή της λειτουργίας βασικών λειτουργιών του καρκινικού κυττάρου. Η πρόοδος της τεχνολογίας βοήθησε στην ανάπτυξη των στοχευμένων θεραπειών που συνέβαλλαν στην βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με ΟΚΚ. Υπάρχουν όμως αρκετά αναπάντητα ερωτήματα ως προς την χρήση των θεραπειών αυτών που η παρούσα μελέτη επιχειρεί να απαντήσει. Επιπλέον, παρατίθενται συνοπτικά νεότερα δεδομένα με έμφαση στον ρόλο της πρωτεΐνης BRAF, το ρόλο της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA και της πρωτεΐνης Cyclin D1 αλλά και ορισμένα ερωτήματα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η μέση επιβίωση των ασθενών στην μελέτη μας ήταν 31.5 μήνες, σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με την επιβίωση που έχει καταγραφεί σε άλλες μελέτες.⁹⁰ Είναι γνωστό ότι η χρησιμοποίηση τριών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (οξαλιπλατίνη, ιρινοτεκάνη, 5FU) κατά τη διάρκεια της θεραπείας ενός ασθενούς με μεταστατικό ΟΚΚ βελτιώνει την μέση επιβίωση.⁹⁰ Οι Grothey και συνεργάτες έδειξαν ότι μελέτες στις οποίες ασθενείς έλαβαν και τα τρία φάρμακα είχαν μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με ασθενείς που έλαβαν λιγότερα από τρία. Ορισμένοι λόγοι της υψηλής επιβίωσης που καταγράφηκε στην μελέτη

μας είναι: (α) ένας μεγάλος αριθμός ασθενών υποβλήθηκε σε χειρουργική αφαίρεση της μετάστασης ή εκτομή της μετάστασης μετά την αρχική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, (β) το 87% των ασθενών της μελέτης έλαβε και τα τρία χημειοθεραπευτικά φάρμακα κατά τη συνολική πορεία της θεραπείας του και (γ) το 45% των ασθενών έλαβε θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα.

Μεταστασεκτομή πραγματοποιήθηκε στο 15% ($n=21$) των ασθενών. Έχει δειχτεί ότι η μεταστασεκτομή όταν είναι εφικτή πρέπει να πραγματοποιείται. Αυξάνει σημαντικά την πενταετή και δεκαετή επιβίωση των ασθενών με ΟΚΚ.⁶ Πρόσφατα η μελέτη των Rees και συνεργατών επαλήθευσε την χρησιμότητα ενός προγνωστικού αλγόριθμου για ασθενείς που έκαναν ηπατική μεταστασεκτομή, που τους εντάσσει σε ομάδες υψηλού ή χαμηλού κινδύνου για υποτροπή.⁹¹ Επιπλέον, αναδρομικές μελέτες αναφέρουν ότι και η εκτομή μεταστάσεων από το πνευμονικό παρέγχυμα αυξάνει την επιβίωση σε ασθενείς με ΟΚΚ.⁹² Συμπερασματικά, η μεταστασεκτομή σε ήπαρ και πνεύμονα πρέπει να πραγματοποιείται όπου κρίνεται εφικτή. Στην παρούσα μελέτη, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών υποβλήθηκε σε αφαίρεση μεταστατικής νόσου γεγονός που οφείλεται σε προηγμένες χειρουργικές τεχνικές, στην αποτελεσματικότητα των νεώτερων φαρμακευτικών θεραπειών αλλά και στην πρόοδο μοριακών τεχνικών που βοηθάνε στην επιλογή των καταλληλότερων θεραπειών όπως για παράδειγμα η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα EGFR.

Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα EGFR (CET, PAN) και έναντι του VEGF (BEV) έχουν συμβάλει στην βελτίωση της επιβίωσης ασθενών με μεταστατικό ΟΚΚ. Στην παρούσα μελέτη ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών έλαβε μονοκλωνικά αντισώματα σε κάποιο στάδιο της θεραπείας του που, ενδεχομένως, να εξηγεί την υψηλή διάμεση επιβίωση. Πρέπει όμως να επισημάνουμε ότι η μελέτη δεν ήταν τυχαιοποιημένη και για τον λόγο αυτόν τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευτούν με επιφύλαξη μέχρις ότου επαληθευτούν σε μεγάλες πολυκεντρικές και τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές.

Μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF (BRAF V600E) βρέθηκε στον πρωτοπαθή όγκο δώδεκα ασθενών (8%). Ταυτόχρονη μετάλλαξη σε KRAS και BRAF δεν παρατηρήθηκε σε καμία περίπτωση. Ο ρόλος της BRAF ως προγνωστικού δείκτη δεν έχει αποσαφηνιστεί. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με m-BRAF έχουν σημαντικά μικρότερο PFS

και διάμεση επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς που είχαν wt-BRAF. Ειδικότερα, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η μετάλλαξη της BRAF είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για χαμηλότερο PFS και μικρότερη διάμεση επιβίωση. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με αυτά προηγούμενων μελετών^{52,67} Πράγματι, η πρώτη είναι μια αναδρομική μελέτη σε 168 ασθενείς και έδειξε την προγνωστική αξία της μετάλλαξης στο γονίδιο της πρωτεΐνης BRAF.⁶⁷ Οι Di Nicolantonio και συνεργάτες μελέτησαν 79 ασθενείς με ΟΚΚ και διαπίστωσαν ότι οι 11 έφεραν τη μετάλλαξη V600E στην πρωτεΐνη BRAF.⁵²

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε, επιπλέον, την στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA με την μετάλλαξη στην πρωτεΐνη BRAF. Συγκεκριμένα, ασθενείς με MSI-H είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες να φέρουν την μετάλλαξη V600E στο γονίδιο BRAF. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης μας με αυτά των δύο προηγούμενων μελετών^{52,67} προτείνουμε, ασθενείς με ΟΚΚ που έχουν MSI-H να ελέγχονται για την κατάσταση του γονιδίου BRAF και του γονιδίου KRAS πριν την χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων CET και PAN. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σημαντικό διότι αναδείξαμε την ύπαρξη μίας ομάδας ασθενών που έχουν μεγάλες πιθανότητες να μην οφεληθούν από θεραπείες που στοχεύουν τον διαμεμβρανικό υποδοχέα EGFR. Είναι, κατά συνέπεια, σημαντικό να αναφέρουμε τις πιθανές θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με την μετάλλαξη V600E στην πρωτεΐνη BRAF.

Το Sorafenib ήταν ο πρώτος αναστολέας του BRAF που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική. Έχει λάβει έγκριση από τον FDA για χρήση στη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Πρόκειται για ένα μικρής ισχύος αναστολέα της BRAF που ασκεί την αντικαρκινική του δράση κυρίως αναστέλλοντας την νεο-αγγειογένεση.⁹³ Σε προκλινικές μελέτες το Sorafenib προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου όταν χορηγήθηκε σε δύο early-stage human colon xenograft models (HT-29 and Colo-205, που εκφράζανε την μεταλλαγμένη BRAF).⁹³ Κλινικές μελέτες του sorafenib σε ασθενείς με ΟΚΚ και μεταλλαγμένη BRAF είναι σε εξέλιξη και αναμένονται με ενδιαφέρον. (www.clinicaltrials.gov) (Πίνακας 11).

Τίτλος Μελέτης	Κατάσταση Μελέτης
<i>BAY 43-9006 Plus Cetuximab to Treat Colorectal Cancer</i>	recruiting
<i>Phase I Trial of Sorafenib + FOLFIRI In Metastatic Colorectal Cancer</i>	recruiting
<i>Sorafenib Plus Capecitabine Efficacy Assessment in Patients With Advanced Pre-treated Colorectal Cancer</i>	recruiting
<i>Sorafenib With Irinotecan in Metastatic Colorectal Cancer (mCRC) and K-RAS Mutation</i>	Active, not recruiting
<i>Sorafenib, Cetuximab, and Irinotecan in Treating Patients With Advanced or Metastatic Colorectal Cancer</i>	Active, not recruiting
<i>Sorafenib and Bevacizumab in Treating Patients With Metastatic Colorectal Cancer</i>	Active not recruiting
<i>Sorafenib and FOLFIRI Regimen in 2nd Colorectal Cancer (CRC) After Failure of Oxaliplatin Treatment</i>	recruiting
<i>Lenalidomide in Combination With Bevacizumab, Sorafenib, Temsirolimus, or 5-Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin (FOLFOX)</i>	recruiting
<i>Pre-operative 5-Fluorouracil (5-FU) and Sorafenib With External Radiation in Locally Advanced Rectal Cancer</i>	recruiting
<i>Πίνακας 11. Κλινικές μελέτες με τον μικρομοριακό αναστολέα πολλαπλών τυροσινικών κινασών sorafenib σε ασθενείς με ΟΚΚ.</i>	

Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για την αποτελεσματικότητα του sorafenib σε ασθενείς με ΟΚΚ (όπως φαίνεται και από τον μεγάλο αριθμό κλινικών μελετών που βρίσκονται σε εξέλιξη) πηγάζει από την δράση του ως αναστολέα της νεο-αγγειογένεσης μέσω της αναστολής των τυροσινικών κινασών των υποδοχέων μεταξύ άλλων του VEGF (VEGF-R) αλλά και αναστέλλοντας την λειτουργία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης BRAF. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του VEGF-R έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού στο οποίο συμμετέχει και η πρωτεΐνη BRAF.⁹⁴ Η αναστολή της νεο-αγγειογένεσης μολονότι μπορεί να επιτευχθεί είτε εξωκυττάρια (αντισώματα έναντι του VEGF-R, όπως το BEV) είτε ενδοκυττάρια (αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του VEGF-R, όπως το SOR) έχει αρκετές αδιευκρίνιστες πτυχές.

Για παράδειγμα, μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί κατάλληλοι προβλεπτικοί δείκτες για την επιλογή ασθενών σε θεραπείες με αναστολείς της νεο-αγγειογένεσης. Μερικοί από τους

λόγους είναι ότι: α) τα καρκινικά κύτταρα μολονότι παράγουν VEGF δεν φέρουν τον αντίστοιχο υποδοχέα (VEGF-R) στην μεμβράνη τους, β) σε μερικές περιπτώσεις, όπως στον καρκίνο του μαστού ο υποδοχέας (VEGF-R) μπορεί να βρίσκεται ενδοκυττάρια και ο ρόλος του να είναι αδιευκρίνιστος⁹⁵ και γ) η αγγειογένεση, ενδεχομένως, να μην είναι χαρακτηριστικό του όγκου αλλά της αλληλεπίδρασης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων με αιματοποιητικά και άλλα κύτταρα.⁹⁶

Ένα επιπλέον πρόβλημα αναφορικά με την χρήση των αντί-νεο-αγγεογενετικών παραγόντων είναι η περιορισμένη κατανόηση από την επιστημονική κοινότητα των κυτταρικών μηχανισμών αντίστασης σε αυτές τις θεραπείες. Κάποιες από τις θεωρίες που έχουν αναπτυχθεί αναφέρουν ότι η υπερπαραγωγή άλλων μορίων όπως του FGF (Fibroblast Growth Factor) αλλά και επίκτητες μεταλλάξεις γονιδίων, όπως του p53, μειώνουν την αποτελεσματικότητα αναστολών της νεο-αγγειογένεσης.^{97, 98}

Ενδεχομένως, η χρήση αναστολών του BRAF που δρουν σε διαφορετικό μοριακό επίπεδο από τους αναστολείς του VEGF-R να αναστέλλουν την νεο-αγγειογένεση αποτελεσματικότερα και γι αυτό προτείνουμε την περαιτέρω διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς τους σε ασθενείς με ΟΚΚ μέσα από μεγάλες τυχαιοποιημένες και πολυκεντρικές κλινικές μελέτες. Ένας από τους νεότερους αναστολείς της μεταλλαγμένης BRAF είναι το vemurafenib (VEM).

Το VEM είχε εντυπωσιακά αποτελέσματα σε μελέτη φάσης I σε ασθενείς με μεταστασικό μελάνωμα και μετάλλαξη στο BRAF. Η αποτελεσματικότητά του σε ασθενείς με ΟΚΚ και μεταλλαγμένο BRAF δεν έχει ακόμα δειχτεί και βρίσκεται σε πρώιμες κλινικές μελέτες.⁹⁹

Ίσως η πιο ελπιδοφόρα θεραπεία έναντι της μεταλλαγμένης BRAF να είναι το VEM, η δραστηριότητα του οποίου επιβεβαιώθηκε σε ασθενείς με μελάνωμα με m-BRAF (V600E). Μολονότι η αναστολή της μεταλλαγμένης BRAF είχε ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση των όγκων στη μελέτη των Flaherty και συνεργατών, παρατηρήθηκε ότι το 25% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με το VEM (PLX4032) παρουσίασαν υπερπλαστικές αλλοιώσεις του δέρματος (κερατοακανθώματα) και σε μερικές περιπτώσεις πλακώδη καρκινώματα.⁷⁴ Η υπόθεση που χρησιμοποιήθηκε για να εξηγηθεί το παραπάνω φαινόμενο ήταν ότι ενώ το υπό μελέτη φάρμακο αναστέλλει τη λειτουργία του μεταλλαγμένου BRAF και σταματάει

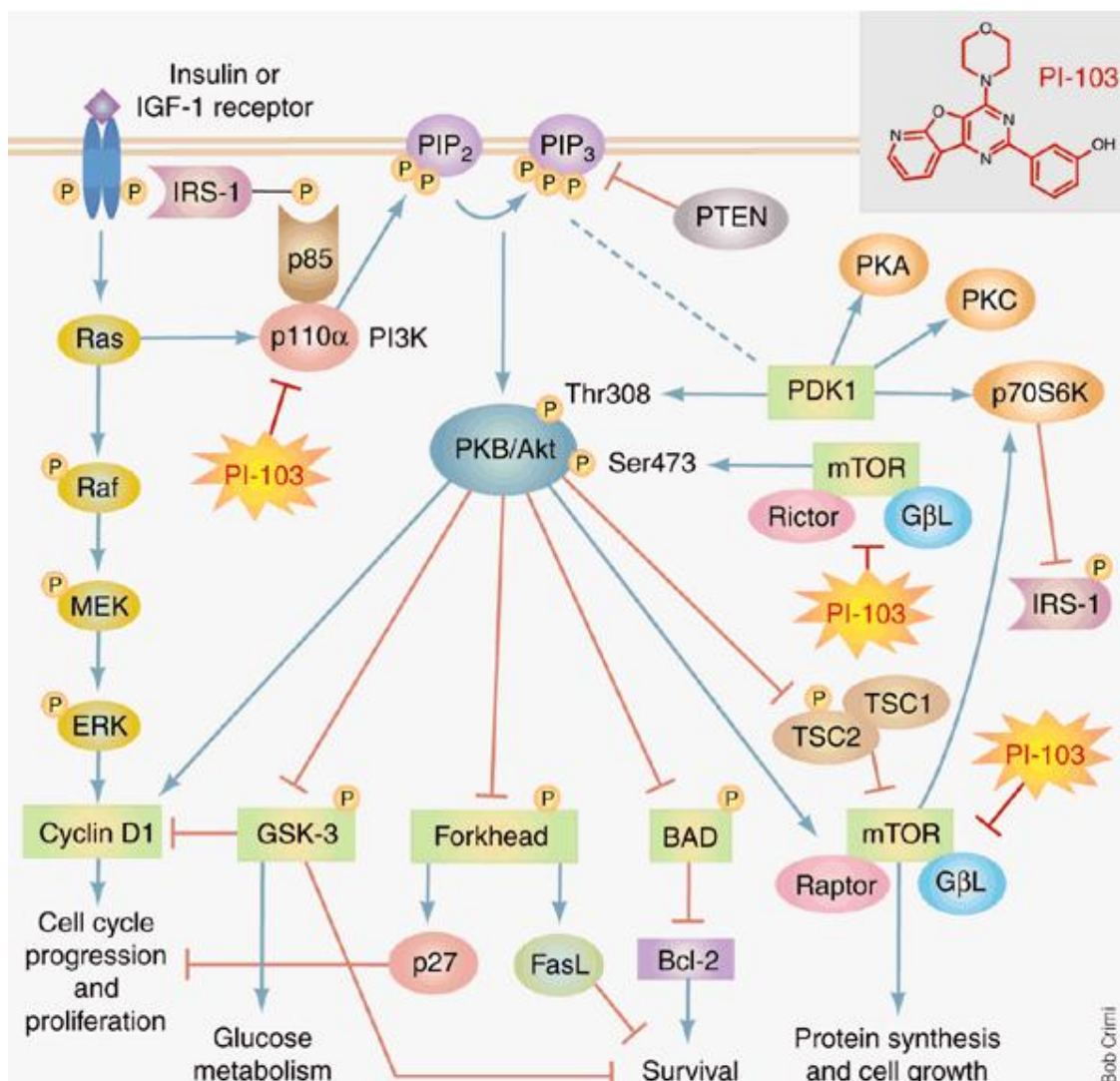
την κυτταρική διαίρεση, όταν ο όγκος δεν έχει μεταλλαγμένο BRAF τότε το PLX4032 ενεργοποιεί το μοριακό μονοπάτι και προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τρεις μελέτες επιχείρησαν να δώσουν απαντήσεις διερευνώντας την παραπάνω υπόθεση:

1. Οι Heidorn και συνεργάτες σε έρευνες σε κυτταρικές σειρές, παρατήρησαν ότι ο BRAF αναστολέας με την κωδική ονομασία 885-A προσδένεται στο μη-μεταλλαγμένο (μη-ενεργοποιημένο) BRAF με αποτέλεσμα να σχηματίζονται διμερή που ενεργοποιούν το μοριακό μονοπάτι. Τα μόρια MEK-ERK συμμετέχουν ενεργά σε αυτήν τη διαδικασία, όπως αναφέρουν οι ερευνητές.¹⁰⁰
2. Οι Chatzivasilίου και συνεργάτες χρησιμοποίησαν διαφορετικούς αναστολείς του μεταλλαγμένου BRAF (GDC-0879 και PLX4720) σε κυτταρικές σειρές με μη μεταλλαγμένο BRAF. Παρατήρησαν ότι η ενεργοποίηση του BRAF γινόταν με το σχηματισμό διμερών που προάγουν την κυτταρική διαίρεση.¹⁰¹
3. Οι Roulikakos και συνεργάτες έδειξαν ότι σε μικρές συγκεντρώσεις οι αναστολείς του BRAF έχουν το αντίστροφο αποτέλεσμα.¹⁰²

Τα συμπεράσματα από τις παραπάνω μελέτες έχουν σημαντικό αντίκτυπο διότι: (α) ασθενείς με μη μεταλλαγμένο BRAF δεν θα πρέπει να λαμβάνουν θεραπεία με φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή της λειτουργίας του. (β) Οι αναστολείς του BRAF δεν ενεργοποιούν το μόριο όριο ERK που βρίσκεται στο ίδιο μοριακό μονοπάτι, σε αντίθεση με τους αναστολείς του MEK (πίνακας 4, σελίδα 22). Αυτό εξηγεί γιατί οι αναστολείς του MEK αποδείχτηκαν λιγότερο αποτελεσματικοί σε σχέση με τους αναστολείς του BRAF. (γ) Το σημαντικότερο ίσως συμπέρασμα είναι ότι, παρά την πολυετή έρευνα που έχει γίνει στους μηχανισμούς λειτουργίας του μονοπατιού KRAS-BRAF-MEK-ERK, ακόμα παραμένουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα κάποια από τα οποία συζητήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Μολονότι η χρήση αναστολέων της πρωτεΐνης BRAF αποτελεί ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για ασθενείς με μεταλλαγμένη KRAS η χρήση τους βρίσκεται ακόμα σε πρόδρομα στάδια κλινικών μελετών και τα αποτελέσματα πρώιμων κλινικών μελετών πρέπει πάντα να αξιολογούνται με επιφύλαξη.

Εναλλακτικοί θεραπευτικοί στόχοι σε ασθενείς με μεταλλαγμένη πρωτεΐνη BRAF μπορούν να αποτελέσουν μόρια που ενεργοποιούνται από την BRAF. Τέτοια μόρια είναι οι πρωτεΐνες MEK1 και MEK2. Συμμετέχουν και οι δύο στο ενδοκυττάριο μονοπάτι του EGFR. Πρόσφατες προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι κυτταρικές σειρές με μεταλλαγμένη (ενεργοποιημένη) KRAS είχαν μικρή ευαισθησία σε αναστολείς του MEK. Η εξήγηση που έδωσαν οι ερευνητές ήταν ότι το μεταλλαγμένο KRAS ενεργοποιεί και άλλα ενδοκυττάρια μονοπάτια όπως το PI3K με αποτέλεσμα η αναστολή του MEK από μόνη της να μην είναι ικανή να σταματήσει την κυτταρική διαίρεση.¹⁰³ Σύγχρονη αναστολή του MEK και της PI3K είχαν ως αποτέλεσμα την εντυπωσιακή αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυτταρικών σειρών.¹⁰⁴ Επιπλέον, η ενεργοποιημένη PI3K ή η χαμηλή έκφραση της ρυθμιστικής της πρωτεΐνης PTEN είχαν ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα των κυτταρικών σειρών σε αναστολείς της MEK.¹⁰⁵ Οι παραπάνω μελέτες αναδεικνύουν ότι ο συνδυασμός φαρμάκων που αναστέλλουν την MEK και την PI3K θα μπορούσε να δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες και πιο συγκεκριμένα σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο KRAS ή στο BRAF. Η Εικόνα 10 αναδεικνύει την πολυπλοκότητα των ενδοκυττάρων μοριακών μονοπατιών αλλά και την σχέση του μορίου MEK/PI3K με την πρωτεΐνη BRAF.

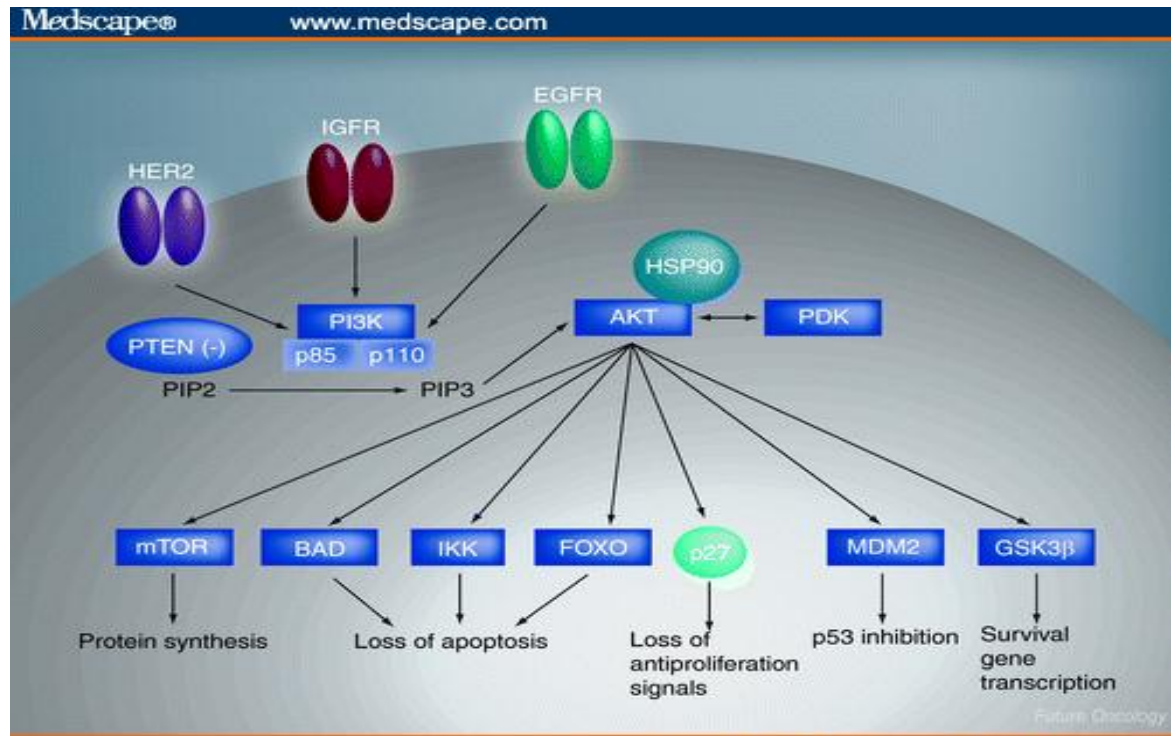


Εικόνα 10. Η πολυπλοκότητα των μοριακών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από την KRAS εξηγεί γιατί η αναστολή πολλαπλών μορίων-στόχων ενδεχομένως να είναι πιο συνετή στρατηγική σε σχέση με την προσπάθεια αναστολής ενός μόνο μορίου

Μια ακόμη θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς με μετάλλαξη στο KRAS ή στο BRAF είναι μέσω της αναστολής διαμεμβρανικών υποδοχών που ενεργοποιούν παρόμοια μοριακά μονοπάτια με τον EGFR. Τέτοιοι υποδοχείς, όπως είναι οι IGF-1 και MET, αποτελούν θεραπευτικούς στόχους σε ασθενείς με ΟΚΚ (Εικόνα 10). Ο κυτταρικός υποδοχέας IGF-1 ενεργοποιεί ενδοκυττάρια μονοπάτια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στον ΟΚΚ.¹⁰⁶ Μελέτες έδειξαν ότι οι υποδοχείς EGFR και IGF-1 λειτουργούν συμπληρωματικά. Σε κυτταρικές σειρές ΟΚΚ η φαρμακευτική αναστολή της λειτουργίας των δύο υποδοχών έδειξε συνέργεια στην αντικαρκινική τους δράση.^{107, 108} Η εξέλιξη φαρμακευτικών ουσιών με δράση εναντίων του IGF-1 βρίσκεται στο στάδιο των πρώιμων κλινικών μελετών.

Προ-κλινικές μελέτες έδειξαν ότι το μοριακό μονοπάτι που συνδέεται με τον υποδοχέα MET (mesenchymal-epithelial transition), βρίσκεται συχνά ενεργοποιημένο σε κύτταρα ανθεκτικά σε θεραπείες που στοχεύουν στην αναστολή του EGFR. Συνεπώς, ο συνδυασμός θεραπειών με δράση στο επίπεδο του MET και του EGFR θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον.¹⁰⁹

110



Εικόνα 11. Ενδοκυττάρια μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους ίδιους εξωκυττάριους υποδοχείς

Όπως δείξαμε στην μελέτη μας, η πρωτεΐνη Cyclin D1 εκφράζεται και στην πλειοψηφία των ασθενών με OKK και ειδικότερα σε αυτούς που φέρουν την μετάλλαξη V600E στο γονίδιο BRAF που έχουν χειρότερη πρόγνωση και λιγότερες θεραπευτικές επιλογές σε σύγκριση με ασθενείς που ο όγκος τους δεν φέρει την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Είναι γνωστό ότι η απορύθμιση του μοριακού μονοπατιού στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη Cyclin D1 έχει κεντρικό ρόλο στην δημιουργία αλλά και την ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου στον άνθρωπο όπως το λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα αλλά και τον καρκίνο του μαστού.

Μολονότι υπάρχει πληθώρα δεδομένων που αναγνωρίζουν τον ρόλο της Cyclin D1 στην διαδικασία της καρκινογέννησης ακόμα δεν έχουν αναπτυχθεί φαρμακευτικές ουσίες που να στοχεύουν στην αναστολή της λειτουργίας της. Ενδεχομένως, η έλλειψη ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας και η θέση της μέσα στο κύτταρο να την καθιστούν δύσκολο

στόχο για την δημιουργία κατάλληλων φαρμάκων. Έμμεσος τρόπος αναστολής της λειτουργίας του εξαρτώμενου από την Cyclin D1 μοριακού μονοπατιού είναι η αναστολή κινασών που συμμετέχουν στο ίδιο μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα, η βιβλιογραφική μας αναζήτηση έδειξε ότι έξι νέες φαρμακευτικές ουσίες που αναστέλλουν την δράση των εξαρτημένων από την Cyclin D1-κινασών (cyclin-dependent kinases inhibitors–CDKi) βρίσκονται στο στάδιο πρώιμων κλινικών μελετών με ενδείξεις αντι-καρκινικής δραστηριότητας (Πίνακας 12).

Φαρμακευτική ουσία (εταιρία)	Πρωτογενείς στόχοι	Κλινικές μελέτες
BAY1000394 (Bayer)	CDK1-cyclin B CDK2-cyclin E CDK9-cyclin T1 CDK4-cyclin D1	Phase I (NCT01188252)
P1446-05 (Piramal Healthcare)	CDK1-cyclin B CDK9-cyclin T CDK4-cyclin D1	Phase I (NCT00840190, NCT00772876)
PD0332991 (Pfizer)	CDK2-cyclin A CDK1-cyclin B CDK5-p25 CDK2-cyclin E2 CDK6-cyclin D2 CDK4-cyclin D3 CDK4-cyclin D1	Phase I and II (NCT00141297, NCT01209598, NCT01037790, NCT00721409)
R547 (Hoffman-Roche)	CDK2-cyclin A CDK1-cyclin B CDK5-p35 CDK2-cyclin E CDK6-cyclin D3 CDK7-cyclin H CDK4-cyclin D3 CDK4-cyclin D	Phase I (NCT00400296)
RGB-286638 (GPC Biotech/Agenix)	CDK2-cyclin A CDK1-cyclin B CDK9-cyclin T CDK2-cyclin E CDK6-cyclin D CDK4-cyclin D	Phase I (NCT01168882)
ZK304709 (Schering pharma AG)	CDK2-cyclin A CDK1-cyclin B CDK9-cyclin T1 CDK2-cyclin E CDK4-cyclin D1 VEGFR/PDGFR TKI	Phase I

Πίνακας 12. Φαρμακευτικές ουσίες σε κλινικές μελέτες που δρουν στο ενεργοποιούμενο από κυκλίνες μοριακό μονοπάτι.

Φαρμακευτικές ουσίες όπως για παράδειγμα το becharotene (ενεργοποιητής του μορίου RXR) βρέθηκε να έχει συνεργιστική δράση όταν δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με τον μικρομοριακό αναστολέα του EGFR – erlotinib, σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ενδιαφέρον προκάλεσε η παρατήρηση ότι μετά την θεραπεία με τον παραπάνω συνδυασμό μειώθηκε αισθητά η έκφραση της Cyclin D1 στους όγκους των ασθενών. Η παρατήρηση αυτή ερμηνεύτηκε ως πιθανή δράση του becharotene στην Cyclin D1 και ότι, επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική έκφρασή της να αποτελεί ένα αξιόπιστο προβλεπτικό δείκτη.
111-112

Τέλος οι αναστολείς των CDKί έχουν δοκιμαστεί σε διάφορους συνδυασμούς με χημειοθεραπεία (cisplatin, doxorubicin, 5FU) ή ορμονοθεραπεία (letrozole) με ενθαρρυντικά πρόδρομα αποτελέσματα.

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το 15% (22/144) των ασθενών είχε ελλατωματικό σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (MSI-H ή d-MMR) σε αντίθεση με το υπόλοιπο 85% που χαρακτηρίζεται ως MSI-L ή proficient mismatch repair system (p-MMR). Οι ασθενείς με p-MMR είχαν ελαφρώς καλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με d-MMR αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Είναι γνωστό ότι το 15% των ασθενών με σποραδικό OKK έχουν τον φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας του γενετικού υλικού (DNA) που οφείλεται στην ύπαρξη μη λειτουργικού συστήματος επιδιόρθωσης (defective mismatch repair system – d-MMR) του DNA.¹¹³ Η ύπαρξη d-MMR εντοπίζεται είτε με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας στο DNA ή με την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση ελλατωματικών πρωτεϊνών, όπως η MLH1, MSH2, MSH6 και άλλες που συμμετέχουν στη λειτουργία επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού.¹¹⁴

Κάποιες αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με OKK και d-MMR έχουν καλύτερη επιβίωση, ανεξαρτήτως σταδίου νόσου, σε σύγκριση με ασθενείς με p-MMR. Οι Thibodeau και συνεργάτες έδειξαν ότι ασθενείς με OKK με d-MMR έχουν καλύτερη επιβίωση σε σχέση με ασθενείς με p-MMR όγκους. Επιπλέον, όγκοι με d-MMR εντοπίζονται πιο συχνά στο ανιόν κόλον.¹¹⁴ Αντίστοιχα αποτελέσματα είχε η μελέτη από τους Lothe και συνεργάτες που έδειξαν ότι οι όγκοι με d-MMR συσχετίζονται με την επιβίωση ασθενών με OKK.¹¹⁵ Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων των δύο παραπάνω μελετών έγινε από τη μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τους Porat και συνεργάτες. Αναλύθηκαν τριάντα δύο μελέτες

με 7642 ασθενείς. Μόνο οι μελέτες που αναφέρονταν τη διάμεση επιβίωση στα αποτελέσματά τους συμπεριλήφθηκαν στη τελική ανάλυση. Στα συμπεράσματα φαίνεται μία βελτίωση της διάμεσης επιβίωσης των ασθενών με d-MMR σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό των ασθενών με ΟΚΚ.⁷⁹

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα επτά μοριακοί δείκτες μικροδορυφορικής αστάθειας αλλά και ανοσοϊστοχημεία γεγονός που ενισχύει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Κάτι τέτοιο δεν έχει γίνει σε καμία από τις προαναφερθείσες μελέτες στο παρελθόν. Συμπερασματικά, ο προγνωστικός ρόλος της μικροδορυφορικής αστάθειας του γενετικού υλικού παραμένει αντικείμενο μελέτης και, ενδεχομένως, η αξία της ως προγνωστικός δείκτης στον μεταστατικό ΟΚΚ να μην είναι καθοριστική.

Η προβλεπτική αξία του MSI έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών. Η πρώτη μελέτη έγινε σε ασθενείς που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία για ΟΚΚ. Τα ιστολογικά παρασκευάσματα 95 ασθενών αναλύθηκαν για την ύπαρξη d-MMR και, στην συνέχεια, έγινε η συσχέτιση τους με το PFS. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με όγκους που ήταν d-MMR είχαν μεγαλύτερο όφελος από τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία σε σχέση με ασθενείς με p-MMR όγκους.¹¹⁶ Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη μελέτη των Elshaleh και συνεργατών.¹¹⁷

Νεώτερες έρευνες σε ασθενείς με ΟΚΚ που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία έδειξαν αντίθετα αποτελέσματα. Οι Ribic και συνεργάτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με d-MMR δεν οφελούνται από συμπληρωματική χημειοθεραπεία.¹¹⁸ Αντίστοιχα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν πρόσφατα από τους Sargent και συνεργάτες αναφέροντας, επιπλέον, ότι ασθενείς με στάδιο II ΟΚΚ έχουν μικρότερη επιβίωση εάν λάβουν συμπληρωματική θεραπεία.¹¹⁹ Από τις παραπάνω μελέτες είναι δύσκολο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά τη χρήση συμπληρωματικής θεραπείας σε ασθενείς με ΟΚΚ. Φαίνεται όμως ότι ασθενείς με στάδιο II ΟΚΚ και d-MMR όχι μόνο δεν ωφελούνται αλλά έχουν χειρότερα αποτελέσματα με τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε σχέση με ασθενείς στο ίδιο στάδιο νόσου αλλά με p-MMR. Σαν συμπέρασμα θα λέγαμε ότι η χημειοθεραπεία θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που τα προσδοκώμενα ωφέλη της είναι μεγαλύτερα από τις αναμενόμενες παρενέργειές της.

Η εργασία μας ανέδειξε την στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA με την παρουσία της μεταλλαγμένης BRAF πρωτεΐνης (10/22 ασθενείς με d-MMR είχαν μεταλλαγμένη BRAF). Ακόμα δείξαμε ότι η παρουσία της μεταλλαγμένης BRAF αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα για τη χρήση αντισωμάτων που δρουν στον EGFR. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα αναγνωρίζεται ο ρόλος της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA ως έμμεσος προβλεπτικός δείκτης στην θεραπεία με αντισώματα έναντι του EGFR. Η προβλεπτική αξία του MSI σε ασθενείς με ΟΚΚ που λαμβάνουν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής δεν έχει ακόμα αποδειχτεί. Οι Jensen και συνεργάτες έδειξαν μια συσχέτιση ανάμεσα σε όγκους με p-MMR (πιο συγκεκριμένα ασθενείς με μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης MSH2) και μεγαλύτερη επιβίωση σε ασθενείς που έλαβαν capecitabine (από του στόματος χορηγούμενο ανάλογο της 5-FU) για την θεραπεία μεταστατικού ΟΚΚ.¹²⁰ Οι Muller και συνεργάτες έδειξαν ότι ασθενείς με d-MMR έχουν χειρότερη εξέλιξη όταν λαμβάνουν τον συνδυασμό οξαλιπλατίνης/5FU ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε σχέση με ασθενείς που έχουν p-MMR όγκους.¹²¹

Η επιτυχημένη εφαρμογή στην κλινική πράξη καινοτόμων στοχευμένων θεραπειών προϋποθέτει την σωστή ταυτοποίηση των μορίων-στόχων αλλά και την σωστή επιλογή των ομάδων των ασθενών με αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης στην θεραπεία. Η συμβολή της παρούσας μελέτης έγκειται στην αναγνώριση ενός πληθυσμού ασθενών που έχουν μικρές πιθανότητες να οφεληθούν από θεραπεία έναντι του EGFR. Επιπλέον, προτείνουμε εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές και αναφέρουμε πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως εφαλτήριο για την εξέλιξη καινούργιων φαρμακευτικών ουσιών για ασθενείς με μεταστατικό ΟΚΚ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο ορθοκολικός καρκίνος (ΟΚΚ) αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περισσότερες από ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις παγκοσμίως. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι σποραδικοί καρκίνοι, δηλαδή καρκίνοι που δεν σχετίζονται με κάποιο κληρονομικό σύνδρομο ή προϋπάρχουσα νόσο.

Παράγοντες κινδύνου για τον ΟΚΚ είναι η ηλικία, το ανδρικό φύλο, το ιστορικό πολυπόδων του εντέρου καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά την επιβίωση ασθενών με ΟΚΚ λόγω των σύγχρονων τεχνικών έγκαιρης διάγνωσης και των αποτελεσματικότερων θεραπειών. Η έγκαιρη διάγνωση επιτυγχάνεται με τη χρήση της δοκιμασίας ανίχνευσης αίματος στα κόπρανα σε συνδυασμό με τεχνικές επισκόπησης του βλεννογόνου του εντέρου, όπως η σιγμοειδοσκόπηση και η κολonosκόπηση.

Η αποτελεσματικότητα των θεραπειών έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αυτό είναι αποτέλεσμα της χρήσης νέων εξελιγμένων φαρμάκων αλλά και της επιλογής θεραπείας με βάση τα χαρακτηριστικά του όγκου του ασθενούς.

Αναλυτικότερα, η θεραπεία περιλαμβάνει τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου όπου αυτή είναι εφικτή και η χορήγηση συνδυασμού χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Τα τελευταία πέντε χρόνια στο οπλοστάσιο των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του ΟΚΚ προστέθηκε μία νέα κατηγορία φαρμάκων – οι στοχευμένες θεραπείες. Το βασικό τους χαρακτηριστικό είναι ότι αναστέλλουν ζωτικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα υγιή κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι λιγότερο τοξικά σε σχέση με τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα που επηρεάζουν τη λειτουργία κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού χωρίς να διακρίνουν τα υγιή από τα καρκινικά.

Η πληθώρα θεραπευτικών επιλογών και η σωστή επιλογή ασθενών σε θεραπείες που έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας έχουν ως αποτέλεσμα την ίαση ή τη μακροχρόνια επιβίωση ασθενών με ΟΚΚ. Δυστυχώς, όμως, η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων έχει

σε πολλές περιπτώσεις σημαντικές παρενέργειες χωρίς τα προσδοκόμενα οφέλη. Θα ήταν πολύ χρήσιμο να υπάρχουν κριτήρια επιλογής ασθενών οι οποίοι να έχουν μεγάλες πιθανότητες να οφεληθούν από τη θεραπεία.

Η πρωτεΐνη BRAF συμμετέχει σε ένα σημαντικό ενδοκυττάριο μοριακό μονοπάτι το οποίο, όταν είναι υπερενεργοποιημένο, συμβάλλει στην καρκινογένεση. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού μπορεί να γίνει με διάφορα ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο, κυρίως από εξωκυττάριους αυξητικούς παράγοντες. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού χωρίς ερέθισμα μπορεί να γίνει όταν η BRAF πρωτεΐνη έχει υποστεί μετάλλαξη. Μεταλλάξεις της *BRAF* έχουν βρεθεί σε διάφορους καρκίνους όπως για παράδειγμα στο μελάνωμα, στα χαμηλής κακοήθειας καρκινώματα των ωοθηκών και στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του θυρεοειδούς. Ο ρόλος της πρωτεΐνης BRAF στον ΟΚΚ δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) του DNA είναι ένας δείκτης της λειτουργίας των ενζύμων επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού. Όταν τα ένζυμα αυτά δυσλειτουργούν τότε οι πιθανότητες καρκινογένεσης αυξάνουν. Ο ρόλος του MSI έχει διερευνηθεί σε ασθενείς που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία για ΟΚΚ. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ΟΚΚ σταδίου Dukes B που χειρουργήθηκαν και έχουν υψηλό δείκτη MSI δεν οφελούνται από συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Ο ρόλος του MSI στον μεταστατικό ΟΚΚ δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Η κυκλίνη D1 έχει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Η σημασία της έκφρασης της κυκλίνης D1 σε ασθενείς με ΟΚΚ δεν είναι γνωστή.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή γίνεται προσπάθεια να αναγνωριστούν μοριακοί παράγοντες στους όγκους ασθενών με ΟΚΚ οι οποίοι έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και να συσχετίσουμε τους παράγοντες αυτούς με την ανταπόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η V600E μετάλλαξη του *BRAF*, η μικροδορυφορική αστάθεια του DNA (microsatellite instability – MSI) και η έκφραση της κυκλίνης D1 στον πρωτοπαθή όγκο των παραπάνω ασθενών.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από τον πρωτοπαθή όγκο 144 ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής για ΟΚΚ από τον Ιανουάριο του 2002 έως τον Δεκέμβριο του 2006 στην Πανεπιστημιακή Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Η εργαστηριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου και στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Ιατρικού τμήματος του Π.Κ. Για την ανίχνευση μεταλλάξεων του *BRAF* χρησιμοποιήθηκε μέθοδος διαχωρισμού αλληλίων με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Για την ανίχνευση της μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης των δεικτών που προτείνονται από το NCI καθώς και ανοσοϊστοχημική μέθοδος για τις πρωτεΐνες του MMR συστήματος.

Για την ανίχνευση της κυκλίνης D1 στον ιστό των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος.

Όλες οι τεχνικές αναφέρονται λεπτομερώς στο πλήρες κείμενο της διδακτορικής διατριβής.

Οι συσχετισμοί ανάμεσα στην πρωτεΐνη *BRAF* το MSI, την έκφραση της κυκλίνης D1 και των χαρακτηριστικών των ασθενών έγινε με τη χρήση του Fisher exact test για κατηγορικές μεταβλητές και λογιστικής παλινδρόμησης για συνεχείς μεταβλητές. Ο χρόνος που η νόσος δεν επιδεινώθηκε (progression free survival–PFS) υπολογίστηκε από την ημέρα που ξεκίνησε η χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής μέχρι την αύξηση της διαμέτρου των όγκων όπως μετρήθηκε στην αξονική τομογραφία. Η επιβίωση των ασθενών υπολογίστηκε από την μέρα διάγνωσης της μεταστατικής νόσου μέχρι την ημέρα θανάτου από ΟΚΚ. Οι συσχετισμοί ανάμεσα στους προαναφερθέντες μοριακούς παράγοντες και το PFS και την επιβίωση έγιναν με τη χρήση του Cox proportional hazards regression models.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν τα 64 έτη και το 57% ($n=82$) ήταν άνδρες. Μεταλλαγμένο *BRAF* (μετάλλαξη στην θέση V600E) ανιχνεύτηκε στο 8% των ασθενών ($n=12$), ενώ 22 ασθενείς (15%) χαρακτηρίστηκαν ως MSI-H. Αναφέρουμε ότι ανοσοϊστοχημεία και μοριακές τεχνικές είχαν ταυτόσημα αποτελέσματα όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των όγκων MSI-H ή MSS. Η κυκλίνη D1 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο 18% ($n=26$) των ασθενών, να έχει ασθενή έκφραση στο 44% ($n=63$) και τέλος να μην εκφράζεται καθόλου σε 55 ασθενείς.

Μεταλλάξεις του *BRAF* βρέθηκαν σε ασθενείς με MSI-H και MSI-L/S σε ποσοστό 45% και 1.6% αντίστοιχα ($p<0.001$). Η ύπαρξη του *BRAF* V600E στον πρωτοπαθή όγκο συσχετίστηκε και με την έκφραση της κυκλίνης D1. Ειδικότερα, η κυκλίνη D1 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο 58% των ασθενών που έφεραν μετάλλαξη του *BRAF* σε σύγκριση με το 14% στους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη του *BRAF* (wt*BRAF*) ($p<0.001$).

Στο σύνολο του πληθυσμού, η διάμεση περίοδος χωρίς επιδείνωση της νόσου (PFS) ήταν 9.5 μήνες (95% CI 8.4-10.8) και αντίστοιχα η διάμεση επιβίωση (OS) 31.5 μήνες (95% CI 26.4-37.7).

Μονοπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σαν σημαντικούς παράγοντες για μειωμένο PFS (α) τη χαμηλή διαφοροποίηση του πρωτοπαθούς όγκου ($p=0.001$), (β) μεταλλαγμένο *BRAF* ($p<0.001$) και (γ) και τη μη πραγματοποιήσιμη μεταστασεκτομή ($p<0.001$). Επιπλέον, η μονοπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σαν σημαντικούς παράγοντες για μειωμένη επιβίωση (OS) (α) όγκους υψηλού βαθμού ιστολογικής κακοήθειας ($p<0.001$), (β) *BRAF* ($p<0.0001$), (γ) μεταστασεκτομή ($p=0.03$) και (δ) το σύνολο των χημειοθεραπειών που έλαβαν οι ασθενείς ($p=0.02$).

Στο σύνολο του πληθυσμού οι ασθενείς με μετάλλαξη στο *BRAF* είχαν στατιστικά σημαντική μικρότερη διάρκεια PFS ($p=0.05$) και μικρότερη επιβίωση ($p=0.004$). Για τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με cetuximab η ύπαρξη μετάλλαξης είτε στο *KRAS* είτε στο *BRAF* σχετίζεται με μικρότερο PFS ($p=0.013$) και μικρότερη επιβίωση ($p=0.003$) σε ασθενείς που έλαβαν CET. Επίσης, η μετάλλαξη στο *BRAF* γονίδιο παραμένει προγνωστική για το PFS

($p=0.003$) και την επιβίωση ($p=0.001$) στον πληθυσμό των ασθενών που δεν έλαβαν cetuximab σε κανένα στάδιο της θεραπείας τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ΟΚΚ είναι ένα από τα πιο συχνά νεοπλάσματα. Ευθύνεται για 49.920 θανάτους στις ΗΠΑ το 2009. Νεότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα προστέθηκαν στην θεραπεία του ΟΚΚ που έχουν ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με μεταστατική νόσο σε δύο χρόνια. Η προσθήκη στη χημειοθεραπεία των θεραπειών μοριακής στόχευσης με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του αυξητικού παράγοντα των ενδοθηλιακών αγγειακών κυττάρων (VEGF, bevacizumab) και έναντι του υποδοχέα του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (EGFR, cetuximab, panitumumab) βελτίωσε τη διάμεση επιβίωση περαιτέρω. Η χρησιμοποίηση των θεραπειών μοριακής στόχευσης (ΘΜΣ) έχει γίνει αντικείμενο εκτενούς μελέτης μετά από την παρατήρηση ότι ασθενείς που φέρουν συγκεκριμένες αλλαγές στο γενετικό τους υλικό έχουν καλύτερες πιθανότητες να οφηληθούν από την χρήση ΘΜΣ. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι ασθενείς με μετάλλαξη στην πρωτεΐνη KRAS έχουν μικρές πιθανότητες να οφηληθούν από το μονοκλωνικό αντισωμα cetuximab.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήσαμε (α) τον ρόλο των πρωτεϊνών *BRAF* και (β) της κυκλίνης D1 ως προγνωστικούς ή/και προβλεπτικούς παράγοντες στην θεραπεία του ΟΚΚ. Επιπλέον, μελετήσαμε (γ) την αστάθεια του γενετικού υλικού και, συγκεκριμένα, των μικροδορυφόρων του DNA (μικροδορυφορική αστάθεια – microsatellite instability, MSI). Η αστάθεια των μικροδορυφόρων του DNA οφείλεται στη δυσλειτουργία του mismatch repair (MMR) συστήματος.

Γίνεται συσχέτιση των παραπάνω τριών παραμέτρων με την ανταπόκριση στην θεραπεία και την επιβίωση των ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής για ΟΚΚ. Από την συσχέτιση αυτή εξάγονται χρήσιμα συμπεράσματα για την προγνωστική και προβλεπτική τους αξία και τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαστρωμάτωση των ασθενών σε μελλοντικές κλινικές μελέτες. Τέλος, η εξαιρετικά δυσμενής πρόγνωση των ασθενών που φέρουν μετάλλαξη του *BRAF* στον πρωτοπαθή όγκο δικαιολογεί την ένταξη

αυτών των ασθενών σε ερευνητικές μελέτες με νέους παράγοντες (π.χ. αναστολείς της BRAF^{V600E}, αναστολείς της ERK).

THESIS SUMMARY

INTRODUCTION

Despite advances in diagnosis and treatment, colorectal cancer (CRC) remains a major public health problem. It is estimated that one million new cases are diagnosed worldwide every year. The majority of the cases are not associated with any underlying condition while recognized risk factors for CRC are male sex, age, bowel polyps and various environmental factors.

The last decade there has been a marked improvement in the survival of patients with CRC. This is partly due to the improved screening and early diagnosis methods and also due to the more efficient surgical and pharmacological treatment options. The guaic-based fecal occult blood test and sigmoidoscopy / colonoscopy are the preferred screening tools. On the other hand efficacy of pharmacological treatments is increased as a result of our better understanding of the molecular mechanisms of cancer that (a) aid in the development of novel compounds and (b) help identify groups of patients more likely to benefit from specific treatments.

The optimal treatment for the newly diagnosed patient with CRC is surgical resection of the primary tumour, whenever this is possible, followed by the administration of systemic chemotherapy. In the recent years a new class of drugs, the targeted therapies (TT), have shown to be beneficial in patients with CRC. One of the advantages of TT is that they block vital functions of the cancer cells while affecting little the healthy tissues. Another aspect of treatment optimization is patient selection. To that end our better understanding of molecular biology is pivotal. The recognition of cancer-promoting alterations in the genome of malignant cells helps not only in the development of targeted therapies but also as prognostic and predictive biomarkers. A specific example is the gene that encodes for the protein BRAF. BRAF is a protein that participates in the RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinase pathway that mediates cellular responses to growth signals. When the gene encoding for BRAF is mutated, specifically a single substitution missense mutation (V600E), it leads to the production of a continuously activated protein that has been shown to have a critical role in

the development of malignant tumors such as melanoma. The mutated variant of BRAF (V600E) is detected in 8-10% of patients with CRC as per recent reports, but its role as a predictive or prognostic biomarker is not yet clear.

The microsatellite instability of DNA (MSI) is characterized by the absence of protein expression encoded by the corresponding mismatch repair (MMR) genes (hMLH1, hMSH2, hMSH6). MSI is observed in the vast majority of patients with hereditary non-polyposis colon cancer and in 20% of patients with sporadic CRC. In the sporadic form the MMR genes are inactivated due to epigenetic methylation in the promoter region of hMLH1 or by alteration of the hMSH2 or hMSH6 genes. Microsatellite genotyping of CRC patients is based on specific standard criteria using specific panels. The use of MSI as predictive and/ or prognostic biomarker is not sufficiently clarified.

Cyclin D1 is a G protein that with the aid of cyclins D2 and D3 activate the cyclin dependent kinases 4 and 6. Extracellular signals, such as growth factor receptor activation, influence cyclin D transcription and translation resulting in mitogenic signaling within the cell cycle machinery. The deregulation of cyclin expression can lead to uncontrolled proliferation independent of extracellular stimuli. Cyclin D1 is a well-established oncogene with evidence suggesting that when amplified or overexpressed can contribute in the development of breast cancer. The role of cyclin D1 in CRC is less well understood nevertheless, it is implicated in EGFR signaling a pathway of special interest in patients with CRC.

The aim of the present project is to identify the role of BRAF, MSI and cyclin D1 in the molecular mechanisms that lead to CRC and investigate their role as potential predictive and / or prognostic biomarkers.

METHOD

A total of 144 consecutive patients, with histologically confirmed CRC and available tumor material for molecular analysis, who were treated in the University Hospital of Heraklion, between January 2002 and December 2006 were included in the study. The study had all the necessary formal approvals and patients gave their informed consent prospectively. All patients had documented metastatic disease and received 5-FU based chemotherapy.

Formalin-fixed, paraffin embedded tumor sections were reviewed by an experienced pathologist to confirm the diagnosis and assess the suitability of the samples for further analysis. The V600E BRAF mutation was detected with the use of real-time PCR (RT-PCR) using the allelic discrimination method. For the immunohistochemical staining of the MMR proteins two antibodies were used, specifically anti-hMLH1, anti-hMSH2 and for cyclin D1 the anti-cyclin D1 antibody. The immunostaining kit used was the UltraVision large volume detection system AP Polymer. The dilutions of the antibodies were: (a) hMLH1 1:50, (b) hMSH2 1:50 and (c) cyclin D1 1:25. Positive and negative staining controls were used in all cases. Microsatellite instability was evaluated in all samples using the five reference markers of the NCI panel in addition to two markers suggested from alternative panels. PCR, using single strand conformation polymorphism in a non denaturing environment, was used for the above mentioned molecular markers. All PCR analyses were repeated twice to confirm the validity of the results. If >30% of the loci examined showed MSI, the tumor was classified as MSI-H whereas if <30% of loci displayed MSI then the tumor was labeled as MSI-L or MSS.

Associations between BRAF mutation status, d-MMR, cyclin D1 expression and baseline characteristics were assessed using the Fisher's exact test for categorical variables or logistic regression for continuous variables. PFS was measured from the date of initiation of first line chemotherapy until the radiologic confirmation of progressive disease or death. Overall survival was calculated from date of diagnosis of metastatic CRC until death.

RESULTS

The median age of patients was 64 years and 57% of them were men. Metastasectomy was performed in 21 (15%) patients. The BRAF V600E mutation and tumors characterized as MSI-H were 12 (8%) and 22 (15%) respectively. Cyclin D1 was overexpressed in 26 (18%) patients while it was weakly expressed in 63 (44%) and not expressed in 55 (38%).

The median time from initial diagnosis to the radiological documentation of metastatic disease was 19.3 months (95% CI 14.6-20.3). Median interval from diagnosis of metastatic CRC to initiation of chemotherapy was 0.8 months (95% CI 0.5-1.1). All patients received 5-

FU based treatment. At the time of the analysis 132 out of the 144 (92%) patients were deceased – 128 due to progressive CRC.

BRAF mutations were found with increased frequency in tumors characterized as MSI-H as compared to MSI-L or MSS tumors (45% and 1.6% respectively, $p=0.001$). In addition the BRAF mutations were also correlated with cyclin D1 overexpression. Specifically cyclin D1 was overexpressed in 58% of BRAF V600E tumors compared to 14% of BRAF wild-type tumors ($p=0.001$).

The median PFS of the patient population enrolled was 9.5 months (95% CI 8.4-10.8) and the median overall survival was 31.5 months (95% CI 26.4-37.7). Patients with wild type BRAF had significantly increased survival and PFS compared to patients with BRAF V600E (30 vs 14 months and 9.8 vs 2.7 months respectively). Univariate analysis revealed significant associations of PFS with undifferentiated tumor histology ($p=0.001$), BRAF mutations ($p<0.001$) and no metastasectomy ($p<0.001$). Overall survival was associated with tumor differentiation ($p<0.001$), BRAF mutations ($p<0.0001$), no metastasectomy ($p=0.03$) and finally the sum of chemotherapy lines the patient received ($p=0.02$).

In multivariate analysis, BRAF V600E and tumor grade were found to be independent prognostic factors for reduced PFS (HR 2.8, 95% CI 1.4-5.7, $p=0.004$ and HR 2.0 95% CI 1.3-3.2, $p=0.001$ respectively) and OS (HR 5.3, 95% CI 2.5-11.3, $p<0.001$ and HR 2.6, 95% CI 1.6-4.4, $p<0.001$ respectively).

Forty-eight patients (33%) were treated with cetuximab, 13 (31%) of them carrying the mutated allele of KRAS in their primary tumors. Interestingly, KRAS and BRAF mutations were found to be mutually exclusive. The presence of either mutation was significantly correlated with decreased PFS ($p=0.013$) and median overall survival ($p=0.003$).

DISCUSSION

Our results indicate that patients with CRC who tumors harbor the mutated variant of BRAF have a significantly lower PFS and OS compared to patients with wild-type BRAF. In addition, the mutated BRAF is predictive of poor response to cetuximab, an anti-EGFR antibody. In our study we report a median OS of 31.5 months which is higher compared to other studies.

Some of the reasons are: (a) a significant percentage of patients underwent metastasectomy following first line chemotherapy. Metastasectomy, has been shown to increase survival and should be pursued when feasible. (b) the majority of the patients in the study received all three chemotherapeutic drugs in the course of their treatment and finally (c) 45% of the patients received cetuximab and bevacizumab.

In our study the incidence of BRAF V600E was significantly higher in tumors characterized as MSI-H or tumors that overexpressed cyclin D1. Given that approximately half of the patients with MSI-H had mutated BRAF, a predictive biomarker for cetuximab, we hypothesize that patients with known MSI-H status could possibly benefit from BRAF assessment prior to treatment with anti-EGFR antibodies.

In summary, patients that have the mutant BRAF represent a population with poor prognosis. Furthermore, treatment with anti-EGFR antibodies should not be routine in patients with BRAF mutations. On the other hand, we should note that these results need to be validated prospectively in randomized trials before applied in clinical practice.

|

6. Βιβλιογραφία

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
3. Colorectal cancer risk factors. 2009.http://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/risk_factors.htm (accessed Feb 2, 2010)
4. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF, et al. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-35.
5. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2004;126:1634-48.
6. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal Cancer. *Lancet* 2010;375:1030-47.
7. Towler B, Irwig L, Glasziou B, et al. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ* 1998;317:559-65.
8. Whitlock EP, Lin JS, Liles E, et al. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the US preventive services task force. *Ann Intern Med* 2008;149:638-658.
9. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP, et al. A case control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992;326:653-7.
10. Newcomb PA, Storer BF, Morimoto LM, et al. Long-term efficacy of sigmoidoscopy in the reduction of colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:622-5.
11. Pignone M, Rich M, Teutsch SM, et al. Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the US Preventive services task force. *Ann Intern Med* 2002;137:132-41.
12. Atkin WS, Edwards R, Wardle J, et al. Design of a multi-centre randomised trial to evaluate flexible sigmoidoscopy in colorectal cancer screening. *J Med Screen* 2001;8:137-44.

13. Segnan N, Senore C, Andreoni B, et al. Baseline findings of the Italian multi-centre randomised controlled trial of once only sigmoidoscopy – SCORE. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1763-72.
14. Lakoff J, Paszat LF, Saskin R, et al. Risk of developing proximal versus distal colorectal cancer after a negative colonoscopy: a population based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1117-21.
15. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, et al. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2009;150:1-8.
16. Halligan S, Altman DG, Taylor SA, et al. CT colonography in the direction of colorectal polyps and cancer: a systematic review, meta-analysis, and proposed minimum data set for study level reporting. *Radiology* 2005;237:893-904.
17. Vijan S, Hwang I, Inadomi J, et al. The cost-effectiveness of CT colonography in screening for colorectal neoplasia. *Am J Gastroenterol* 2007;102:380-90.
18. Imperiale TF, Ransohoff TF, Itzkowitz SH, et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal cancer screening in an average risk population. *N Engl J Med* 2004;351:2704-14.
19. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 2008;135:489-98.
20. Benson VS, Patnick J, Davies AK, et al. Colorectal cancer screening: a comparison of 35 initiatives in 17 countries. *Int J Cancer* 2008;122:1357-67.
21. Compton CC and Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *Ca Cancer J Clin* 2004;54:295-308.
22. Compton CC, Fielding LP, Burgardt LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American pathologists consensus statement. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:979-994.
23. Compton CC et al. AJCC Prognostic Factors Consensus Conference, Colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88:1739-1757.
24. Quirke P, Dixon MF, Durdey P, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. *Lancet* 1986; 2: 996-9.

25. Washington MK, Berlin J, Branton P, et al. Protocol for examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1539.
26. Liebig C, Ayala G, Wilks J, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5131-5137.
27. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, et al. Prospective evaluation of prognostic factors in patients with colorectal cancer undergoing curative resection. *J Surg Oncol* 2003;84:127-131.
28. Quah HM. Identification of patients with high risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rect* 2008;51:53-507.
29. Goldstein NS and Turner JR. Percolonic tumor deposits in patients with T3N+M0: adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2228-2238.
30. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, et al. Extramural cancer deposits without nodal structure in colorectal cancer: optimal categorization for prognostic staging. *J Clin Pathol* 2007;117:287-294.
31. Lo DS, Pollett A, Siu LL, et al. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer* 2008;112:50-54.
32. Puppa G, Maisonneuve P, Sonzogni A, et al. Pathological assessment of pericolonic tumor deposits in advanced colonic carcinoma: relevance to prognosis and tumor staging. *Mod Pathol* 2007;20:843-855.
33. Sargent DJ, Marsoni S, Thibodeau SN, et al. Confirmation of deficient mismatch repair (dMMR) as a predictive marker for lack of benefit from 5-FU based chemotherapy in stage II and III colon Cancer (CC): A pooled reanalysis of randomized chemotherapy trials. *J Clin Oncol* 2008;26(May 20 suppl;abstr 4008).
34. Amado IG, Wolf M, Peeters M et al. Wild-type KRAS is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(10):1626-1634.
35. Lievre A, Bachatte J-B, Blige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-379.

36. Vardakis N, Messaritakis I, Papadaki C, et al. Prognostic significance of the detection of peripheral blood CEACAM5mRNA-positive cells by real-time polymerase chain reaction in operable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010;17:165-173
37. Leung KL, Kwok SPY, Lam SCW, et al. Laparoscopic resection of rectosigmoid carcinoma: prospective randomised trial. *Lancet* 2004;363:1187-92.
38. Guillaou PJ, Quirke P, Thorpe H, et al. for the MRC CLASSIC trial group. Short term endpoints of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASSIC trial):multi-centre, randomised controlled trial. *Lancet* 2005;365:1718-26.
39. Lacy AM, Delgado S, Castells A, et al. The long-term results of a randomised clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg* 2008;248:1-7.
40. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for respectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371:1007-16.
41. IMPACT investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International multi-centre pooled analysis of colon cancer trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995;345:939-44.
42. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomised GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004;22:229-37.
43. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and irinotecan (FOLFOXIRI) compared to infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) as first line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007;13:1670-6.
44. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731-49.
45. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated colorectal cancer: results from the ECOG study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25:1539-44.

46. Scappaticci FA, Fehrenbacher L, Cartwright T, et al. Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *J Surg Oncol* 2005;91:173-80.
47. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. 2010 *J Clin Oncol* 27: 2091–2096.
48. Sienna S, Cassidy J, Tabarnero J, et al. Randomised phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 compared to FOLFOX4 alone as first line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer: PRIME trial. *Gastrointestinal symposium* 2010;283 (abstr).
49. Osborne SK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998;339:1609-18.
50. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;348:2431-42.
51. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-26.
52. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;26:2733-43.
53. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive biomarker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;20:3219-26.
54. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T, et al. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81:153-208.
55. Gibbs JB, Oliff A. The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:143-66.
56. Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: a strategic target of anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999;17:3631-52.

57. Oldam SM, Cox AD, Reynolds ER, et al. Ras but not Src transformation of RIE-1 epithelial cells is dependent on activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Oncogene* 1998;16:2665-73.
58. Rochlitz CF, Scott GK, Dodson JM, et al. Incidence of activating ras oncogene mutations associated with primary and metastatic human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:357-60.
59. Thor A, Ohuchi N, Hand PH, et al. Ras gene alterations and enhanced levels of Ras p21 expression in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Lab Invest* 1986;55:603-15.
60. Kolch W. Ras/Raf signalling and emerging pharmatherapeutic targets. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:709-18.
61. Sebti SM, Hamilton AD. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol ther* 1997;74:103-14.
62. Gibbs JB, Oliff A, Kohl NE, et al. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* 1994;77:175-8.
63. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6771-90.
64. Kaufman HL. *Molecular Targeting in Oncology*. Page 65. Humana Press 2008.
65. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
66. Preto A, Figueiredo J, Velho S, et al. BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. *J Pathol*. 2008;214:320-7.
67. Souglakos J, Philips J, Wang R, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101:465-472.
68. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705-5712.
69. Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs today* 2005;41:773-84.

70. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356:125-34.
71. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer*. 2006;95:581-6.
72. K. T. Flaherty, S. J. Lee, L. M. Schuchter, et al. Final results of E2603: a double-blind, phase III trial, comparing carboplatin/paclitaxel with or without sorafenib in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 8511)
73. Amaravadi RK, Schuchter LM, McDermott DF, et al. Phase II Trial of Temozolomide and Sorafenib in Advanced Melanoma Patients with or without Brain Metastases. *Clin Cancer Res*. 2009;15:7711-7718.
74. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:809-19.
75. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260:812-6.
76. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260:816-9.
77. Lynch HT, Lynch JF. The Lynch syndromes. *Curr Opin Oncol*. 1993;5:687-96.
78. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997;57:808-11.
79. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005 ;23:609-18.
80. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5FU-based adjuvant therapy. *J Natl Caner Inst* 2011;103:863-75.
81. Kaufman HL. *Molecular Targeting in Oncology*. Page 4. Humana Press 2008.
82. Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, et al. The cyclins and the cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 199;20:501-534.

83. Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, et al. Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:34186-95.
84. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 2002;16:3277-89.
85. Hult J, Wang C, Li Z, et al. Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumour number in ApcMin mice. *Mol Cell Biol* 2004;24:7598-7611.
86. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, et al. Cyclin A and Cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer. *BMC Gastroenterology* 2004;4:22.
87. Holland TA, Elder J, McCloud JM, et al. Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21(WAF1/CIP1) expression and correlates with patient survival. *Int J Cancer*. 2001;95:302-6.
88. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4431-8.
89. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
90. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004;22:1209-14.
91. Rees M, Tekkis PP, Welsh FK, et al. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. *Ann Surg*. 2008;247:125-35.
92. Treasure T, Fallowfield L, Lees B, et al. Pulmonary metastasectomy in colorectal cancer: the PulMiCC trial. *Thorax*. 2011 May 10.
93. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099-109.
94. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.

95. Lee TH, Seng S, Sekine M, et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007;4:e186.
96. Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer* 2007;97:978-85.
97. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, et al. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005;8:299-309.
98. Yu JL, Rak JW, Coomber BL, et al. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002;295:1526-8.
99. S. Kopetz, J. Desai, E. Chan, et al. PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. *J Clin Oncol* 2010;28:15s
100. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140:209-221.
101. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464:431-5.
102. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, et al. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464:427-30.
103. Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, et al. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4456-62.
104. Mirzoeva OK, Das D, Heiser LM, et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Res* 2009;69:565-72.
105. Wee S, Jagani Z, Xiang KX, et al. PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers. *Cancer Res* 2009;69:4286-93.
106. Reinmuth N, Liu W, Fan F, et al. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3259-69.
107. Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ, et al. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary

- human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signalling. *Cancer Res* 2002;62:200-7.
108. Hu YP, Patil SB, Panasiwicz M, et al. Heterogeneity of receptor function in colon carcinoma cells determined by cross-talk between type I insulin-like growth factor receptor and epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2008;68:8004-13.
109. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 2007;318:287-90.
110. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG, et al. Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors. *Lancet Oncol* 2009;10:709-717
111. Dragnev KH, Petty WJ, Shah S, et al. Bexarotene and erlotinib for aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8757-8764.
112. Kim ES, Lee JJ, Wistuba II. Co-targeting cyclin D1 starts a new chapter in lung cancer prevention and therapy. *Cancer Prev Res* 2011;4:779-782.
113. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
114. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D, et al. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
115. Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849-52.
116. Hemminki A, Mecklin JP, Järvinen H, et al. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119:921-8.
117. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, et al. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000;355:1745-50.

118. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
119. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219-26.
120. Jensen LH, Danenberg KD, Danenberg PV, et al. Predictive value of MSH2 gene expression in colorectal cancer treated with capecitabine. *Clin Colorectal Cancer* 2007;6:433-5.
121. Müller CI, Schulmann K, Reinacher-Schick A, et al. Predictive and prognostic value of microsatellite instability in patients with advanced colorectal cancer treated with a fluoropyrimidine and oxaliplatin containing first-line chemotherapy. A report of the AIO Colorectal Study Group. *Int J Colorectal Dis* 2008;23:1033-9.

