



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΓΟΥΛΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ
ΜΙΚΡΟΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΥΕΛΟ
ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
ΣΤΑΔΙΟΥ Β2 ΚΑΙ C ΚΑΤΑ ASTLER COLLER**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΒΑΡΔΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

Επιβλέποντες

Γεωργούλιας Βασίλειος (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Συμβουλευτική Επιτροπή

Γεωργούλιας Βασίλειος (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Σαμώνης Γεώργιος (Καθηγητής Παθολογίας)

Χαλκιαδάκης Γεώργιος (Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής)

Εξεταστική Επιτροπή

Γεωργούλιας Βασίλειος (Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Σαμώνης Γεώργιος (Καθηγητής Παθολογίας)

Χαλκιαδάκης Γεώργιος (Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής)

Ζώρας Οδυσσέας (Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής)

Μαυρουδής Δημήτριος (Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας)

Σουγκλάκος Ιωάννης (Λέκτορας Παθολογίας-Ογκολογίας)

Τζαρδή Μαρία (Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας)

**στους γονείς μου,
στη Δέσποινα,
στα παιδιά μου...**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	5
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία ορθοκολικού καρκίνου.....	9
1.2. Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης στον ορθοκολικό καρκίνο	11
1.2.1. Πρότυπα ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου	11
1.2.1.1. Σποραδική μορφή	12
1.2.1.2. Κληρονομική μορφή.....	12
1.2.1.3. Οικογενής μορφή	17
1.2.2. Γονιδιακές μεταλλάξεις και καρκινογένεση ορθοκολικού καρκίνου	17
1.2.2.1. Ακολουθία αδενώματος-καρκινώματος	18
1.2.2.2. Η διαδικασία πολλαπλών βημάτων της καρκινογένεσης.....	18
1.2.2.3. Κυριότερα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση	22
1.3. Σταδιοποίηση ορθοκολικού καρκίνου	25
1.4. Προγνωστικοί παράγοντες	27
1.5. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) στον ορθοκολικό καρκίνο	30
1.5.1. Μέθοδοι και περιορισμοί για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs)	33
1.6. Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA ή CEACAM5) – Edrecolomab (Panogex®) μονοκλωνικό αντίσωμα	39
1.7. Στόχοι Διατριβής.....	41
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
2.1. Οι ασθενείς.....	44
2.2. Μεθοδολογία.....	45
2.2.1. Μοριακή ανίχνευση CEACAM5 mRNA(+) CTCs.....	45

2.2.1.1. Κλινικά δείγματα.....	45
2.2.1.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs).....	46
2.2.1.3. Απομόνωση ολικού RNA.....	47
2.2.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας του ολικού RNA.....	48
2.2.1.5. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	49
2.2.1.6. Δείκτης για την ανίχνευση των CTCs.....	50
2.2.1.7. Ποσοτικός προσδιορισμός του CEACAM5 mRNA με real-time PCR.....	51
2.2.1.8. Σχεδιασμός και επιλογή εκκινητών και ανιχνευτή της εκλεκτικής ανίχνευσης του cDNA του CEACAM5 με real-time RCR.....	53
2.3. Στατιστική ανάλυση.....	55
2.4. Αποτελέσματα.....	56
2.4.1. Βελτιστοποίηση της RT-qPCR μεθόδου.....	56
2.4.2. Ανίχνευση των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων σε ασθενείς και ομάδες ελέγχου.....	64
2.4.3. Προγνωστική σημαντικότητα της ανίχνευσης CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων σε ότι αφορά την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση.....	67
2.4.4. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση.....	72
2.4.5. Δραστικότητα Edrecolomab μονοκλωνικού αντισώματος.....	74
2.5. Συζήτηση.....	76
3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	80
3.2. SUMMARY.....	89
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97
5. ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ.....	112
6. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	115

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs-Circulating Tumor Cells), επίσης γνωστά ως η "λευχαιμική φάση" των συμπαγών όγκων, συνιστούν την αιματογενή οδό της μετάστασης και έχουν συσχετισθεί με την κλινική έκβαση σε διάφορες κακοήθειες, περιλαμβάνοντας τον καρκίνο μαστού, προστάτη, οισοφάγου, στομάχου και τον ορθοκολικό καρκίνο.

Η παρουσία διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων (DTCs-Disseminated Tumor Cells) στον μυελό των οστών έχει συσχετισθεί με πτωχή κλινική έκβαση στον πρώιμο καρκίνο του μαστού σε πολλές μελέτες. Ωστόσο, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) του περιφερικού αίματος είναι ευκολότερη και επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη εκτίμηση και παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (μικρομεταστατικά κύτταρα). Τα μικρομεταστατικά κύτταρα δεν ανιχνεύονται με τις συνήθεις διαγνωστικές τεχνικές. Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί διάφορες μοριακές τεχνικές, προκειμένου να απαντήσουν στην Ογκολογία κρίσιμα ερωτήματα όπως: (α) ποιοι άρρωστοι έχουν τόσο καλή πρόγνωση ώστε να μπορούμε με ασφάλεια να μην χορηγήσουμε συμπληρωματική χημειοθεραπεία (πρόγνωση), (β) ποια θεραπεία θα είναι πιο αποτελεσματική για κάθε συγκεκριμένο ασθενή (πρόβλεψη) και (γ) ποιοι άρρωστοι παραμένουν σε υψηλό κίνδυνο υποτροπής και χρήζουν χορήγησης συμπληρωματικής χημειοθεραπείας.

Το 1996 δημιουργήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης μια ερευνητική ομάδα με στόχο την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού. Έτσι το 1999, μου προτάθηκε η εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα που αφορούσε τη μελέτη των μικρομεταστατικών κυττάρων στον ορθοκολικό καρκίνο, με στήριγμα την εμπειρία που υπήρχε από την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στον καρκίνο του μαστού. Η μελέτη της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου σε ασθενείς με πρώιμο ορθοκολικό καρκίνο σταδίου II-III (B2 – C κατά Astler Coller) έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, διότι μπορεί όχι μόνο να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τη βιολογία της μετάστασης στον ορθοκολικό καρκίνο, αλλά και πιθανά να μπορέσουμε να προβλέψουμε την έκβαση της νόσου σε κάθε

ασθενή. Επιπλέον, στο μέλλον, ο φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός των μικρομεταστατικών κυττάρων, μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς αποτυχίας της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και να εντοπίσουμε καινούργιους θεραπευτικούς στόχους για καινοτόμες στρατηγικές συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, έτσι ώστε να μπορέσουν οι κλινικοί Ογκολόγοι να προσφέρουν εξατομικευμένη θεραπεία στους ασθενείς τους.

Στη παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε μια μέθοδος που χρησιμοποίησε τον δείκτη CEACAM5 (αλλιώς CEA) για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και η οποία ελέγχθηκε για τη προγνωστική της αξία σε 265 ασθενείς με πρώιμο ορθοκολικό καρκίνο. Η έρευνα αυτή, που δημοσιεύθηκε πρόσφατα στη διεθνή βιβλιογραφία, αποδεικνύει ότι η ανίχνευση των CTCs, με τη χρήση ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time RT-qPCR) χρησιμοποιώντας τον δείκτη CEACAM5, έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου II-III. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση μιας διεθνούς πολυκεντρικής μελέτης, στην οποία η κλινική χρησιμότητα της παραπάνω μεθόδου θα ελεγχθεί σε διαφορετικά εργαστήρια και στην οποία θα απαντηθούν ερωτήματα, όπως η σταθερότητα του δείγματος κατά τη μεταφορά, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια και ο έλεγχος της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή και δάσκαλό μου κ. Β. Γεωργούλια τόσο για τη τιμή να μου αναθέσει την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, όσο και για τις γνώσεις που μου έδωσε αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια που συνεργάζομαι μαζί του στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του ΠΑΓΝΗ. Τέλος τον ευχαριστώ γιατί μου έμαθε πώς να προσεγγίζω τον Ογκολογικό άρρωστο και να του προσφέρω τις υπηρεσίες μου. Ιδιαίτερα επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Παθολογίας Ογκολογίας και φίλο μου, κ. Ι. Σουγκλάκο, ο οποίος ήταν και ο επιβλέπων της διατριβής μου τα δυο τελευταία χρόνια, γιατί χωρίς τη συνεχή βοήθειά του δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ τις βιολόγους Μ. Περράκη, Σ. Αποστολάκη, Γ. Σαλούστρου και τον βιολόγο Ι. Μεσσαριτάκη για τις πολύτιμες υποδείξεις τους και τη βοήθειά τους στην εκτέλεση των πειραμάτων. Ευχαριστώ την Data Manager Κα Δώρα Χατζηδάκη και τον Λέκτορα Παθολογίας Ογκολογίας κ. Ι. Σουγκλάκο για τη πολύτιμη βοήθειά τους σε θέματα Βιοστατιστικής. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Σαμώνη, κ. Ζώρα, κ. Χαλκιαδάκη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαυρουδή και την Επίκουρη Καθηγήτρια Κα Τζαρδή, για τις παρατηρήσεις τους σχετικά με τη διατριβή μου.

Ευχαριστώ όλους τους ιατρούς, τις νοσηλεύτριες, τις γραμματείς της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ, τα μέλη της ομάδας των κλινικών μελετών και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου της Βιολογίας του Καρκίνου για τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους ασθενείς που πρόθυμα δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία ορθοκολικού καρκίνου

Ο ορθοκολικός καρκίνος (CRC) αντιπροσωπεύει περίπου το 10% όλων των περιπτώσεων καρκίνου, ενώ τα ποσοστά επίπτωσης και θανάτου είναι υψηλότερα στους Αφρο-Αμερικάνους από ότι στους λευκούς¹.

Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρία (ACS) εκτίμησε ότι το 2010, σε ότι αφορά και τα δυο φύλα, 142.570 άτομα θα διαγνωσθούν με CRC, ενώ ο κίνδυνος διάγνωσης κατά τη διάρκεια της ζωής εκτιμάται ότι είναι 5,9% για τους άνδρες και 5,5% για τις γυναίκες. Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ο τρίτος πιο κοινός καρκίνος και στα δυο φύλα. Τα ποσοστά επίπτωσης της νόσου έχουν ελαττωθεί τις δυο τελευταίες δεκαετίες (από 66,3 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα το 1985 σε 45,5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα το 2006). Η μείωση επιταχύνθηκε από το 1998 έως το 2006 και αποδόθηκε στην αυξημένη δευτερογενή πρόληψη (screening) που αποδόθηκε στην αυξημένη χρήση screening εξετάσεων που επιτρέπουν την ανίχνευση και αφαίρεση των ορθοκολικών πολυπόδων, πριν την εξέλιξή τους σε καρκίνο. Αντίθετα, μεταξύ ενηλίκων μέσου κινδύνου <50 ετών, για τους οποίους δεν συνιστάται screening, τα ποσοστά επίπτωσης CRC έχουν αυξηθεί κατά περίπου 2% ανά έτος από το 1994 και στα δυο φύλα (Πίνακας 1).

Επίσης, εκτιμάται ότι 51.370 θάνατοι από ορθοκολικό καρκίνο αναμένεται να συμβούν το 2010, αποτελώντας το 9% των συνολικών θανάτων από καρκίνο. Τα ποσοστά θνησιμότητας για τον ορθοκολικό καρκίνο έχουν μειωθεί και στους άνδρες και στις γυναίκες τις δυο τελευταίες δεκαετίες, με μεγαλύτερη μείωση πιο πρόσφατα (3,9% ανά έτος για τους άνδρες και 3,4% ανά έτος από το 2001-2006 για τις γυναίκες). Αυτή η μείωση αντανακλά τη πτώση των ποσοστών επίπτωσης και τη βελτίωση στη πρώιμη διάγνωση και θεραπεία².

Υπάρχει τουλάχιστον μια 25πλάσια μεταβολή στην εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Οι ανεπτυγμένες περιοχές - ιδίως Αυστραλία, Δυτική Ευρώπη, Ιαπωνία και Βόρεια Αμερική - έχουν τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης. Οι μεγάλες διαφορές στην επίπτωση, πιθανώς να οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι πιστεύεται ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του ορθοκολικού

καρκίνου. Για περισσότερο από 30 χρόνια, οι επιδημιολόγοι έχουν περιγράψει ισχυρούς διεθνείς συσχετισμούς μεταξύ ορθοκολικού καρκίνου και διαφόρων διαιτητικών συστατικών, περιλαμβάνοντας τη κατανάλωση φυτικών ινών, ζωικών λιπών και κρέατος. Πρόσφατα δεδομένα φαίνεται να δείχνουν, ότι η κατανάλωση κόκκινου κρέατος και η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας πιθανά παίζουν τον μεγαλύτερο ρόλο³. Οι τάσεις επίπτωσης υποδεικνύουν ότι οι κίνδυνοι αυξάνονται σε προηγούμενα χαμηλού κινδύνου περιοχές (π.χ. Ασία), αλλά είναι σταθεροί ή ελαττώνονται σε πολλές, προηγούμενα υψηλού κινδύνου, περιοχές (π.χ. Βόρεια Αμερική). Οι σημαντικές διαφορές στη επιβίωση πιθανά προκύπτουν από διακυμάνσεις στο screening, στη πρώιμη διάγνωση και στις θεραπευτικές υπηρεσίες.

Η μελέτη των πληθυσμών που μεταναστεύουν, προσέφερε σημαντικά στοιχεία στην ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου και ανέδειξε τη σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων. Συνολικά, οι ομάδες μεταναστών τείνουν να έχουν τους κινδύνους για ορθοκολικό καρκίνο της θετής τους πατρίδας, τυπικά σε μια ή δυο γενιές. Για παράδειγμα, μελέτες των Γιαπωνέζων και Κινέζων μεταναστών στις Ηνωμένες Πολιτείες έδειξαν καθαρά αυξήσεις στον κίνδυνο, ίσως οφειλόμενες με αλλαγές στις διαιτητικές συνήθειες, τις διαθέσιμες πηγές τροφίμων ή τη σωματική δραστηριότητα^{4,5}.

Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex for All Sites, US, 2010*						
	Estimated New Cases			Estimated Deaths		
	Both Sexes	Male	Female	Both Sexes	Male	Female
All Sites	1,529,560	789,620	739,940	569,490	299,200	270,290
Oral cavity & pharynx	36,540	25,420	11,120	7,880	5,430	2,450
Tongue	10,990	7,690	3,300	1,990	1,300	690
Mouth	10,840	6,430	4,410	1,830	1,140	690
Pharynx	12,660	9,880	2,780	2,410	1,730	680
Other oral cavity	2,050	1,420	630	1,650	1,260	390
Digestive system	274,330	148,540	125,790	139,580	79,010	60,570
Esophagus	16,640	13,130	3,510	14,500	11,650	2,850
Stomach	21,000	12,730	8,270	10,570	6,350	4,220
Small intestine	6,960	3,680	3,280	1,100	610	490
Colon†	102,900	49,470	53,430	51,370	26,580	24,790
Rectum	39,670	22,620	17,050			
Anus, anal canal, & anorectum	5,260	2,000	3,260	720	280	440
Liver & intrahepatic bile duct	24,120	17,430	6,690	18,910	12,720	6,190
Gallbladder & other biliary	9,760	4,450	5,310	3,320	1,240	2,080
Pancreas	43,140	21,370	21,770	36,800	18,770	18,030
Other digestive organs	4,880	1,660	3,220	2,290	810	1,480
Respiratory system	240,610	130,600	110,010	161,670	89,550	72,120
Larynx	12,720	10,110	2,610	3,600	2,870	730
Lung & bronchus	222,520	116,750	105,770	157,300	86,220	71,080
Other respiratory organs	5,370	3,740	1,630	770	460	310
Bones & joints	2,650	1,530	1,120	1,460	830	630
Soft tissue (including heart)	10,520	5,680	4,840	3,920	2,020	1,900
Skin (excluding basal & squamous)	74,010	42,610	31,400	11,790	7,910	3,880
Melanoma-skin	68,130	38,870	29,260	8,700	5,670	3,030
Other nonepithelial skin	5,880	3,740	2,140	3,090	2,240	850
Breast	209,060	1,970	207,090	40,230	390	39,840
Genital system	311,210	227,460	83,750	60,420	32,710	27,710
Uterine cervix	12,200		12,200	4,210		4,210
Uterine corpus	43,470		43,470	7,950		7,950
Ovary	21,880		21,880	13,850		13,850
Vulva	3,900		3,900	920		920
Vagina & other genital, female	2,300		2,300	780		780
Prostate	217,730	217,730		32,050	32,050	
Testis	8,480	8,480		350	350	
Penis & other genital, male	1,250	1,250		310	310	
Urinary system	131,260	89,620	41,640	28,550	19,110	9,440
Urinary bladder	70,530	52,760	17,770	14,680	10,410	4,270
Kidney & renal pelvis	58,240	35,370	22,870	13,040	8,210	4,830
Ureter & other urinary organs	2,490	1,490	1,000	830	490	340
Eye & orbit	2,480	1,240	1,240	230	120	110
Brain & other nervous system	22,020	11,980	10,040	13,140	7,420	5,720
Endocrine system	46,930	11,890	35,040	2,570	1,140	1,430
Thyroid	44,670	10,740	33,930	1,690	730	960
Other endocrine	2,260	1,150	1,110	880	410	470
Lymphoma	74,030	40,050	33,980	21,530	11,450	10,080
Hodgkin lymphoma	8,490	4,670	3,820	1,320	740	580
Non-Hodgkin lymphoma	65,540	35,380	30,160	20,210	10,710	9,500
Myeloma	20,180	11,170	9,010	10,650	5,760	4,890
Leukemia	43,050	24,690	18,360	21,840	12,660	9,180
Acute lymphocytic leukemia	5,330	3,150	2,180	1,420	790	630
Chronic lymphocytic leukemia	14,990	8,870	6,120	4,390	2,650	1,740
Acute myeloid leukemia	12,330	6,590	5,740	8,950	5,280	3,670
Chronic myeloid leukemia	4,870	2,800	2,070	440	190	250
Other leukemia*	5,530	3,280	2,250	6,640	3,750	2,890
Other & unspecified primary sites*	30,680	15,170	15,510	44,030	23,690	20,340

*Rounded to the nearest 10; estimated new cases exclude basal and squamous cell skin cancers and in situ carcinomas except urinary bladder. About 54,010 female carcinoma in situ of the breast and 46,770 melanoma in situ will be newly diagnosed in 2010. † Estimated deaths for colon and rectum cancers are combined.
#More deaths than cases may reflect lack of specificity in recording underlying cause of death on death certificates or an undercount in the case estimate.
Source: Estimated new cases are based on 1995-2006 incidence rates from 44 states and the District of Columbia as reported by the North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR), representing about 89% of the US population. Estimated deaths are based on data from US Mortality Data, 1969 to 2007, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, 2010.

©2010, American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Policy Research

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Εκτίμηση της Επίπτωσης και Θανάτου CRC με βάση το φύλο, στις ΗΠΑ, το 2010

1.2. Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης στον ορθοκολικό καρκίνο

1.2.1. Πρότυπα Ανάπτυξης Ορθοκολικού καρκίνου

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι συχνή και θανατηφόρος κακοήθεια και στα δύο φύλα, γεγονός που καθιστά τη συγκεκριμένη νόσο σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για τον τρόπο ανάπτυξης της νόσου. Συνήθως αναπτύσσεται με

ένα από τα ακόλουθα τρία πρότυπα, τον σποραδικό, τον κληρονομούμενο και τον οικογενή τύπο.

1.2.1.1. Σποραδικός τύπος.

Ο σποραδικός καρκίνος, χωρίς υπόστρωμα κληρονομικής ή οικογενούς προδιάθεσης, συναντάται περίπου στο 70% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου στον γενικό πληθυσμό. Είναι συχνός σε άτομα μεγαλύτερα των 50 ετών σαν επακόλουθο επίδρασης διαιτητικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

1.2.1.2. Κληρονομικός τύπος.

Ο κληρονομικός τύπος συναντάται περίπου στο 5% των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. Τα κληρονομούμενα σύνδρομα περιλαμβάνουν εκείνα που χαρακτηρίζονται από τη παρουσία πολυπόδων ως κοινή εκδήλωση και εκείνα στα οποία οι πολύποδες απουσιάζουν. Τα σύνδρομα με πολυποδίαση ταξινομούνται στα οικογενή σύνδρομα αδενωματώδους πολυποδίασης (οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση - FAP: Familial Adenomatous Polyposis, το σύνδρομο Gardner και το σύνδρομο Turcot) και στα οικογενή σύνδρομα αμαρτωματώδους πολυποδίασης (Peutz-Jeghers, νεανική πολυποδίαση και σύνδρομο Cowden)⁶. Ο κληρονομούμενος ορθοκολικός καρκίνος που δεν χαρακτηρίζεται από τη ταυτόχρονη ανεύρεση πολυπόδων, είναι γνωστός ως κληρονομικός μη-πολυποδιασικός ορθοκολικός καρκίνος (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer - HNPCC ή σύνδρομο Lynch) και παρουσιάζει πολύ υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου.

Οικογενή Σύνδρομα Αδενοματώδους Πολυποδίασης

A. Οικογενής Αδενοματώδης Πολυποδίαση (FAP). Τα προσβεβλημένα άτομα αναπτύσσουν από εκατοντάδες έως χιλιάδες πολύποδες σε όλη την έκταση του παχέος εντέρου. Όλοι οι ασθενείς με FAP αν δεν αντιμετωπιστούν κατάλληλα θα αναπτύξουν ορθοκολικό καρκίνο. Η μέση ηλικία εμφάνισης των πολυπόδων είναι τα 25 έτη, ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης του συνδρόμου και διάγνωσης του καρκίνου είναι τα 36 έτη και 42 έτη, αντίστοιχα. Το σύνδρομο

συνοδεύεται και από διάφορες εξω-εντερικές εκδηλώσεις (οστεώματα κάτω γνάθου, πολύποδες ανώτερου πεπτικού, δεσμοειδείς όγκοι, συγγενή υπερτροφία επιθηλίου αμφιβληστροειδούς) αλλά και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθων όγκων (δωδεκαδακτύλου, παγκρέατος, θυρεοειδούς, εγκεφάλου - μυελοβλάστωμα, ηπατοβλάστωμα).

Η γενετική διαταραχή που ευθύνεται για το σύνδρομο, είναι η γαμετική μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC (adenomatous Polyposis Coli), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q21. Το APC γονίδιο αποτελείται από 15 εξόνια, ενώ μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κωδόνια σχετίζονται με ανάλογη προεξάρχουσα κλινική εικόνα. Έτσι, μεταλλάξεις μεταξύ των κωδονίων 1250-1464 σχετίζονται με την εμφάνιση χιλιάδων πολυπόδων και βαριά μορφή της νόσου. Η νόσος κληρονομείται με τον αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα και εμφανίζει 100% διεισδυτικότητα.

Υπάρχει γενετικό τεστ για ανίχνευση μετάλλαξης στο γονίδιο APC και θα πρέπει να γίνεται σε:

- ασθενείς με κλινική διάγνωση FAP ή της εξασθενημένης μορφής (AFAP)
- πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων με γνωστή μετάλλαξη στο APC, ανεξάρτητα της ύπαρξης πολυπόδων ή όχι
- Σε άτομα με πολλαπλούς πολύποδες και με ύπαρξη συγγενούς με μετάλλαξη στο APC.

Η ενδοσκόπηση αποτελεί την ενδεδειγμένη μέθοδο παρακολούθησης των ίδιων των ασθενών αλλά και του πρώτου βαθμού συγγενών τους, οι οποίοι οφείλουν να υποβάλλονται σε αυτήν από την ηλικία των 12 ετών. Η ολική κολεκτομή αποτελεί τη θεραπεία εκλογής, αφού αποσκοπεί στην απομάκρυνση του προσβεβλημένου οργάνου (παχύ έντερο και ορθό) και τη προφύλαξη από ανάπτυξη καρκίνου.

B. Εξασθενημένο Σύνδρομο Αδενωματώδους Πολυποδίασης (AFAP).

Αφορά μια υποομάδα ασθενών με FAP, οι οποίοι εμφανίζουν ηπιότερη μορφή της νόσου, δηλαδή μικρότερο αριθμό πολυπόδων και καθυστερημένη ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου. Οφείλεται σε μετάλλαξη στο APC γονίδιο στα 5' (πριν το κωδόνιο 436) και 3' (μετά το κωδόνιο 1596) άκρα. Ο αριθμός

των αδενωμάτων είναι μεταξύ 20 και 100, εντοπίζονται κεντρικότερα της σπληνικής καμπής και είναι επιπέδου ή πολυποειδούς τύπου. Τα συμπτώματα εμφανίζονται με καθυστέρηση 10-15 ετών σε σχέση με τη κλασσική FAP και οι εξωεντερικές εκδηλώσεις είναι ηπιότερες. Περίπου το 69% των ασθενών εμφανίζει ορθοκολικό καρκίνο μέχρι την ηλικία των 80 ετών.

Γ. Σύνδρομο Gardner. Ταυτίζεται με την FAP και χαρακτηρίζεται από πολυποδίαση και πολλαπλά οστεώματα κρανίου και γνάθων, επιδερμικές κύστεις, δεσμοειδείς όγκους και ίνωση του μεσεντερίου η οποία καταλήγει σε θάνατο στο 8% - 11% των περιπτώσεων.

Δ. Σύνδρομο Turcot. Χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νεοπλασμάτων στο παχύ έντερο και το ΚΝΣ. Έχουν περιγραφεί δύο τύποι: α) οικογενής αδеноματώδης πολυποδίαση και πολύμορφο γλοιοβλάστωμα λόγω μεταλλάξεων στο APC γονίδιο και β) καρκίνος παχέος εντέρου και αστροκύτωμα λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων επιδιόρθωσης αστοχίας βάσεων στο DNA (MMR-mismatch repair).

Οικογενή Σύνδρομα Αμαρτωματώδους Πολυποδίασης

A. Σύνδρομο Peutz-Jeghers. Χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη αμαρτωματωδών πολυπόδων (αμαρτωμάτων) στο πεπτικό σύστημα (στόμαχο, λεπτό έντερο, παχύ έντερο) σε συνδυασμό με μελαγχρωματικές κηλίδες (εναπόθεση μελανίνης) βλεννογόνων και δέρματος. Οφείλεται σε γαμετική μετάλλαξη του γονιδίου STK11 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19p13.3 και κληρονομείται με τον αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα με κυμαινόμενη διεισδυτικότητα. Περίπου οι μισοί ασθενείς αναπτύσσουν ορθοκολικό καρκίνο ή γαστρικό καρκίνο, νεοπλασμάτα λεπτού εντέρου, με μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου τα 50 έτη. Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου προέρχονται από τα αμαρτώματα του γαστρεντερικού και περιλαμβάνουν αιμορραγία από το ορθό, απόφραξη ή εγκολεασμό. Υπάρχει διαθέσιμο γενετικό τεστ σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

B. Σύνδρομο Νεανικής Πολυποδίασης (JPS). Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη πολλαπλών αμαρτωμάτων σε όλο τον

γαστρεντερικό σωλήνα (κυρίως στο ορθό αλλά και λεπτό έντερο - στόμαχο). Παρατηρείται στα παιδιά με μέση ηλικία διάγνωσης τα 9,5-18,5 έτη. Η νόσος εκδηλώνεται συνήθως με αιμορραγία, ενώ ο συνολικός κίνδυνος καρκίνου είναι περίπου 50%. Έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο SMAD4 (μέλος της οικογένειας του υποδοχέα TGF-beta).

Γ. Σύνδρομο Cowden. Χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη αμαρτωματωδών όγκων κυρίως του δέρματος (90% - 100%), αλλά και των βλεννογόνων, του γαστρεντερικού, των οστών, του ΚΝΣ, των οφθαλμών, του ουρογεννητικού συστήματος και του θυρεοειδούς. Οφείλεται σε γαμετική μετάλλαξη στο γονίδιο PTEN στο χρωμόσωμα 10 και κληρονομείται με τον αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα. Οι ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού (20% - 30% των γυναικών) και καρκίνου θυρεοειδούς 7%.

Κληρονομικός Μη Πολυποδιασικός Ορθοκολικός Καρκίνος (HNPCC).

Προκαλείται από γαμετική μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης άστοχων βάσεων του DNA (mismatch repair gene) και σχετίζεται με όγκους που εμφανίζουν μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite Instability High - MSI-H). Τα κυριότερα γονίδια που εμπλέκονται στο mismatch repair είναι το hMLH1, hMSH2, hMSH6 και hPMS2. Γαμετικές μεταλλάξεις στα MLH1 και MSH2 γονίδια αποτελούν το 90% των ανιχνεύσιμων μεταλλάξεων σε οικογένειες με HNPCC. Μεταλλάξεις του MSH6 και του PMS2 έχουν αναφερθεί σε 7% - 10% και σε λιγότερο από 5% των οικογενειών με HNPCC, αντίστοιχα.

Χαρακτηρίζεται από αυξημένο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου αλλά και άλλων καρκίνων (όπως του ενδομητρίου, ωοθηκών, στομάχου, λεπτού εντέρου, χοληφόρων, ανώτερου ουροποιητικού, εγκεφάλου και δέρματος). Άτομα με HNPCC έχουν κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου περίπου 80% κατά τη διάρκεια της ζωής τους και η μέση ηλικία ανάπτυξης CRC είναι τα 61 έτη. Γυναίκες με HNPCC παρουσιάζουν κίνδυνο ανάπτυξης ενδομητρικού καρκίνου 20% - 60% στη διάρκεια της ζωής τους, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 46 - 62 έτη. Στο HNPCC, η μέση ηλικία διάγνωσης γαστρικού

καρκίνου είναι τα 56 έτη με πιο συχνό ιστολογικό τύπο το αδenoκαρκίνωμα εντερικού τύπου.

Η διάγνωση του συνδρόμου γίνεται με βάση τα κλινικά κριτήρια Amsterdam (Πίνακας 2) ή με γενετική μοριακή εξέταση για γαμετικές μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης (mismatch repair genes). Η ευαισθησία και η ειδικότητα των κλινικών κριτηρίων Amsterdam για αναγνώριση μιας μετάλλαξης στα γονίδια επιδιόρθωσης MLH1 και MSH2 έχουν αναφερθεί ότι είναι 67% και 61%, αντίστοιχα. Η ευαισθησία αυξάνει στο 78% χρησιμοποιώντας τα Amsterdam κριτήρια II. Πολυπαραγοντικά μοντέλα δείχνουν ότι η διάγνωση ορθοκολικού καρκίνου σε νεώτερη ηλικία, η εκπλήρωση των κριτηρίων Amsterdam και η παρουσία ενδομητρικού καρκίνου στην οικογένεια, είναι ανεξάρτητοι παράγοντες της παρουσίας γαμετικών μεταλλάξεων στα MLH1 και MSH2 γονίδια⁷.

Amsterdam Κριτήρια	Amsterdam II Κριτήρια
Τρία ή περισσότερα μέλη οικογένειας, ένα εκ των οποίων είναι πρώτου βαθμού ¹ συγγενής των άλλων δύο, με επιβεβαιωμένη διάγνωση ορθοκολικού καρκίνου.	Τρία ή περισσότερα μέλη οικογένειας, ένα εκ των οποίων είναι πρώτου βαθμού συγγενής των άλλων δύο, με HNPCC σχετιζόμενους καρκίνους ² .
Δύο διαδοχικές προσβεβλημένες γενιές.	Δύο διαδοχικές προσβεβλημένες γενιές.
Ένας ή περισσότεροι ορθοκολικοί καρκίνοι, διαγνωσμένοι πριν την ηλικία των 50 ετών.	Ένας ή περισσότεροι από HNPCC σχετιζόμενοι καρκίνοι, διαγνωσμένοι πριν την ηλικία των 50 ετών.
Αποκλεισμός FAP.	Αποκλεισμός FAP.
1. Γονέας, παιδί ή αδελφός. 2. Ορθοκολικός, Ενδομητρίου, Στομάχου, Λεπτού εντέρου, Χοληφόρων, Νεφρικής πυέλου, Ουρητήρων.	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Κλινικά Κριτήρια Amsterdam

Περίπου 90% των ορθοκολικών καρκίνων από οικογένειες που πληρούν τα κριτήρια Amsterdam είναι MSI-high (>30% των δεικτών δείχνουν αστάθεια). Αντίθετα, 10% - 20% των ορθοκολικών καρκίνων που εμφανίζονται σε άτομα που δεν είναι γνωστό ότι έχουν HNPCC, έχουν MSI που

προκαλείται είτε από σιωπή (silencing) στη γονιδιακή έκφραση του MLH1 με μεθυλίωση ή από σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair)⁸⁻¹⁰.

1.2.1.3. Οικογενής τύπος.

Η οικογενής μορφή αφορά έως το 25% των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. Οι προσβεβλημένοι ασθενείς έχουν οικογενειακό ιστορικό ορθοκολικού καρκίνου, αλλά η μορφή αυτή δεν εντάσσεται σε κάποιο από τα κληρονομούμενα σύνδρομα. Άτομα από τις συγκεκριμένες οικογένειες, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου, ο κίνδυνος όμως αυτός είναι σημαντικά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο των κληρονομούμενων συνδρόμων.

Σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, η ύπαρξη ενός πρώτου βαθμού προσβεβλημένου συγγενή (γονέα, παιδί ή αδελφό) συνεπάγεται αύξηση κινδύνου ανάπτυξης CRC κατά 1,7 φορές. Ο κίνδυνος αυξάνεται περισσότερο εάν δυο συγγενείς πρώτου βαθμού έχουν καρκίνο παχέος εντέρου, ή εάν το πρώτο περιστατικό στην οικογένεια έχει διαγνωσθεί πριν την ηλικία των 55 ετών.

Όμως, σε ασθενείς καταγόμενους από τους Εβραίους Ashkenazi, μια συγκεκριμένη μετάλλαξη στο γονίδιο APC συνδέεται με ένα οικογενή τύπο ορθοκολικού καρκίνου. Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι αυτές οι οικογένειες αντιπροσωπεύουν μια παραλλαγή του HNPCC¹¹ και συνεπώς ανωμαλίες των διορθωτικών γονιδίων συνταιριάσματος του DNA εμπλέκονται σε σημαντικό ποσοστό αυτών των ασθενειών¹²⁻¹⁴.

1.2.2. Γονιδιακές Μεταλλάξεις και Καρκινογένεση Ορθοκολικού Καρκίνου

Γενετικές μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για τη καρκινογένεση του παχέος εντέρου, τόσο σε ασθενείς με κληρονομούμενα σύνδρομα όσο και ασθενείς με σποραδικό καρκίνο. Γαμετική μετάλλαξη είναι η μετάλλαξη που συμβαίνει πριν ή κατά τη γονιμοποίηση του ωαρίου και μεταδίδεται από τον γονέα στον απόγονο ως κληρονομικό ελάττωμα. Αντίθετα, σωματική μετάλλαξη καλείται

αυτή που εμφανίζεται κατά την ανάπτυξη ενός ιστού ή οργάνου. Οι σωματικές μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου που περιέχει το μεταλλαγμένο γενετικό υλικό (κλωνική εξέλιξη του κυττάρου)¹⁵.

1.2.2.1. Αλληλουχία αδενώματος - καρκινώματος.

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι το αποτέλεσμα μιας πολυσταδιακής διεργασίας σε επίπεδο ιστολογικής αρχιτεκτονικής, η οποία υποκινείται από πολλές μοριακές μεταβολές. Σύμφωνα με την αλληλουχία αδενώματος - καρκινώματος, η ανάπτυξη αδενωματοδών πολυπόδων προηγείται της εμφάνισης του ορθοκολικού καρκίνου στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, καθιστώντας τους πολύποδες προκαρκινικές βλάβες, που επάγουν την ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου.

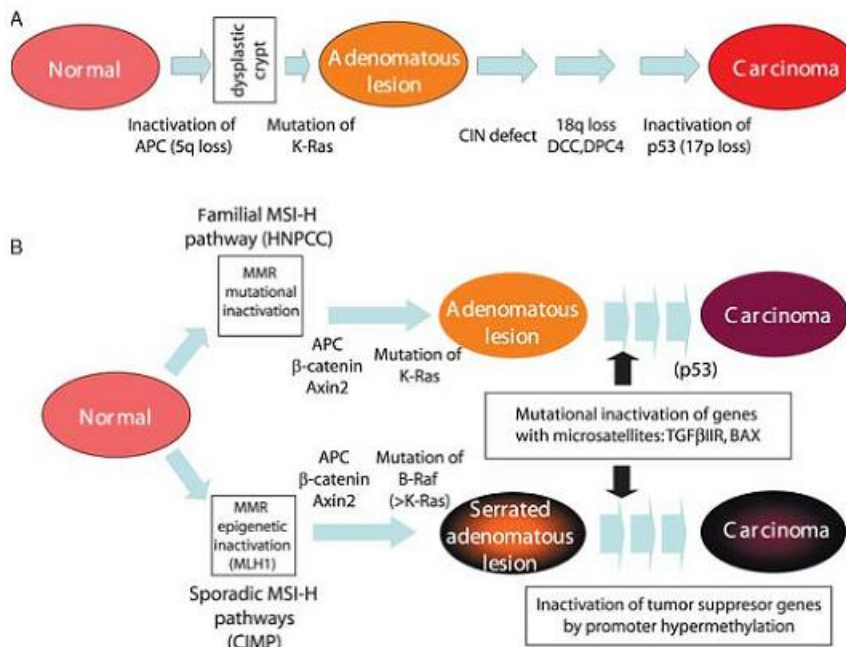
Σημαντικές παρατηρήσεις στηρίζουν το πρότυπο αλληλουχίας αδενώματος - καρκινώματος:

- Γύρω από τον καρκινικό ιστό ανευρίσκονται περιοχές αδενωματοδών αλλαγής, ενώ πρώιμοι καρκίνοι παρατηρούνται συχνά σε μεγάλους αδενωματοδείς πολύποδες.
- Η ενδοσκοπική εκτομή - αφαίρεση πολυπόδων σε ευρείες πληθυσμιακές ομάδες μειώνει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου.¹⁶
- Όταν ασθενείς παρακολουθήθηκαν για 20 χρόνια, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου στη θέση του αδενώματος ήταν 25%, ένα ποσοστό πολύ υψηλότερο από αυτό που αναμένεται στον γενικό πληθυσμό¹⁷.

1.2.2.2. Η Διαδικασία Πολλαπλών Βημάτων της Καρκινογένεσης του Ορθοκολικού Καρκίνου.

Έχει προταθεί ένα απλοποιημένο μοντέλο της εξέλιξης του όγκου, το μοντέλο Fearon-Volgestein¹⁸ (Σχήμα 1). Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει μια βαθμιαία συσσώρευση γενετικών γεγονότων σε μερικά γονίδια "κλειδιά" και γενετικές περιοχές: ενεργοποίηση της Wnt οδού (μέσω μετάλλαξης APC ή β-catenin), ενεργοποίηση του K-ras πρωτο-ογκογονιδίου, μειωμένη έκφραση του SMAD4

και μετάλλαξη του TP53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Στον πίνακα 3, αναφέρονται οι μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου.



ΣΧΗΜΑ 1: Γενετικό πρότυπο της ανάπτυξης του ορθοκολικού καρκίνου. **A:** Η πλειοψηφία των ορθοκολικών καρκίνων προκύπτουν από αδενωμάτωδεις πολύποδες κατά τη διάρκεια μιας περιόδου ετών ή ακόμα και δεκαετιών. Οι κληρονομούμενες και σωματικές γενετικές μεταβολές που θεωρούνται βασικές για την έναρξη και εξέλιξη του όγκου, αναφέρονται στο κείμενο. **B:** Σε περίπου 15% των ορθοκολικών καρκίνων, η λειτουργία επιδιόρθωσης των άστοχων βάσεων (mismatch repair-MMR) είναι απενεργοποιημένη είτε από σωματικές μεταλλάξεις ή από επιγενετική απενεργοποίηση οδηγώντας σε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H). Μεταλλαξιγόνα απενεργοποίηση των MMR γονιδίων πιο συχνά παρατηρείται ως δεύτερο κύττημα σε ασθενείς που ήδη φέρουν γαμετικές μεταλλάξεις στα MMR γονίδια και εμπíπτουν στο σύνδρομο κληρονομικού μη-πολυποδιασικού ορθοκολικού καρκίνου. Επιγενετική απενεργοποίηση των MMR γονιδίων πιο κοινά αφορά υπερμεθυλίωση του εκκινητή του MLH1 γονιδίου. Αυτοί οι όγκοι συχνά παρουσιάζονται αρχικά ως οδοντωτά αδενώματα, παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση διαφόρων γονιδίων (CpG island methylation phenotype, CIMP), και παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο. (Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 8th Edition)

Τύπος Μετάλλαξης	Εμπλεκόμενα Γονίδια	Τύπος Νόσου
Γενετικός	APC* MMR**	Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση HNPCC*** (Σύνδρομο Lynch)
Σωματικός	<u>Ογκογονίδια</u> myc ras src erbB2 <u>Ογκοκατασταλτικά</u> p53 DCC APC <u>Γονίδια MMR</u> hMSH2 hMLH1 hPMS1 hPMS2 hMSH6 hMSH3	Σποραδικός

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Μεταλλάξεις Γονιδίων, Εμπλεκομένων στην Ανάπτυξη του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου

*APC: Γονίδιο Αδενωματώδους Πολυποδίασης Παχέος Εντέρου **MMR: Γονίδια επιδιόρθωσης αστόχου ζευγαρώματος ***HNPCC: Κληρονομούμενος Μη Πολυποδιασιακός ορθοκολικός Καρκίνος

Μια πιο λεπτομερής μοριακή ανάλυση της νόσου, αποκάλυψε όγκους που είναι ετερογενείς σε σχέση με τις μοριακές μεταβολές, και δυνητικά κατηγοριοποιήσιμοι σε ειδικούς ογκολογικούς φαινότυπους με βάση το μοριακό τους προφίλ. Δύο από αυτούς τους φαινότυπους σχετίζονται με γενετική αστάθεια.

Η πλειοψηφία των σποραδικών περιπτώσεων (περίπου το 85%) επιδεικνύουν χρωμοσωμική αστάθεια (CIN - chromosomal instability) και αφορά σε απώλεια μεγάλων τμημάτων κάποιων χρωμοσωμάτων. Οι όγκοι με CIN φέρουν στο σύνολό τους μια γενετική μεταβολή που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt (συνηθέστερα αδρανοποιό μετάλλαξη του APC) και πολύ συχνά μεταλλάξεις των K-ras και TP53.

Σε αντίθεση, το υπόλοιπο 15% του σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου,

επιδεικνύουν ένα φαινόμενο μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-microsatellite instability) και οφείλεται στην απώλεια λειτουργίας του mismatch repair (MMR) συστήματος^{18,19}.

Τα παραπάνω οδήγησαν στο απλουστευμένο μοντέλο των δύο μονοπατιών που οδηγούν στην ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου: α) το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN) με το μοντέλο της εξέλιξης από αδένωμα σε καρκίνωμα²⁰ και β) το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας²¹.

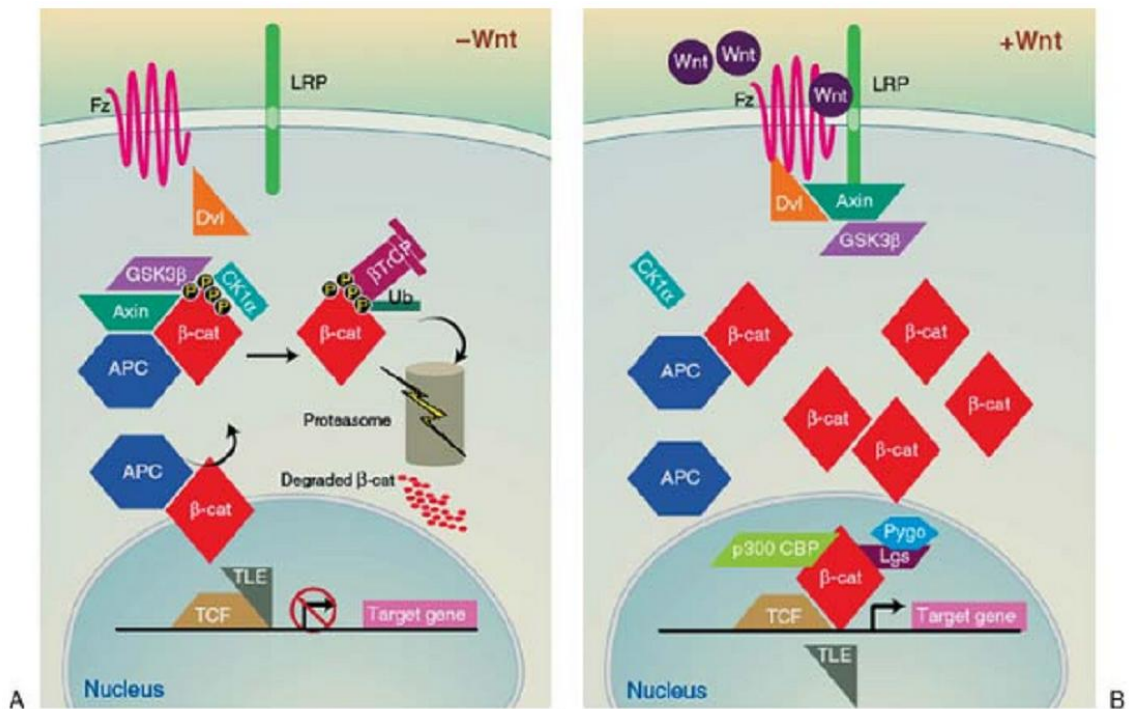
Υπάρχουν όμως μερικές περιπτώσεις σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου που δεν μπορούν να ενταχθούν στο μονοπάτι της CIN ή της MSI²², στις οποίες παρατηρήθηκαν επιγενετικές αλλαγές κυρίως λόγω μεθυλίωσης του DNA. Έτσι καθορίστηκε ένας υπότυπος της νόσου με σημαντική υπερμεθυλίωση, ο οποίος χαρακτηρίστηκε ως CIMP (CpG Island Methylator Phenotype)^{23,24}. Οι περιπτώσεις CIMP χαρακτηρίζονται κυρίως από μεταλλάξεις του BRAF (έως και 50% των περιπτώσεων) και πολύ σπάνια των APC, K-ras, TP53.

Από τα παραπάνω λοιπόν φαίνεται ότι ο ορθοκολικός καρκίνος είναι μια ετερογενής νόσος και η περαιτέρω μελέτη των μονοπατιών που οδηγούν στη νόσο θα έχει επίπτωση στη χάραξη στρατηγικών πρόληψης, προληπτικού ελέγχου, διάγνωσης και θεραπείας. Πρόσφατα, η ανάλυση της μετάλλαξης του K-ras γονιδίου (επίπτωση 40%), αποτελεί ένα παράδειγμα ανάπτυξης βιοδεικτών στην εποχή θεραπειών μοριακής "στόχευσης"²⁵. Έτσι λοιπόν αποδείχθηκε ότι οι ασθενείς, των οποίων ο πρωτοπαθής όγκος φέρει μεταλλάξεις του K-ras, έχουν νόσο ανθεκτική στη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα (Cetuximab, Panitumumab) έναντι του EGFR²⁶⁻³⁰ (υποδοχέας ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα). Αυτό οδήγησε τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων να αλλάξει την ένδειξη χρήσης των φαρμάκων αυτών (μόνο σε όγκους που φέρουν wild-type K-ras).

Οι γενετικές μεταλλάξεις που χαρακτηρίζουν τον ορθοκολικό καρκίνο είναι πολύ καλά τεκμηριωμένες και οι συχνότερες από αυτές είναι των APC, K-ras και TP53 γονιδίων, ακολουθούμενες σε συχνότητα από τις μεταλλάξεις των PIK3CA και BRAF γονιδίων³¹.

1.2.2.3. Κυριότερα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση

APC γονίδιο. Ογκοκατασταλτικό γονίδιο εντοπιζόμενο στο χρωμόσωμα 5q21, αποτελεί πιθανά το σπουδαιότερο γονίδιο που εμπλέκεται στη πρώιμη ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου. Μια μοναδική γαμετική μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης, ενώ σωματικές μεταλλάξεις και στα δυο αλληλία γονίδια εμφανίζονται στο 80% των σποραδικών ορθοκολικών καρκίνων. Έτσι, απώλεια και του δεύτερου APC αλληλόμορφου, διαμέσου διαγραφής ή σωματικής μετάλλαξης, εμφανίζεται στις πρώιμες κακοήθεις αλλοιώσεις (πρόδρομες εστιακές δυσπλαστικές κρύπτες - μικροαδενώματα - μικροί αδενωματώδεις πολύποδες). Οι περισσότεροι σποραδικοί ορθοκολικοί καρκίνοι με φυσιολογικό (wild-type) APC γονίδιο παρουσιάζουν μεταλλάξεις στη β-catenin, μια πρωτεΐνη οποία εμπλέκεται στον ίδιο καταρράκτη σηματοδότησης όπως το APC, την οδό Wnt (wingless-type)³²⁻³³. Η οδός Wnt, εκτός από τη συμβολή της στην εμβρυική ανάπτυξη, κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανανέωση του εντερικού επιθηλίου. Έτσι, η wild-type APC πρωτεΐνη, παρεμποδίζει τη συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, μεσολαβώντας στη φωσφορυλίωση και αποδόμησή της. Αντίθετα, οι γαμετικές και σωματικές μεταλλάξεις του APC, οδηγούν σε απώλεια της APC πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση της β-κατενίνης στον πυρήνα, η οποία δεσμεύει και ενεργοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής Tcf-4 (T-cell factor)³⁴⁻³⁵. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αντίσταση στην απόπτωση και ο συνεχής κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Σχήμα 2).



ΣΧΗΜΑ 2: Βασικά χαρακτηριστικά της οδού Wnt και ο ρόλος του APC και β-catenin στην απόπτωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (Devita, Hellman & Rosenberg's *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 8th Edition)

Γονίδιο TP53. Ογκοκατασταλτικό γονίδιο εντοπιζόμενο στο χρωμόσωμα 17p και είναι το γονίδιο που μεταλλάσσεται περισσότερο στον καρκίνο. Η απώλεια του TP53 συναντάται στο 75% των ορθοκολικών καρκίνων και μάλιστα καθυστερημένα στην ογκογένεση της νόσου, αφού δεν παρατηρείται η απώλειά του σε αδενώματα και πρόδρομες εστιακές δυσπλαστικές κρύπτες³⁶. Το wild-type (φυσιολογικό) TP53 αναφέρεται ως "ο φύλακας του γονιδιώματος" (guardian of the genom)³⁷, αφού κατέχει έναν σπουδαίο και κεντρικό ρόλο στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με βλάβη του DNA. Το wild-type γονίδιο μέσω επαγωγής-ενεργοποίησής του, αναστέλλει την αύξηση των κυττάρων ως απάντηση σε παράγοντες οι οποίοι καταστρέφουν το DNA (ακτινοβολία, υποξία, χημικοί παράγοντες)³⁸⁻⁴⁰. Αφού ενεργοποιηθεί, προκαλεί μια ποικιλία από δράσεις, οι οποίες περιορίζουν την αύξηση (διακοπή κυτταρικού κύκλου για να διευκολυνθεί η επιδιόρθωση του DNA, ενεργοποίηση απόπτωσης και αντιαγγειογενετικών οδών). Η απενεργοποίηση του TP53, στο 50% - 70% των ασθενών με ορθοκολικό

καρκίνο, συμβαίνει με μετάλλαξη του ενός αλληλόμορφου γονιδίου, η οποία ακολουθείται από την απώλεια του εναπομείναντος γονιδίου wild-type^{41,42}.

Ογκογονίδιο K-ras. Η Ras οικογένεια των μικρών G-πρωτεϊνών, λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες στις οδούς σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα. Τα τρία μέλη της (K-ras, H-ras, N-ras), συχνά μεταβάλλονται από σωματικές μεταλλάξεις στους ανθρώπινους καρκίνους. Μεταλλάξεις των K-ras γονιδίων αναγνωρίζονται στο 40% των ορθοκολικών καρκίνων⁴³. Οι περισσότερες Ras μεταλλάξεις είναι παρούσες στα κωδόνια 12 και 13 του K-ras, με περίπου το 70% των ras μεταλλάξεων να παρουσιάζονται στο κωδόνιο 12 και περίπου το 20% στο κωδόνιο 13. Δεν έχουν περιγραφεί H-ras μεταλλάξεις στον ορθοκολικό καρκίνο.

Οι K-ras μεταλλάξεις μπορεί να συμβάλλουν στην εξέλιξη των ορθοκολικών αδενωμάτων, αλλά σίγουρα δεν απαιτούνται για την έναρξη σχηματισμού του αδενώματος. Στους αδενωμάτωδεις πολύποδες, η συχνότητα των K-ras μεταλλάξεων εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης. Μόνο 10% των αδενωμάτων κάτω του 1cm έχουν K-ras μεταλλάξεις, ενώ το 50% των αδενωμάτων μεγαλύτερων του 1cm έχουν μεταλλάξεις του K-ras⁴⁴.

Οι Ras πρωτεΐνες, ενεργοποιούν απ' ευθείας μια πρωτεϊνική κινάση, την B-raf, η οποία είναι μεταλλαγμένη στο 5% των ορθοκολικών καρκίνων⁴⁵. Αυτές οι μεταλλάξεις σχετίζονται σε υψηλό βαθμό με τη παρουσία ενός φαινότυπου υπερμεθυλίωσης CpG νησίδων (CpG island hypermethylation phenotype)⁴⁶.

Γονίδια Επιδιόρθωσης DNA. Τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair-MMR) είναι υπεύθυνα για τη διόρθωση λαθών που συμβαίνουν κατά τον διπλασιασμό του DNA και τα λάθη αυτά αφορούν άστοχο ζευγάρωμα των νουκλεοτιδικών βάσεων και μικρών εισαγωγών ή διαγραφών⁴⁷⁻⁴⁹. Τα κυριότερα MMR γονίδια είναι τα hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6 και hMLH3.

Ανωμαλίες των γονιδίων αυτών ανευρίσκονται στο 15%-20% των σποραδικών καρκίνων^{50,51}, ενώ γαμετική μετάλλαξη σε ένα από τα MMR γονίδια είναι η βασική γενετική διαταραχή στον κληρονομικό μη πολυποδιασικό ορθοκολικό καρκίνο (HNPCC). Ο σποραδικός καρκίνος με

ελαττωματικά MMR γονίδια χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ανωμαλιών σε βραχείες αλληλουχίες νουκλεοτιδικών βάσεων, οι οποίες ονομάζονται μικροδορυφόροι⁵². Όταν υπάρχουν ελαττωματικά MMR γονίδια, αρκετά "κρίσιμα γονίδια" [*TGFβ-RII* (υποδοχέας του νεοπλασματικού αυξητικού παράγοντα β), *BAX*, *Caspase-5* (οι δύο τελευταίες κωδικοποιούν προαποπτωτικά μόρια), *TCF4* (όπου απενεργοποίησή του αντιπροσωπεύει έναν εναλλακτικό μηχανισμό απορρύθμισης του *Wnt/APC/β-catenin* οδού στους ορθοκολικούς καρκίνους)] για τη ρύθμιση της αύξησης του καρκινικού κυττάρου, περιέχουν μικροδορυφόρους στη περιοχή του εκκινήτη που είναι επιρρεπείς σε μεταλλάξεις. Αυτό το φαινόμενο καλείται αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (microsatellite instability, MSI-H)^{53,54}. Οι σποραδικοί ορθοκολικοί καρκίνοι που παρουσιάζουν MSI-H (15% των περιπτώσεων), τείνουν να εμφανίζονται στο εγγύς παχύ έντερο, παρουσιάζουν μεγαλύτερη σύνθεση βλέννης, λεμφοκυτταρικές διηθήσεις και συνήθως είναι χαμηλής διαφοροποίησης. Η παρουσία MSI-H συνδέεται με μακρύτερη επιβίωση τόσο στον HNPCC όσο και στον σποραδικό ορθοκολικό καρκίνο^{55,56}.

1.3. Σταδιοποίηση ορθοκολικού καρκίνου

Σε αντίθεση με τα άλλα συστήματα σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου (Duke's, MAC η οποία είναι μια τροποποιημένη κατά Astler-Coller σταδιοποίηση) το TNM πλεονεκτεί στο ότι ενημερώνεται συνεχώς με σύγχρονα δεδομένα, έχει διεπιστημονικό σχεδιασμό, επιτρέπει την ενσωμάτωση όλων των τεχνολογικών προσεγγίσεων και τέλος έχει ένα περιεκτικό σύνολο κανόνων που εξασφαλίζουν την ομοιόμορφη χρήση (Πίνακας 4). Η TNM ταξινόμηση, εφαρμόζεται τόσο στη κλινική (cTNM) όσο και στη παθολογοανατομική (pTNM) σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου. Πάντως, ασθενείς με υψηλού κινδύνου καρκίνους του ορθού που συνήθως λαμβάνουν προεγχειρητική χημειο-ακτινοθεαπεία πριν τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου, στη παθολογοανατομική σταδιοποίηση θα πρέπει να περιλαμβάνεται το πρόθεμα γ (ypTNM).

Σύμφωνα με τη ταξινόμηση κατά TNM ισχύουν τα εξής:

Πρωτοπαθής εστία (T)

- TX Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
- T0 Απουσία στοιχείων πρωτοπαθούς όγκου
- Tis Καρκίνωμα in situ (ενδοεπιθηλιακό ή ενδοβλεννογόνιο)
- T1 Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνιο χιτώνα
- T2 Ο όγκος διηθεί το μυικό χιτώνα
- T3 Ο όγκος διαπερνά το μυικό χιτώνα και διηθεί τον υποορογόνιο ιστό ή τους μη καλυπτόμενους από περιτόναιο περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς
- T4a Ο όγκος διηθεί το σπλαγχνικό περιτόναιο
- T4b Ο όγκος κατά συνέχεια προσκολλάται και διηθεί άλλα όργανα ή δομές

Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

- NX Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
- N0 Απουσία επιχώριας λεμφαδενικής μετάστασης
- N1 Μετάσταση σε 1 έως και 3 λεμφαδένες
- N1a Μετάσταση σε ένα περιοχικό λεμφαδένα
- N1b Μετάσταση σε 2-3 περιοχικούς λεμφαδένες
- N1c Καρκινική εναπόθεση ή εναποθέσεις (tumor deposit - TD) στον υποορογόνιο ιστό, μεσεντέριο, ή στους μη καλυπτόμενους από περιτόναιο περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς, χωρίς μετάσταση σε περιοχικούς λεμφαδένες
- N2 Μετάσταση σε 4 ή περισσότερους λεμφαδένες
- N2a Μετάσταση σε 4-6 περιοχικούς λεμφαδένες
- N2b Μετάσταση σε 7 ή περισσότερους περιοχικούς λεμφαδένες

Απομεμακρυσμένη μετάσταση (M)

- MX Η παρουσία απομεμακρυσμένης μετάστασης δεν μπορεί να προσδιορισθεί
- M0 Απουσία απομεμακρυσμένης μετάστασης
- M1 Παρουσία απομεμακρυσμένης μετάστασης
- M1a Παρουσία μετάστασης σε ένα όργανο ή περιοχή (π.χ. ήπαρ, πνεύμονας, ωθήκη, μη-περιοχικός λεμφαδένας)

M1b Παρουσία μεταστάσεων σε περισσότερα από ένα όργανο/περιοχή ή στο περιτόναιο

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	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Σταδιοποίηση-προγνωστικές ομάδες ορθοκολικού καρκίνου κατά TNM και συσχέτισή του με τη σταδιοποίηση κατά Duke's και MAC (AJCC 7th Edition)

1.4. Προγνωστικοί παράγοντες ορθοκολικού καρκίνου

Η πρόγνωση νεοδιαγνωσθεισών περιπτώσεων ΚΠΕ βασίζεται κυρίως στο στάδιο και την ανατομική έκταση του όγκου, όπως αυτά καθορίζονται από τη TNM σταδιοποίηση της UICC (International Union Against Cancer)⁵⁷ και τη ταξινόμηση της AJCC (American Joint Committee on Cancer)⁵⁸. Ωστόσο, ο ΚΠΕ εκπροσωπεί μία ετερογενή, πολυπαραγοντική νοσολογική οντότητα, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι ιστολογικά πανομοιότυποι καθώς και όγκοι ίδιου σταδίου μπορεί να εμφανίζουν διαφορετική πρόγνωση και απάντηση στη θεραπεία⁵⁹. Η μοριακή ανάλυση και χρήση πρωτεϊνικών δεικτών αποτελούν τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας για την ανάδειξη

ομάδων ασθενών που θα έχουν πτωχή κλινική ανταπόκριση και συνεπώς θα ωφεληθούν από τη μετεγχειρητική (adjuvant) θεραπεία⁶⁰⁻⁶².

Έτσι, στο πόρισμα της ιστολογικής εξέτασης του χειρουργικού παρασκευάσματος, πρέπει να αναφέρονται οι ακόλουθοι παράμετροι που καθορίζουν σε μέγιστο βαθμό τη πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο αλλά και την αναγκαιότητα ή μη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας:

(α) **Βάθος διείσδυσης του όγκου στο τοίχωμα του παχέος εντέρου (T)**

(β) **Αριθμός ανευρεθέντων και διηθημένων λεμφαδένων (N):** Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες NCCN, θα πρέπει ο ελάχιστος αριθμός λεμφαδένων που εξετάζονται να είναι 12, για την ακριβή αναγνώριση ορθοκολικών καρκίνων σταδίου II⁶³⁻⁶⁵. Έχει δειχθεί ότι, ο αριθμός των αρνητικών λεμφαδένων είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου IIIB και IIIC⁶⁶.

(γ) **Προεγχειρητικά επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA):** Αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα του CEA (> 5ng/ml) είναι φτωχός προγνωστικός παράγοντας για υποτροπή της νόσου⁶⁴.

(δ) **Βαθμός διαφοροποίησης του όγκου:** Η ιστολογική διαβάθμιση βασίζεται κυρίως στο ποσοστό σχηματισμού αδενίων εντός του όγκου (είναι ανάλογη αυτού). Η πλειονότητα των συστημάτων κατατάσσουν τους όγκους σε 3 ή 4 κατηγορίες (Βαθμός κακοήθειας 1: όγκοι υψηλής διαφοροποίησης, Βαθμός 2: μέτριας διαφοροποίησης, Βαθμός 3: χαμηλής διαφοροποίησης, Βαθμός 4: αδιαφοροποίητοι όγκοι). Εν τούτοις, η εφαρμογή μίας ταξινόμησης 2 βαθμίδων (χαμηλού βαθμού κακοήθειας για όγκους υψηλής και μέτριας διαφοροποίησης, και υψηλού βαθμού κακοήθειας για χαμηλής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητους όγκους), όχι μόνο μειώνει τις αποκλίσεις μεταξύ Παθολογοανατόμων στο χαρακτηρισμό του όγκου, αλλά αναδεικνύει και τη σαφή θετική προγνωστική αξία των χαμηλού σε σχέση με τους υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους⁶⁷.

(ε) **Κατάσταση των εγγύς, απομακρυσμένων και περιφερικών (circumferential) ορίων εκτομής:** Η ορογόνια (περιτοναϊκή) επιφάνεια δεν αποτελεί χειρουργικό όριο. Το περιφερικό όριο εκτομής, αντιπροσωπεύει το οπισθοπεριτοναϊκό ή περιτοναϊκό όριο μαλακού ιστού που βρίσκεται

πλησιέστερα στη βαθύτερη διείσδυση του όγκου και θα πρέπει να εκτιμάται σε όλα τα τμήματα παχέος-ορθού που δεν καλύπτονται από περιτόναιο. Ο κίνδυνος τοπικής υποτροπής είναι πολύ αυξημένος, εάν ο όγκος είναι παρών σε <1mm (κατά άλλους <2mm) από την επιφάνεια του χειρουργικού παρασκευάσματος που δεν καλύπτεται από περιτόναιο και το περιφερικό όριο εκτομής θεωρείται θετικό.

(στ) **Διήθηση αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων:** Σε αρκετές μελέτες έχει καταδειχθεί, με πολυπαραγοντική ανάλυση, ότι η συγκεκριμένη παράμετρος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα αρνητικής πρόγνωσης^{58,68}.

(ζ) **Περινευρική διήθηση (Perineural Invasion - PNI):** Η παρουσία PNI σχετίζεται με σημαντικά χειρότερη πρόγνωση. Σε πολυπαραγοντική μελέτη, η PNI είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ειδική του καρκίνου ελεύθερη νόσου επιβίωση, αλλά και για τη συνολική ελεύθερη νόσου επιβίωση. Για ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου II, εκείνοι με PNI έχουν μια σημαντικά χειρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση συγκρινόμενη με εκείνους χωρίς PNI, 29% έναντι 82%, αντίστοιχα ($p=0,0005$)⁶⁹⁻⁷¹.

(η) **Εξωλεμφαδενικές καρκινικές εναποθέσεις (Tumor Deposits - TD):** Πρόκειται για καρκινική εναπόθεση ή εναποθέσεις στον υποορογόνο ιστό, μεσεντέριο, ή στους μη καλυπτόμενους από περιτόναιο περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς, χωρίς μετάσταση σε περιοχικούς λεμφαδένες, και σχετίζονται με ελαττωμένη ελεύθερη νόσου και συνολική επιβίωση⁷²⁻⁷⁵. Στην 7^η έκδοση του εγχειριδίου σταδιοποίησης κατά AJCC, οι εξωλεμφαδενικές καρκινικές εναποθέσεις σταδιοποιούνται ως pN1c.

(θ) **Μικροδορυφορική Αστάθεια (Microsatellite Instability - MSI):** Στον ορθοκολικό καρκίνο, οποιαδήποτε βλάβη στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA, χαρακτηρίζεται από λανθασμένη ακολουθία νουκλεοτιδίων, γνωστή και ως «σφάλμα αντιγραφής» (replication error). Τα σφάλματα αντιγραφής αναγνωρίζονται από αλλαγές (αστάθεια) σε κληρονομούμενα πρότυπα απλών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (μικροδορυφόροι) που απαντώνται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος.

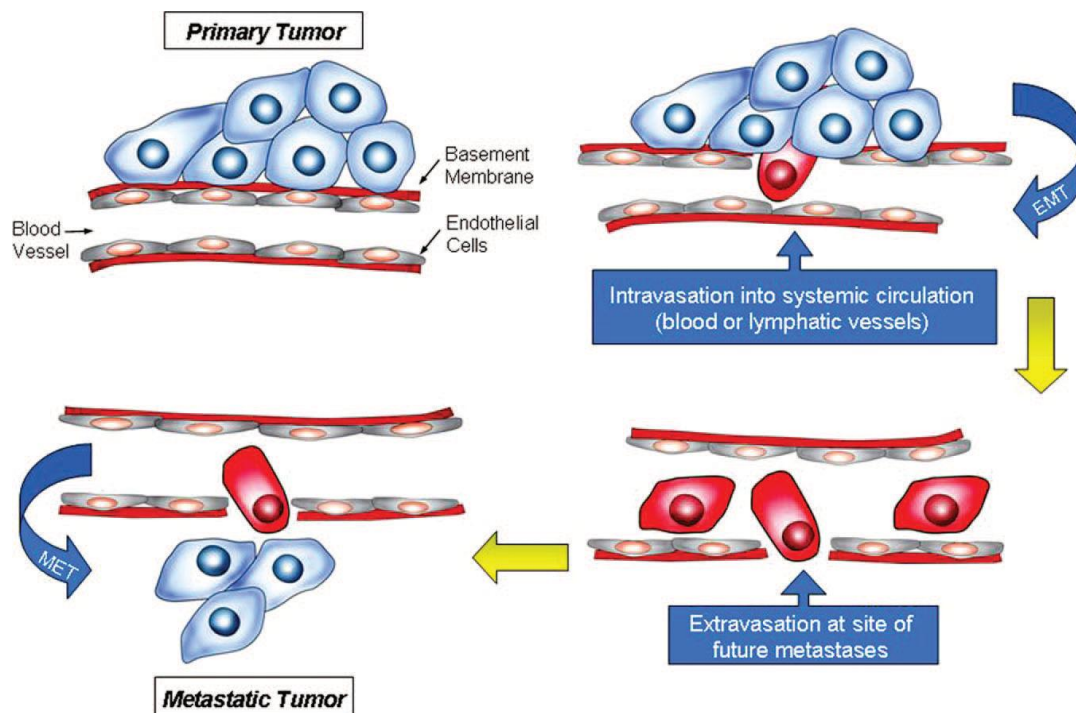
Όγκοι που εμφανίζουν αντίστοιχες αλλαγές σε ποσοστό $\geq 30\%$ των «μικροδορυφορικών δεικτών» που εξετάζονται, διακρίνονται από υψηλή

μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-High), ενώ όταν οι αλλαγές αυτές αφορούν < 30% των μικροδορυφορικών δεικτών οι όγκοι χαρακτηρίζονται από χαμηλή MSI (MSI-Low). Αν κανένας γενετικός τόπος δεν είναι ασταθής, ο όγκος βαθμολογείται ως μικροδορυφορικά σταθερός (MSS: microsatellite stable). Έχει αποδειχθεί ότι οι MSI-H όγκοι συνδέονται με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με MSI-L ή MSS όγκους αντίστοιχου σταδίου, και πιθανά δεν ωφελούνται από τη συμπληρωματική θεραπεία με 5-FU⁷⁶⁻⁷⁷.

(i) **Μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου:** Μεταλλάξεις στα κωδόνια 12 και 13 στο εξώνιο 2 του KRAS γονιδίου, προβλέπει την απώλεια ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντισώματα που στοχεύουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα^{26,78}.

1.5. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) στον ορθοκολικό καρκίνο

Από τη στιγμή της δημιουργίας του πρωτοπαθούς όγκου έως την εμφάνιση μακροσκοπικών μεταστάσεων μεσολαβεί μια περίοδος, παρόμοια και το ίδιο σημαντική με τη περίοδο της ογκογένεσης, κατά την οποία ορισμένα καρκινικά κύτταρα, εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία - κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumors cells, CTCs), καταστρέφονται ή επιβιώνουν από την αλληλεπίδραση τους με το ανοσολογικό σύστημα, αποπίπτουν ή μεταπίπτουν σε κάποιου είδους ληθαργική κατάσταση, δημιουργούν μικροσκοπικές εστίες από διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα (disseminated tumor cells, DTCs) σε διάφορα όργανα (π.χ. μυελός των οστών) και τελικά εξαφανίζονται ή αναπτύσσονται με τη μορφή δευτεροπαθών εστιών. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το μεταστατικό δυναμικό του φαινοτύπου τους, την έκβαση των αλληλεπιδράσεων τους με τον ξενιστή και τις θεραπευτικές τακτικές που θα εφαρμοσθούν (Σχήμα 3).



ΣΧΗΜΑ 3: Σχήμα της σύνθετης μεταστατικής διαδικασίας. Η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) μεταβάλλει τον κυτταρικό φαινότυπο (απώλεια κυτταρικής προσκόλλησης, καταστολή έκφρασης *E-cadherin* και αυξημένη κινητικότητα κυττάρων), επιτρέποντας την ενδαγγείωση στη συστηματική κυκλοφορία. Μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση εμφανίζεται στις περιοχές των απομακρυσμένων μεταστάσεων. Dotan, Cohen, Alpaugh et al. *The Oncologist* 2009;14:1070–1082.

Στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα CTCs προέρχονται από κλώνους του πρωτοπαθούς όγκου⁷⁹ υποδηλώνει ότι μπορεί να αντανακλούν το φορτίο του όγκου σε όλα τα στάδια της εξέλιξης του.

Έτσι, εκτός από ένα δυνητικό ρόλο στη πρώιμη διάγνωση και πρόγνωση, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα μπορεί να παίξουν ένα σημαντικό ρόλο στον χαρακτηρισμό γενετικών και ανοσοφαινοτυπικών αλλαγών με την εξέλιξη του όγκου, βοηθώντας έτσι στη καθοδήγηση της στοχευμένης θεραπείας⁸⁰⁻⁸¹.

Τα ευρήματα ότι τα CTCs μπορεί να βρεθούν σε ασθενείς πριν την ανίχνευση του πρωτοπαθούς όγκου, τα CTCs βρίσκονται σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών όταν ένα καρκίνωμα υποτροπιάζει, και ότι τα CTCs εξακολουθούν να υπάρχουν σε ορισμένους ασθενείς μετά την αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου, παρέχουν την ώθηση για συνεχιζόμενες μελέτες των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορούν να ταυτοποιηθούν σε διάφορα τμήματα του σώματος χρησιμοποιώντας ανοσοφαινοτυπικές και RT-PCR τεχνικές⁸²⁻⁸³. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου στο μυελό των οστών, στο περιτοναϊκό έκπλυμα και στα δείγματα λεμφαδένων συσχετίστηκαν με πτωχή επιβίωση στο πρώιμο στάδιο του καρκίνου του παχέος εντέρου⁸⁴⁻⁸⁵.

Στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, στο Πανεπιστημίου Κρήτης, αναπτύξαμε μία μεθοδολογία για την ανίχνευση ισοδύναμων αντιγράφων του CEA mRNA κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης (limit of detection LOD=3.3SD/slope) προσδιορίστηκε στα 0,72 Ιονο κυτταρικά ισοδύναμα. Αρχικά αναλύσαμε 140 δείγματα από φυσιολογικά άτομα (αιμοδότες) και αποδείξαμε την ειδικότητα της μεθόδου (98%). Χρησιμοποιώντας αυτό το όριο, αναλύσαμε 261 ασθενείς με mCRC. Ανιχνεύσαμε περισσότερα από 0,72 Ιονο κυτταρικά ισοδύναμα στο 42% των ασθενών πριν από την έναρξη της θεραπείας και στο 33% των ασθενών μετά την ολοκλήρωσή της.

Πρόσφατα, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ενέκρινε το Σύστημα CellSearch (Veridex LLC, Ράριταν, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ) για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε μια προοπτική μελέτη, οι Cristofanilli et al.⁸⁶ έδειξαν ότι η ανίχνευση αυξημένου αριθμού CTCs ήταν ένας προγνωστικός παράγοντας σε νεοδιαγνωσθείσες ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού καθώς και μία ακριβής ένδειξη ταχείας εξέλιξης της νόσου και θνησιμότητας. Παρόλο που οι περισσότερες τρέχουσες πληροφορίες για τα CTCs προέρχονται από μελέτες για τον καρκίνο του μαστού, η συγκεκριμένη εξέταση είναι επίσης κατάλληλη για χρήση σε διαφορετικούς καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης. Μελέτες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και του προστάτη έδειξαν ότι η ποσοτικοποίηση των CTCs θα μπορούσε να είναι ένας πολύτιμος προγνωστικός παράγοντας⁸⁷. Σε μια πρόσφατη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CellSearch σε υγιείς εθελοντές, σε ασθενείς με μη κακοήγη νοσήματα και σε ασθενείς με μεταστατικά καρκινώματα,

αποδείχθηκε ότι μόνο σε κακοήθεις επιθηλιακούς όγκους ανευρέθηκαν ≥ 2 CTCs ανά 7,5 ml περιφερικού αίματος⁸⁸. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το όριο, CTCs από προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου ανιχνεύτηκαν στο 30% των ασθενών. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μία μεταγενέστερη μελέτη⁸⁹ που έδειξε ότι 60,7% των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου IV είχαν ανιχνεύσιμα CTCs.

Επιπλέον, σε μια πολυκεντρική προοπτική μελέτη η οποία περιλάμβανε 456 ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο, οι Cohen et al.⁹⁰ έδειξαν ότι τα επίπεδα των CTCs πριν από τη θεραπεία και σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία αποτελούσαν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (progression-free survival) και τη συνολική επιβίωση. Στην πολυπαραγοντική τους ανάλυση που περιελάμβανε την ηλικία, τη γενική κατάσταση υγείας κατά ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), καθώς και τον τύπο και τη γραμμή χημειοθεραπείας, τα επίπεδα CTCs $\geq 3/7,5$ ml αναδείχθηκαν ως ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας έκβασης της νόσου.

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό γνώρισμα της εξέτασης αίματος για τα CTCs είναι η ασφάλειά της και ότι μπορεί να εκτελείται συχνά, ενώ επανειλημμένες επεμβατικές διαδικασίες, συμπεριλαμβάνοντας την αναρρόφηση μυελού των οστών, μπορεί να παρέχουν περιορισμένη συμμόρφωση των ασθενών.

1.5.1. Μέθοδοι και Περιορισμοί για την Ανίχνευση Κυκλοφορούντων Καρκινικών Κυττάρων (CTCs)

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) σε δείγματα περιφερικού αίματος, θα μπορούσε να υπηρετήσει ως ένα μοναδικό και εύκολο διαγνωστικό εργαλείο, για τον καθορισμό της πρόγνωσης και της παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας⁹¹.

Εξ ορισμού, τα μικρομεταστικά κύτταρα δεν είναι ανιχνεύσιμα με τη καθιερωμένη χρώση αιματοξυλίνης - εωσίνης. Αυτά τα κύτταρα ανιχνεύονται συνήθως μετά από ένα αρχικό στάδιο εμπλουτισμού (διαβαθμιζόμενη

φυγοκέντριση με τη χρήση Ficoll/Hypaque, OncoQuick, διήθηση, τεχνικές ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, όπως διαχωρισμός κυττάρων με τη χρήση μαγνητικού πεδίου και μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με ειδικά αντισώματα) χρησιμοποιώντας είτε άμεσες μεθόδους, κυρίως μεθόδους που βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων (ανοσοκυτταροχημεία, ανοσοφθορισμός, κυτταρομετρία ροής) είτε έμμεσες μεθόδους, κυρίως μεθόδους που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων (mRNA μεταγράφων με RT-PCR)⁹².

Διάφοροι ερευνητές έχουν συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων⁹³⁻⁹⁴. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων θεωρούνται γενικά πιο ευαίσθητες, ενώ η ανοσοκυτταροχημεία προσφέρει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την εκτίμηση της μορφολογίας των κυττάρων.

Μια τεχνική που βασίζεται στον ανοσοφθορισμό και τη κυτταρομετρία ροής αποτελεί τη βάση ενός ημι-αυτοματοποιημένου συστήματος, του CellSearch system (Veridex, Warren, New Jersey, USA), το οποίο έχει πρόσφατα εγκριθεί από τον FDA. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs⁹⁵.

Όσον αφορά τον ανοσοφθορισμό η προτιμώμενη μέθοδος ανίχνευσης είναι η αυτοματοποιημένη ψηφιακή μικροσκοπία (automated digital microscopy, ADM). Ωστόσο η μέθοδος αυτή είναι πολύ αργή στη σάρωση. Έχει δημοσιευθεί η χρησιμοποίηση της τεχνολογίας των οπτικών ινών για τη σάρωση μεγάλων επιφανειών (fiber-optic array scanning technology, FAST), η οποία εφαρμόζει τεχνικές laser-printing για την επίλυση του προβλήματος ανίχνευσης σπάνιων κυττάρων⁹⁶. Το πλεονέκτημα με τη χρήση της FAST τεχνολογίας είναι ότι δεν είναι απαραίτητες τεχνικές εμπλουτισμού οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη ευαισθησία λόγω απώλειας κυττάρων⁹⁶.

Μια άλλη μέθοδος έχει προταθεί για την ανίχνευση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων (Circulating Epithelial Tumor Cells, CETCs) χωρίς να προηγηθεί στάδιο εμπλουτισμού. Αυτή χρησιμοποιεί laser scanning κυτταρομετρητή για την ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων μετά από

χρώση με αντισώματα έναντι του EpCAM και CD45 επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες⁹⁷.

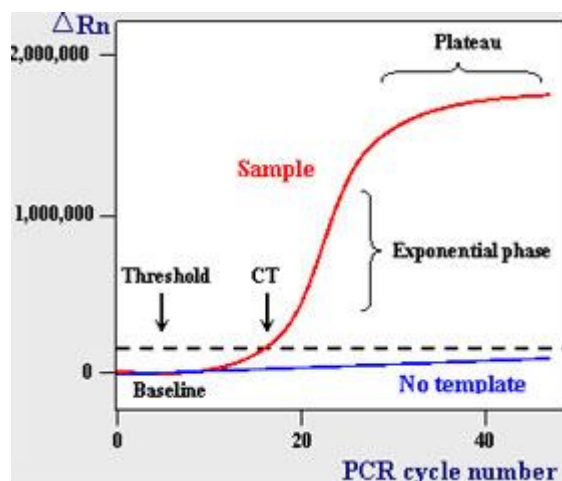
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για τη περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για τη πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης.

Η ποσοτική RT-PCR (Quantitative RT-PCR, RT-qPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει τη ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής RT-PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί

όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με τη ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους (Σχήμα 4).

Οι μετρήσεις για τη ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για τη ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος⁹⁸⁻⁹⁹.



ΣΧΗΜΑ 4: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης η ενίσχυση του προϊόντος περιγράφεται από τη σχέση: $N = N_0 \times E^n$

Όπου: **N** η ποσότητα του προϊόντος

N₀ η αρχική ποσότητα του DNA στόχου

n ο αριθμός των κύκλων της PCR και

E η μέση απόδοση (efficiency) της αντίδρασης για κάθε κύκλο.

Θεωρητικά, η μέγιστη τιμή του E είναι 2, δηλαδή το προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Όμως στη πράξη το E έχει μικρότερη τιμή διότι εξαρτάται σημαντικά από τις πειραματικές συνθήκες, καθώς μεταβολές σε παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, η θερμοκρασία και ο χρόνος, επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης. Ωστόσο, στο ξεκίνημα της λογαριθμικής φάσης η E παραμένει σταθερή για 2-5 κύκλους και μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια συγκεντρώσεων πρότυπης αλληλουχίας. Η συνεχής παρακολούθηση της έντασης φθορισμού στην αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο κάνει εύκολη την αναγνώριση των κύκλων αυτών.

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR), παρέχει την ευαισθησία και την εφικτότητα (practicability) που είναι απαραίτητα για την ανίχνευση σπανίων CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών¹⁰⁰. Στον ορθοκολικό καρκίνο, ο δείκτης που έχει συχνότερα

μελετηθεί, είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA). Οι αρχικές κλινικές μελέτες ανέλυσαν τη χρησιμότητα του CEACAM5 mRNA για την ανίχνευση των CTCs σε δείγματα ασθενών με CRC αλλά καμιά απ' αυτές δεν ποσοτικοποίησε το προϊόν της PCR¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Ωστόσο, ένα χαμηλό επίπεδο της έκφρασης του CEACAM5 mRNA ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικά άτομα, υποδηλώνοντας μια αντικανονική (illegitimate) έκφραση του CEACAM5 γονιδίου στα αιμοποιητικά κύτταρα¹⁰⁵⁻¹⁰⁶, ενώ άλλες μελέτες απέτυχαν να δείξουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση του CEACAM5 mRNA μεταξύ καρκινοπαθών και υγιών ατόμων¹⁰⁷. Αυτές οι μελέτες διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας σύνολα εκκινητών οι οποίοι ενίσχυαν ένα εναλλακτικό μετάγραφο (splice variant) του CEACAM1 που εκφράζεται στα φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια (white blood cells – WBCs), στο οποίο μια ακολουθία ιντρονίου αντικαθιστά μέρος του εξωνίου 10¹⁰⁵ έτσι, εξηγώντας, τα ευρήματα της έκφρασης του CEACAM5 mRNA στα φυσιολογικά δείγματα αίματος¹⁰⁶ ή σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου¹⁰⁷ και σε καλλιεργημένα λευκά αιμοσφαίρια μετά από επαγωγή με G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor)¹⁰⁸. Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, η συνολική χρησιμότητα του CEACAM5 ως δείκτης ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων με βάση τη PCR παραμένει αμφισβητήσιμη.

Η χρήση ποσοτικής RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία μερικές φορές μπορεί να ξεχωρίσει χαμηλά επίπεδα παράτυπης έκφρασης από υψηλότερα επίπεδα που παρατηρούνται στον καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς επίσης και ο σχεδιασμός των εκκινητών, ώστε να μην ενισχύουν γενωμικό DNA ή ψευδογονίδια, μπορούν ως ένα βαθμό να λύσουν τα παραπάνω προβλήματα¹⁰⁹. Παρόμοιοι περιορισμοί έχουν περιγραφεί με μεθόδους που βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων.

Η αξιοπιστία του προσδιορισμού καρκινο-σχετιζόμενων μεταγράφων mRNA με RT-PCR και real-time RT-PCR για την ανίχνευση των CTCs στο περιφερικό αίμα, μπορεί επίσης να περιοριστεί από τους προαναλυτικούς παράγοντες, όπως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη δειγματοληψία μέχρι την επεξεργασία του δείγματος, ο χρόνος της ανάλυσης και η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της παραμονής και της επεξεργασίας, τα οποία

έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση¹¹⁰. Επιπλέον, τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να προκληθεί από τη φλεβοτομή, την επαφή με ξένες επιφάνειες ή ακόμη μετά από έκθεση σε συστατικά από λυμένα κύτταρα, όπως η αιμοσφαιρίνη. Μάλιστα το ενδοκυττάριο RNA μπορεί να αποικοδομηθεί κατά την *ex vivo* παραμονή του αίματος από ειδικές και μη ειδικές ενδογενείς ριβονουκλεάσες¹¹⁰. Κατά συνέπεια, τα δείγματα αίματος και το RNA θα πρέπει να υφίστανται άμεση επεξεργασία μετά τη συλλογή τους, για να αποφευχθεί η αλλοίωση της *in vivo* γονιδιακής έκφρασης από *ex vivo* αποκρίσεις στο στρες, ιδιαίτερα όταν η ποσότητα του RNA στόχου είναι πάρα πολύ μικρή, όπως ισχύει στη περίπτωση της ανίχνευσης CTCs στο περιφερικό αίμα. Εναλλακτικά, υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kit, όπως το PAXgene (Qiagen), για τη συλλογή, σταθεροποίηση και απευθείας απομόνωση του RNA από ολικό αίμα, τα οποία εξασφαλίζουν σταθεροποίηση του RNA μέχρι και για 5 μέρες μετά τη δειγματοληψία.

1.6. Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόνο (CEA ή CEACAM5) – Edrecolomab (Panorex®)

Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA ή CEACAM5): ανακαλύφθηκε το 1965 ως μια 180 kDa ογκοεμβρυϊκή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία ήταν παρούσα στον ορό ασθενών με καρκίνωμα του παχέος εντέρου¹¹¹. Έκτοτε, κλωνοποιήθηκε και αποδείχθηκε ότι είναι μέλος της οικογένειας IgSF (Immunoglobulin superfamily), που μεσολαβεί στη μη εξαρτώμενη εξ ασβεστίου ομοτυπική συσσώρευση των κυτταρικών σειρών επί καρκίνου του παχέος εντέρου. Ακόμη, μεσολαβεί στη σύνδεση κυττάρου προς θεμέλιο ουσία.¹¹²⁻¹¹³ Προσθήκη του αντίστοιχου συμπληρωματικού DNA σε κύτταρα ωθηκών κινέζικων hamster (chinese hamster ovary, CHO) αυξάνει την ομοτυπική κυτταρική συσσώρευση σε μοντέλο ανεξάρτητο της παρουσίας ιόντων ασβεστίου, επιβεβαιώνοντας έτσι το ρόλο του CEA ως υποδοχέα προσκόλλησης κυττάρου προς κύτταρο¹¹⁴.

Ωστόσο, σε κυτταρικές σειρές, διαταραχή της λειτουργίας του CEA με

αντι-CEA μονοκλωνικά αντισώματα δεν αναστέλλει πάντοτε τη κυττάρου προς κύτταρο προσκόλληση και, επιπλέον, CEA θετικές κυτταρικές σειρές (π.χ. LS174T) δεν επιτυγχάνουν πάντοτε προσκόλληση κυττάρου προς κύτταρο. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κυτταρική προσκόλληση στην οποία μεσολαβεί το CEA απαιτεί τη συνύπαρξη και άλλων μορίων ή ότι εναλλακτικά το CEA μπορεί να λειτουργήσει ως ένα επιπρόσθετο μόριο που ρυθμίζει τη προσκολλητική δραστηριότητα και άλλων προσκολλητικών πρωτεϊνών¹¹⁵. Δέον να σημειωθεί ότι το CEA εκκρίνεται στη πλειονότητα των κολοορθικών καρκινωμάτων, αλλά παράγεται και φυσιολογικά μέσα στις κολονικές κρύπτες και έτσι δεν είναι ακόμη γνωστό αν το CEA μπορεί να υποβοηθήσει στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του ορθοκολικού καρκίνου.

Το 1993, οι Jothy et al. έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα σε καρκίνο του παχέος εντέρου που βρίσκονται στη διηθούσα πλευρά του όγκου και όπου ενδεχομένως απαιτείται μειωμένη κυτταρική προσκόλληση, παράγουν 2,6 φορές περισσότερο mRNA CEA σε σύγκριση με τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην αυλική επιφάνεια του όγκου¹¹⁶. Οι ίδιοι αυτοί ερευνητές διατύπωσαν την άποψη ότι το CEA έχει διπλή λειτουργία, μία φορά λειτουργώντας ως προσκολλητική πρωτεΐνη και, εναλλακτικά, μία άλλη ενεργώντας ως αντιπροσκολλητική πρωτεΐνη. Το ποια από αυτές τις δύο λειτουργίες θα επικρατήσει εξαρτάται, κατά τους Jothy et al, από το εάν η πρωτεΐνη αυτή κατακρατείται από το κύτταρο ή από το αν εκκρινόμενη οδηγείται στη συνέχεια προς το εξωκυττάριο περιβάλλον.

Edrecolomab (Panorex®): Πρόκειται για Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού που αντιδρά ανοσολογικά με το συνοδό αντιγόνο των όγκων 17-1A και χρησιμοποιήθηκε ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, ενώ ήδη αξιολογήθηκε η χρήση του ως συμπληρωματική θεραπεία για τη μικρομεταστατική νόσο στο καρκίνωμα του μαστού¹¹⁷⁻¹¹⁸. Σε μελέτη τυχαίας κατανομής με 189 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, σταδίου III, η χορήγηση edrecolomab μετά την εγχείρηση αύξησε τη συνολική επιβίωση κατά 32% και μείωσε το ποσοστό υποτροπών κατά 23%, χωρίς σημαντική τοξικότητα¹¹⁹.

Ωστόσο σε δυο πολυκεντρικές μελέτες φάσης III, το edrecolomab δεν

βελτίωσε τη συνολική επιβίωση, όταν συγχορηγήθηκε με χημειοθεραπεία και υπολείπετο σε σχέση με τον συνδυασμό 5-FU/LV¹²⁰⁻¹²¹. Μετά τη πρώτη αρνητική φάση III μελέτη¹²⁰ το 2002, το αντίσωμα αποσύρθηκε από τη κλινική του χρήση.

1.7. Στόχοι της διατριβής

Ο ορθοκολικός καρκίνος ευθύνεται για το 10% περίπου όλων των κακοήθων όγκων στους ενήλικες¹. Αν και η θεραπευτική χειρουργική εξαίρεση είναι δυνατή στους δύο από τους τρεις ασθενείς κατά τη διάγνωση, σχεδόν το ένα τρίτο από αυτούς θα παρουσιάσουν τοπική ή/και μεταστατική υποτροπή και θα πεθάνουν από τη νόσο¹²². Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων είναι ένα θεμελιώδες βήμα της εξέλιξης προς μεταστατική νόσο. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορούν να ταυτοποιηθούν σε διάφορα τμήματα του σώματος χρησιμοποιώντας ανοσοφαινοτυπικές ή μοριακές (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση, RT-PCR) τεχνικές⁸²⁻⁸³. Έτσι, σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο ορθοκολικού καρκίνου, η ανίχνευση των κακοήθων κυττάρων στον μυελό των οστών, στο περιτοναϊκό έκπλυμα και στους περιοχικούς λεμφαδένες, σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση⁸⁴⁻⁸⁵.

Επίσης, η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR) έχει δείξει να παρέχει την ευαισθησία και εφικτότητα, που απαιτείται, για την ανίχνευση σπάνιων καρκινικών κυκλοφορούντων κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών¹⁰⁰.

Οι στόχοι της παρούσης διατριβής είναι: (α) να μελετηθεί η παρουσία των CEACAM5 mRNA-θετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας μια νέα RT-qPCR τεχνική (η οποία σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αποφευχθεί η ενίσχυση ενός εναλλακτικού μεταγράφου που εκφράζεται στα φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια) και να καθορισθεί η προγνωστική τους σημασία σε ασθενείς με πρώιμο ορθοκολικό καρκίνο (στάδια II-III), μετά τη χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και πριν τη χορήγηση συστηματικής θεραπείας και (β) να εκτιμηθεί η δραστηριότητα

διαφορετικών σχημάτων χορήγησης του μονοκλωνικού αντισώματος Edrecolomab (Panorex[®]) στην εξαφάνιση των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων από το περιφερικό αίμα ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οι ασθενείς

Στην μελέτη εντάχθηκαν 269 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο πρώιμο ορθοκολικό καρκίνο (στάδιο II-III), ενώ στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 265 ασθενείς (τέσσερεις ασθενείς αποκλείστηκαν, ένας λόγω ελλειπών κλινικών δεδομένων και τρεις λόγω ανεπαρκούς παρακολούθησης). Πρίν τη χειρουργική επέμβαση, όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε απεικονιστικό έλεγχο, για να αποκλεισθεί η παρουσία μεταστατικών εστιών. Ο έλεγχος περιλάμβανε ακτινογραφία θώρακος, υπολογιστική τομογραφία κοιλίας, ενώ όπου κρίθηκε απαραίτητο διενεργήθηκε περαιτέρω έλεγχος με αξονική θώρακος ή/και μαγνητική τομογραφία κάτω κοιλίας (ιδιαίτερα σε περίπτωση καρκίνου του ορθού).

Τρεις με οκτώ εβδομάδες, μετά τη χειρουργική επέμβαση και πριν από την έναρξη οποιασδήποτε συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, γινόταν ενημέρωση των ασθενών, τους δινόταν το έντυπο πληροφόρησης και μετά την έγγραφη συγκατάθεσή τους, εντάσσονταν στη μελέτη. Ακολουθούσε λήψη αίματος για έλεγχο παρουσίας κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, ενώ σε 104 ασθενείς εντός 1 μηνός από την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, λήφθηκαν δείγματα αίματος. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Συμπληρωματική χημειοθεραπεία χορηγήθηκε σε 257 ασθενείς (97%) ενώ σε 102 από αυτούς (37%) χορηγήθηκε χημειοθεραπευτικό σχήμα με βάση την Οξαλιπλάτινα.

Η παρακολούθηση των ασθενών έγινε στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής, με κλινική εξέταση και εργαστηριακές εξετάσεις κάθε 3 μήνες για τα πρώτα 3 χρόνια και κάθε 6 μήνες για τα επόμενα 2 χρόνια, και μετά ανά έτος. Αξονική τομογραφία θώρακος και αξονική τομογραφία κοιλίας γινόταν ετησίως για τα πρώτα 3 χρόνια και ακολούθως ανάλογα με τη κρίση του ιατρού. Το ελάχιστο διάστημα παρακολούθησης των 265 ασθενών ήταν 24 μήνες. Ιστοπαθολογικά στοιχεία λήφθηκαν από τις ιστολογικές εκθέσεις και περιλάμβαναν τη κατάσταση της

εξωτοιχωματικής (extramural) αγγειακής διήθησης, τη διαφοροποίηση του όγκου, το μέγιστο βάθος διήθησης (pT) και τη διήθηση περιοχικών λεμφαδένων.

Σε 20 ασθενείς με στάδιο III/IV ορθοκολικό καρκίνο και ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά κύτταρα, χορηγήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα Panorex με ένα από τα σχήματα χορήγησης του πίνακα 5. Το Panorex διαλυόταν σε N/S 1000 ml με διάρκεια έγχυσης 2 ώρες τη πρώτη φορά ενώ οι επόμενες χορηγήσεις δινόταν σε 1 ώρα, ενδοφλέβια. Πρίν και 1 ώρα μετά από κάθε έγχυση, καθώς επίσης και κάθε μήνα μετά το πέρας κάθε σχήματος χορήγησης, λαμβανόταν 15ml αίμα, ώστε να ελεγχθεί ο ρυθμός και το χρονικό διάστημα εξαφάνισης των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων.

ΣΧΗΜΑΤΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ PANOREX

ΣΧΗΜΑ 1: 500mg/d x 4days

ΣΧΗΜΑ 2: 500mg/d ημέρα παρ'ημέρα για 1 εβδομάδα

ΣΧΗΜΑ 3 : Standard Schedule (500mg x 1→100mg x 4)

ΣΧΗΜΑ 4 : 500mg d1 and d4 για 1 εβδομάδα

ΣΧΗΜΑ 5 : 500mg/εβδομαδιαίως x 4 εβδομάδες

Πίνακας 5: Σχήματα χορήγησης Panorex σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου III/IV

2.2. Μεθοδολογία

2.2.1. Μοριακή ανίχνευση CEACAM5 mRNA (+) CTCs

2.2.1.1. Κλινικά δείγματα

Περιφερικό αίμα (15ml σε EDTA) είχε ληφθεί από κάθε ασθενή 3-8 εβδομάδες μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Για την αποφυγή επιμόλυνσης με επιθηλιακά κύτταρα από

το δέρμα, αίμα για την ανάλυση μικρομεταστατικών κυττάρων λαμβανόταν στο μέσο της φλεβοκέντησης, αφού είχαν απορριφθεί τα πρώτα 5ml αίματος.

Για την εκτίμηση της αναλυτικής ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου, αναλύθηκαν δείγματα αίματος από 96 υγιείς δότες (Healthy Volunteers – HV), 15 ασθενείς με αδενώματα παχέος εντέρου, 21 ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease - IBD) και 100 ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο.

2.2.1.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

Το αίμα (15 mL) τοποθετείται σε σωληνάριο γενικής αίματος που περιέχει EDTA και ακολούθως μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 50 mL. Στη συνέχεια, το αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο στείρου διαλύματος PBS (8,0 gr/l NaCl, 0,2gr/l KCl, 1,15 gr/l Na₂HPO₄, 0,2 gr/l KH₂PO₄, pH 7,3) και το διάλυμα επιστοιβάζεται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου τύπου Falcon των 50 mL, όπου έχει ήδη προστεθεί φυκόλη με πυκνότητα 1,077g/mL (Ficoll-Histopaque 1077, Sigma) όγκου ίσου με 2/3 του όγκου του διαλύματος. Το αραιωμένο αίμα τοποθετείται με προσοχή πάνω στην επιφάνεια της φυκόλης ούτως ώστε να μην αναμειχθούν τα δυο υγρά και τελικά να σχηματισθούν δυο στιβάδες με αίμα και φυκόλη.

Πραγματοποιείται διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση του δείγματος (στα 1.200 g, για 30 min, στους 4 °C). Μετά τη φυγοκέντρηση η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στιβάδας της φυκόλης και της στιβάδας ορού και PBS. Η φυκόλη έχοντας ειδική πυκνότητα μεταξύ των λεμφοκυττάρων/μονοπύρηνων και ερυθροκυττάρων/κοκκιοκυττάρων διαχωρίζει τις δυο στιβάδες και γίνεται δυνατή η λήψη των μονοπύρηνων.

Αφού συλλεχθεί ο δακτύλιος των μονοπύρηνων σε ξεχωριστό αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρου, με προσοχή ώστε να αναρροφηθεί η ελάχιστη δυνατή ποσότητα φυκόλης η οποία είναι κυτταροτοξική, τα μονοπύρηννα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS (50 mL, φυγοκέντρηση στα 1.600 g, για 10 min, στους 18 °C). Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο

υγρό και το ίζημα των κυττάρων είτε χρησιμοποιείται αμέσως, είτε φυλάσσεται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Μεταξύ των δυο εκπλύσεων με PBS γίνεται η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων. Αναμειγνύονται 20μL από το διαλυμένο ίζημα με 180 μL χρωστικής κυανού του τρυπανίου (Sigma) και γίνεται μικροσκόπηση σε πλάκα κυτταρομέτρησης. Τα αποπτωτικά κύτταρα προσλαμβάνουν χρωστική (μπλε) και εξαιρούνται από τη καταμέτρηση, όπως επίσης και τα ερυθρά με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους.

2.2.1.3. Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση του RNA αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi¹²³. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να απομονωθεί το ολικό RNA από 0,1 έως 15 kb σε μήκος. Η εκχύλιση του RNA γίνεται χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (Gibco, BRL). Η λύση των κυττάρων βασίζεται στη παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα, ο οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA και επιπλέον αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά τη λύση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή επιτρέπει την απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Η όλη προετοιμασία και ολοκλήρωση της μεθόδου, εκτός των φυγοκεντρίσεων, γίνεται σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής για εξασφάλιση συνθηκών ελεύθερων από μολύνσεις.

Αρχικά 25×10^4 - 1×10^6 κύτταρα αναμειγνύονται με 1 mL αντιδραστηρίου Trizol σε σωληνάρια από πολυπροπυλένιο και τα κύτταρα διασπώνται αφού αναδευτούν και αναρροφηθούν επανειλημμένως σε σύριγγα ινσουλίνης (26 gauge needle). Όταν το διάλυμα γίνει διαυγές, επωάζεται για 5 min στους $15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια προστίθενται 200 μL χλωροφόρμιο και το μίγμα αναδεύεται με περιδίνηση (vortex) για 15 sec. Αφού το διάλυμα επωαστεί για 10 min στους $15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, φυγοκεντρείται για 10 min στα 12.000 g, στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντρηση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: στη

κατώτερη ερυθρωπή, οργανική φάση όπου παραμένουν οι πρωτεΐνες και όλα τα κυτταρικά υπολείμματα, στη λευκωπή μεσόφαση όπου παραμένει το DNA και στην ανώτερη διαυγή, υδάτινη φάση όπου βρίσκεται το ολικό RNA των κυττάρων. Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε ένα στείρο, RNase-free σωληνάριο πολυπροπυλενίου, και προστίθεται ίση περίπου ποσότητα 100% ισοπροπανόλης (500 μ L) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 min στα 12.000 g, στους 4 °C, οπότε η ισοπροπυλική αλκοόλη προκαλεί κατακρήμνιση του RNA με τη μορφή ενός καθαρού πηκτώδους ιζήματος.

Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 1 mL 75% αιθανόλη σε δισαππεσταγμένο νερό (ddH₂O) επεξεργασμένο με αναστολέα νουκλεασών DEPC (διεθυλπυροκαρβονικό άλας 97%, Sigma). Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρηση του για 5 min στα 7.500 g, στους 4 °C. Αν το ίζημα είναι έντονα λευκό επαναλαμβάνουμε την έκπλυση άλλη μια φορά.

Τέλος, αφού αποχυθεί το υπερκείμενο υγρό και στεγνώσει τελείως το ίζημα από την αιθανόλη (είτε εκτιθέμενο στο αέρα, είτε σε κενό αέρα για 5-10 min), επαναδιαλύεται σε 20-30 μ L DEPC-ddH₂O, σε σωληνάριο τύπου erpedorf και τοποθετείται για 10 min στους 55-65 °C (είτε σε υδατόλουτρο, είτε σε κλίβανο), ώστε να ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση του RNA. Από το τελικό υδατικό διάλυμα χρησιμοποιούνται 5 μ L για ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA, ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -80 °C, σε 2 κλάσματα, εάν είναι >20 μ L, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

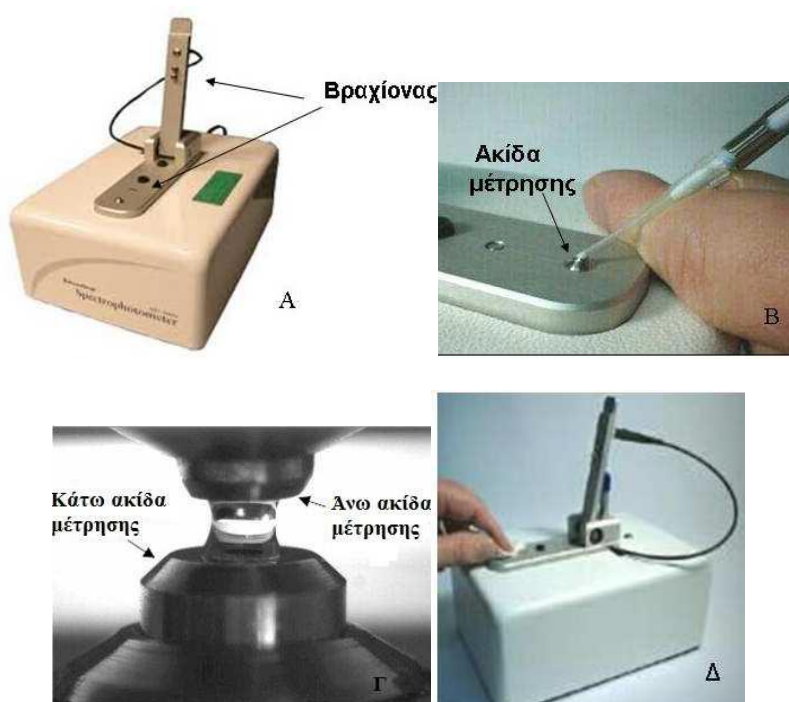
2.2.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας του ολικού RNA

Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 260 nm (A_{260}) σε φασματοφωτόμετρο (NanoDrop). (Εικόνα 1). Χρησιμοποιούμε 1-2 μ L του δείγματος RNA και προσδιορίζεται η απορροφητικότητα του (A) σε μήκος κύματος 260nm. Απορρόφηση στα 260 nm ίση με 1.00 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA 40 μ g/mL.

Η καθαρότητα του δείγματος ελέγχεται υπολογίζοντας τον λόγο των

απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260 nm και στα 280 nm (A_{260}/A_{280}). Καθαρό RNA έχει λόγο A_{260}/A_{280} ίσο με 2.00. Ένα δείγμα RNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε RT-PCR όταν ο παραπάνω λόγος κυμαίνεται από 1.8 έως 2.2, ενώ υψηλή τιμή απορρόφησης στα 280 nm υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες εμποδίζουν τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA και παρεμποδίζουν την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

Η τελική συγκέντρωση (C) του RNA μετριέται σε ng/μl.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Τα μέρη της συσκευής Nanodrop και ο τρόπος χρήσης της: Α) Ο βραχίονας που φέρει τις ακίδες μέτρησης, Β) Τοποθέτηση σταγόνας δείγματος στην ακίδα, Γ) Άνω και κάτω ακίδα μέτρησης και Δ) Καθαρισμός ακίδας (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

2.2.1.5. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) προς συμπληρωματικό DNA (cDNA) πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου ανάστροφη τρανσκριπτάση (Reverse Transcriptase-RT) και χρησιμοποιείται το σύστημα SuperScript III Platinum Transcriptase (Invitrogen, CA, USA).

Για κάθε δείγμα προετοιμάζουμε σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf

(RNase-free, DNase-free) στον πάγο, ένα μίγμα αντίδρασης το οποίο περιλαμβάνει:

(α) 10μl 2X RT Reaction MIX

- Oligo (dT)₂₀ (2,5 μM)
- random hexamers (2,5 mg/μl)
- 10 mM MgCl₂
- dNTPs (Deoxyribonucleotide triphosphate)

(β) Enzyme MIX

- Superscript III RT
- RNaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor)

(γ) 5μg ολικού RNA

(δ) DEPC-treated water (Diethylpyrocarbonate) σε ποσότητα που να συμπληρώνεται συνολικός όγκος του μίγματος 20μl

Στη συνέχεια αναδεύεται ελαφρά το περιεχόμενο του σωληναρίου και πραγματοποιείται επώαση του δείγματος σε θερμικό κυκλοποιητή, στους 25⁰C για 10min και στους 42⁰C για 50min, όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής Oligo(dT₂₀) και δρα η αντίστροφη τρανσκριπτάση (RT). Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος στους 85⁰C για 5min, όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-cDNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη τρανσκριπτάση. Τελικά, στο διάλυμα προστίθεται 1 μl RNase H, για την αποδόμηση του εκμαγείου του RNA και ακολουθεί επώαση στους 37⁰C για 20min, αφού η αφαίρεση του RNA πιστεύεται ότι αυξάνει την ευαισθησία στη RT-qPCR. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είτε φυλάσσεται στους -20⁰C.

2.2.1.6. Δείκτης για την ανίχνευση των CTCs

Ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή είναι το CEACAM5.

2.2.1.7. Ποσοτικός προσδιορισμός του *CEACAM5* mRNA με real-time PCR

Μετά την απομόνωση του mRNA από τα δείγματα και τη σύνθεση του cDNA, στη συνέχεια πραγματοποιείται PCR σε πραγματικό χρόνο. Αρχικά, παρασκευάζεται το μίγμα της αντίδρασης για τη β-ακτίνη και το *CEACAM5* χρησιμοποιώντας:

- (α) 2,5 μl εκμαγείου cDNA
- (β) 6,25 μl TaqMan Universal Master Mix (AB; Applied Biosystems)
- (γ) 1,25 μl των ειδικών εκκινητών (3 μmol/L)
- (δ) 0,5 μl ανιχνευτή υδρόλυσης (2,5 μmol/L)
- (ε) DEPC-treated water (Diethylpyrocarbonate) σε ποσότητα που να συμπληρώνεται συνολικός όγκος 12,5 μl/αντίδραση

Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (AB) (Εικόνα 2). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, και μόνο τριπλέτες πειραμάτων με τιμή standard απόκλισης του κύκλου ποσοτικοποίησης (Cq-quantification cycle) μικρότερη από 0,25 ήταν αποδεκτές. Η ποσοτικοποίηση βασίσθηκε σε μια εξωτερική καμπύλη αναφοράς (διάγραμμα βαθμονόμησης) που επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας εξωτερικά πρότυπα (standards) cDNAs γνωστής συγκέντρωσης. Το διάγραμμα βαθμονόμησης προκύπτει μέσω της μέτρησης της έντασης του φθορισμού σε δείγματα γνωστής περιεκτικότητας σε κύτταρα Lovo (θετικός μάρτυρας) και ARH77 λευχαιμικής κυτταρικής σειράς (αρνητικός μάρτυρας).

Ολικό RNA απομονώθηκε από 10^6 Lovo κύτταρα και το οποίο στη συνέχεια υποβλήθηκε σε συνεχείς αραιώσεις με DEPC δισαποσταγμένο νερό, και οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 1 έως 10^5 Lovo κύτταρα. Το απομονωθέν RNA στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του αντίστοιχου cDNA. Η καμπύλη βαθμονόμησης δημιουργήθηκε καταρτίζοντας διάγραμμα του αριθμού των Lovo κυττάρων που αντιστοιχούν σε κάθε εξωτερικό standard cDNA έναντι της τιμής των κύκλων ποσοτικοποίησής τους (Cq).

Ο αριθμός των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων για όλα τα

εξεταζόμενα δείγματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα Λονο κύτταρα/5μg του ολικού RNA σύμφωνα με την εξωτερική πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Επιπλέον, για να προσδιορίσουμε τον αριθμό των Λονο κυττάρων που θα μπορούσε να ανακτηθούν, προσθέσαμε ελαττούμενο αριθμό Λονο κυττάρων (από 10^3 σε 1) σε 10^6 φυσιολογικά μονοπύρηνια κύτταρα (PBMCs) σε 5 διαφορετικά πειράματα.

Το SDS 2,3 λογισμικό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το σύνολο των εκκινήτων και ανιχνευτών σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primer Express 2,0 (AB).

Η ενίσχυση της β-ακτίνης ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) έγινε για την επαλήθευση της ακεραιότητας του RNA. Οι εκκινήτες και ο ανιχνευτής για τη β-ακτίνη έχουν προηγουμένως αναφερθεί¹²⁴⁻¹²⁵, ενώ η αλληλουχία των βάσεων των εκκινήτων και του ανιχνευτή του γονιδίου περιγράφεται στον πίνακα 6.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System

Δείκτης	Εκκινήτες	Αλληλουχία 5´- 3´
β-ακτίνη	Πρόσθιος	TGAGCGCGGCTACAGCTT
	Ανάστροφος	TCCTTAATGTCACGCACGATTT
	Ανιχνευτής	ACCACCACGGCCGAGCGG

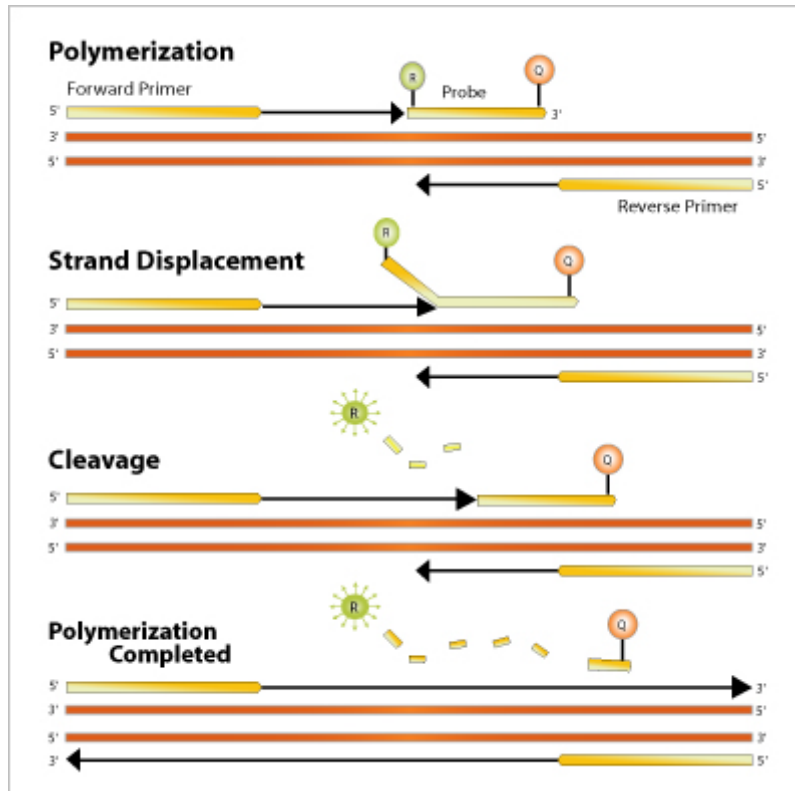
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Αλληλουχία βάσεων εκκινήτων γονιδίου β-ακτίνης

2.2.1.8. Σχεδιασμός και επιλογή εκκινητών και ανιχνευτή της εκλεκτικής ανίχνευσης του cDNA του CEACAM5 με real-time PCR

Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής [(TaqMan probe - 5' labeled fluorescent reporter dye (6Fam) probe)] σχεδιάστηκαν σύμφωνα με το Ref Seq NM_004363.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>). Η αλληλουχία των βάσεων των εκκινητών και του ανιχνευτή για το CEACAM5 γονίδιο, περιγράφεται στον Πίνακα 7. Επιπλέον, η αρχή της μεθόδου TaqMan probe απεικονίζεται στο Σχήμα 5.

Δείκτης	Εκκινητές	Αλληλουχία 5' - 3'
CEACAM5	Πρόσθιος	AATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGT
	Ανάστροφος	CTCTCAGCTGGGGCCACTG
	TAQMAN Ανιχνευτής	CTGCATCTGGAACTTCTCCTGGT

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Αλληλουχία βάσεων εκκινητών γονιδίου CEACAM5



ΣΧΗΜΑ 5: Αρχή της μεθόδου Taqman probes. Διακρίνονται οι δύο εκκινητές καθώς και ο ειδικός ανιχνευτής (ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει στο 5' άκρο του μια χρωστική που φθορίζει και στο 3' άκρο του μια άλλη χρωστική η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από τη πρώτη), ο οποίος προσδένεται ειδικά σε εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος. Η δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, συμβάλλει στην υδρόλυση του ανιχνευτή, που οδηγεί στην αποκοπή του άκρου του ανιχνευτή από τη πολυμεράση και κατ' επέκταση στη διακοπή της αλληλοεξουδετέρωσης του σήματος και απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής που βρίσκεται στο 5' άκρο. Καθώς ο πολυμερισμός συνεχίζεται αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ανιχνευτή, και, συνεπώς αυξάνεται παράλληλα η ένταση φθορισμού, η οποία είναι ανάλογη με τη ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.

Για να αποφύγουμε την ενίσχυση του εναλλακτικού μεταγράφου (splice variant), το οποίο εκφράζεται στα φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια (WBCs), ο ανιχνευτής σχεδιάστηκε να εκτείνεται κατά πλάτος της συμβολής του εξωνίου 9 με το εξώνιο 10. Έρευνα στο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) επιβεβαίωσε τη ειδικότητα των συγκεκριμένων εκκινητών, καθώς καμία ομολογία σε ψευδογονίδιο, εναλλακτικά μεταγράφα ή μη αναμενόμενοι στόχοι, βρέθηκαν. Καθώς το CEACAM1 (Ref Seq NK_001014912.1) είναι περίπου 90% ομόλογο με το CEACAM5, σχεδιάσαμε εκκινητές και ανιχνευτές για αυτό

το μέλος της οικογένειας και εξετάσαμε την ειδικότητα της μεθόδου, μαζί στην HL60 λευχαιμική κυτταρική σειρά και στα μονοπύρρηνα κύτταρα ενός υγιούς εθελοντή (HV-Health Volunteer) για την έκφραση του CEACAM1¹²⁶⁻¹²⁷ και τις MCF7 κυτταρικές σειρές για την έκφραση του CEACAM5¹²⁸. Τελικά, αποκλείστηκε η επιμόλυνση με γενωμικό DNA, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν RNA μεταγγραφα (transcripts) σε κάθε αναλυόμενο δείγμα εν απουσία της αντίστροφης τρανσκριπτάσης.

2.3. Στατιστική Ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο σκοπός αυτής της μελέτης, ήταν να διερευνήσουμε τη προγνωστική σημαντικότητα των CEACAM5 mRNA-θετικών κυκλοφορούντων κυττάρων (CTCs) σε ασθενείς με στάδιο II-III ορθοκολικό καρκίνο (CRC).

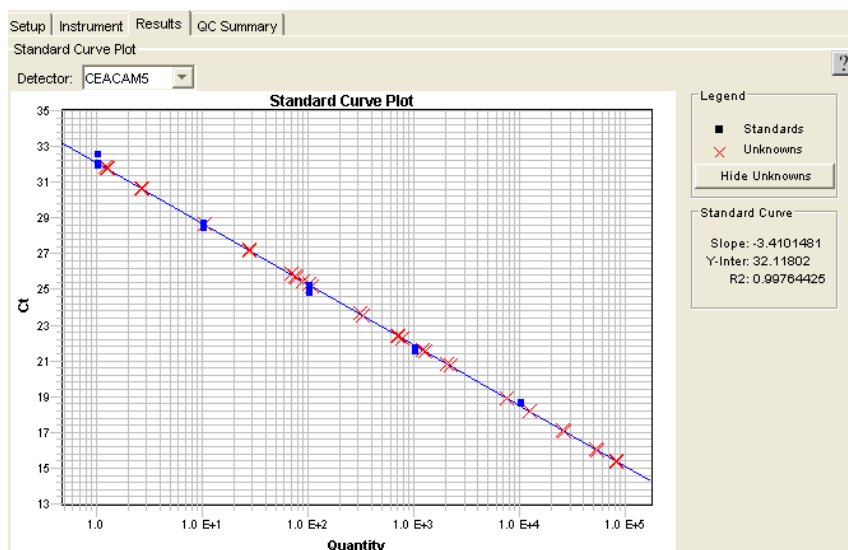
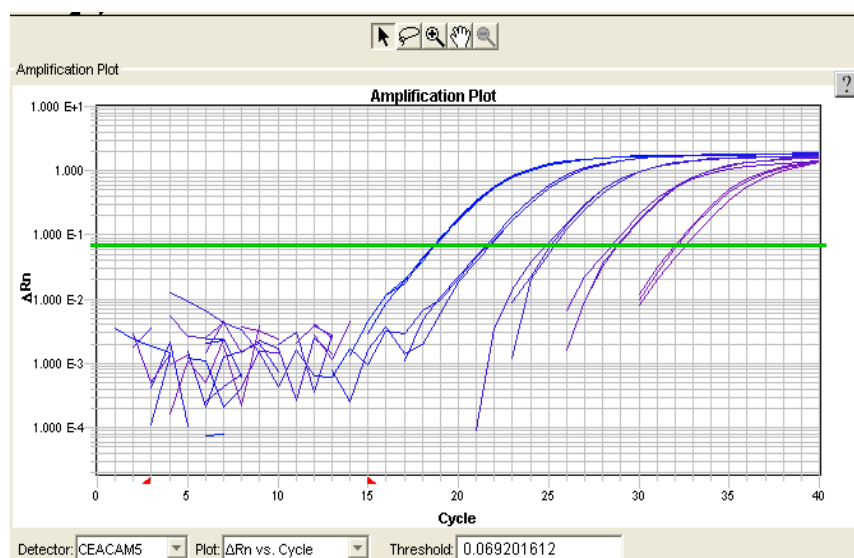
Η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS - disease free survival) και η συνολική επιβίωση (OS - overall survival) υπολογίστηκαν από την ημέρα του χειρουργείου έως τη πρώτη τεκμηριωμένη υποτροπή ή θάνατο, αντίστοιχα. Υποτροπή ορίστηκε ως το εύρημα μεταστατικής νόσου, τοπικής υποτροπής ή δεύτερου πρωτοπαθούς όγκου. Η αξιολόγηση της παρουσίας CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων έγινε τυφλά σε σχέση με τα κλινικά δεδομένα.

Οι πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ των αρχικών χαρακτηριστικών, υποτροπής και των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων, συγκρίθηκαν με αμφίπλευρο τεστ ακριβείας Fisher (2-sided Fisher exact test). Ο συσχετισμός των παραγόντων κινδύνου με τα τελικά σημεία που αφορούν τον χρόνο μέχρι την εμφάνιση κάποιου συμβάντος, αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία log-rank (δοκιμασία λογαριθμικής τάξης) ενώ η μέθοδος Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για τη γραφική παράσταση της αντίστοιχης DFS και OS καμπύλης. Οι συσχετισμοί μεταξύ πιθανού προγνωστικού παράγοντα και του DFS και OS, εξετάστηκαν με τη χρήση μονοπαραγοντικού και πολυπαραγοντικού μοντέλου αναλογικών κινδύνων παλινδρόμησης κατά Cox με δείκτες κινδύνου (Hazard ratios) και 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (CIs-Confidence Intervals). Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως $P \leq 0,05$.

2.4. Αποτελέσματα

2.4.1. Βελτιστοποίηση της μεθόδου RT-qPCR

Το cDNA που απομονώθηκε από τα Λονο κύτταρα αναλύθηκε για τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας και γραμμικότητας της RT-qPCR αντίδρασης. Οι καμπύλες βαθμονόμησης αυτών των πειραμάτων απέδειξαν τη γραμμικότητα της μεθόδου σε όλο το εύρος της ποσοτικοποίησης ($1-10^5$ Λονο κύτταρα) με συντελεστή γραμμικότητας (correlation coefficients) 0,994 (Σχήμα 6).



ΣΧΗΜΑ 6. Ποσοτικοποίηση των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων με RT-qPCR στο ABI Prism 7900HT. Το πάνω γράφημα απεικονίζει τις καμπύλες του σήματος φθορισμού κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης. Οι καμπύλες, από δεξιά προς αριστερά, αντιστοιχούν σε $1-10^5$ Lono κύτταρα. Κάτω το γράφημα (καμπύλη αναφοράς) δείχνει τους κύκλους ποσοτικοποίησης (Cqs) έναντι του αριθμού των Lono κυττάρων.

Η αποδοτικότητα της RT-qPCR που εκφράστηκε ως $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$ ¹²⁹, ήταν $0,97 \pm 0,029$ SD (standard deviation-τυπική απόκλιση) [συντελεστής διακύμανσης (CV-coefficient of variation): 3%; n= 18 πειράματα] και η μέση τιμή κλίσης (slope) και το μέσο σημείο απόκλισης (intercept) ήταν $3,516 \pm 0,11$ (CV:3,1; n=18) και $30,28 \pm 0,78$ (CV:2,6; n= 18 πειράματα), αντίστοιχα. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης (LOD-limit of detection) της δοκιμής ορίστηκε ως 3,3 φορές η σταθερή απόκλιση (SD) του σημείου τομής (Cp-crossing point) του πρώτου εξωτερικού προτύπου (ενός Lono κυτταρικού ισοδύναμου) διαιρεμένη με τη μέση τιμή της κλίσης (slope) της καμπύλης βαθμονόμησης^{100,130} και βρέθηκε ότι αντιστοιχεί σε 0,7 κυτταρικά ισοδύναμα / 5μg RNA.

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας (repeatability) της μεθόδου, cDNA δείγματα που αντιστοιχούσαν σε $1-10^4$ Lono κύτταρα αναλύθηκαν στο ίδιο πείραμα σε έξι παράλληλους προσδιορισμούς χρησιμοποιώντας την ίδια καμπύλη βαθμονόμησης¹³¹. Οι σταθερές απόκλισης των σημείων τομής για τα Lono κύτταρα και των συντελεστών διακύμανσης (CV – coefficients of variation) απεικονίζονται στον Πίνακα 8 που καταδεικνύει την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το ίδιο RNA, το οποίο ήταν καταψυγμένο σε υποπολλαπλάσια δείγματα (aliquots), και αναλύθηκαν για μια περίοδο 6 εβδομάδων σε 12 διαφορετικά πειράματα σε διαφορετικές ημέρες, επιβεβαίωσαν την αναπαραγωγικότητα (reproducibility) της μεθόδου. Επιπλέον, όπως συνοψίζεται στον Πίνακα 9, σε 5 διαφορετικά πειράματα καταφέραμε να ανακτήσουμε 10 Lono κύτταρα σε 10^6 φυσιολογικά μονοπύρηννα κύτταρα ($1:10^5$).

Μόνο το CEACAM1 ενισχύθηκε σε HL60 κύτταρα, ενώ μόνο το CEACAM5 ενισχύθηκε σε MCF7 κύτταρα με τη χρήση συμβατικής PCR χρησιμοποιώντας 100ng γενωμικού DNA ανά αντίδραση (Σχήμα 7). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν επίσης στην RT-qPCR αντίδραση, ξεκινώντας

από 5μg RNA για κάθε γονίδιο (Σχήματα 8A-8D). Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (sequencing) του προϊόντος της RT-qPCR επιβεβαίωσε την ειδικότητα της μεθόδου (Σχήμα 9).

Ακολουθούν οι Πίνακες 8,9 και τα σχήματα 7-9.

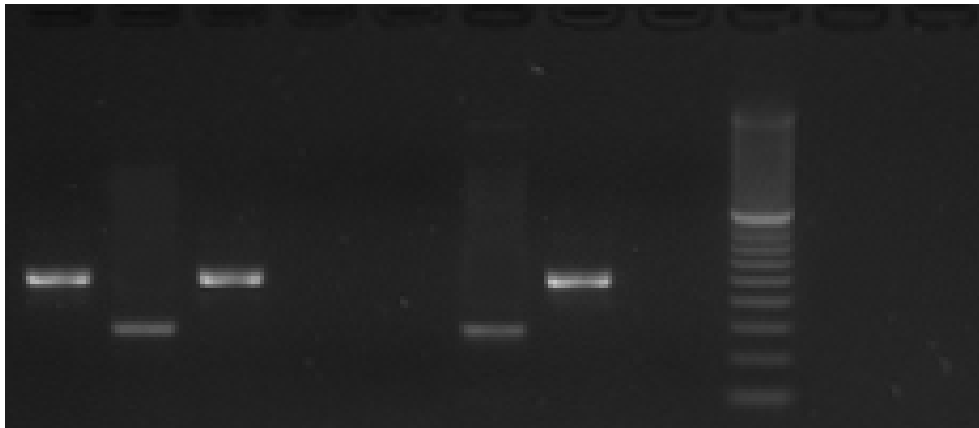
Επαναληψιμότητα (within run precision) N=6				
	Cq		Lovo-cells	
Lovo cells ισοδύναμα	Mean	SD*	Mean (SD*)	CVs [#] (%)
1	31.51	± 0.74	0.83 (± 0.06)	7.2
10	27.67	± 0.53	9.4 (± 0.56)	5.9
100	23.84	± 0.50	95.6 (± 7.8)	8.1
1000	20.23	± 0.32	981.2 ± (6.7)	6.8
Αναπαραγωγικότητα (between run precision) N=12				
	Cq		Lovo-cells	
Lovo cells ισοδύναμα	Mean	SD*	Mean (SD)	CVs [#] (%)
1	31.79	± 0.91	0.90 (± 0.08)	8.8
10	27.94	± 0.61	9.6 (± 0.6)	6.2
100	24.11	± 0.58	98.3 (± 8.2)	8.3
1000	20.44	± 0.36	996.7 ± (7.3)	7.3

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Αποτελέσματα για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγικότητας της RT-qPCR για την ανίχνευση των CEACAMmRNA-θετικών καρκινικών κυττάρων.

No Lovo cells diluted in 10⁶ PBMs	Lovo-cells recoverd		
	Mean	SD*	CVs [#] (%)
1	0.0	-	-
10	9.8	± 0.61	6.0
100	97.9	± 8.4	8.6
1000	987.8	±7.3	7.4

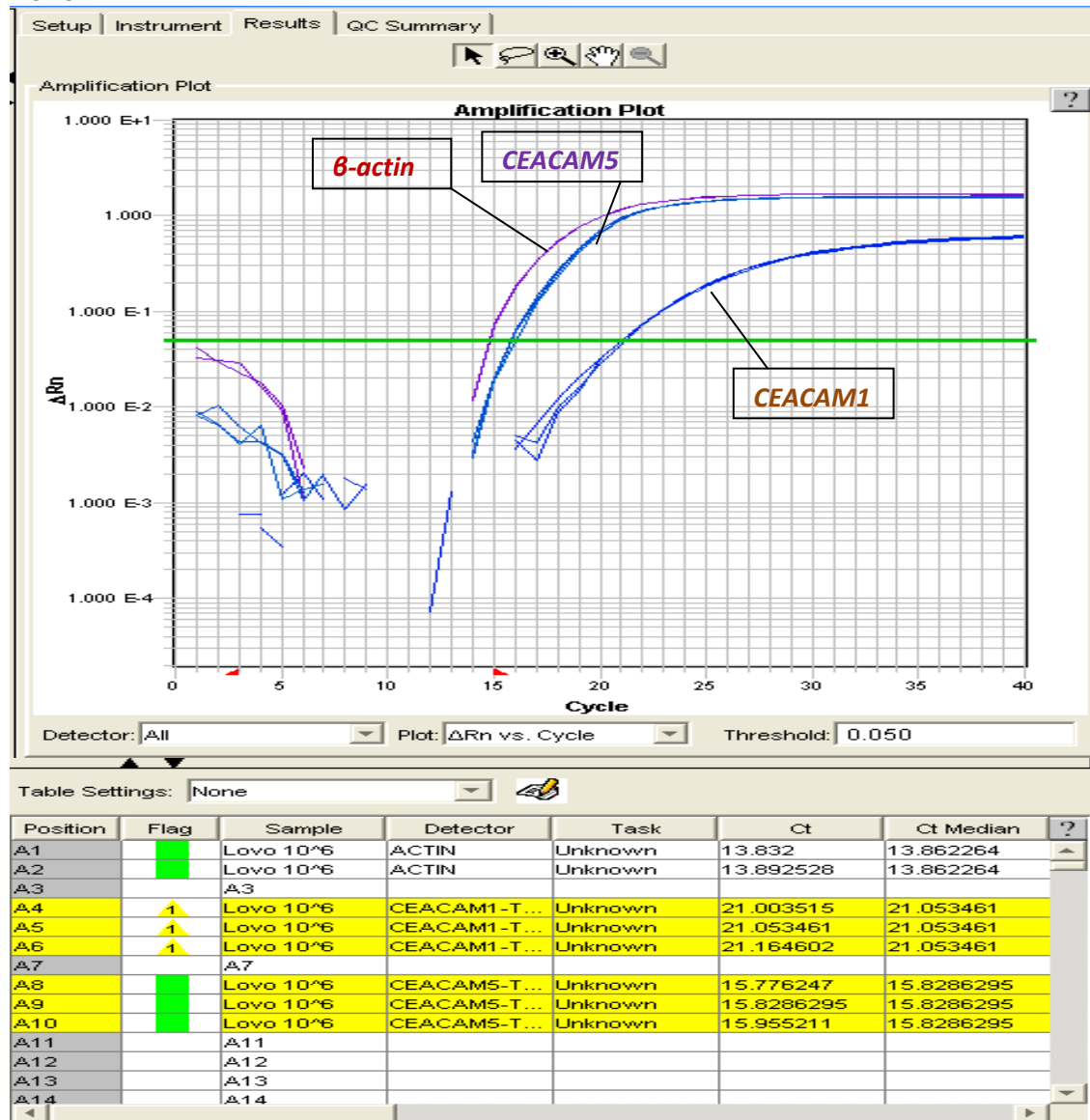
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Αποτελέσματα από 5 διαφορετικά πειράματα στα οποία διαδοχικά μειούμενος αριθμός Lovo κυττάρων διαλύθηκε σε 10⁶ PBMCs.

LoVo		HL-60		MCF-7		HV*		Blank	
Cam1	Cam5	Cam1	Cam5	Cam1	Cam5	Cam1	Cam5	100bp	Cam1 Cam5



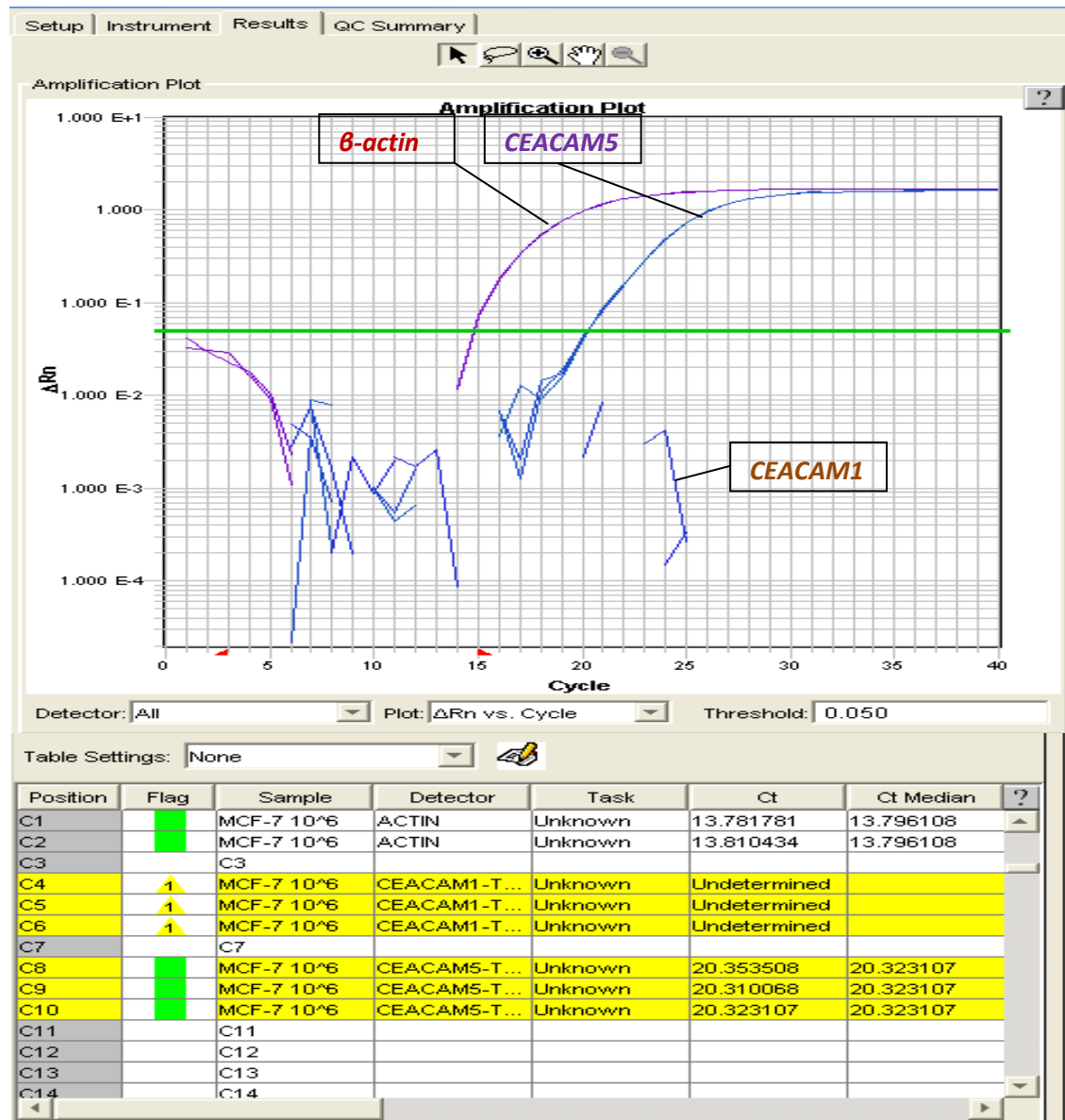
ΣΧΗΜΑ 7. Ενίσχυση των CEACAM5 and CEACAM1 σε LoVo, MCF7 and HL60 κυτταρικές γραμμές καθώς επίσης από PBMCs περιφερικού αίματος ενός υγιούς εθελοντή με τη χρήση των ίδιων εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR.

Lovo



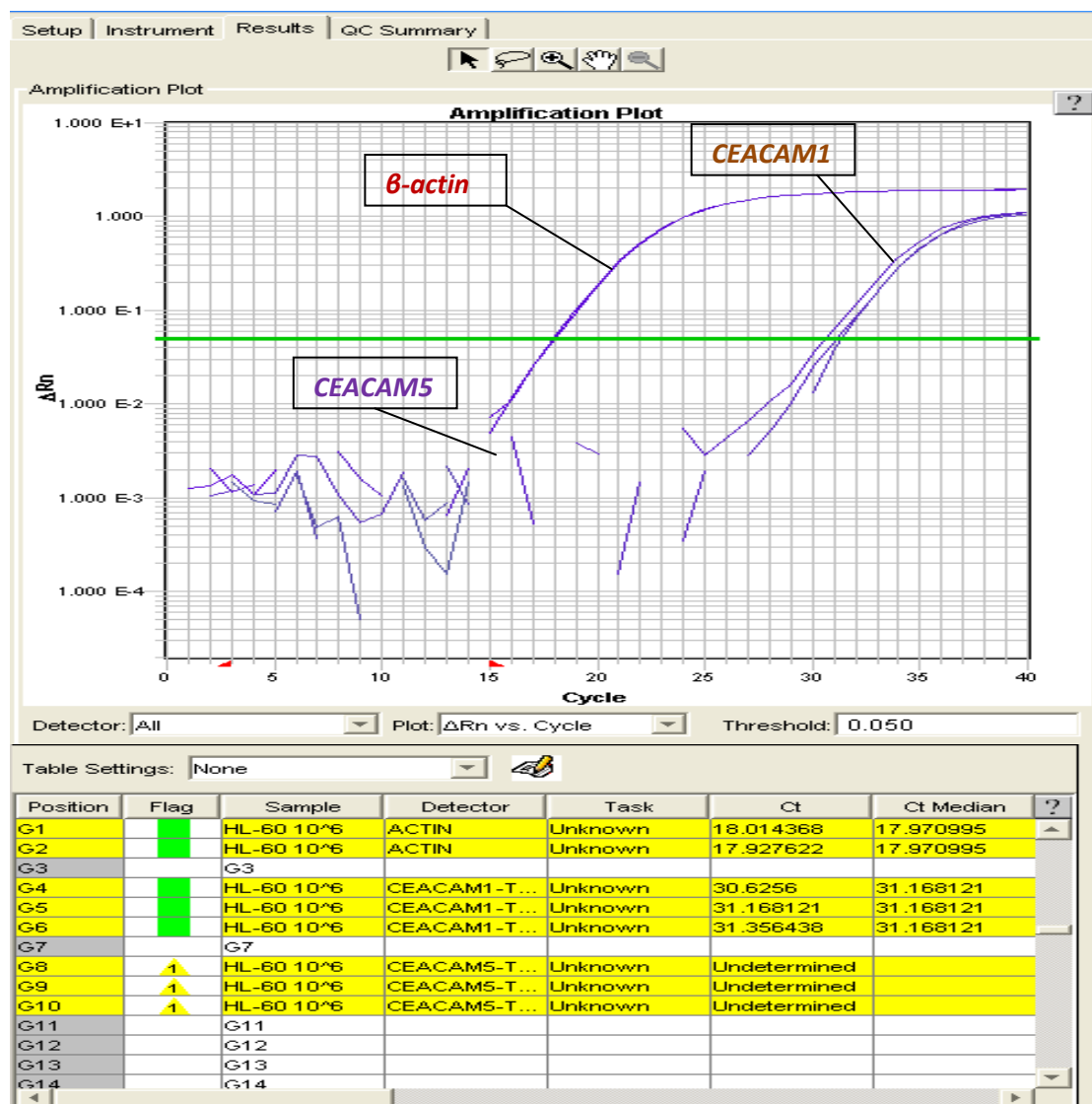
ΣΧΗΜΑ 8Α. Η RT-qPCR με εκκινήτες και ανιχνευτές για CEACAM1 και CEACAM5 σε Lovo κυτταρική σειρά, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της συμβατικής PCR. .

MCF-7



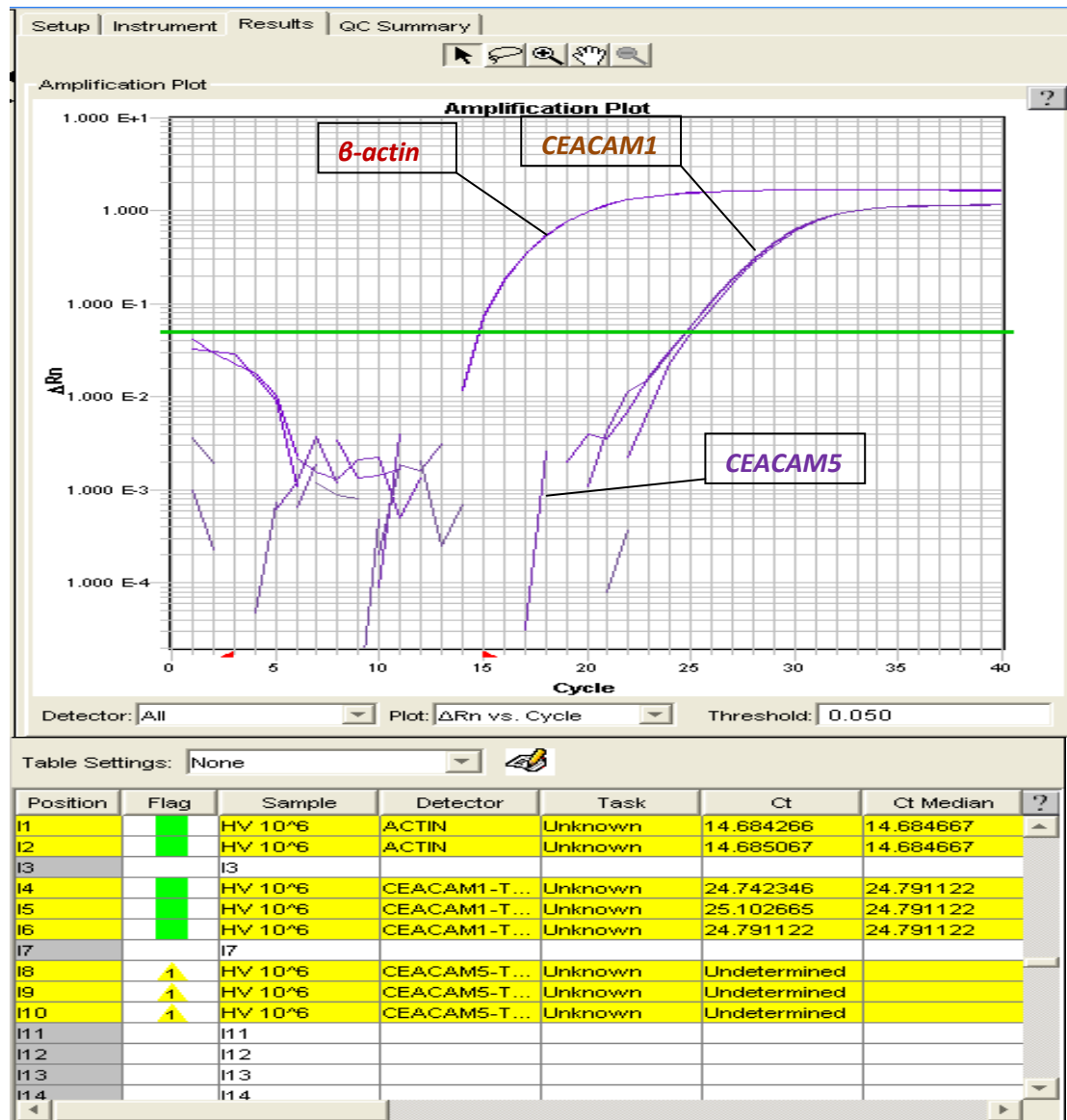
ΣΧΗΜΑ 8B. Η RT-qPCR με εκκινητές και ανιχνευτές για CEACAM1 και CEACAM5 σε MCF7 κυτταρική σειρά, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της συμβατικής PCR.

HL60



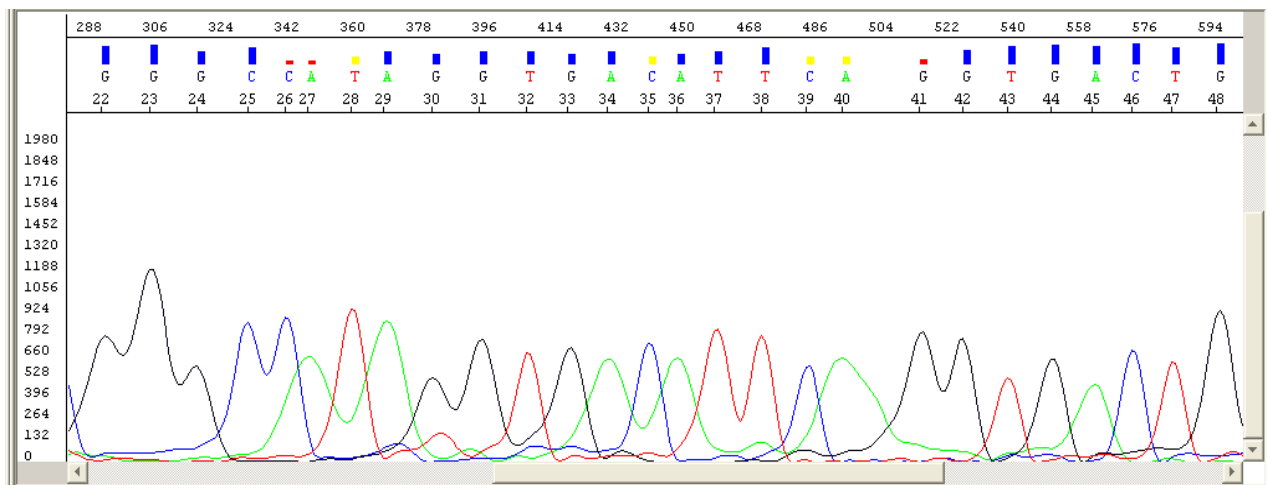
ΣΧΗΜΑ 8C. Η RT-qPCR με εκκινήτες και ανιχνευτές για CEACAM1 και CEACAM5 σε HL60 κυτταρική σειρά, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της συμβατικής PCR.

Μονοπύρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος (PBMCs) Υγιούς Εθελοντή (HV)

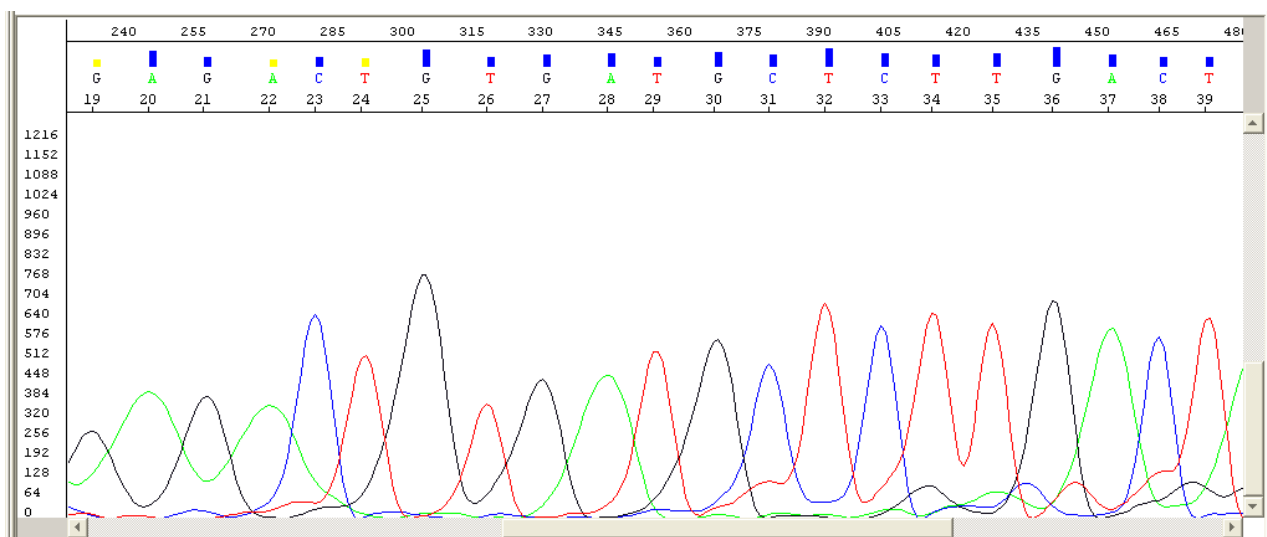


ΣΧΗΜΑ 8D. Η RT-qPCR με εκκινήτες και ανιχνευτές για CEACAM1 και CEACAM5 σε Μονοπύρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος (PBMCs) Υγιούς Εθελοντή (HV), επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της συμβατικής PCR.

Αλληλουχία του *CEACAM1* RT-qPCR προϊόντος στα HL60 κύτταρα



Αλληλουχία του *CEACAM5* RT-qPCR προϊόντος στα MCF-7 κύτταρα



ΣΧΗΜΑ 9. Η ανάλυση της αλληλουχίας των *CEACAM5* and *CEACAM1* στις MCF7 και HL60 κυτταρικές γραμμές χρησιμοποιώντας την RT-qPCR μέθοδο επιβεβαίωσε την ειδικότητα της μεθόδου.

2.4.2. Ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων σε ασθενείς και ομάδες ελέγχου

Η επίπτωση της ανίχνευσης των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων στις ομάδες ελέγχου και στους ασθενείς παρουσιάζεται στον Πίνακα 10. Σύμφωνα με το όριο ανίχνευσης (cutoff point), (>0,7 Lono κυτταρικά ισοδύναμα / 5μg RNA), μόνο 2 (2,2%) δείγματα από τους 96 υγιείς εθελοντές

(HV) ήταν θετικά, δηλώνοντας ποσοστό ειδικότητας 97,8%. Επίσης, στον πίνακα βλέπουμε ότι 1 (4,6%) ασθενής με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD-inflammatory bowel disease), αλλά κανένας με κολονικά αδενώματα, είχαν ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα.

	No of samples	No of +ve samples (%)	Mean no of cells	Range (min-max)	SD* (±)
Healthy donors blood	96	2 (2.2)	0.21	0.0-0.87	0.23
IBD ^{&}	21	1 (4.7)	0.47 ^{##}	0.16-0.85	0.34
Adenomas	15	0 (0.0)	0.32 ^{###}	0.0-0.64	0.29
Stage II-III CRC [@]	265	98 (37)	0.68	0.1-26.5	0.7
CEA mRNA (+)	98		1.72 [#]	0.72-26.5	1.8
CEA mRNA (-)	167		0.52	0.1-0.68	0.71
Metastatic CRC	100	44 (44)	0.74	0.2-218.2	0.0
CEA mRNA (+)	44		4.18 ^{####}	0.94-218.2	6.21
CEA mRNA (-)	56		0.58	0.2-0.69	0.65

*SD: Standard deviation

[&]IBD: Inflammatory Bowel Disease

[@]CRC: Colorectal Cancer

[#] stage II-III CRC patients vs. healthy donors ($p < 0.001$)

^{##} stage II-III CRC patients vs. patients with IBD ($p < 0.001$) mCRC ($p = 0.4$)

^{###} stage II-III CRC patients vs. patients with colonic adenomas ($p < 0.001$),

^{####} stage II-III CRC patients vs. patients with metastatic CRC ($p = 0.4$)

Πίνακας 10. Ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων σε διαφορετικές ομάδες ασθενών και υγιών ατόμων.

Αντίθετα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε 98 (37%) και 44 (44%) ασθενείς με στάδια II-III και IV ορθοκολικό καρκίνο, αντίστοιχα ($P = 0,4$; Πίνακας 10). Ο μέσος αριθμός των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων ήταν 1,72 (διακύμανση 0,72 - 26,5) και 4,18 (διακύμανση 0,94 - 218,2) σε ασθενείς με στάδιο II-III και μεταστατική νόσο, αντίστοιχα ($P = 0,4$; Πίνακας 10). Δεν υπάρχει σημαντική σχέση για την ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων με κάποιο από τα εξεταζόμενα κλινικοπαθολογικά γνωρίσματα σε ασθενείς με στάδιο II-III νόσο (Πίνακας 11).

Σε αντίθεση, σε ασθενείς με μεταστατική νόσο (στάδιο IV), η συμμετοχή του ήπατος συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερη ανίχνευση *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων (52% έναντι 31% σε ασθενείς με ή χωρίς ηπατικές μεταστάσεις; $P = 0,021$; Πίνακας 12).

	No of patients	CEA mRNA status				p-value
		Positive N = 98		Negative N=167		
		N	%	N	%	
Gender						
Male	167	67	40	100	60	0.2
Female	98	31	32	67	68	
Age						
≤ 70 years	185	69	37	116	63	0.9
> 70 years	80	29	36	51	64	
Tumor Location						
Colon	184	69	37	115	63	0.9
Rectum	81	29	36	52	63	
Stage at diagnosis						
II	105	41	39	65	61	0.6 [#]
High risk stage II*	(85)	(34)	(40)	(51)	(60)	
III	160	57	36	103	64	
Histologic Grade						
I-II	194	73	37	121	63	0.8
III	71	29	43	42	57	
Mucinous						
Yes	53	20	37	33	63	1.0
No	212	78	37	134	63	
Neural Invasion						
Yes	78	29	37	49	63	1.0
No	187	69	37	118	63	
Vessels Invasion						
Yes	118	44	37	74	63	1.0
No	147	54	37	93	63	
Vessels Cancer Emboli						
Yes	67	30	45	37	55	0.1
No	198	68	34	130	66	

*High risk stage II: T4 tumor or grade III or perforation-obstruction at diagnosis, or < 12 lymph node dissected

[#] Comparison between stage II and III

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Χαρακτηριστικά των ασθενών με στάδιο II-III σύμφωνα με την παρουσία των CEACAM5 mRNA-θετικών CTCs

		<i>CEACAM5</i> mRNA status				
		Positive (N = 44)		Negative (N=56)		
	No of patients	N	%	N	%	p-value
Gender						
Male	58	27	47	31	53	0.6
Female	42	17	40	25	60	
Age						
≤ 70 years	71	32	46	39	54	0.8
> 70 years	29	12	41	17	59	
Tumor Location						
Colon	67	28	41	39	59	0.3
Rectum	33	16	48	17	52	
Histologic Grade						
I-II	61	25	41	36	59	0.3
III	39	19	49	20	51	
Liver involvement						
Yes	64	33	52	31	48	0.021
No	36	11	31	25	69	

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Χαρακτηριστικά ασθενών με στάδιο IV σύμφωνα με την παρουσία των *CEAmRNA*-θετικών CTCs.

2.4.3. Προγνωστική σημαντικότητα της ανίχνευσης των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων

(α) **Υποτροπή της νόσου:** Μετά από μέση περίοδο παρακολούθησης 34,1 μηνών (διακύμανση 24,2 – 122,4 μήνες), 57 (22%) υποτροπές παρατηρήθηκαν μεταξύ των 256 ασθενών με χειρουργήσιμο ορθοκολικό καρκίνο. Όλοι οι ασθενείς με υποτροπή είχαν απομακρυσμένες μεταστάσεις και 7 επίσης παρουσίασαν τοπική υποτροπή. Η επίπτωση των υποτροπών ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα κύτταρα (37% έναντι 12%; $P < 0,001$; Πίνακας 13).

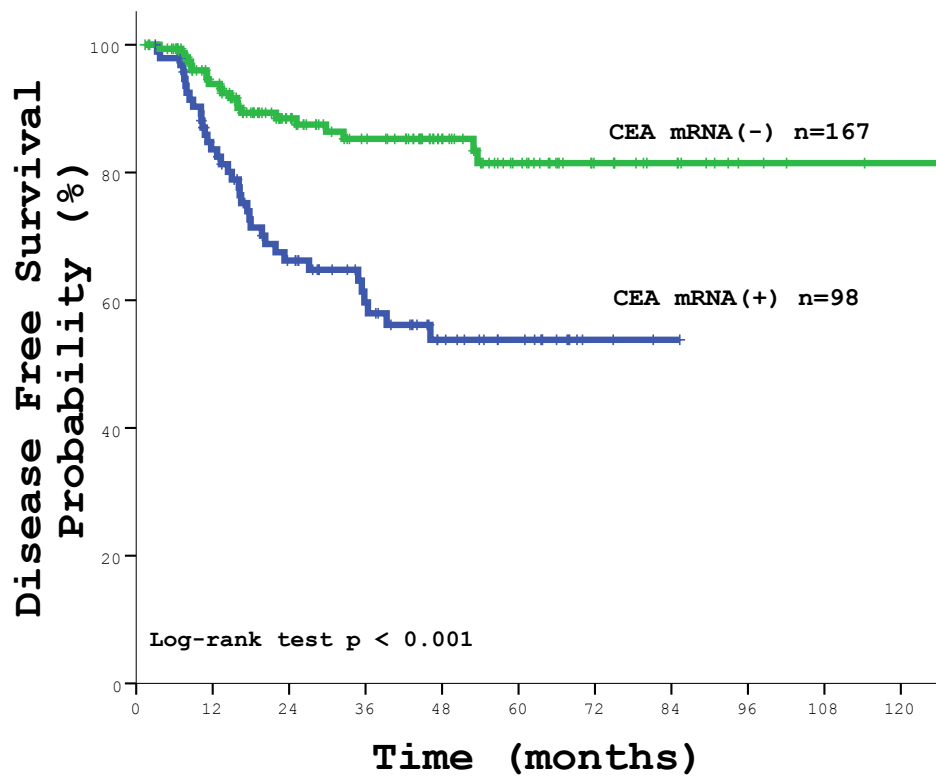
Η μέση επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) δεν έχει ακόμη επιτευχθεί, αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα κυκλοφορούντα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν ($P < 0,001$; Σχήμα 10). Επιπρόσθετα, η πιθανότητα της επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής (relapse free survival) ήταν 83% και 58% σε ασθενείς με και χωρίς ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα,

αντίστοιχα (P=0,001). Επίσης ασθενείς (n=54) με μη ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα πριν και μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία, παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη DFS συγκριτικά με εκείνους (n=20) με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα πριν και μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία (P=0,017) ή με εκείνους (n=9) με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα μόνο μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας (P=0,005; Σχήμα 11). Στους ασθενείς με μεταστατική νόσο, η ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων συσχετίσθηκε με σημαντικά ελαττωμένη επιβίωση ελεύθερης υποτροπής (PFS – progression-free survival) με μέση PFS 6,6 και 9,2 μήνες σε ασθενείς με και χωρίς ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα, αντίστοιχα (P=0,043).

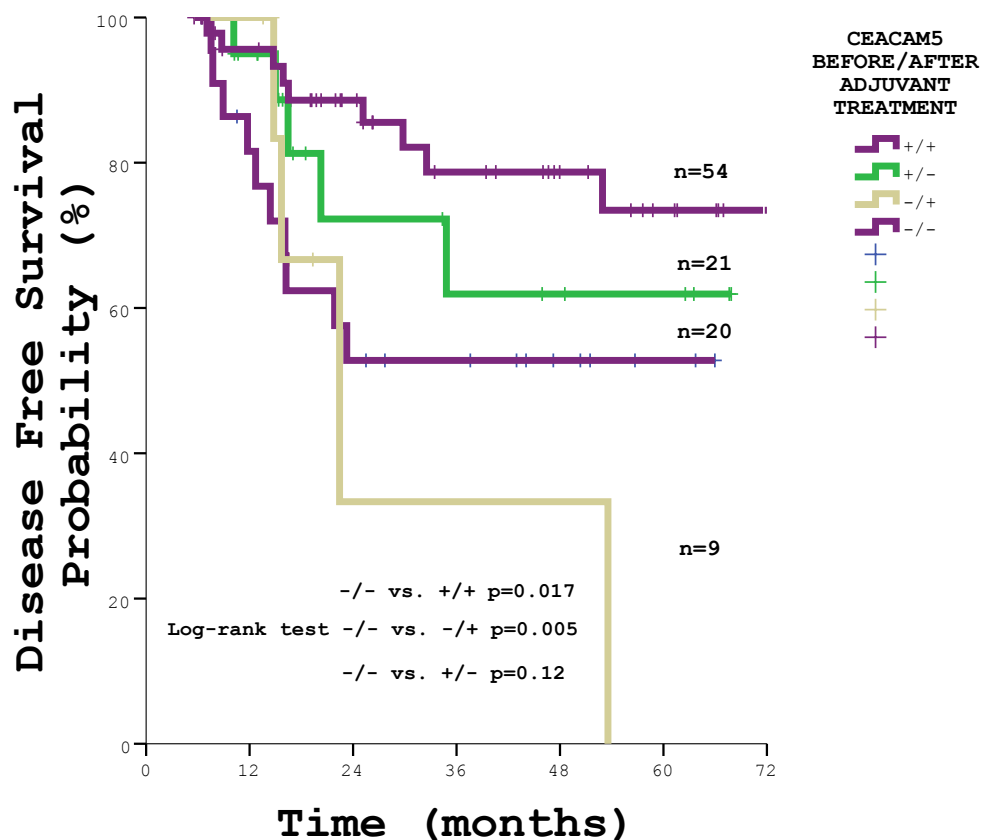
	No of patients	Relapses (n=57)			Deaths (n=45)		
		n	%	p value*	n	%	p-value*
CEA mRNA status							
Positive	98	36	37	<0.001	24	24	0.017
Negative	167	21	12		21	12	

*Fisher's exact test

Πίνακας 13. Επίπτωση της υποτροπής της νόσου και θανάτου σύμφωνα με την ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων



ΣΧΗΜΑ 10. Ελεύθερη νόσου επιβίωση σύμφωνα με την ανίχνευση των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων. Η ανίχνευσή τους σχετίστηκε με σημαντικά ελαττωμένο DFS.

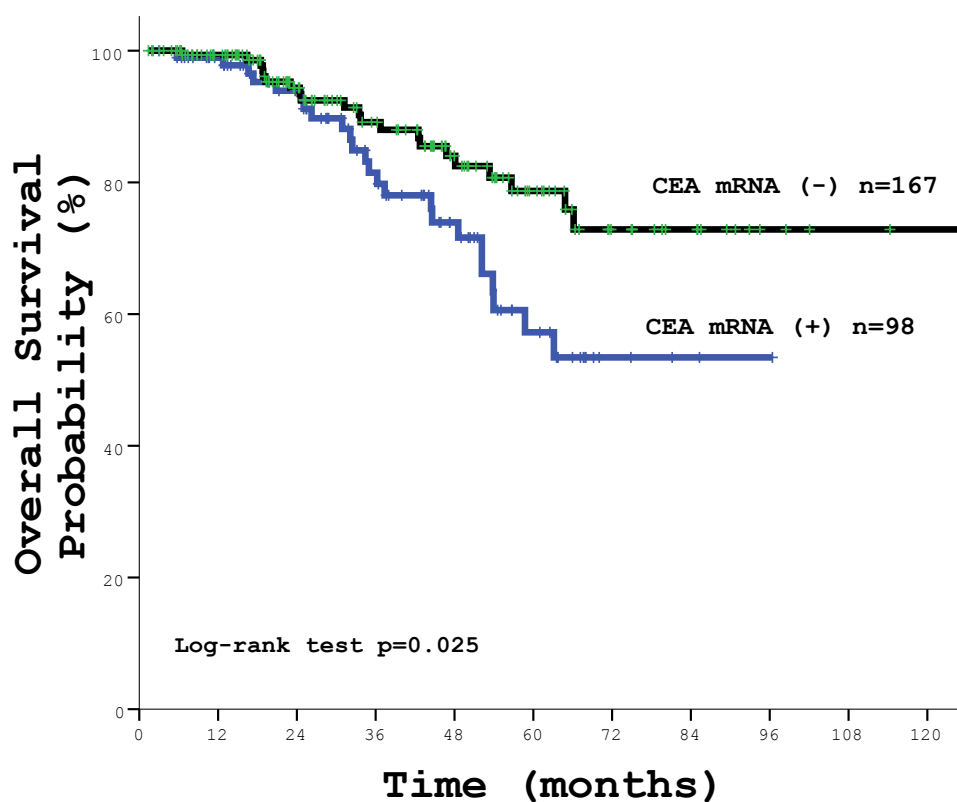


ΣΧΗΜΑ 11. Ελεύθερη νόσου επιβίωση σύμφωνα με την ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων πριν και/ή μετά τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Η ανίχνευσή τους πριν την έναρξη και στο τέλος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας σχετίστηκε με σημαντικά ελαττωμένο DFS.

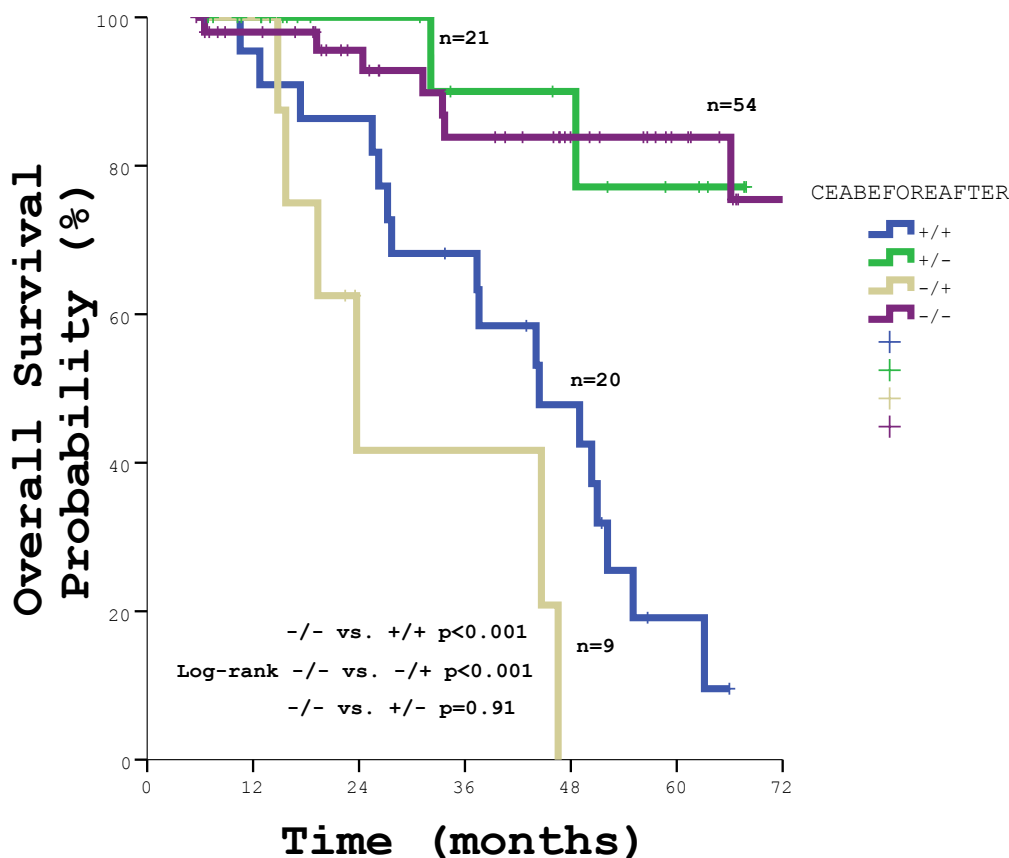
(β) Επιβίωση: Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, 45 από τους 265 ασθενείς (17%) πέθαναν λόγω προόδου νόσου. Είκοσι τέσσερεις (24%) θάνατοι αφορούσαν ασθενείς με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα και 21 (12%) θάνατοι αφορούσαν ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα καρκινικά κύτταρα ($P=0,017$; Πίνακας 13). Η μέση επιβίωση OS των ασθενών χωρίς ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκρινόμενη με αυτή των ασθενών με ανιχνεύσιμα καρκινικά κύτταρα ($P=0,025$; Σχήμα 12).

Η πιθανότητα επιβίωσης στα 3 και 5 έτη ήταν 79% και 57%, αντίστοιχα, για *CEACAM5* mRNA-θετικούς ασθενείς, συγκριτικά με 88% και 78%, αντίστοιχα, για *CEACAM5* mRNA-αρνητικούς ασθενείς. Επίσης, ασθενείς με μη ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα πριν και μετά τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας ($n=54$) παρουσίασαν σημαντικά

υψηλότερη OS συγκριτικά με εκείνους (n=20) με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα πριν και μετά τη συμπληρωματική θεραπεία (P=0,001) ή με εκείνους (n=9) με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα μόνο μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας (P=0,001); Σχήμα 13). Παρομοίως, σε ασθενείς με μεταστατική νόσο, η ανίχνευση *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση (21,6 μήνες έναντι 17,3 μήνες; P=0,047).



ΣΧΗΜΑ 12. Η μέση συνολική επιβίωση OS σύμφωνα με τη ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων. Οι ασθενείς χωρίς *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη OS συγκριτικά με εκείνους με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα.



ΣΧΗΜΑ 13. Η μέση συνολική επιβίωση OS σύμφωνα με τη ανίχνευση των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων πριν και/ή μετά τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Η ανίχνευσή τους πριν την έναρξη και στο τέλος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας σχετίστηκε με σημαντικά ελαττωμένο OS.

2.4.4. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση

Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι οι CEACAM5 mRNA-θετικοί ασθενείς παρουσίασαν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής συγκριτικά με τους CEACAM5 mRNA-αρνητικούς ασθενείς (HR 3,4; $P < 0.001$; Πίνακας 14). Επίσης το στάδιο της νόσου (III έναντι II), η διαφοροποίηση του όγκου (φτωχής έναντι καλής/μέσης) και η παρουσία νευρικής διήθησης και καρκινωματώδων αγγειακών εμβόλων (CVE-cancerous vessels emboli) συσχετίστηκαν με ελαττωμένη ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS). Η πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι η ανίχνευση των CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένο DFS (HR=3,4; 95% CI:2,0-5,9; $P < 0,001$; Πίνακας 15). Παρομοίως, οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά κύτταρα παρουσίασαν υψηλότερο κίνδυνο θανάτου

συγκρινόμενοι με τους ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα καρκινικά κύτταρα (HR=1,9; P=0,028; Πίνακας 14). Το στάδιο νόσου, η διαφοροποίηση του όγκου και η παρουσία καρκινωματοδών αγγειακών εμβόλων (CVE) επίσης συσχετίστηκαν σημαντικά με OS. Η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ότι το στάδιο III (HR=1,9; P=0,048) και η παρουσία CVE (HR=2,4; P=0,008) ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με ελαττωμένη επιβίωση (Πίνακας 15).

Feature	N	%	<u>Disease Free Survival</u>		<u>Overall Survival</u>	
			HR (95% CI)	p-value	HR(95% CI)	p-value
Median Age (Range)	65 (22-86)					
> 70 years vs.	80	30	1.4	0.2	1.8	0.08
≤ 70 years	185	70	(0.8-2.7)		(0.9-3.4)	
Gender						
Male vs.	167	63	1.2	0.4	1.3	0.4
Female	98	37	(0.7-2.1)		(0.7-2.1)	
Stage at diagnosis						
III vs.	160	60	3.4	0.001	2.6	0.005
II	105	40	(1.8-6.6)		(1.3-5.3)	
Tumor Location						
Colon vs.	184	69	1.2	0.4	1.6	0.1
Rectum	81	31	(0.7-2.1)		(0.9-2.7)	
Histologic Grade						
III vs.	71	27	2.7	<0.001	3.6	<0.001
I-II	194	73	(1.6-4.5)		(1.7-5.7)	
Mucinous						
No vs.	212	80	0.7	0.3	0.6	0.2
Yes	52	20	(0.3-1.4)		(0.3-1.4)	
Vessels Invasion						
Yes vs.	118	45	1.4	0.1	1.4	0.3
No	147	55	(0.8-2.4)		(0.8-2.5)	
Neural Invasion						
Yes vs.	78	29	1.9	0.01	2.4	0.3
No	187	71	(1.1-3.3)		(1.3-4.5)	
Vessels Cancer Emboli						
Yes vs.	67	25	1.9	0.01	3.1	0.001
No	198	75	(1.1-3.3)		(1.7-5.7)	
CEACAM5 mRNA CTCs						
Positive vs.	98	37	3.2	<0.001	1.9	0.03
Negative	167	63	(1.8-5.5)		(1.1-3.5)	

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Χαρακτηριστικά ασθενών και μονοπαραγοντική ανάλυση για DFS και OS.

	Hazard Ratio	95% CI	p-value
DFS			
CEACAM mRNA (positive vs negative)	3.4	2.0-5.9	<0.001
Stage (III vs II)	3.0	1.5-5.9	0.002
Grade (3 vs 1-2)	1.9	1.1-3.3	0.022
Neural invasion (yes vs no)	1.2	0.6-2.7	0.552
Vessels Tumoral emboli (yes vs no)	1.4	0.8-2.6	0.183
OS			
CEACAM5 mRNA (positive vs negative)	1.9	0.95-4.0	0.065
Stage (III vs II)	1.9	1.2-3.9	0.048
Grade (3 vs 1-2)	1.9	0.98-3.7	0.056
Vessels Tumoral emboli (yes vs no)	2.4	1.4-4.4	0.008

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Πολυπαραγοντική ανάλυση για ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για DFS και OS.

2.4.5. Δραστικότητα μονοκλωνικού αντισώματος Edrecolomab (Panorex[®])

Το Panorex χορηγήθηκε σε 20 ασθενείς (65% άνδρες έναντι 35% γυναίκες), με μέση ηλικία τα 64 έτη και στάδιο III έναντι στάδιο IV 20% και 80%, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 16, φαίνεται η κατανομή των ασθενών ανάλογα με το σχήμα χορήγησης Panorex, η ανταπόκριση (εξαφάνιση των κυκλοφορούντων CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων), η διάρκεια της ανταπόκρισης σε μήνες (η ανταπόκριση μετρήθηκε από την ημέρα εξαφάνισης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μέχρι την εκ νέου ανίχνευσή τους) και/ή την εμφάνιση μη-ανεκτής τοξικότητας του φαρμάκου.

Και οι 20 ασθενείς, που έλαβαν το φάρμακο, εξαφάνισαν τα CEACAM5 mRNA-θετικά κύτταρα μετά τη δεύτερη χορήγηση του φαρμάκου. Η διάρκεια ανταπόκρισης κυμάνθηκε από 2 έως 8 μήνες. Σε ό,τι αφορά τη τοξικότητα του φαρμάκου, όλοι οι ασθενείς είχαν πολύ καλή ανοχή χωρίς βαθμού III/IV τοξικότητα (ένας ασθενής παρουσίασε βαθμού II αλλεργική αντίδραση που αντιμετωπίστηκε με ενδοφλέβια κορτιζόνη και αντιισταμινικά,

ενώ άλλος ένας παρουσίασε βαθμού II διάρροια που αντιμετωπίστηκε με Λοπεραμίδη).

Η ένταξη ασθενών στη χορήγηση Panorex σταμάτησε πρόωρα λόγω της αρνητικής φάση III μελέτης¹²⁰ οπότε και το αντίσωμα αποσύρθηκε από την κλινική του χρήση. Έτσι, αν και η χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος Panorex φάνηκε ότι είναι ικανή να εξαφανίζει τα κυκλοφορούντα CEACAM5 mRNA-θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου III-IV, η πρόωρη διακοπή της μελέτης αυτής δεν μας οδήγησε σε σαφή και ασφαλή συμπεράσματα για τη δραστικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος στην εξαφάνιση των κυκλοφορούντων CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων.

ΣΧΗΜΑΤΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ PANOREX	ΑΣΘΕΝΕΙΣ (n)	ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ (n)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΜΗΝΕΣ (m)	ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ
500mg/d d1-d4	4	4	4m	Αλλεργική αντίδραση Βαθμού II (1)
500mg on d1,d3,d5	4	4	2m	(-)
500mg on d1 100mg on d29,57,85,103 (standard)	5	5	7.6m	(-)
500mg d1 and d4	4	4	7m	(-)
500mg/weekly x4weeks	3	1	8m	Διάρροια Βαθμού II (1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Σχήματα χορήγησης Panorex, ανταπόκριση, διάρκεια ανταπόκρισης και τοξικότητα.

2.5. Συζήτηση

Οι σκοποί αυτής της μελέτης, ήταν να αναπτύξουμε μια αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη RT-qPCR μέθοδο, χρησιμοποιώντας το *CEACAM5* mRNA ως ένα δείκτη ανίχνευσης για τη ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς με χειρουργήσιμο ορθοκολικό καρκίνο (στάδιο II-III) και να εκτιμήσουμε αν η ανίχνευσή τους αποτελεί προγνωστικό παράγοντα.

Στον καρκίνο του μαστού, μετά από θεραπευτική εκτομή, τα ποσοστά ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μειώνονται μετά μερικές εβδομάδες στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, ενώ αντίθετα η επιμονή της ανίχνευσής τους μετά, έχει προγνωστική σημαντικότητα¹³². Για τον λόγο αυτό, αποφασίσαμε να λάβουμε τα δείγματα περιφερικού αίματος, μόλις πριν την έναρξη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας (για σταδίου III και υψηλού κινδύνου σταδίου II ασθενείς) ή κατά την έναρξη παρακολούθησης ασθενών που δεν έλαβαν χημειοθεραπεία.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δεν θα πρέπει να συγκριθούν με εκείνα προηγούμενων μελετών, στις οποίες μέθοδοι με βάση την PCR χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων. Οι περισσότερες από εκείνες τις μελέτες χρησιμοποίησαν ποιοτικές μεθόδους^{83,85,104,133} και, πιο πιθανά, συμπεριέλαβαν "ψευδώς θετικά" αποτελέσματα, λόγω ενίσχυσης ενός εναλλακτικού μεταγράφου, του *CEACAM1*, το οποίο εκφράζεται στα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs)¹⁰⁵. Με βάση αυτή τη παραδοχή, σχεδιάσαμε ένα ειδικό σύνολο εκκινητών και ανιχνευτών, τα οποία δεν ενισχύουν αυτό το εναλλακτικό μετάγραφο, και αποδείξαμε την υψηλή ειδικότητα και αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Στη συνέχεια, παρατηρήσαμε μια σημαντικά ελαττωμένη ελεύθερη νόσου επιβίωση -DFS- ($P < 0.001$) και συνολική επιβίωση -OS- ($P = 0,017$) σε ασθενείς με χειρουργήσιμο ορθοκολικό καρκίνο και ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα, ενώ, η ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένο DFS (HR=3,4; $P < 0,001$). Επίσης, μια τάση για αύξηση του κινδύνου θανάτου (HR=1,9; $P = 0,065$) καταγράφηκε, η οποία δεν έφτασε τη

στατιστική σημαντικότητα, προφανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού των συμβάντων που υπήρξαν κατά τη διάρκεια της βραχείας περιόδου παρακολούθησης.

Αντίθετα, η παρουσία καρκινωματοδών αγγειακών εμβόλων (CVE) αναδείχθηκε ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη επιβίωση, σε συμφωνία με μερικές προηγούμενες αναφορές¹³⁴⁻¹³⁵. Επιπλέον, στην υποομάδα των ασθενών με διαθέσιμα δείγματα κατά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, η διατήρηση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων ήταν ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για μειωμένο DFS και OS. Αυτό το προκαταρκτικό εύρημα, παρέχει μια λογική για τη μελέτη, του κατά πόσο δηλαδή η ανίχνευση *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας αντιπροσωπευτικός δείκτης για την αποτελεσματικότητα της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας.

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά κύτταρα μεταξύ των σταδίων II, III και IV, παρά τον υψηλότερο πραγματικό αριθμό κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στους ασθενείς σταδίου IV. Άξιο προσοχής είναι ότι, στους ασθενείς σταδίου IV, εκείνοι με ηπατικές μεταστάσεις είχαν ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων ($P=0,021$).

Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με εκείνα που έχουν αναφερθεί σε μελέτες που χρησιμοποίησαν κυτταρικές (cell-based) τεχνικές. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι χρησιμοποιώντας τη πλατφόρμα Cell Search (Veridex LLC), ≥ 2 κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα/7,5ml αίματος θα μπορούσαν να ανιχνευθούν μόνο σε ασθενείς με κακοήθεις επιθηλιακούς όγκους⁸⁸ ενώ το ποσοστό ανίχνευσης CTCs σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο ήταν 36,2% και η ποσοτικοποίηση θα μπορούσε να είναι ένας πολύτιμος προγνωστικός παράγοντας⁸⁹. Μια πολυκεντρική προοπτική μελέτη έδειξε ότι CTCs θα μπορούσαν να ανιχνευθούν στο 60% των ασθενών πριν τη θεραπεία και ήταν ο ισχυρότερος προβλεπτικός παράγοντας για PFS και OS και ότι η ηπατική μετάσταση συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης CTCs⁹⁰. Μια άλλη ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να είναι ότι καμιά από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν

μέχρι τώρα δεν είναι ικανή να ανιχνεύσει όλα τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στη κυκλοφορία, και προκαταρκτικά αποτελέσματα από μελέτες που χρησιμοποίησαν προηγμένες τεχνικές υποδηλώνουν ότι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να ανιχνευθούν σε σχεδόν όλους τους ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο (CRC)¹³⁶.

Επίσης, δεν υπήρχε καμία διαφορά στο ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμα CTCs μεταξύ σταδίου II (39%) και σταδίου III (36%). Το γεγονός ότι 81% των ασθενών σταδίου II ήταν "υψηλού κινδύνου" ίσως μερικώς εξηγεί αυτό το εύρημα, καθώς αυτοί οι ασθενείς είχαν παρόμοια πρόγνωση με εκείνους σταδίου IIIA ή ακόμα και IIIB νόσο. Επιπλέον, η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ότι η ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων ήταν προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένο DFS ανεξαρτήτως σταδίου νόσου (Πίνακας 15), ενώ ο Sastre et al. ανέφεραν σχεδόν ίδια ποσοστά ανίχνευσης σε ασθενείς σταδίου II (20,7%) και III (24,1%)⁸⁹. Επίσης, έχει δειχθεί ότι CK-19mRNA-θετικά κύτταρα θα μπορούσε να ανιχνευθούν στο 31% των ασθενών με καρκίνο μαστού και αρνητικούς μασχालιαίους λεμφαδένες¹³⁷, η διασπορά των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να είναι ανεξάρτητη της διήθησης λεμφαδένων. Πάντως, καθώς η παρουσία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων είναι ένα απαραίτητο (αν και όχι επαρκές) βήμα στη μεταστατική διεργασία, αυτά τα κύτταρα πιθανά καθορίζουν ένα υποσύνολο καρκινικών κυττάρων τα οποία ίσως οδηγούν στην ανάπτυξη της μετάστασης. Τα μεταστατικά κύτταρα ίσως παρουσιάζουν πολύ διαφορετικά μοριακά προφίλ από εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου¹³⁶. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι η αναγνώριση των CTCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια μοριακή υπογραφή της μεταστατικής ικανότητας ενός συγκεκριμένου όγκου με το πέρασμα του χρόνου¹³⁸. Η απομόνωση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των *CEACAM5* mRNA-θετικών CTCs, μπορεί να επιτρέψει τον μη επεμβατικό γενοτυπικό χαρακτηρισμό των καρκινικών κυττάρων, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής του όγκου και μεταστατικής νόσου, για τη θεραπευτική διαστρωμάτωση των ασθενών, την αναγνώριση πρότυπων θεραπευτικών

στόχων και τη παρακολούθηση της συστηματικής αντικαρκινικής θεραπείας¹³⁹⁻¹⁴⁰.

Λόγω των αδυναμιών στο σχεδιασμό της παρούσης μελέτης (μη ομοιόμορφα θεραπευμένοι ασθενείς, έλλειψη ομάδας ελέγχου για τη προοπτική αξιολόγηση των ασθενών-validation patient's cohort), τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή. Μελλοντικές μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες απαιτούνται προκειμένου να εκτιμηθεί κατά πόσο η παρακολούθηση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας των ασθενών με πρώιμη ή μεταστατική νόσο, θα μπορούσε να έχει κλινική σημασία επηρεάζοντας τη θεραπευτική απόφαση.

3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) ευθύνεται για το 10% όλων των Κακοήθων όγκων στους ενήλικες και θεωρείται σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρκίνο σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η Αμερικανική Εταιρία Καρκίνου (ACS) εκτίμησε ότι το 2010, 142.570 άτομα θα διαγνωσθούν με CRC και 51370 θα πεθάνουν από τη νόσο τους. Στις Ηνωμένες Πολιτείες ο κίνδυνος κατά τη διάρκεια της ζωής διάγνωσης CRC εκτιμάται ότι είναι 5,9% για τους άνδρες και 5,5% για τις γυναίκες.

Τα επακριβή αίτια ανάπτυξης CRC είναι άγνωστα, αλλά περιβαλλοντικοί-διαιτητικοί- γενετικοί και οικογενείς παράγοντες (οικογενειακό ιστορικό, αδενωματώδεις πολύποδες, φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση, κληρονομικός μη-πολυποσικός CRC, δίαιτα πλούσια σε λίπος και χοληστερόλη) έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τον ορθοκολικό καρκίνο.

Παρόλο που είναι δυνατή η θεραπευτική χειρουργική εξαίρεση στο 70%-80% των ασθενών κατά τη διάγνωση, περίπου το ένα τρίτο από αυτούς θα παρουσιάσουν τοπική ή/και μεταστατική υποτροπή και θα πεθάνουν από τη νόσο.

Οι ασθενείς σταδίου III, λόγω αυξημένου κινδύνου υποτροπής (διηθημένοι περιοχικοί λεμφαδένες) λαμβάνουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία, με Oxaliplatin, Fluorouracil και Leucovorin. Για τους ασθενείς σταδίου II, η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας είναι αμφιλεγόμενη. Όμως σύμφωνα με τις πρόσφατες συστάσεις του National Comprehensive Cancer Network (NCCN version 1.2011), σε ασθενείς σταδίου II υψηλού κινδύνου (T4 όγκοι, διάτρηση ή/και απόφραξη εντέρου, διήθηση λεμφαγγείων, διηθημένα όρια εκτομής, όγκος χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης, εύρεση <12 λεμφαδένων στο χειρουργικό παρασκεύασμα) θα πρέπει να εξετάζεται σοβαρά η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας.

Για τον μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (mCRC), η χημειοθεραπεία με βάση την 5-Fluorouracil (5-FU) ήταν η θεραπεία εκλογής για δεκαετίες, με μικρό κλινικό όφελος. Τα τελευταία χρόνια, η άφιξη νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Oxaliplatin, Irinotecan) και σε συνδυασμό με την 5-FU, έχει αυξήσει τη συνολική επιβίωση από 12 μήνες σε 21-22 μήνες. Επίσης, η έλευση της στοχευμένης θεραπείας διέυρυνε περαιτέρω τις θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με mCRC. Συγκεκριμένα, η αναστολή του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και της αγγειογένεσης μέσω της αναστολής της έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα (Cetuximab-Panitumumab και Bevacizumab αντίστοιχα) οδήγησε

στη περαιτέρω βελτίωση της έκβασης των ασθενών με mCRC. Επίσης, η έλευση της στοχευμένης θεραπείας διεύρυνε περαιτέρω τις θεραπευτικές επιλογές για το mCRC.

Επιπροσθέτως, η εκτομή (κυρίως ηπατικών και πνευμονικών) μεταστάσεων από καρκίνο του παχέος εντέρου αποτελεί συνήθη ιατρική πρακτική για τους ασθενείς με περιορισμένη μεταστατική νόσο και προς το παρόν παραμένει η μόνη δυνητικά θεραπευτική αντιμετώπιση. Μακροχρόνια επιβίωση έχει αναφερθεί από πολυάριθμες αναδρομικές σειρές, ωστόσο, η θεραπευτική εκτομή είναι δυνατή σε ποσοστό μικρότερο από το 25% των ασθενών με νόσο περιορισμένη στο ήπαρ ή τους πνεύμονες, που συνεπώς μεταφράζεται σε ποσοστό μόλις 5%-10% της αρχικής ομάδας που αναπτύσσει μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (mCRC).

Το Edrecolomab (Panorex[®] anti- 17-1A mAb) είναι μονοκλωνικό αντίσωμα επίμυος IgG2a, το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο 17-1A (γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας) που βρίσκεται στην επιφάνεια τόσο των καρκινικών κυττάρων όσο και κυττάρων του φυσιολογικού επιθηλιακού ιστού. Το αντίσωμα αυτό, το οποίο ονομάζεται PANOREX, έχει τη δυνατότητα να καταστρέφει νεοπλασματικά κύτταρα μέσω διαφόρων ανοσολογικών μηχανισμών αλλά, κύρια, μέσω της ADCC (Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity). Η χρήση του PANOREX σε τυχαίοποιημένη μελέτη (Riethmuller et al JCO 1998) σαν συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου III, έδειξε μια σημαντική παράταση του ελεύθερου νόσου διαστήματος καθώς επίσης και μείωση της πιθανότητας υποτροπής της νόσου. Η επανεκτίμηση των δεδομένων της μελέτης αυτής μετά από μια περίοδο 7 ετών παρακολούθησης των ασθενών έδειξε ότι το προαναφερθέν όφελος παρέμενε.

Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων είναι ένα θεμελιώδες βήμα της εξέλιξης προς μεταστατική νόσο. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορούν να ταυτοποιηθούν σε διάφορα τμήματα του σώματος χρησιμοποιώντας ανοσοφαινοτυπικές και μοριακές (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση- RT-PCR) τεχνικές. Σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο CRC, η ανίχνευση των κακοήθων κυττάρων στον μυελό των οστών, στο περιτοναϊκό έκπλυμα και στους περιοχικούς λεμφαδένες, σχετίζεται με φτωχή επιβίωση.

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στα δείγματα αίματος θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένα μοναδικό και εύκολο διαγνωστικό μέσο για τον καθορισμό της πρόγνωσης και της παρακολούθησης της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας. Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (REAL TIME-qPCR) έχει δείξει να παρέχει την ευαισθησία και την εφικτότητα που απαιτείται για την ανίχνευση σπάνιων καρκινικών κυκλοφορούντων κυττάρων στο αίμα

ασθενών. Στον ορθοκολικό καρκίνο, ο δείκτης που έχει μελετηθεί πιο πολύ είναι το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA).

Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, εξετάσθηκε η παρουσία των CEACAM5 mRNA θετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα με τη μέθοδο της RT-qPCR και καταβλήθηκε προσπάθεια να προσδιορισθεί η προγνωστική τους σημασία σε ασθενείς με χειρουργήσιμο (στάδιο II-III) ορθοκολικό καρκίνο, καθώς επίσης εκτιμήθηκε η δραστηριότητα διαφορετικών σχημάτων χορήγησης Edrecolomab (PANOREX[®]) στην εξαφάνιση CEACAM-mRNA θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με χειρ/σιμο ή μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Από τον Ιανουάριο 1998, έγινε λήψη περιφερικού αίματος (15ml σε EDTA) από διαδοχικούς ασθενείς με CRC κατά τη πρώτη επίσκεψη (συνήθως 3-8 εβδομάδες μετά το χειρουργείο) στο Τμήμα Κλινικής Ογκολογίας του ΠΑ.Γ.Ν.Η σε τακτική βάση, μετά από την ενυπόγραφη συγκατάθεση μετά από ενημέρωση του εκάστοτε ασθενούς. Συνολικά, δείγματα αίματος λήφθηκαν από 265 ασθενείς με χειρ/σιμο CRC (στάδιο II-III) με ελάχιστη παρακολούθηση 24 μηνών. Από τις ιστολογικές αναφορές λήφθηκαν υπόψιν τα εξής στοιχεία: η εξωτοιχωματική διήθηση των αγγείων, το βάθος διήθησης του τοιχώματος του εντέρου (pT), η διήθηση περιοχικών λεμφαδένων (pN) και ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου. Για την εκτίμηση της αναλυτικής ευαισθησίας της μεθόδου (RT-qPCR), αναλύθηκαν δείγματα αίματος από 96 υγιείς δότες, 15 ασθενείς με αδενώματα παχέος εντέρου, 21 ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο εντέρου (IBD) και 100 ασθενείς με mCRC.

Όλα τα δείγματα αίματος λήφθησαν κατά τη μέση της φλεβικής παρακέντησης, μετά από αφαίρεση των πρώτων 5ml, ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση με επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας. Συμπληρωματική χημειοθεραπεία χορηγήθηκε σε 257 (97%) ασθενείς και σε 102 από αυτούς (39%) χρησιμοποιήθηκε σχήμα ΧΜΘ με βάση την Oxaliplatin.

Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν με κλινική εξέταση και εργαστηριακές εξετάσεις κάθε 3 μήνες για τα πρώτα 3 χρόνια και κάθε 6 μήνες για τα επόμενα 2 χρόνια και εν συνεχεία ετησίως, και με Αξονική τομογραφία θώρακος και κοιλίας ετησίως για τα 3 πρώτα έτη και στη συνέχεια κατά τη κρίση του γιατρού. Η μελέτη έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή και Δεοντολογίας του Ιδρύματος μας.

Από 15 ml περιφερικού αίματος, διαχωρίζονταν τα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος με φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας κατά Ficoll-Hyraque. Τα κύτταρα που συγκεντρώνονται στην ενδιάμεση στοιβάδα απομακρύνονται, πλύνονται δυο φορές με 50 ml στείρου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε 1.200 g επί 10 λεπτά, διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C έως τη χρήση τους. Το ολικό RNA απομονώνεται με

αντιδραστήριο Trizol LS (Gibco, Life Sciences, BRL, Γκραντ Άιλαντ, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Το απομονωμένο RNA διαλύεται σε υδατικό διάλυμα διαιθυλοπυροκαρβονικού (DEPC) και διατηρείται σε θερμοκρασία -80°C έως τη χρήση του. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο Nanodrop (NanoDrop Technologies, Γουίλμινγκτον, Ντέλαγουερ, ΗΠΑ). Η ακεραιότητα του RNA ελέγχεται με PCR ενίσχυση του ιδιοσυστατικού γονιδίου της β -ακτίνης.

Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA, γίνεται με τη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τυποποιημένα πρότυπα συμπληρωματικού DNA (cDNAs). Το ολικό RNA θα παρασκευάζεται από 1×10^6 κύτταρα καρκινικής σειράς Lovo CRC (κατόπιν επαλήθευσης με αιμοσφαιριόμετρο). Για τη σύνθεση των cDNAs χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις αυτού του παρασκευάσματος του RNA σε υδατικό διάλυμα DEPC που αντιστοιχεί με $1-10^5$ κύτταρα καρκινικής σειράς LoVo. Τα εν λόγω cDNAs διασπάστηκαν σε κλάσματα, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C και χρησιμοποιήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της μελέτης ως εξωτερικά πρότυπα. Αυτή η καμπύλη βαθμονόμησης δημιουργείται αναπαριστώντας γραφικά τον αριθμό των κυττάρων καρκινικής σειράς LoVo που αντιστοιχούν σε κάθε τυποποιημένο πρότυπο cDNA *έναντι* της τιμής του ουδού του κύκλου του (Cq). Ο αριθμός των κυκλοφορούντων *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων για όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν εκφράστηκε ως αντίγραφα ανά κύτταρο καρκινικής σειράς Lovo ανά 5 μg ολικού RNA, σύμφωνα με την εξωτερική πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Το λογισμικό πρόγραμμα SDS 2.3 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Όλες οι τεχνικές της μεθόδου ανίχνευσης των *CEACAM5* mRNA θετικών κυττάρων αναφέρονται λεπτομερώς στο ολοκληρωμένο κείμενο της διδακτορικής διατριβής.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσουμε τη προγνωστική σημασία των *CEACAM5* mRNA θετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) σε ασθενείς με στάδιο II-III CRC. Η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και η ολική επιβίωση (OS) υπολογίσθηκαν από την ημέρα του χειρουργείου έως τη πρώτη τεκμηρίωση υποτροπής ή θάνατο, αντίστοιχα. Υποτροπή ορίστηκε ως τη διαπίστωση μεταστατικής νόσου, τοπική υποτροπή ή δεύτερο πρωτοπαθή όγκο. Οι πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ των αρχικών χαρ/κών, της υποτροπής και των *CEACAM5* mRNA θετικών κυττάρων συγκρίθηκαν με αμφίπλευρο τεστ ακριβείας Fisher. Ο συσχετισμός των παραγόντων κινδύνου με τα τελικά σημεία που αφορούν τον χρόνο μέχρι την εμφάνιση κάποιου συμβάντος, αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία log-rank, και η μέθοδος Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για τη γραφική παράσταση της αντίστοιχης DFS και OS καμπύλης. Οι συσχετισμοί μεταξύ πιθανού προγνωστικού παράγοντα και του DFS ή OS, εξετάστηκαν με τη

χρήση του μοντέλου αναλογικών κινδύνων κατά Cox. Η στατιστική σημαντικότητα ορίσθηκε σε $p \leq 0,05$.

Σε 20 ασθενείς με στάδιο III/IV CRC που είχαν CEA-mRNA θετικά κύτταρα, χορηγήθηκε Panorex (iv) με ένα από τα σχήματα του πίνακα 1. Πρίν και 1 ώρα μετά από κάθε έγχυση, καθώς επίσης και κάθε μήνα μετά το πέρας κάθε σχήματος χορήγησης, λαμβανόταν 15ml αίμα, ώστε να ελεγχθεί ο ρυθμός και το χρονικό διάστημα εξαφάνισης των CEA-mRNA θετικών κυττάρων.

Πίνακας 1.

ΣΧΗΜΑΤΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ PANOREX
ΣΧΗΜΑ 1: 500mg/d x 4days
ΣΧΗΜΑ 2: 500mg/d ημέρα παρ'ημέρα για 1 εβδομάδα
ΣΧΗΜΑ 3 : Standard Schedule (500mg x 1→100mg x 4)
ΣΧΗΜΑ 4 : 500mg d1 and d4 για 1 εβδομάδα
ΣΧΗΜΑ 5 : 500mg/εβδομαδιαίως x 4 εβδομάδες

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βελτιστοποίηση της μεθόδου RT-qPCR: Για τον καθορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας και της γραμμικότητας της μεθόδου, αναλύθηκαν οι εξωτερικές πρότυπες συγκεντρώσεις cDNA σε 18 διαφορετικά πειράματα. Τα διαγράμματα βαθμονόμησης των αντιδράσεων έδειξαν κανονική γραμμικότητα σε όλο το εύρος ποσοτικοποίησης (1 έως 10^5 Lono κύτταρα) και συντελεστή γραμμικότητας (correlation coefficients) 0.994 για όλα τα δείγματα. Η αποδοτικότητα της RT-qPCR, που εκφράστηκε ως $E=10^{-1/\text{slope}} - 1$, ήταν 0.97 ± 0.029 SD (συντελεστής διακύμανσης CV:3.0%; n=18) και η μέση τιμή κλίσης (slope) και το μέσο σημείο απόκλισης (intercept) ήταν 3.516 ± 0.11 (CV:3.1; n=18) και 30.28 ± 0.78 (CV:2.6%; n=18 πειράματα), αντίστοιχα. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου ορίσθηκε ως 3.3 φορές η σταθερή απόκλιση (SD) του σημείου τομής (Cq) για 1 Lono κυτταρικό ισοδύναμο, διαιρεμένη με την μέση τιμή της κλίσης (slope) της καμπύλης βαθμονόμησης, και βρέθηκε ότι αντιστοιχεί σε 0.7 Lono κυτταρικά ισοδύναμα / 5μg RNA. Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, cDNA δείγματα που αντιστοιχούσαν σε $1-10^4$ Lono κύτταρα, αναλύθηκαν στον ίδιο πείραμα (run) σε 6 παράλληλους προσδιορισμούς, χρησιμοποιώντας την ίδια καμπύλη βαθμονόμησης. Οι σταθερές απόκλισης των σημείων τομής για τα Lono κύτταρα απεικονίζονται στον συμπληρωματικό πίνακα 1 που καταδεικνύει την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το ίδιο RNA (το οποίο ήταν κατεψυγμένο) και αναλύθηκαν για μια περίοδο 6 εβδομάδων σε 12 διαφορετικά πειράματα σε διαφορετικές ημέρες,

επιβεβαίωσαν την αναπαραγωγικότητα (reproducibility) της μεθόδου. Επιπλέον όπως συνοψίζεται στον συμπληρωματικό πίνακα 2, σε 5 διαφορετικά πειράματα καταφέραμε να ανακτηθούν (recovered) 10 Lono κύτταρα σε 10^6 φυσιολογικά μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ($1:10^5$).

Ανίχνευση CEACAM5 mRNA-θετικών CTCs σε ασθενείς και ομάδες ελέγχου: Σύμφωνα με το όριο ανίχνευσης -cut-off point- (>0.7 Lono κυτταρικά ισοδύναμα/5μg RNA), μόνο δύο δείγματα (2.2%) από τους 96 υγιείς εθελοντές ήταν θετικά (ποσοστό ειδικότητας 97.8%). Ένας ασθενής με IBD (4.6%) είχε ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά κύτταρα και κανένας με αδενώματα παχέος. Αντίθετα, CEACAM5 mRNA-θετικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε 98 (37%) και 44 (44%) ασθενείς με στάδιο II-III και IV CRC, αντίστοιχα ($p=0.4$). Ο μέσος αριθμός των CEACAM5 mRNA-θετικών CTCs ήταν 1.72 (διακύμανση 0.72-26.5) και 4.18 (διακύμανση 0.94-218.2) σε ασθενείς με στάδιο II-III και μεταστατική νόσο, αντίστοιχα ($p=0.4$). Δεν υπήρχε σημαντικός συσχετισμός για την ανίχνευση CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων με κανένα από τα κλινικοπαθολογικά γνωρίσματα σε ασθενείς με στάδιο II-III νόσο. Αντίθετα, σε ασθενείς με μεταστατική νόσο, η συμμετοχή του ήπατος συσχετίσθηκε με σημαντικά υψηλότερη ανίχνευση CEACAM5 mRNA-θετικών CTCs (52% vs. 31% σε ασθενείς με ή χωρίς ηπατικές μεταστάσεις; $p=0.021$).

Προγνωστική σημαντικότητα της ανίχνευσης CEACAM5 mRNA-θετικών CTCs:

Υποτροπή Νόσου: Μετά από μέση περίοδο παρακολούθησης 34.1 μήνες (διακύμανση 24.2 – 122.4 μήνες), 57 (22%) υποτροπές παρατηρήθηκαν μεταξύ των 265 ασθενών με χειρ/σιμο CRC. Όλοι οι ασθενείς με υποτροπή είχαν απομακρυσμένες μεταστάσεις και 7 επίσης παρουσίασαν τοπική υποτροπή. Η επίπτωση των υποτροπών ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με CEACAM5 mRNA-θετικά CTCs συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα κύτταρα (37% vs. 12%; $p<0.001$). Η μέση DFS (ελεύθερη νόσου επιβίωση) δεν έχει ακόμη επιτευχθεί, αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα κυκλοφορούντα CEACAM5 mRNA-θετικά CTCs συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν ($p<0.001$). Επιπρόσθετα, η πιθανότητα της επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής (relapse-free survival) στα 3 έτη, σε ασθενείς με και χωρίς ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά CTCs ήταν 83% και 58%, αντίστοιχα ($p=0.001$). Επίσης, ασθενείς ($n=54$) με μη ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά CTCs πριν και μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία (ΧΜΘ) παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη DFS συγκριτικά με εκείνους ($n=20$) με ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά CTCs πριν και μετά τη συμπληρωματική ΧΜΘ ($p=0.017$) ή με εκείνους ($n=9$) με ανιχνεύσιμα CEACAM5 mRNA-θετικά CTCs μόνο μετά την ολοκλήρωση της ΧΜΘ ($p=0.005$). Στους ασθενείς με μεταστατική νόσο, η ανίχνευση CEACAM5 mRNA-θετικών κυττάρων συσχετίσθηκε με σημαντικά ελαττωμένη

επιβίωση ελεύθερη υποτροπής-PFS- (μέση PFS 6.6 και 9.2 μήνες σε ασθενείς με και χωρίς ανιχνεύσιμα CTCs, αντίστοιχα; $p=0.043$).

Επιβίωση: Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, 45 από τους 265 ασθενείς (17%) πέθαναν λόγω προόδου νόσου. Είκοσι τέσσερεις (24%) θάνατοι αφορούσαν ασθενείς με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs και 21 (12%) χωρίς ($p=0.017$). Η μέση επιβίωση OS των ασθενών χωρίς ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκρινόμενη με αυτή των ασθενών με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs ($p=0.025$). Η πιθανότητα επιβίωσης στα 3 και 5 έτη για ασθενείς με *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs, ήταν 79% και 57%, αντίστοιχα, συγκριτικά με 88% και 78%, αντίστοιχα για τους *CEACAM5* mRNA-αρνητικούς ασθενείς. Επίσης, ασθενείς με μη ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs πριν και μετά τη χορήγηση συμπληρωματικής ΧΜΘ ($n=54$) παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη OS συγκριτικά με εκείνους ($n=20$) που είχαν ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs πριν και μετά τη συμπληρωματική ΧΜΘ ($p=0.001$) ή με εκείνους ($n=9$) που είχαν *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs μόνο μετά το πέρας της συμπληρωματικής ΧΜΘ ($p=0.001$). Παρομοίως σε ασθενείς με μεταστατική νόσο, η ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων, συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση (21.6 vs. 17.3 μήνες; $p=0.047$).

Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση:

Η Μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι οι *CEACAM5* mRNA-θετικοί ασθενείς παρουσίασαν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής συγκριτικά με τους *CEACAM5* mRNA-αρνητικούς ασθενείς (HR:3.4; $p<0.001$). Επίσης, το στάδιο νόσου (III vs. II), η διαφοροποίηση του όγκου (φτωχή vs.καλή/μέση) και η παρουσία νευρικής διήθησης και καρκινωματώδων αγγειακών εμβόλων (CVE) συσχετίστηκαν με ελαττωμένο DFS.

Η Πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι η ανίχνευση *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένο DFS (HR=3.4; 95% CI:2.0-5.9; $p<0.001$). Επιπρόσθετα, το στάδιο III (HR=3.0; 95% CI:1.5-5.9; $p=0.002$) και η παρουσία όγκων φτωχής διαφοροποίησης (HR=1.9; 95% CI:1.1-3.3; $p=0.022$), επίσης ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες που σχετίστηκαν με μειωμένο DFS. Παρομοίως, ασθενείς με ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs παρουσίασαν μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου συγκρινόμενοι με ασθενείς χωρίς *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs (HR=1.9; $p=0.028$). Το στάδιο νόσου, η διαφοροποίηση όγκου και η παρουσία CVE επίσης σημαντικά συσχετίστηκαν με OS. Η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ότι το στάδιο III (HR=1.9; $p=0.048$) και η παρουσία CVE (HR=2.4; $p=0.008$) ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με ελαττωμένη επιβίωση.

Χορήγηση Panorex σε ασθενείς με χειρ/σιμο CRC και σε ασθενείς σταδίου IV:

Το Panorex χορηγήθηκε σε 20 ασθενείς (65% άνδρες vs. 35% γυναίκες), με μέση ηλικία τα 64 έτη και στάδιο II vs. στάδιο IV 20% και 80% αντίστοιχα. Από τον πίνακα 2, φαίνεται η κατανομή των ασθενών ανάλογα το σχήμα θεραπείας, την ανταπόκριση (εξαφάνιση των κυκλοφορούντων CEAmRNA-θετικών κυττάρων), τη διάρκεια ανταπόκρισης και τη τοξικότητα. Και οι 20 ασθενείς, που έλαβαν το φάρμακο, αρνητικοποίησαν το CEAmRNA μετά τη δεύτερη χορήγηση του φαρμάκου, ανεξαρτήτως σχήματος χορήγησης αυτού. Η μεγαλύτερη διάρκεια ανταπόκρισης παρατηρήθηκε στο 3^ο, 4^ο και 5^ο σχήμα θεραπείας (πίνακας 2).

Πίνακας 2.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΜΗΝΕΣ (m)	ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ
500mg/d D1-4	4	4	4m	Αλλεργική αντίδραση Gr 2 (1)
500mg on d1,d3,d5	4	4	2m	(-)
500mg on d1 100mg on d29,57,85,103 (standard)	5	5	7.6m	(-)
500mg d1 and d4	4	4	7m	(-)
500mg/weekly x4weeks	3	1	8m	Διάρροια Gr 2 (1)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι σκοποί της παρούσης μελέτης ήταν να αναπτύξουμε μια αξιόπιστη και αναπαραγωγίμη RT-qPCR μέθοδο, χρησιμοποιώντας το CEACAM5 mRNA ως ένα δείκτη ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των CTCs σε ασθενείς με CRC, και να εκτιμήσουμε την ανίχνευσή τους ως ένα προγνωστικό δείκτη. Στον καρκίνο του μαστού, μετά τη θεραπευτική εκτομή τα ποσοστά ανίχνευσης των CTCs είναι ελαττωμένα μετά από μερικές εβδομάδες στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, και η επιμονή των CTCs μετά έχει προγνωστική σημαντικότητα. Για αυτόν τον λόγο, αποφασίσαμε να λάβουμε τα δείγματα αίματος ακριβώς πριν από την έναρξη της επικουρικής ΧΜΘ (για ασθενείς σταδίου III ή σταδίου II υψηλού κινδύνου) ή στην έναρξη παρακολούθησης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δεν θα πρέπει να συγκριθούν με

εκείνα προηγούμενων μελετών, στις οποίες μέθοδοι με βάση την PCR χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων. Οι περισσότερες από εκείνες τις μελέτες χρησιμοποιούσαν ποιοτικές μεθόδους και, πιο πιθανά, συμπεριέλαβαν “ψευδώς θετικά” αποτελέσματα λόγω της ενίσχυσης ενός εναλλακτικού μεταγράφου του *CEACAM1* το οποίο εκφράζεται στα λευκά αιμοσφαίρια. Με βάση αυτή τη παραδοχή, σχεδιάστηκε ένα ειδικό σύνολο εκκινητών και ανιχνευτών τα οποία δεν ενισχύουν αυτό το εναλλακτικό μετάγραφο και αποδείχθηκε η υψηλή ειδικότητα και αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Στην συνέχεια, παρατηρήθηκε μια σημαντικά ελαττωμένη DFS ($p < 0.001$) και OS ($p = 0.017$) σε ασθενείς με χειρ/σιμο CRC και ανιχνεύσιμα *CEACAM5* mRNA-θετικά CTCs, ενώ, η ανίχνευση *CEACAM5* mRNA-θετικών CTCs αναδείχτηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένο DFS (HR=3.4; $p < 0.001$). Επίσης, μια τάση για αύξηση του κινδύνου θανάτου (HR=1.9; $p = 0.065$) καταγράφηκε η οποία, όμως, δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα, προφανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού των συμβάντων που υπήρξαν κατά τη διάρκεια της βραχείας περιόδου παρακολούθησης. Αντίθετα, η παρουσία των CVE αναδείχθηκε ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη επιβίωση, σε συμφωνία με μερικές προηγούμενες αναφορές. Επιπλέον, στην υποομάδα των ασθενών με διαθέσιμα δείγματα κατά την ολοκλήρωση της επικουρικής ΧΜΘ, η διατήρηση των *CEACAM5* mRNA-θετικών CTCs ήταν ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας μειωμένου DFS και OS. Αυτό το προκαταρκτικό εύρημα, παρέχει μια λογική για τη μελέτη, του κατά πόσο η ανίχνευση των *CEACAM5* mRNA-θετικών κυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας αντιπροσωπευτικός δείκτης για την αποτελεσματικότητα της επικουρικής ΧΜΘ.

Λόγω των αδυναμιών στον σχεδιασμό της παρούσης μελέτης (μη ομοιόμορφα θεραπευμένοι ασθενείς, έλλειψη ομάδας ελέγχου-validation patient's cohort-για τη προοπτική αξιολόγηση ασθενών) τα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή. Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται προκειμένου να εκτιμηθεί κατά πόσο η παρακολούθηση των *CEACAM5* mRNA-θετικών CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας των ασθενών με πρώιμη ή μεταστατική νόσο, θα μπορούσε να έχει κλινική σημασία επηρεάζοντας την θεραπευτική απόφαση.

Η χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος Panogex, είναι ικανή να εξαφανίσει τα κυκλοφορούντα CEAmRNA-θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών με στάδιο III και IV CRC, ανεξαρτήτως του σχήματος χορήγησής του.

Λόγω της άρνησης πολλών ασθενών να δώσουν τη συγκατάθεσή τους για την λήψη μυελού των οστών, δεν προχωρήσαμε τη διαδικασία αυτή.

3.2. SUMMARY

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) accounts for 10% of all malignant tumors in adults and is a major cause of morbidity and mortality from cancer worldwide. The American Cancer Society (ACS) estimated that in 2010, 142,570 people will be diagnosed with CRC and 51,370 will die from their disease. In the United States the danger of a lifetime diagnosis of CRC is estimated to be 5.9% for men and 5.5% for women.

The exact causes of CRC development is unknown, but environmental-dietary-genetic and familial factors (family history of adenomatous polyps, inflammatory bowel disease, familial adenomatous polyposis (FAP), hereditary non-polyposis CRC (HNPCC), a diet rich in fat and cholesterol) have been found to be associated with colorectal cancers.

Although surgical resection is possible in 70% -80% of patients at diagnosis, about one third of them will face local and / or metastatic relapse and die from the disease.

Patients with stage III disease, due to increased risk of relapse (infiltrated regional lymph nodes) receive adjuvant chemotherapy with Oxaliplatin, Fluorouracil and Leucovorin. For stage II patients, the administration of adjuvant chemotherapy is controversial. But according to recent recommendations of the National Comprehensive Cancer Network (NCCN version 1.2011), in patients with high risk stage II (T4 tumors, perforation and / or bowel obstruction, lymphatic vessels infiltration, positive margin of resection, poorly differentiated histology, less than 12 lymph nodes evaluated after surgery) should be strongly considered for adjuvant chemotherapy administration.

For metastatic colorectal cancer (mCRC), 5-Fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy was the treatment of choice for decades, with minor clinical benefit. In recent years, the arrival of new chemotherapeutic agents (Oxaliplatin, Irinotecan) in combination with 5-FU, has increased the overall survival from 12 months to 21-22 months. Also, the advent of targeted therapy further broadened the treatment options for patients with mCRC. Specifically, inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) and angiogenesis by inhibiting the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) using monoclonal antibodies (Cetuximab-Panitumumab and Bevacizumab respectively) led to further improvement in outcome for patients with mCRC. Also, the advent of targeted therapy further expanded the therapeutic options for mCRC.

In addition, resection for colorectal metastases (mainly in lung and liver) is a common medical practice for patients with limited metastatic disease, and currently remains the only potentially curative treatment. Several retrospective series have reported long-term survival, however, curative resection is possible in less than 25% of patients with disease limited to the liver or lungs, which consequently translates into only 5% to 10% of the original group developing metastatic colorectal cancer. (mCRC).

Edrecolomab (Panorex[®] anti- 17-1A mAb) is a murine IgG2a

monoclonal antibody, which recognizes the antigen 17-1A (surface glycoprotein) located on the surface of both cancer and epithelial cells of normal tissue. This antibody, called Panorex, can destroy tumor cells via different immunological mechanisms, but foremost through ADCC (Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity). The use of Panorex in a randomized trial (Riethmuller et al JCO 1998) as adjuvant therapy in patients with operable colon cancer stage III, showed a significant prolongation in disease free survival and also reduced the likelihood of recurrence. The revised data for this study after a period of 7 years of patient follow-up, showed that the aforementioned benefits remained.

Dissemination of tumor cells is an obligatory step toward progression to metastatic disease. Circulating colon cancer cells can be identified in various body compartments using immunophenotyping and RT-PCR techniques. In colon cancer, finding of minimal residual disease in bone marrow, peritoneal lavage and lymph node samples correlated with poor survival in early stage colon Ca.

Detection and quantification of circulating tumor cells CTCs in blood samples could serve as a unique and easy diagnostic tool to determine prognosis and monitor treatment effectiveness. Quantitative Real Time RT-PCR (RT-qPCR) has been shown to provide the sensitivity and the practicability which is necessary to detect rare CTCs in patients' blood. In CRC, the most frequently analyzed marker is the Carcino-Embryonic Antigen (CEA).

In this doctorate thesis, we examined the presence of CEACAM5 mRNA positive circulating tumor cells in peripheral blood by the method of RT-qPCR and tried to determine their prognostic significance in patients with operable (stage II-III) colorectal cancer; also we assessed the efficacy of different schedules of Edrecolomab administration (Panorex[®]) in eliminating CEACAM-mRNA positive cells in the peripheral blood of patients with operable or metastatic colorectal cancer.

PATIENTS AND METHODS

Since January 1998, peripheral blood (15 ml in EDTA) was obtained from consecutive patients with CRC at the time of the first visit (usually 3-8 weeks after surgery) in the Department of Medical Oncology of the University Hospital of Heraklion, on a routine basis after obtaining the patient's consent. Totally, blood samples were obtained from 269 patients with stage II-III CRC. Four patients were excluded from the analysis due to incomplete clinical data (1 case) or inadequate follow-up (3 cases). In the present analysis, 265 patients with operable CRC (stage II-III) with a minimum follow-up of 24 months were included. Histopathological data was obtained from the pathology reports included the extramural vascular invasion status, tumor differentiation, maximum depth of invasion (pT), and lymph node involvement (pN). For the evaluation of the analytical sensitivity and specificity of the method blood samples from 96 healthy blood donors, 15 patients with colonic adenomas, 21 patients with inflammatory bowel disease (IBD) and 100 patients with metastatic CRC (mCRC) were analyzed. All blood samples were obtained at the middle of vein puncture after the first 5mL of blood were discarded, in order to avoid contamination with epithelial cells from the skin.

Adjuvant chemotherapy was administered in 257 (97%) patients and in 102 of the cases (39%) an Oxaliplatin-based regimen was used. Blood samples from 104 patients were also obtained within one month after the completion of the treatment.

Patients were followed with clinical examination and laboratory tests every 3 months for the first 3 years and every 6 months for the next 2 years and yearly thereafter. Chest and abdominal-pelvic computed tomography was performed yearly for the first 3 years and subsequently at the discretion of the physician. The study has been approved by the Ethics and Scientific Committees of our Institution.

Peripheral blood mononuclear cells will be obtained, from 7.5 ml of peripheral blood, by gradient density centrifugation using Ficoll-Hypaque. The interface cells will be removed, will be washed twice with 50 mL of sterile phosphate-buffered saline at 1,200 g for 10 minutes, pelleted, and stored at -80°C until used. Total RNA isolation will be performed by using Trizol LS reagent (Gibco, Life Sciences, BRL, Grand Island, NY), according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA will be dissolved in diethylpyrocarbonate-treated water (DEPC) and will be stored at -80°C until used. RNA concentration will be determined by Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA integrity will be tested by PCR amplification of the β -actin housekeeping gene.

For quantification of RNA, an external calibration curve will be obtained by using external standard complementary DNAs (cDNAs). Total RNA will be prepared from 1×10^6 lovo cells (as verified by a hemocytometer). Serial dilutions of this RNA preparation in DEPC-treated water, corresponding to $1-10^5$ lovo cells, were used for cDNA synthesis. These cDNAs were kept in aliquots at -20°C and used throughout the study as external standards.

This calibration curve was created by plotting the number of Lovo cells corresponding to each external standard cDNA *versus* the value of its Cq. The number of CEACAM5 mRNA-positive cells for all of the tested samples was expressed as Lovo cell equivalents/ $5 \mu\text{g}$ of total-RNA according to the external standard calibration curve. The SDS 2.3 software program used to analyze the results. All method techniques for the detection of CEACAM5 mRNA positive cells are detailed in the complete text of the doctoral thesis.

The aim of the current study was to explore the prognostic significance of CEACAM5 mRNA-positive CTCs in patients with stage II-III CRC. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were calculated from the day of surgery to the first documented relapse or death, respectively. Relapse was defined as the finding of metastatic disease, local recurrence or a second primary tumor.

The potential association between baseline characteristics, relapse and CEACAM5 mRNA-positive cells were compared with the two-sided Fisher's exact test for categorical variables. The association of risk factors with time-to-event endpoints was analyzed with the log-rank test, and the Kaplan-Meier method was used to plot the corresponding DFS and OS curves.

Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models with hazard ratios and 95% Confidence Intervals (CI), were used to assess the

association between potential prognostic factor and DFS or OS. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

In 20 patients with stage III / IV CRC and CEA-mRNA positive cells, Panorex was administered intravenously, with one of five schedules, as being shown on table 1. Before and 1 hour after each injection, and every month after the end of each treatment schedule, 15ml of peripheral blood was obtained in order to assess the rate and duration of CEA-mRNA positive cells' elimination.

Table 1.

EDRECOLOMAB ADMINISTRATION SCHEDULES
Schedule 1: 500mg/d x 4days
Schedule 2: 500mg/d every other day for 1 week
Schedule 3: Standard Schedule (500mg x 1→100mg x4)
Schedule 4: 500mg d1 and d4 for 1 week
Schedule 5: 500mg/weekly x 4weeks

RESULTS

RT-qPCR assay optimization: cDNA obtained from Lovo cells was analyzed in order to determine the analytical sensitivity and linearity of the RT-qPCR assay. The calibration curves of these experiments proved the linearity of the assay over the entire quantification range ($1-10^5$ Lovo cells) with a correlation coefficient of 0.994 (Supplementary Figure 2). The RT-qPCR's efficiency expressed as $E=10^{-1/\text{slope}} - 1$, was 0.97 ± 0.029 SD (CV:3.0%; $n=18$) and the mean value of slope and intercept were 3.516 ± 0.11 (CV: 3.1; $n=18$) and 30.28 ± 0.78 (CV: 2.6%; $n=18$ experiments), respectively.

The detection limit (LOD) of the assay was found to correspond to 0.7 Lovo cell equivalents/ $5\mu\text{g}$ RNA (LOD= 3.3 SD/slope, where SD is the standard deviation of the Cq for 1 Lovo cell equivalent).

For the determination of the repeatability of the assay cDNA samples corresponding to 1-10.000 Lovo cells were assayed in the same run in 6 parallel determinations, using the same calibration curve. The SDs of the Cqs values and the CVs for Lovo cells are shown in Supplementary Table 1 which demonstrates the repeatability of the assay. The results obtained from the same RNA, which was frozen in aliquots, and analyzed over a period of 6 weeks in 12 different experiments performed in different days confirmed the reproducibility of the assay. In addition, as summarized in supplementary Table 2, in 5 different experiments we were able to recovered 10 Lovo cells in 10^6 normal PBMCs ($1:10^5$).

CEACAM5 mRNA-positive cells detection in patients and control groups: The incidence of detection of CEACAM5 mRNA-positive cells in the controls and

patients is presented in Table 1. According to the cut-off point (> 0.7 Lovo cells equivalents/ $5\mu\text{g}$ RNA) only two (2.2%) samples from the 96 healthy volunteers tested positive, suggesting a specificity rate of 97.8%. Table 1 also indicates that one (4.6%) patient with IBD but none with colonic adenomas had detectable *CEACAM5* mRNA-positive cells. In contrast, *CEACAM5* mRNA-positive cells could be detected in 98 (37%) and 44 (44%) patients with stage II-III and IV CRC, respectively ($p=0.4$; Table 1). The median number of *CEACAM5* mRNA-positive CTCs was 1.72 (range, 0.72-26.5) and 4.18 (range, 0.94-218.2) in patients with stage II-II and metastatic disease, respectively ($p=0.4$; Table 1). There was no significant association for the detection of *CEACAM5* mRNA-positive CTCs with any of the examined clinico-pathological features in patients with stage II-III disease (Table 2). In contrast, in patients with metastatic disease, liver involvement was associated with significantly higher *CEACAM5* mRNA-positive CTCs detection (52% vs. 31% in patients with or without liver metastasis; $p=0.021$) (Table 2b).

Prognostic significance of the *CEACAM5* mRNA-positive cells detection

Disease Relapse: After a median follow-up period of 34.1 months (range: 24.2-122.4 months), 57 (22%) relapses were observed among the 265 patients with operable CRC. All relapsed patients had distant metastases and seven also presented local relapse. The incidence of relapses was significantly higher in patients with *CEACAM5* mRNA-positive CTCs than in patients without (37% vs. 12%; $p < 0.001$; Table 3). The median DFS has not been reached but it was significantly higher in patients without detectable circulating *CEACAM5* mRNA-positive cells compared to patients with ($p < 0.001$; Figure 1a). In addition, the probability of 3-year relapse-free survival was 83% and 58% in patients with and without detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs, respectively ($p=0.001$). Moreover, patients with undetectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs before and after the administration of the adjuvant treatment ($n=54$) experienced significantly increase DFS in comparison with those ($n=20$) with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs before and after adjuvant treatment ($p=0.017$) or with those ($n=9$) with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs only after the completion of the adjuvant treatment ($p=0.005$) (Figure 1c). Also, in the patients with metastatic disease, detection of *CEACAM5* mRNA-positive CTCs was correlated with significantly decreased Progression Free Survival (median PFS 6.6 and 9.2 months in patients with and without detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTC, respectively; $p=0.043$).

Survival: During the follow-up period, 45 of 265 patients (17%) died due to disease progression (Table 3). Twenty-four (24%) deaths occurred in patients with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs and 21 (12%) in patients without ($p=0.017$; Table 3). The median OS of patients without detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs was significantly higher compared with that of patients with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs ($p=0.025$; Figure 1b). The 3- and 5-year probability of survival was 79% and 57%, respectively, for *CEACAM5* mRNA-positive patients in comparison to 88% and 78%, respectively, for *CEACAM5* mRNA-negative patients. Also, patients with undetectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs before and after the administration of the adjuvant treatment ($n=54$) experienced significantly

increase OS in comparison with those (n=20) with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs before and after adjuvant treatment (p=0.001) or with those (n=9) with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs only after the completion of the adjuvant treatment (p=0.001) (Figure 1d). Similarly, in patients with metastatic disease the detection of *CEACAM5* mRNA-positive CTCs, was associated with decreased survival (21.6 months vs.17.3 months; p=0.047).

Univariate and multivariate analysis: The univariate analysis demonstrated that *CEACAM5* mRNA-positive patients presented higher risk of progression compared to *CEACAM5* mRNA-negative patients (HR=3.4; p <0.001; Table 4). Also, disease stage (III vs. II), tumor differentiation (poor vs. well/moderate), and presence of neural invasion and cancerous vessels emboli (CVE) were associated with decreased DFS (Table 4). Multivariate analysis confirmed that the detection of *CEACAM5* mRNA-positive CTCs was independent prognostic factor for decreased DFS (HR=3.4; 95% CI: 2.0-5.9; p<0.001; Table 5). Moreover, stage III (HR=3.0; 95% CI: 1.5-5.9; p=0.002) and the presence of poorly differentiated tumors (HR=1.9; 95% CI: 1.1-3.3; p=0.022) also emerged as independent prognostic factors associated with decreased DFS (Table 5). Similarly, patients with detectable *CEACAM5* mRNA-positive CTCs presented higher risk of death compared to patients without *CEACAM5* mRNA-positive cells (HR=1.9; p=0.028; Table 4). Disease stage, tumor differentiation and presence of CVE were also significantly associated with OS. The multivariate analysis revealed that stage III (HR=1.9; p=0.048) and the presence of CVE (HR=2.4; p=0.008) were independent prognostic factors associated with decreased survival (Table 5).

Panorex administration in patients with operable and stageIV CRC:

Panorex was administered in 20 patients (65% men vs. 35% women) with a mean age of 64 years and stage III vs. IV 20% and 80% respectively. Table 2 displays the distribution of patients according to treatment schedule, the response (elimination of circulating CEAmRNA-positive cells), the duration of response and toxicity. All the 20 patients who received the drug, eliminated CEAmRNA-positive cells after the second drug administration, regardless treatment schedule. Greater duration of response was observed in 3rd, 4th and 5th treatment schedule (Table 2).

Table 2.

RESULTS				
TREATMENT SCHEDULES	PATIENTS	RESPONSE	RESPONSE DURATION	TOXICITY
500mg/d D1-4	4	4	4m	Allergic Reaction Gr 2 (1)
500mg on d1,d3,d5	4	4	2m	(-)
500mg on d1 100mg on d29,57,85,103 (standard)	5	5	7.6m	(-)
500mg d1 and d4	4	4	7m	(-)
500mg/weekly x4weeks	3	1	8m	Diarrhea Gr 2 (1)

DISCUSSION

The aims of the present study was to develop a reliable and reproducible RT-qPCR assay, using *CEACAM5* mRNA as a detection marker for CTCs' quantification in patients with CRC, and to evaluate their detection as a prognostic factor. In breast cancer, after "curative resection" the rates of CTCs detection are decreased after few weeks in the majority of the cases and the persistence of CTCs after have prognostic significance. For this reason we decide to obtain the blood samples just before the initiation of adjuvant chemotherapy (for stage III or high risk stage II patients) or follow-up. The results of our study should not be compared with those of previous studies in which PCR-based assays have been used for the detection of *CEACAM5* mRNA-positive cells. Most of those studies used qualitative assays and, most likely, included "false positive" results due to the amplification of a splicing variant of *CEACAM1* which is expressed in WBCs. Based on this assumption, we designed a specific set of primers and probe which didn't amplify this variant and we proved the high specificity and efficiency of the method.

Subsequently, we observed a significant decreased DFS ($p < 0.001$) and OS ($p = 0.017$) in patients with operable CRC and detectable *CEACAM5* mRNA-positive cells, while, the detection of *CEACAM5* mRNA-positive cells was revealed as independent prognostic factor for decreased DFS (HR=3.4; $p < 0.001$). Also, a trend for increased risk of death (HR=1.9; $p = 0.065$) was recorded which didn't reached statistical significance probably due to the limited number of events occurring during the short follow-up period. In contrast, the presence of CVE was revealed as an independent prognostic factor for decreased OS in agreement with several previous reports. In addition, in the subset of patients with available specimen at the completion of the adjuvant chemotherapy the persistence of *CEACAM5* mRNA positive cells was a strong prognostic factor of decreased DFS and OS. This preliminary finding provides a rational for the study of whether the detection *CEACAM5*

mRNA-positive cells could be used as a surrogate marker for the efficacy of the adjuvant treatment.

Due to the weaknesses in the design of the presented study (not uniformly treated patients, lack of a validation patients' cohort) the results should be evaluated with cautious. Future studies are warranted in order to evaluate whether the monitoring of *CEACAM5* mRNA-positive CTCs during the treatment of patients with early or metastatic disease could be of any clinical relevance influencing the therapeutic decision.

The administration of Edrecolomab (Panorex[®]) is capable to eliminate circulating CEA-mRNA-positive cells in peripheral blood of patients with stage III and IV CRC independent of the treatment schedules that were used.

Due to the refusal of many patients to give their consent in obtaining bone marrow aspiration, we didn't proceed to this procedure.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J.Clin.* 2009 Jul;59(4):225-49.
2. American Cancer Society.: *Cancer Facts and Figures 2010*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2010.
3. Willett WC: Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:3-8
4. Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, et al: Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:915-926.
5. Locke FB, King H: Cancer mortality risk among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:1149-1156.
6. Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA: Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 319-27.
7. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1998b;339:511–8.
8. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993;260:816–9.
9. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med.* 1996;2:169–74.
10. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Parc Y, Burgart LJ, Halling KC, McDonnell SK, Schaid DJ, Walsh Vockley C, Kubly V, Nelson H, Michels VV, Thibodeau SN. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet.* 2001;69:780–90.

11. Pinsky PF: Does hereditary nonpolyposis colorectal cancer explain the observed excess risk of colorectal cancer associated with family history? *Epidemiology* 2000; 11: 297-303.
12. Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, et al: Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 787-92.
13. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, et al: Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1631-4.
14. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, et al: Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003; 163: 827-32.
15. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
16. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al: Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;329: 1977-1981.
17. Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG, et al.: A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. National Polyp Study Work Group. *N Engl J Med* 342 (24) : 1766-72, 2000.
18. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396(6712):643-649.
19. Vogelstein B. Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 1990; 348(6303):681-682.
20. Jen J, Kim H, Piantadosi S et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331(4):313-221.

21. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301(5895):89-92.
22. Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH. Heterogeneity studies identify subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 1999; 18(56):7933-7940.
23. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-8686.
24. Shen L, Toyota M, Kondo Y et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:18654-18659.
25. Hamilton SR. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2008; 21 Suppl 2:S23-S30.
26. 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.
27. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A et al. Fluorouracil, Leucovorin and Oxaliplatin with and without Cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 Feb 10;27(5):663-671.
28. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ et al. K-ras mutations and benefit from Cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(17):1757-1765.
29. 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(3):465-472.
30. Van Cutsem E, Lang I, D'haens I et al. KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without Cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 26 2008 (May 29 suppl; abstr 2) – Ref Type: Abstract ASCO 2008.

31. Wood LD, Parsons DW, Jones S et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318(5853):1108-1113.
32. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993; 262: 1734-7.
33. Bienz M, Clevers H: Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-20.
34. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V et al: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-90.
35. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1967-79.
36. Kirsch DG, Kastan M: Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3158-68.
37. Lane DP: Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
38. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D et al: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11.
39. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7491-5.
40. Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 2001; 264: 56-66.
41. Soussi T: The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 121-37.
42. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM et al: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 7717-22.

43. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327 (6120) :293.
44. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319 (9) :525.
45. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418 (6901) :934.
46. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38 (7) :787.
47. Chung DC, Rustgi AK: DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995; 109: 1685-99.
48. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Liu B et al: Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995; 268: 1915-7.
49. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF et al: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-9.
50. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
51. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y et al: Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994; 6: 273-81.
52. 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.
53. Markowitz S, Wang J, Myeroff L et al: Inactivation of the type II TGF-receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-8.

54. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T et al: Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1998; 153: 1063-78.
55. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM et al: Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58: 1713-8.
56. Laiho P, Launonen V, Lahermo P et al: Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 2002; 62: 1166-70.
57. Sobin L, Wittekind C, editors. *TNM Classification of malignant tumors*. New York: Wiley-Liss, Inc; 2010.
58. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th edition. New York; Springer; 2010.
59. Jass JR. Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control. *Surg Oncol* 2007.
60. Eschrich S, Yang I, Bloom G et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23:3526-35.
61. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23:1826-38.
62. Kim IJ, Lim SB, Kang HC et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; 50:1342-53.
63. Compton CC and Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *Ca Cancer J Clin* 2004;54:295-308.
64. 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.
65. Sobin HL, and Greene FL. TNM classification. Clarification of number of regional lymph nodes for pN0. *Cancer* 2001;92:452.

66. Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R and Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3570-3575.
67. Compton CC et al. AJCC Prognostic Factors Consensus Conference, Colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88:1739-1757.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Quah HM. Identification of patients with high risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rect* 2008;51:53-507.
72. Goldstein NS and Turner JR. Pericolonic tumor deposits in patients with T3N+M0: adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2228-2238.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-18.

77. 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).
78. 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.
79. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 2002;8:2073– 84.
80. Hayes DF, Walker TM, Singh B, et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2002;21:1111– 8.
81. O'Hara SM, Moreno JG, Zweitzig DR, et al. Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormonorefractory prostate cancer. *Clin Chem* 2004;50:826 –35.
82. Jung R, Kruger W, Hosch S et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998; 78(9):1194-1198
83. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12(4):725-729.
84. Schott A, Vogel I, Krueger U et al. Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker. *Ann Surg* 1998; 227(3):372-379.
85. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van d, V et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339(4):223-228.

86. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT et al. Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(7):1420-1430.
87. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6(2):125-132.
88. Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20):6897-6904.
89. Sastre J, Maestro ML, Puente J et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol* 2008;May;19(5):935-938.
90. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 1;26(19):3213-3221.
91. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2177–84.
92. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8(5):329-340.
93. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005; 92(5):906-912.
94. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000; 18(7):1432-1439.

95. Kagan M, Howard D, Bendele T, Mayes J, Silvia J, Repollet M et al. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay* 2002; 25:104-110.
96. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsrud DE et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29): 10501-10504.
97. Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(6):617-627.
98. Bustin S. A, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR: A perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 2005;34(3):597–601.
99. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3): 95-125.
100. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* 2003;9:5145-51.
101. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725–9.
102. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol* 2000; 11:785–92.
103. Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996;68:739–43.

104. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71: 278–81.
105. Hampton R, Walker M, Marshall J, Juhl H. Differential expression of carcinoembryonic antigen (CEA) splice variants in whole blood of colon cancer patients and healthy volunteers: implication for the detection of circulating colon cancer cells. *Oncogene* 2002;21:7817–23.
106. Ko Y, Klinz M, Totzke G, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Vetter H. Limitations of the reverse transcription-polymerase chain reaction method for the detection of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells in peripheral blood. *ClinCancer Res* 1998;4:2141–6.
107. Castells A, Boix L, Bessa X, Gargallo L, Pique JM. Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1998;78:1368–72.
108. Jung R, Kruger W, Hosch S, Holweg M, Kroger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998;78:1194–8.
109. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(7):1654-1659.
110. Benoy IH, Elst H, Van Dam P, Scharpe S, Van Marck E, Vermeulen PB et al. Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative realtime RT-PCR: effect of pre-analytical time. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(9):1082-1087.
111. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965, 121:439–443.

112. Paxton RJ, Mooser G, Pandle H. Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: Identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:920–924.
113. Levin LV, Griffin TW. Specific adhesion of carcinoembryonic antigen-bearing colorectal cancer cells to immobilized carcinoembryonic antigen. *Cancer Lett* 1991, 60:143–152.
114. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirola K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989, 57:327–334.
115. ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ Κ. Γονιδιακή υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών. Στο: Μόρια προσκόλλησης και καρκίνος. Αυτοέκδοση, Αθήνα, 1997:19–22.
116. Jothy S, Yuan SY, Shirola K. Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. *In situ* hybridization study and implication for a new *in vivo* functional model. *Am J Pathol* 1993, 143:250–257.
117. Braun S, Hepp F, Kentenich C, et al: Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clinical Cancer Res* 5:3999-4004, 1999.
118. Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. *Ann.Oncol.* 2002; 13: 1044-1048.
119. Riethmuller G, Holtz E, Schlimok G, et al. Monoclonal antibody therapy for resected Duke's C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 16:1788-1794.
120. Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, et al. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomized study. *Lancet* 2002; 360:671-677.

121. Fields AL, Keller A, Schwartzberg L, et al. Adjuvant therapy with the monoclonal antibody Edrecolomab plus fluorouracil-based therapy does not improve overall survival of patients with stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):1941-7.
122. Gramont D. Rapid evolution in colorectal cancer: therapy now and over the next five years. *Oncologist* 2005;10Suppl 2:4–8.
123. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem*. 1987; 162: 156-159.
124. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004;13: 2443-2449.
125. Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, et al. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer* 2008; 98: 1710-1715.
126. Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Obrink B. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol* 2002;168:5139–46.
127. Ozeki M, Shively JE. Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells. *J Leukoc Biol* 2008;84:769–79.
128. Kirshner J, Chen CJ, Liu P, Huang J, Shively JE. CEACAM1-4S, a cellcell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:521–6.
129. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.

130. Miller JC, Miller JN. *Statistics for Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1986.
131. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
132. Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, Nitta H, Sato T, Miyachi M, et al. Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery* 2004;135:419–26.
133. Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996;69:278–282.
134. Dresen RC, Peters EE, Rutten HJ, Nieuwenhuijzen GA, Demeyere TB, Van Den Brule AJ, et al. Local recurrence in rectal cancer can be predicted by histopathological factors. *Eur J Surg Oncol* 2009;35:1071–1077.
135. West NP, Dattani M, McShane P, Hutchins G, Grabsch J, Mueller W, et al. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2010;102:1519–23.
136. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Utkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235–9.
137. Stathopoulos EN, Sanidas E, Kafousi M, Mavroudis D, Askoxylakis J, Bozionelou V, et al. Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes. *Ann Oncol* 2005;16:240–6.
138. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the "leukemic phase" of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006 Mar;12:130–139.

139. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366–77.
140. Lurje G, Schiesser M, Claudius A, Schneider PM. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies: current techniques and clinical implications. *J Oncol*. 2010;2010:392652.

5. ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

ACS	American Cancer Society	Αμερικανική εταιρία καρκίνου
APC	Adenomatous Polyposis coli	
AFAP	Attenuated Familial Adenomatous Polyposis	Εξασθενημένο Σύνδρομο Αδενωματώδους Πολυποδίασης
AJCC	American Joint Committee on Cancer	
ADCC	Antibody-dependent cell mediated Cytotoxicity	
BLAST	Basic Local Alignment Search tool	
CRC	Colorectal cancer	Ορθοκολικός καρκίνος
CIMP	CpG island Methylator Phenotype	
CIN	Chromosomal instability	Χρωμοσωμική αστάθεια
CEA	Carcinoembryonic Antigen	Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόνο
CTCs	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
CETCs	Circulating Epithelial Tumor Cells	Κυκλοφορούντα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα
Ct	Threshold cycle	
cDNA	Complementary RNA	Συμπληρωματικό RNA
CHO	Chinese hamster ovary	
Cq	Quantification cycle	Κύκλος ποσοτικοποίησης
CI	Confidence Intervals	Διαστήματα Εμπιστοσύνης
CV	Coefficient of variation	Συντελεστής διακύμανσης
Cp	Crossing-point	Σημείο τομής

CVE	Cancerous Vessels Emboli	Αγγειακά καρκινωματώδη έμβολα
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλειικό οξύ
DTCs	Disseminated Tumor cells	Διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα
DEPC	Diethylpyrocarbonate	Διεθυλπυροκαρβονικό άλας
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate	
DFS	Disease free survival	Ελεύθερο νόσου διάστημα
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group	
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	
FAP	Familial Adenomatous Polyposis	Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση
FDA	Food and Drug Administration	Υπηρεσία τροφίμων και Φαρμάκων ΗΠΑ
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor	
HNPCC	Hereditary non-polyposis colon cancer	Κληρονομικός μη-πολυποδιασικός καρκίνος παχέος εντέρου
HV	Healthy Volunteer	Υγιής Εθελοντής
HR	Hazard Ratios	Δείκτες κινδύνου
IBD	Inflammatory Bowel Disease	Φλεγμονώδης νόσος εντέρου
JPS	Juvenile Polyposis Syndrome	Σύνδρομο Νεανικής Πολυποδίασης
LV	Leucovorin	Λευκοβορίνη
LOD	Limit of Detection	Αναλυτικό όριο ανίχνευσης

MSI	Microsatellite Instability	Μικροδορυφορική Αστάθεια
MMR	Mismatch Repair	Επιδιόρθωση άστοχων βάσεων
mRNA	Messenger RNA	Αγγελιοφόρο RNA
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	
OS	Overall Survival	Ολική Επιβίωση
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
PFS	Progression free survival	Ελεύθερη νόσου επιβίωση
PNI	Perineural Invasion	Περινευρική Διήθηση
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη τρανσκριπτάση
RT-qPCR	Real-Time quantification PCR	Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο
RT	Reverse transcriptase	Ανάστροφη τρανσκριπτάση
STK11	Serine/threonine kinase 11	
SD	Standard deviation	Τυπική απόκλιση
TD	Tumor Deposits	Εξωλεμφαδενικές καρκινικές εναποθέσεις
UICC	International Union Against Cancer	Διεθνής Αντικαρκινική Ένωση
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
WBCs	White Blood Cells	Λευκά Αιμοσφαίρια
5-FU	5-Fluorouracil	5-Φλουοροουρακίλη

6. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο: Βαρδάκης
Όνομα: Νικόλαος
Όνομα πατρός: Κωνσταντίνος
Ημερομηνία Γέννησης: 14/5/1964
Διεύθυνση: Γορτύνης 19-21, 71303, Ηράκλειο
Τηλέφωνο: 2810250294, 6974479993
e-mail: nivardak@gmail.com

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ:

1. Πτυχίο Νοσηλευτικής, Τεχνολογικής Εκπαίδευσης (Τ. Ε.) Τ.Ε.Ι. Ηρακλείου - (Άριστα) - 19. 11. 1985
2. Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης (Λίαν Καλώς) - 21. 01. 1993
3. Τίτλος Ειδικότητας στην Παθολογική Ογκολογία - 02. 02. 2006

ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ- ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ:

17.2.1993 Άδεια ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος Αρ.Πρωτ. 2073-
Νομαρχία Ηρακλείου

1. 6.4.1994 - 16.4.1996 Αγροτικός ιατρός στο Π.Ι. Αγίου Θωμά
2. 2.3.1993 - 2.3.1994 Στρατιωτική Θητεία, ως Ιατρός της Αεροπορίας (σε Μονάδες και στο 251 ΓΝΑ)
3. 26.4.1996 - 25.4.1999 Ειδικευόμενος Ιατρός στην Παθολογία στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου
4. 26.4.1999 - 27.5.01 Επιστημονικός συνεργάτης στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η
5. 28.5.01 - 28.11.01 Ειδικευόμενος στην Αιματολογία, Αιματολογική Κλινική του Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου
6. 29.11.01 - 22.10.02 Επιστημονικός συνεργάτης στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η
7. 23.10.02 - 22.10.05 Ειδικευόμενος Ιατρός στην Παθολογική Ογκολογία στην Πανεπιστημιακή Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η
8. 23/10/05 - 10/10/06 Επιστημονικός συνεργάτης στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η

- | | | |
|-----|----------------------------|---|
| 9. | <u>11/10/06 -10/10/07</u> | Ειδικευμένος Επικουρικός Ιατρός στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η |
| 10. | <u>12/10/07 – 29/09/08</u> | Επιστημονικός συνεργάτης στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η |
| 11. | <u>30/09/08 – ΣΗΜΕΡΑ</u> | Επιμελητής Β' στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η |

Ξένες γλώσσες: Αγγλικά (Επίπεδο First Certificate – Proficiency)

Συμμετοχή σε Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

1. Χ.Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Ν.Ανδρουλάκης, Β.Παπουτσάκης, Π.Χέρας, Ν.Βαρδάκης, Αθ. Κωτσάκης, Κ.Καλμπάκης, Ν. Μεραμβελιωτάκης, Γ.Φυτρολάκης, Γ.Σαμώνης, Β.Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης Ι στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού με Docetaxel / Mitoxantrone και υποστηρικτική χορήγηση G-CSF
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας-Αθήνα 3-5 Απριλίου 1997
2. Σ. Κακολύρης, Ν. Ανδρουλάκης, Χ. Κουρούσης, Π. Χέρας, Ν. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Αθ. Κωτσάκης, Ν. Μεραμβελιωτάκης, Κ.Κατσογριδιάκης, Γ.Σαμώνης, Β.Γεωργούλιας : Μελέτη φάσηςΙ με συνεχή έγχυση 5-φθοριοουρακίλης για 96h και Irinotecan (CPT-11),στην αντιμετώπιση του προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας-Αθήνα 3-5 Απριλίου 1997
3. Β.Γεωργούλιας, Χ.Κουρούσης, Σ.Κακολύρης, Ν.Ανδρουλάκης, Α. Μ.Δημόπουλος, Ε.Παπαδάκη, Σ.Τζάνες, Αθ.Κωτσάκης, Ν.Βαρδάκης, Κ.Καλμπάκης, Ν.Μεραμβελιωτάκης, Δ.Χατζηδάκη: Θεραπεία δεύτερης γραμμής του προχωρημένου μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα με Paclitaxel και Gemcitabine. Προκαταρκτικά αποτελέσματα ενός δραστικού συνδυασμού.
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας Αθήνα 3-5 Απριλίου 1997
4. Σ.Κακολύρης, Χ.Κουρούσης, Ν.Ανδρουλάκης, Μ.Α.Δημόπουλος, Κ.Καλμπάκης, Δ.Μπούρος, Χ.Παπαδημητρίου, Κ.Χατζάκης, Αθ.Κωτσάκης, Ν.Βαρδάκης,Ν.Μεραμβελιωτάκης, Γ.Σαμώνης, Β.Γεωργούλιας: Μελέτη φάσηςII με Taxotere και Gemcitabine στον προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας Αθήνα 3-5 Απριλίου 1997
5. Π.Β Χέρας, Ν.Βαρδάκης, Γ.Φυτρολάκης, Γ.Μεταξάρης, Β.Γεωργούλιας: Απώτερα αποτελέσματα συμπληρωματικών θεραπειών επι της ψυχολογικής καταστάσεως ασθενών με καρκίνο μαστού.
23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 13-17 Μαΐου,1997
6. Π.Β.Χέρας, Γ. Λιβιεράτος, Γ. Μεταξάρης, Ν. Βαρδάκης, Θ. Κωνσταντινίδης: Χαρακτηριστικά καρδιακών επιπλοκών του AIDS
23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 13-17 Μαΐου,1997
7. Π. Β. Χέρας, Ν. Κ. Βαρδάκης, Γ. Φυτρολάκης: Χαρακτηριστικά της ανάγκης μεταγγίσεως σε μια ογκολογική κλινική

23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 13-17 Μαΐου, 1997

8. Π. Β. Χέρας, Ν. Βαρδάκης, Γ. Φυτρολάκης, Γ. Μεταξάρης, Β. Γεωργούλιας: Ποιότητα ζωής καρκινοπαθών: η επίδραση των απλοϊκών θεωριών των ασθενών επί της επικοινωνίας μεταξύ ιατρικού προσωπικού και ασθενών
23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 13-17 Μαΐου, 1997
9. Π. Β. Χέρας, Ν.Κ. Βαρδάκης, Γ. Φυτρολάκης: Ζώντας με προχωρημένο καρκίνο του μαστού: ανάπτυξη και εφαρμογή ενός κλινικού καταλόγου ελέγχου για ασθενείς υπο ενδοκρινική θεραπεία (ΚΑΕΘ)
23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 13-17 Μαΐου, 1997
10. Δ. Κοφτερίδης, Α. Βαμβακάς, Ι. Παπαδάκης, Π. Μαλλιωτάκης, Ε. Μαρκάκης, Ν. Βαρδάκης, Κ. Στεφανάκη, Ι. Ιζμπαράχ, Δ. Εμμανουήλ: Αποφρακτική Βρογχολίτιδα με οργανούμενη πνευμονία: Περιγραφή δύο περιπτώσεων.
3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Θεσσαλονίκη 2-5 Οκτωβρίου, 1997
11. Σ. Κακολύρης, Χ. Κουρούσης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Ανδρουλάκης, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Α. Κωτσάκης, Ε. Σάρρα, Σ. Αγγελάκη, Γ. Πρινιανάκης, Ν. Βαρδάκης, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης Ι με τον συνδυασμό IRINOTECAN (CPT-11) και CISPLATIN (CDDP) στο μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ).
7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2-4 Απριλίου 1998
12. Π. Παπακώστας, Σ. Αγγελάκη, Γ. Σταθόπουλος, Γ. Αραβαντινός, Γ. Σαμέλης, Κ. Καλμπάκης, Ε. Σάρρα, Γ. Σουγκλάκος, Σ. Κακολύρης, Ν. Ανδρουλάκης, Ν. Βαρδάκης, Γ. Περυσινάκη, Β. Γεωργούλιας: Docetaxel και G-CSF σαν θεραπεία πρώτης γραμμής σε προχωρημένο καρκίνο των χοληφόρων: Πολυκεντρική μελέτη φάσης ΙΙ.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου, 1999
13. Γ. Σουγκλάκος, Δ. Μαυρουδής, Σ. Κακολύρης, Χ. Κουρούσης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Ε. Σάρρα, Ν. Βαρδάκης, Δ. Χατζηδάκη, Π. Μαλλιωτάκης, Κ. Μανδαλάκη, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία 1^{ης} γραμμής του προχωρημένου γαστρικού καρκίνου με Docetaxel και υποστήριξη με G-CSF.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου, 1999
14. Γ. Σουγκλάκος, Αθ. Κωτσάκης, Ε. Σάρρα, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Π. Μαλλιωτάκης, Β. Γεωργούλιας, Γ. Σαμώνης: Μη ουδεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με Docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου, 1999
15. Ν. Ανδρουλάκης, Ε. Παπαδάκης, Ε. Μπάνια, Φ. Αποστολοπούλου, Μ. Αγγελίδου, Χ. Τσιαφάκη, Χ. Καλόφωτος, Α. Ράπτη, Ι. Αράπης, Μ. Τουμπής, Κ. Χαινης, Χ. Κουρούσης, Ν. Βαρδάκης, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία 2^{ης} γραμμής μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονος με Docetaxel και Gemcitabine: Πολυκεντρική μελέτη φάσης ΙΙ.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου, 1999
16. Ε. Σάρρα, Α. Κωτσάκης, Μ. Περράκη, Σ. Αποστολάκη, Χ. Μαλλιωτάκης, Ν. Βαρδάκης, Γ. Σουγκλάκος, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Ανίχνευση του mRNA της

κυτταροκερατίνης 19 στο αίμα ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού: επίδραση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και ορμονοθεραπείας.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου, 1999

17. Χ. Κουρούσης, Δ. Μαυρουδής, Θ. Γιαννακάκης, Ν. Ζήρας, Α. Αθανασιάδης, Σ. Κακολύρης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Ι. Σουγκλάκος, Ε. Σάρρα, Ν. Βαρδάκης, Α. Καλυκάκη, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία διάσωσης του προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) με συνδυασμό Οξαλιπλατίνης (L-OHP) και υψηλών δόσεων 5-φλουοροουρακίλης (5-FU) και λευκοβορίνης (LV) σε 48 ώρες συνεχή iv έγχυση.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου, 1999
18. Γ. Σουγκλάκος, Α. Κωτσάκης, Ε. Σάρρα, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Π. Μαλλιωτάκης, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Μη ουδετεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με Docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων.
10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου, 1999
19. Χ. Κουρούσης, Ι. Σουγκλάκος, Θ. Γιαννακάκης, Ν. Ζήρας, Ν. Βαρδάκης, Σ. Αγγελάκη, Χ. Πανόπουλος, Α. Αθανασιάδης, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Α. Ιζμπιράχ, Δ. Ρέππα, Ε. Κρέμος, Ε. Σάρρα, Α. Κωτσάκης, Ι. Μιζάκη, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία διάσωσης με Oxaliplatin και υψηλές δόσεις 5-Fluorouracil σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου.
10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου, 1999
20. Β. Γεωργούλιας, Ε. Παπαδάκης, Α. Αλεξόπουλος, Μ. Βεσλεμές, Α. Ράπτη, Χ. Κουρούσης, Ν. Βαρδάκης, Ι. Σουγκλάκος, Ε. Σάρρα, Α. Κωτσάκης, Ε. Κρέμος, Δ. Ρέππα, Ι. Μιζάκη, Β. Ζιάννη: Τυχαιοποιημένη μελέτη του συνδυασμού Docetaxel/Cisplatin και Docetaxel/CDDP σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος: προκαταρκτικά αποτελέσματα της Ελληνικής Συνεργατικής Ομάδας για τον καρκίνο του πνεύμονος.
10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου, 1999
21. Βαρδάκης Νικόλαος, Ξενίδης Νικόλαος, Περράκη Μαρία, Αποστολάκη Στυλιανή, Μποζιονέλου Βασιλική, Πάλλης Αθανάσιος, Γεωργούλιας Βασίλειος: Ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με RT-PCR: εκτίμηση των δεικτών κυτταροκερατίνης 19, MASPIN και CEA.
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Αθήνα 4-7 Οκτωβρίου, 2000
22. Γεωργούλιας Βασίλειος, Παπαδάκης Εμμανουήλ, Αλεξόπουλος Αθανάσιος, Ράπτη Αγγελική, Βεσλεμές Μιχαήλ, Βαμβακάς Λάμπρος, Πάλλης Αθανάσιος, Μποζιονέλου Βασιλική, Αδαμτζίκη Ελένη, Βαρδάκης Νικόλαος, Σουγκλάκος Ιωάννης, Αγγελάκη Σοφία, Καλμπάκης Κων/νος, Κουρούσης Χαράλαμπος: Τυχαιοποιημένη μελέτη του συνδυασμού Docetaxel/Cisplatin και Docetaxel/CDDP σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος: τελικά αποτελέσματα της Ελληνικής Συνεργατικής Ομάδας για τον Καρκίνο του Πνεύμονος.
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Αθήνα 4-7 Οκτωβρίου, 2000
23. Σουγκλάκος Ιωάννης, Κωτσάκης Αθανάσιος, Βαμβακάς Λάμπρος, Μποζιονέλου Βασιλική, Κουρούσης Χαράλαμπος, Κακολύρης Στυλιανός, Καλμπάκης Κων/νος,

Βαρδάκης Νικόλαος, Αδαμτζίκη Ελένη, Σαρδελής Ζαφείρης, Γεωργούλιας Βασίλειος: Μη ουδετεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με Docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων.

6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Αθήνα 4-7 Οκτωβρίου, 2000

24. Γ. Σουγκλάκος, Α. Αθανασιάδης, Π. Γκινόπουλος, Θ. Γιαννακάκης, Κ. Συρίγος, Σ. Παπαδούρης, Χ. Κουρούσης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Κακολύρης, Ν. Βαρδάκης, Β. Γεωργούλιας: Oxaliplatin (L-OHP) σε συνδυασμό με Irinotecan (CPT-11), Leucovorin (LV) και 5-Fluorouracil (FOLFOXIRI), έναντι CPT-11, LV και 5-FU (FOLFIRI) ως θεραπεία πρώτης γραμμής για το μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο: Προκαταρκτικά αποτελέσματα ασφαλείας και δραστηριότητα μιας πολυκεντρικής τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής.
11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 4-6 Απριλίου, 2002
25. Ν. Ανδρουλάκης, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Κ. Καλμπάκης, Σ. Αγγελάκη, Ν. Βαρδάκης, Ν. Ξενίδης, Α. Πάλλης, Ε. Αδαμτζίκη, Ι. Σουγκλάκος, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Φάση I μελέτη της σύγχρονης χορήγησης Capecitabine με την ακτινοθεραπεία ως συμπληρωματική χημειοθεραπεία στον εξαιρεσίμο καρκίνο του ορθού
11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 4-6 Απριλίου, 2002
26. Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Χ. Κουρούσης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Κακολύρης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Βαρδάκης, Β. Μποζιονέλου, Δ. Μαυρουδής, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης I της χορήγησης Oxaliplatin (LOHP) σε συνδυασμό με εβδομαδιαία χορήγηση Λευκοβορίνης (LV) και συνεχή έγχυση 5 Φθοριουρακίλης σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους.
11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 4-6 Απριλίου, 2002
27. Β. Μποζιονέλου, Δ. Μαυρουδής, Μ. Περράκη, Ν. Βαρδάκης, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη της επίδρασης του Herceptin (Transtuzumab) σε m-RNA CK-19 θετικά κύτταρα, στο αίμα και το μυελό των οστών, ασθενών με καρκίνο του μαστού
11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 4-6 Απριλίου, 2002
28. Λ. Βαμβακάς, Κ. Συρίγος, Α. Ποταμιάνου, Α. Πολύζος, Ι. Μπουκοβίνας, Ν. Ανδρουλάκης, Χ. Κουρούσης, Ν. Βαρδάκης, Σ. Γιασσάς, Χ. Χριστοφυλλάκης, Α. Κωτσάκης, Β. Γεωργούλιας: Συνδυασμός Irinotecan (CPT-11) και Oxaliplatin (L-OHP) σαν θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε ασθενείς με τοπικά εκτεταμένο ή μεταστατικό καρκίνο στομάχου: Πολυκεντρική μελέτη φάσεως II.
12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 22-24 Απριλίου, 2004
29. Ζ. Σαριδάκη, Μ. Τζαρδή, Μ. Περάκη, Δ. Μαυρουδής, Ν. Βαρδάκης, Α. Καλυκάκη, Γ. Μηλάκη, Α. Πάλλης, Β. Μποζιονέλου, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη της αστάθειας μικροδορυφορικού DNA σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο που έχουν θεραπευθεί με το συνδυασμό Irinotecan (CPT-11), Oxaliplatin (L-OHP) και 5-FU/Leucovorin (Degramont Regimen)-FOLFOXIRI. Συσχέτιση της αστάθειας αλληλουχίας με κλινικές παραμέτρους και θεραπευτική έκβαση
12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 22-24 Απριλίου, 2004
30. Γ. Σταθόπουλος, Γ. Αραβαντινός, Κ. Συρίγος, Κ. Καλμπάκης, Ν. Καρβούνης, Π. Παπακοτούλας, Γ. Μπουκοβίνας, Α. Ποταμιάνου, Α. Πολύζος, Χ. Χριστοφυλλάκης, Σ. Γιασσάς, Ν. Βαρδάκης, Ζ. Σαριδάκη, Β. Γεωργούλιας:

Τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III του συνδυασμού Irinotecan/Gemcitabine και μονοθεραπείας με Gemcitabine σε ασθενείς με τοπικά εκτεταμένο ή μεταστατικό καρκίνο του παγκρέατος.

2^ο Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα 17-20 Μαρτίου, 2005

Συμμετοχή σε Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

1. Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, V. Papoutsakis, P. Herras, N. Vardakis, A. Kotsakis, K. Kalbakis, N. Meramveliotakis, G. Fytrolakis, E. Stefanakis, D. Hadzidaki, G. Samonis, V. Georgoulis: Phase I study of alternating docetaxel and mitoxantrone with G-CSF support in advanced breast cancer
ASCO, May 1997, Denver, USA
2. E. Papadakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, N. Androulakis, A. Dimopoulos, S. Tzannes, A. Kotsakis, N. Vardakis, K. Kalbakis, N. Meramveliotakis, D. Hadzidaki, V. Georgoulis: Second line treatment of advanced NSCLC after cisplatin-based chemotherapy with paclitaxel and gemcitabine
8th World Conference on Lung Cancer, August 1997, Dublin Ireland
3. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, M. Dimopoulos, E. Papadakis, S. Tzannes, Th. Kotsakis, N. Vardakis, N. Meramveliotakis, K. Kalbakis, D. Hatzidaki, V. Georgoulis: Second line treatment of non small cell lung cancer with paclitaxel and gemcitabine
ECCO, 9 September 1997, Hamburg
4. Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, P. Herras, N. Vardakis, Ath. Kotsakis, K. Kalbakis, N. Meramveliotakis, D. Hadzidaki, G. Samonis, V. Georgoulis: Phase I/II study of alternative docetaxel and mitoxantrone with G-CSF support in advanced breast cancer
ECCO, 9 September 1997, Hamburg
5. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, J. Souglakos, D. Mavroudis, K. Kalbakis, S. Aggelaki, Ath. Kotsakis, G. Prinianakis, N. Vardakis, V. Georgoulis : Phase I study of cisplatin and irinotecan (CPT-11) combination in metastatic non-small cell lung cancer
8th International Congress on anti-cancer treatment February 3rd-6th 1998, Paris-France
6. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, Ath. Kotsakis, E. Sarra, S. Aggelaki, G. Prinianakis, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulis :Phase I study of CPT-11 and CDDP combination in metastatic NSCLC ASCO, 34th Annual meeting, May 1998, Los Angeles, USA
7. H. D. Kritikos, I. E. Koutroubakis, E. Petinaki, E. Anagnostopoulou, N. Vardakis, A. Mouzas, E. A. Kouroumalis, E. Kastanas: Prevalence of anticardiolipin and Anti-beta-2glycoprotein 1 antibodies in autoimmune and infectious diseases
Rheumatology in Europe, 11th EULAR Symposium 5-8 September 1998, Geneva-Switzerland
8. D. Mavroudis, n. Malamos, Ch. Kourousis, S. Agelaki, Th. Giannakakis, Alexopoulos, I. Stavrakakis, A. Potamianou, N. Ziras, G. Rigatos, Ch. Kosmas,

- J. Souglakos, N. Vardakis, E. Sarra, S. Papadouris, Ch. Georganta, V. Georgoulas:
Salvage chemotherapy of metastatic breast cancer with Docetaxel and Gemcitabine:
A multicenter phase II trial
Journal of B.U.O.N, vol.3,suppl.A, Ismir, September 1998
9. A. Alexopoulos, Ch.Kouroussis, N. Malamos, G. Rigatos, Th. Giannakakis,
N. Androulakis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, E. Stavrinidis, G. Panagos, S. Agelaki,
Ch. Kosmas, J. Souglakos, N. Vardakis, F. Apostolaki, E. Sarra, V. Georgoulas:
Treatment of metastatic Breast cancer with Intensified combination of Docetaxel
and mitoxantrone: A multicenter phase II trial
Journal of B.U.O.N, vol.3, suppl.A, Ismir, September 1998
 10. N. Androulakis, Ch. Kourousis, S. Kakolyris, E. Sarra, J. Souglakos, K. Kalbakis,
S. Agelaki, T. Kalikaki, S. Kois, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulas:
Monotherapy with Docetaxel and Granulocyte Colony-stimulating factor in
advanced Gastric cancer
Journal of B.U.O.N, vol.3, suppl.A, Ismir, September 1998
 11. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis,
K. Kalbakis, Ath. Kotsakis, E. Sarra, S. Aggelaki, G. Prinianakis, N. Vardakis,
G. Samonis, V. Georgoulas : Phase I study of irinotecan (CPT-11) and Cisplatin
(CDDP) combination in metastatic non small cell lung cancer
5th Central European Lung Cancer Conference, September 1998, Prague
 12. V. Georgoulas, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, M. A. Dimopoulos,
E. Papadakis, D. Bouros, F. Apostolopoulou, Ch. Papadimitriou, A. Aggelidou, V.
Tzianni, F. Apostolaki, K. Hatzakis, K. Kalbakis, Ath. Kotsakis, E. Sarra, N.
Vardakis, J. Vlachonikolis: Front line treatment of advanced non small cell lung
cancer with docetaxel and gemcitabine: A multicenter phase II trial
5th Central European Lung Cancer Conference, September, 1998, Prague
 13. N. Androulakis, Ch. Kourousis, S. Kakolyris, S. Tzannes, E. Papadakis,
Ch. Papadimitriou, A. Geroyanni, Th. Georgopoulou, I. Dimopoulou, J. Souglakos,
V. Tzianni, F. Apostolaki, A. Kotsakis, N. Vardakis, T. Kalikaki, D. Hatzidaki,
V. Georgoulas: Salvage treatment with Paclitaxel and Gemcitabine for patients
with non-small cell lung cancer after cisplatin- or docetaxel-based chemotherapy:
A multicenter phase II study
5th Central European Lung Cancer Conference, September, 1998, Prague
 14. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis,
K. Kalbakis, Ath. Kotsakis, E. Sarra, S. Aggelaki, G. Prinianakis, N. Vardakis,
G. Samonis, V. Georgoulas : Phase I study of irinotecan (CPT-11) and
Cisplatin (CDDP) combination in metastatic non small cell lung cancer
3rd International Congress on Lung Cancer, October 1998 Rhodes
 15. V. Georgoulas, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, M. A. Dimopoulos,
E. Papadakis, D. Bouros, F. Apostolopoulou, Ch. Papadimitriou, A. Aggelidou, V.
Tzianni, F. Apostolaki, K. Hatzakis, K. Kalbakis, Ath. Kotsakis, E. Sarra, N.
Vardakis, J. Vlachonikolis: Front line treatment of advanced non small cell lung
cancer with docetaxel and gemcitabine: A multicenter phase II trial
3rd International Congress on Lung Cancer, October 1998, Rhodes
 16. N. Androulakis, Ch. Kourousis, S. Kakolyris, E. Sarra, K. Kalbakis, T. Kalikaki,

- S. Kois, N. Vardakis, G. Samonis, v. Georgoulas: Monotherapy with Docetaxel and colony-stimulating factor in advanced gastric cancer
23rd Congress of the ESMO, November 6-10 1998, Athens
17. A. Alexopoulos, N. Malamos, Th. Giannakakis, D. Mavroudis, G. Panagos, S. Agelaki, Ch. Kosmas, J. Souglakos, N. Vardakis, F. Apostolaki: Treatment of metastatic breast cancer with intensified combination of Docetaxel and Mitoxantrone: A multicenter phase II trial
23rd Congress of the ESMO, November 6-10 1998, Athens
 18. V. Georgoulas, Ch. Kourousis, S. Kakolyris, M. A. Dimopoulos, E. Papadakis, F. Apostolopoulou, A. Agelidou, V. Tzianni, E. Sarra, N. Vardakis: Front-line Treatment of advanced non-small cell lung cancer with Docetaxel and Gemcitabine: A multicenter phase II trial
23rd Congress of the ESMO, November 6-10 1998, Athens
 19. V. Georgoulas, Ch. Kouroussis, E. Papadakis, S. Kakolyris, M.A.Dimopoulos, F. Apostolopoulou, X. Tsiafaki, E. Bania, V. Tzianni, Ath. Kotsakis, E. Sarra, N. Vardakis: Efficacy of docetaxel/gemcitabine combination as first line treatment of non-small cell lung cancer
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris-France
 20. Kourousis C, Mavroudis D, Gianakakis T, Ziras N, Athanasiadis, Kakolyris S, Androulakis N, Kalbakis K, Agelaki S, Souglakos J, Sara E, Vardakis N, Georgoulas V: Biweekly oxaliplatin and high dose Leucovorin and 5-Fluorouracil (5-FU) 48-hour continuous infusion in pretreated patients with advanced colorectal Cancer (CRC)
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris-France
 21. Alexopoulos A, Malamos N, Gianakakis T, Mavroudis D, Panagos S, Agelaki S, Sara E, Cosmas Ch, Souglakos J, Vardakis N, Apostolaki F, Georgoulas V: A phase I/II study of Docetaxel (D) and Mitoxantrone (M) in metastatic Breast Cancer
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris-France
 22. D. Mavroudis, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, E. Sarra, N. Vardakis, J. Souglakos, D. Hatzidaki, P. Malliotakis, G. Samonis, V. Georgoulas: First line treatment of advanced gastric cancer with Docetaxel monotherapy and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)
35th Annual Meeting of ASCO, May 15-18 1999, Atlanta-USA
 23. S. Agelaki, P. Papakostas, G. Stathopoulos, G. Aravantinos, K. Kalbakis, E. Sarra, J. Souglakos, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, N. Vardakis, V. Georgoulas: Phase II study of Docetaxel with G-CSF support as first-line treatment for unresectable or advanced Biliary Tract carcinoma
35th Annual Meeting of ASCO, May 15-18 1999, Atlanta-USA
 24. Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, Th. Giannakakis, N. Ziras, A. Athanasiadis, S. Kakolyris, N. Androulakis, K. Kalbakis, S. Agelaki, J. Souglakos, E. Sarra, N. Vardakis, V. Georgoulas: Biweekly oxaliplatin (L-OHP) and high dose Leucovorin (LV) and 5-Fluorouracil (5-FU) 48-hour continuous infusion in pretreated patients with advanced colorectal Cancer (CRC)
35th Annual Meeting of ASCO, May 15-18 1999, Atlanta-USA

25. N. Androulakis, E. Papadakis, E. Bania, F. Apostolopoulou, X. Tsiadaki, C. Kalofonos, A. Rapti, M. Toubis, K. Chainis, Ch. Kouroussis, E. Sarra, N. Vardakis, D. Hatzidaki, V. Georgoulas: Second line treatment with Docetaxel (D) and Gemcitabine (G) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A multicenter phase II trial
35th Annual Meeting of ASCO, May 15-18 1999, Atlanta-USA
26. J. Souglakos, Ath. Kotsakis, E. Sarra, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, S. Aggelaki, N. Vardakis, K. Kalbakis, V. Georgoulas: Non neutropenic infections associated with docetaxel containing chemotherapy in patients with solid tumors
ECCO-10, 12-16 September 1999, Vienna
27. Ch. Kouroussis, N. Androulakis, K. Kalbakis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, S. Agelaki, J. Souglakos, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulas: A phase I study of Docetaxel (D) and Oxaliplatin (L-OHP) as front line treatment in metastatic breast and non-small cell lung cancer (NSCLC): Preliminary results
ECCO-10, 12-16 September 1999, Vienna
28. D. Mavroudis, S. Agelaki, K. Kalbakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, N. Androulakis, J. Souglakos, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulas: A dose finding and toxicity Study of the gemcitabine-oxaliplatin combination in patients with advanced solid tumors
ECCO-10, 12-16 September 1999, Vienna
29. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, E. Kremos, E. Sarra, J. Souglakos, N. Vardakis, V. Georgoulas: Second-line treatment with cisplatin and irinotecan (CPT-11) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).
10th International Congress on Anti-cancer Treatment January 31st – February 3rd 2000, Paris-France
30. Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, K. Kalbakis, S. Agelaki, E. Sarra, J. Souglakos, N. Vardakis, P. Malliotakis, V. Georgoulas: Front line treatment of Metastatic breast cancer (MBC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) with Docetaxel (D) and Oxaliplatin (L-OHP): a dose escalation study 10th International Congress on Anti-cancer Treatment
January 31st – February 3rd 2000, Paris-France
31. Kakolyris S, Giannakakis Th, Kourousis Ch, Ziras N, Kalbakis K, Papadouris S, Michaelakis E, Chainis G, Sarra E, Ergazakis M, Vardakis N, Georgoulas V: Front line treatment of non-small cell lung cancer with Docetaxel and Carboplatin: A preliminary analysis of a multicenter phase II trial
10th International Congress on Anti-cancer Treatment January 31st – February 3rd 2000, Paris-France
32. K. Kalbakis, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, S. Agelaki, D. Mavroudis, N. Vardakis, E. Kremos, I. Kazakou, G. Samonis, V. Georgoulas: Salvage chemotherapy with high dose leukovorin (LV) and 48-hour continuous infusion (CI) 5-Fluorouracil (5-FU) in combination with conventional dose of cyclophosphamide (C) in anthracycline and taxane refractory metastatic breast cancer (MBC) patients: a phase II study

36th Annual meeting of ASCO, May 20th 2000, New Orleans-USA

33. J. Souglakos, C. Kouroussis, N. Ziras, N. Malamos, A. Potamianou, D. Mavroudis, K. Kalbakis, N. Vardakis, E. Kremos, G. Samonis, V. Georgoulis: First line treatment with 5-Fluorouracil (5-FU), Leucovorin (LV) and Oxaliplatin (L-OHP) in advanced colorectal cancer (ACC): a multicenter phase II study
36th Annual meeting of ASCO, May 20th 2000, New Orleans-USA
34. S. Kakolyris, N. Androulakis, S. Agelaki, D. Mavroudis, J. Souglakos, N. Vardakis, D. Reppa, G. Samonis, V. Georgoulis: Salvage treatment of taxanes refractory advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with cisplatin plus irinotecan (CPT-11) combination
36th Annual meeting of ASCO, May 20th 2000, New Orleans-USA
35. S. Kakolyris, N. Androulakis, S. Agelaki, D. Mavroudis, J. Souglakos, N. Vardakis, D. Reppa, G. Samonis, V. Georgoulis: Salvage treatment of taxanes refractory advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with cisplatin plus irinotecan (CPT-11) combination
9th World Conference on lung Cancer, 11-15 September 2000, Tokyo-Japan
36. S. Kakolyris, Ch. Kourousis, D. Mavroudis, J. Souglakos, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, L. Vamvakas, D. Reppa, V. Georgoulis: A phase I study of Irinotecan (CPT-11) and Gemcitabine combination as salvage treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer
9th World Conference on lung Cancer, 11-15 September 2000, Tokyo-Japan
37. J. Souglakos, Ch. Kourousis, N. Ziras, N. Malamos, A. Potamianou, D. Mavroudis, S. Kakolyris, N. Androulakis, N. Vardakis, V. Georgoulis: Final results of first line treatment with 5-Fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV) and oxaliplatin (L-OHP) in advanced colorectal cancer (ACC): a multicenter phase II study
25th ESMO Congress, 13-17 October 2000, Hambourg-Germany
38. N. Vardakis, J. Souglakos, K. Kalbakis, S. Agelaki, D. Mavroudis, S. Kakolyris, L. Vamvakas, A. Palis, G. Samonis, V. Georgoulis: Weekly Irinotecan and Leucovorin and 5-Fluorouracil (AIO schedule) in pretreated patients with advanced colorectal cancer: Preliminary results
25th ESMO Congress, 13-17 October 2000, Hambourg-Germany
39. D. Mavroudis, A. Rapti, G. Ardavanis, Ch. Kourousis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, N. Vardakis, L. Vamvakas, N. Klapsinos, V. Georgoulis: Phase I study of the Topotecan and Epirubicin combination as second line treatment in small-cell lung cancer (SCLC)
25th ESMO Congress, 13-17 October 2000, Hambourg-Germany
40. G. Samonis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, M. Ergazakis, K. Stylianou, Ch. Christodoulou, Ch. Malliotakis, V. Georgoulis: Non-neutropenic infections associated with docetaxel-based chemotherapy in patients with solid tumors
11th International Congress on Anti-Cancer Treatment February 6th-9th 2001, Paris-France
41. J. Souglakos, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, S. Agelaki,

- N. Vardakis, K. Malas, L. Vamvakas, Ch. Malliotakis, V. Georgoulas: Weekly irinotecan and leucovorin and 5-Fluorouracil (AIO schedule) in pretreated patients with advanced colorectal cancer: preliminary results
11th International Congress on Anti-Cancer Treatment February 6th-9th 2001, Paris-France
42. T. Giannakakis, S. Kakolyris, E. Michailakis, S. Papadouris, K. Malas, K. Kalbakis, N. Androulakis, J. Souglakos, S. Agelaki, L. Vamvakas, N. Vardakis, A. Pallis, V. Georgoulas: Final results of a phase II study of docetaxel (TXT) and Carboplatin (CBDCA) combination in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). An ongoing study
11th International Congress on Anti-Cancer Treatment February 6th-9th 2001, Paris France
43. S. Agelaki, D. Mavroudis, A. Rapti, Ch. Palamidis, J. Stavrakakis, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, N. Vardakis, L. Vamvakas, N. Klapsinos, V. Bozionelou, A. Pallis, V. Georgoulas: Phase I study of the Topotecan and Epirubicin combination as second-line treatment in small cell lung cancer (SCLC)
11th International Congress on Anti-Cancer Treatment February 6th-9th 2001, Paris-France
44. T. Giannakakis, S. Kakolyris, E. Michailakis, S. Papadouris, K. Malas, K. Kalbakis, N. Androulakis, J. Souglakos, S. Agelaki, L. Vamvakas, N. Vardakis, A. Pallis, V. Georgoulas: Final results of a phase II study of docetaxel (TXT) and Carboplatin (CBDCA) combination in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). An ongoing study
4th International Congress on Lung Cancer, April 2001. Halkidiki-Greece
45. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, J. Souglakos, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, L. Vamvakas, D. Reppa, V. Georgoulas: A phase I study of irinotecan (CPT-11) and gemcitabine combination as salvage treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer
4th International Congress on Lung Cancer, April 2001. Halkidiki-Greece
46. S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, J. Souglakos, L. Vamvakas, N. Vardakis, K. Malas, H. Adamtziki, N. Xenidis, V. Georgoulas: A phase I study with a vinorelbine plus oxaliplatin combination in patients with refractory breast, lung and ovarian cancer
37th ASCO Annual Meeting, May 12-15 2001, San Francisco-USA
47. T. D. Giannakakis, S. Kakolyris, M. Michailakis, S. Papadouris, K. Malas, K. Kalbakis, N. Androulakis, J. Souglakos, S. Agelaki, L. Vamvakas, N. Vardakis, A. Pallis, V. Georgoulas: Final results of a phase II study of Docetaxel (TXT) and Carboplatin (CBDCA) combination in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). An ongoing study
37th ASCO Annual Meeting, May 12-15 2001, San Francisco-USA
48. J. Souglakos, S. Kakolyris, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, V. Bozionelou, A. Pallis, V. Georgoulas: A phase I study with Oxaliplatin (L-OHP) plus leucovorin (LV) / 5-fluorouracil (5-FU) in a weekly schedule (AIO) in patients with advanced solid tumors. Preliminary results
3rd International Conference, Perspectives in colorectal Cancer June 7-9 2001,

Dublin-Ireland

49. D. Mavroudis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, J. Souglakos, N. Vardakis, N. Androulakis, G. Samonis, V. Georgoulas: A phase I study of the caelyx-oxaliplatin combination in patients with advanced solid tumors
ECCO 11, 21-25 October 2001, Lisbon-Portugal
50. N. Androulakis, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, S. Agelaki, J. Souglakos, N. Vardakis, A. Pallis, V. Bozionelou, V. Georgoulas: Phase I study of weekly paclitaxel and liposomal doxorubicin in patients with advanced solid tumors
ECCO 11, 21-25 October 2001, Lisbon-Portugal
51. J. Souglakos, D. Mavroudis, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Vardakis, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, D. Tsetis, N. Athanasiadis, G. Samonis, V. Georgoulas: A triplet combination irinotecan (CPT-11) plus oxaliplatin (L-OHP) plus continuous infusion 5-fluorouracil (5-FU) with leucovorin (LV) as first line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II trial
12th International Congress on Anti-Cancer Treatment February 4th-7th 2002, Paris-France
52. J. Souglakos, A. Athanasiadis, P. Ginopoulos, Th. Giannakakis, K. Syrigos, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, N. Vardakis, V. Georgoulas: Oxaliplatin (L-OHP) combined with irinotecan (CPT-11), leucovorin (LV) and 5-fluorouracil (5-FU) (FOLFOXIRI) compared with CPT-11, LV and 5-FU (FOLFIRI) as first-line Treatment for metastatic colorectal cancer: preliminary safety and efficacy results of a multicenter randomized trial
38th ASCO Annual Meeting, May 18-21 2002, Orlando, Florida-USA
53. S. Agelaki, K. Kalbakis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, J. Souglakos, N. Vardakis, V. Bozionelou, D. Mavroudis, V. Georgoulas: Phase I study of biweekly Oxaliplatin (L-OHP) in combination with weekly administration of leucovorin (LV) and continuous 5-fluorouracil (5-FU) infusion in patients with advanced solid tumors
38th ASCO Annual Meeting, May 18-21 2002, Orlando, Florida-USA
54. N. Androulakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, N. Xenidis, A. Pallis, H. Adamtziki, J. Souglakos, G. Samonis, V. Georgoulas: Phase I study of capecitabine combination with radiotherapy as adjuvant treatment for operable rectal cancer
38th ASCO Annual Meeting, May 18-21 2002, Orlando, Florida-USA
55. Androulakis N, Vardakis N, Souglakos J, Kalbakis K, Pallis A, Athanasiadis A, Ginopoulos A, Giannakakis T, Syrigos K, Georgoulas V: Oxaliplatin (L-OHP) combined with irinotecan (CPT-11), leucovorin (LV) and 5-fluorouracil (5-FU) (FOLFOXIRI) compared with CPT-11, LV and 5-FU (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: preliminary safety and efficacy results of a multicenter randomized trial
4th International Conference, Perspectives in colorectal Cancer June 20-22 2002, Barcelona – Spain
56. Souglakos J, Vardakis N, Androulakis N, Kalbakis K, Agelaki S, Xenidis N, Kafarakis P, Pallis A, Georgoulas V: Phase I study of capecitabine combination

with radiotherapy as adjuvant treatment for operable rectal cancer
4th International Conference, Perspectives in colorectal Cancer June 20-22 2002,
Barcelona – Spain

57. Souglakos J, Vardakis N, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Kakolyris S, Pallis A, Kafarakis P, Xenidis N, Georgoulas V: Phase I study of biweekly Oxaliplatin (L-OHP) in combination with weekly administration of leucovorin (LV) and continuous 5-fluorouracil (5-FU) infusion in patients with advanced solid malignancies
4th International Conference, Perspectives in colorectal Cancer June 20-22 2002,
Barcelona – Spain
58. Vardakis N, Peraki M, Mavroudis D, Souglakos J, Androulakis N, Georgoulas V: Different schedules of Edrecolomab administration in colorectal cancer patients with CEA-mRNA positive cells in the peripheral blood
4th International Conference, Perspectives in colorectal Cancer June 20-22 2002,
Barcelona – Spain
59. Ch. Kouroussis, J. Souglakos, K. Kalbakis, N. Vardakis, K. Malas, S. Agelaki, L. Vamvakas, N. Androulakis, V. Georgoulas: Salvage chemotherapy with leukovorin (LV) and 48-hour continuous infusion (CI) of 5-Fluorouracil (5-FU) in combination with cyclophosphamide (CPM) and vinorelbine (VNL) in pretreated patients with metastatic breast cancer
27th ESMO Congress, 18-22 October 2002, Nice-France
60. N. Vardakis, M. Peraki, S. Apostolaki, J. Souglakos, D. Mavroudis, G. Vogiatzis, V. Georgoulas: Different schedules of Edrecolomab administration in colorectal cancer patients with CEA-mRNA-positive cells in the peripheral blood
27th ESMO Congress, 18-22 October 2002, Nice-France - Oral presentation
61. J. Souglakos, K. Syrigos, A. Potamianou, A. Polyzos, N. Androulakis, N. Vardakis, A. Macheras, C. Kouroussis, G. Samonis, V. Georgoulas: Combination with irinotecan (CPT-11) plus oxaliplatin (L-OHP) as first line treatment in metastatic gastric cancer: A multicenter phase II trial
39th ASCO Annual Meeting, May 31-June3 2003, Chicago-USA
62. J. Souglakos, A. Polyzos, A. Athanasiadis, S. Kakolyris, T. Giannakakis, E. Tselepatiotis, K. Kalbakis, N. Vardakis, V. Georgoulas: Oxaliplatin (L-OHP) combined with irinotecan (CPT-11), leucovorin (LV) and fluorouracil (5-FU) compared with irinotecan, leucovorin and fluorouracil as first line treatment for metastatic colorectal cancer (MCC): Preliminary results of a multicenter randomized phase III trial
40th ASCO Annual Meeting, June 5-8 2004, New Orleans, L.A.-USA
63. J. Souglakos, N. Androulakis, A. Kalykaki, Z. Saridaki, N. Vardakis, K. Kalbakis, S. Agelaki, L. Vamvakas, N. Kentepozidis, S. Giassas, D. Mavroudis, V. Georgoulas: Cetuximab plus capecitabine (CAP) and oxaliplatin (L-OHP) as salvage treatment for patients with metastatic colorectal cancer (CRC) relapsing after combination chemotherapy including oxaliplatin, irinotecan (CPT-11), and 5-fluorouracil (5-FU) or capecitabine
3rd International Symposium on Targeted Therapies (TAT) March 3-5 2005,
Amsterdam-The Netherlands

64. D. Mavroudis, J. Souglakos, A. Kalykaki, N. Androulakis, S. Agelaki, A. Kotsakis, N. Vardakis, K. Kalbakis, V. Georgoulas: A phase I-II study of imatinib (Glivec) in combination with irinotecan (CPT-11) in patients with relapsed or refractory small cell lung cancer
ECCO 13, October 2005, Paris-France
65. M. Ignatiadis, K. Kalbakis, N. Vardakis, S. Giassas, G. Sfakiotaki, Z. Saridaki, V. Bozionelou, J. Gioulbasanis, A. Pallis, V. Georgoulas: First line chemotherapy with docetaxel plus gemcitabine in elderly of poor performance status patients with advanced non-small cell lung cancer: The experience of the Hellenic Oncology Research Group (HORG)
ECCO 13, October 2005, Paris-France
66. J. Souglakos, N. Androulakis, M. Tzardi, A. Kalykaki, N. Vardakis, G. Sfakiotaki, K. Kalbakis, a. Kotsakis, D. Mavroudis, V. Georgoulas: Cetuximab plus capecitabine (CAP) and oxaliplatin (L-OHP) (CAPOX) as salvage treatment for patients with Metastatic colorectal cancer (CRC) relapsing after oxaliplatin-based chemotherapy
2006 Gastrointestinal Cancer Symposium January 26-28 2006, San Francisco, California-USA
67. A. Kalykaki, S. Agelaki, K. Kalbakis, A. Kotsakis, N. Kentepozidis, C. Christophylakis, S. Giassas, L. Vamvakas, N. Vardakis, D. Mavroudis: Phase I study of Gemcitabine (GEM) and pemetrexed (ptx) in the treatment of advanced solid tumors
42nd ASCO Annual Meeting, June 2-6 2006, Atlanta, Georgia-USA
68. M. Ignatiadis, A. Polyzos, G. P. Stathopoulos, E. Tselepatiotis, Ch. Christophylakis, K. Argyraki, N. Androulakis, N. Vardakis, A. Potamianou, V. Georgoulas: A phase II Study of docetaxel in combination with gefitinib in gemcitabine-pretreated patients With advanced /metastatic pancreatic cancer
31st ESMO Congress, 29 September-3 October 2006, Instabul-Turkey
69. A. Kotsakis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, J. Souglakos, K. Kalbakis, L. Vamvakas, N. Vardakis, A. Kalykaki, V. Markos, J. Gioulbasanis: A dose escalation study of pegylated Doxorubicin and Oxaliplatin in patients with advanced solid tumors
18th International Congress on Anti-Cancer Treatment, February 6-9, 2007, Paris - France
70. A. Karampeazis, L. Vamvakas, J. Souglakos, N. Vardakis, A. Kalykaki, A. Pallis, Z. Saridaki, J. Gioulbasanis, V. Markos, V. Georgoulas: Folfoxiri (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) versus folfiri (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a subgroup analysis for elderly patients of a multicenter randomized phase III trial from the Hellenic oncology research group (HORG)
18th International Congress on Anti-Cancer Treatment February 6-9 2007, Paris-France
71. I. Gioulbasanis, A. Kalykaki, L. Vamvakas, A. Pallis, N. Vardakis, E. Saloustris, A. Karampeazis, G. Sfakiotaki, K. Kalbakis, D. Mavroudis: Evaluation of mini

nutritional assessment (MNA) in metastatic lung cancer patients: Correlation of laboratory values indicating malnutrition, inflammation, and cachexia with clinical data. Hellenic Oncology Research Group, Athens, Greece
44th ASCO Annual Meeting, May 30-June 3, 2008, Chicago, Illinois-USA

72. I. Boukovinas, N. Androulakis, A. Polyzos, N. Vardakis, K. Amarantidis, V. Bozionelou, C. Kouroussis, S. Giassas, C. Christophyllakis, D. Mavroudis; Hellenic Oncology Research Group, Athens, Greece: A randomized phase II trial of irinotecan plus oxaliplatin versus oxaliplatin, fluorouracil (5 FU), leukovorin (LV) as first-line treatment in advanced gastric cancer.
45th ASCO Annual Meeting, May 29 – June 2, 2009, Orlando-USA
73. A. Polyzos, K. Kalbakis, S. Giassas, A. Kalykaki, N. K. Vardakis, V. Bozionelou, E. S. Saloustros, E. Kontopodis, D. Mavroudis, V. Georgoulas; Hellenic Oncology Research Group, Athens, Greece; Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Heraklion, Greece: Salvage treatment in metastatic breast cancer (MBC) with weekly paclitaxel (P) plus biweekly bevacizumab (B).
46th ASCO Annual Meeting, June 4-8, 2010, Chicago-USA
74. I. Sougklakos, I. Messaritakis, N. K. Vardakis, C. Papadaki, M. Sfakianaki, S. Apostolaki, M. Perraki, J. Koutroubakis, D. Mavroudis, V. Georgoulas; University General Hospital of Heraklion, Heraklion, Greece; Laboratory of Tumor Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece: Predictive and prognostic value of peripheral blood CEA mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in patients with early-operable colorectal cancer (CRC).
47th ASCO Annual Meeting, June 4-8, 2010, Chicago-USA

Συμμετοχή σε Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά Περιοδικά

1. Δ. Π. Κοφτερίδης, Λ. Ν. Βαμβακάς, Κ. Σ. Στεφανάκη, Α. Ε. Βολουδάκη, Ν. Κ. Βαρδάκης, Π. Ι. Μαλλιωτάκης, Δ. Σ. Εμμανουήλ: Αποφρακτική Βρογχιολίτιδα με Οργανούμενη Πνευμονία (BOOP).
ΙΑΤΡΙΚΗ, 74(2), 165-169, 1998.
2. Ν. Βαρδάκης, Ν. Ξενίδης, Μ. Περράκη, Σ. Αποστολάκη, Β. Μποζιονέλου, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας: Ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με RT-PCR. Εκτίμηση των δεικτών κυτταροκερατίνης 19, maspin και CEA
Νοσοκομειακά Χρονικά τομ62 συμπ. 2000
3. Α. Γ. Πάλλης, Δ. Μαυρουδής, Β. Μποζιονέλου, Ν. Ξενίδης, Γ. Μηλάκη, Ν. Βαρδάκης, Β. Γεωργούλιας: Χορήγηση ZD1839, ενός αναστολέα της τυροσινικής κινάσης του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, ως θεραπεία διάσωσης σε ασθενείς με εκτεταμένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. η εμπειρία της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2002, 1 (4):208-219.

Συμμετογή σε Δημοσιεύσεις σε Ξενόγλωσσα (SCI) Περιοδικά

1. Georgoulas V, Kouroussis Ch, Kakolyris S, Androulakis N, Dimopoulos M. A., Papadakis E, Kotsakis Th, Vardakis N, Kalbakis K, Meramveliotakis N, Hatzidaki D: Second line treatment of advanced non-small cell lung cancer with Paclitaxel and Gemcitabine: A preliminary report on an active regimen
Semin Oncol. 1997 Aug;24 (4 suppl12):61-66
2. Georgoulas V, Kouroussis Ch, Androulakis N, Kakolyris S, Dimopoulos M. A., Papadimitriou Ch, Bouros D, Hatzakis K, Herras P, Kalbakis K, Kotsakis Th, Vardakis N, N. Merambeliotakis, D. Hatzidaki: Docetaxel (Taxotere) and Gemcitabine (Gemsar) in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): Preliminary results.
Semin Oncol. 1997 Aug;24(4 suppl 14):22-25
3. Androulakis N, Kouroussis C, Kakolyris S, Tzannes S, Papadakis E, Papadimitriou C, Geroyianni A, Georgopoulou T, Dimopoulou I, Souglakos J, Kotsakis A, Vardakis N, Hatzidaki D, Georgoulas V: Salvage treatment with paclitaxel and gemcitabine patients with non-small cell lung cancer after cisplatin- or docetaxel-based chemotherapy: a multicenter phase II study
Ann Oncol. 1998 Oct;9(10):1127-30
4. Kouroussis C, Androulakis N, Kakolyris S, Souglakos J, Kotsakis T, Mavroudis D, Katsogridakis K, Vardakis N, Hatzidaki D, Samonis G, Vlachonikolis J, Georgoulas V: Dose-escalation study of docetaxel in combination with mitoxantrone as first-line treatment in patients with metastatic breast cancer
J Clin Oncol. 1999 Mar;17(3):862-9
5. Georgoulas V, Kouroussis C, Androulakis N, Kakolyris S, Dimopoulos MA, Papadakis E, Bouros D, Apostolopoulou F, Papadimitriou C, Agelidou A, Hatzakis K, Kalbakis K, Kotsakis A, Vardakis N, Vlachonikolis J: Front-line treatment of advanced non-small cell lung cancer with docetaxel and gemcitabine: a multicenter phase II trial
J Clin Oncol. 1999 Mar;17(3):914-20
6. Kofteridis DP, Malliotakis PI, Vardakis NK, Vamvakas LN, Emmanouel DS: Acute onset of dermatomyositis presenting in pregnancy with rhabdomyolysis and fetal loss
Scand J Rheumatol. 1999;28(3):192-4
7. Mavroudis D, Kouroussis C, Kakolyris S, Agelaki S, Kalbakis K, Androulakis N, Souglakos J, Vardakis N, Samonis G, Georgoulas V: Phase I study of the gemcitabine/oxaliplatin combination in patients with advanced solid tumors: a preliminary report
Semin Oncol. 2000 Feb;27(1 suppl 2):25-30
8. Mavroudis D, Kouroussis C, Androulakis N, Kalbakis K, Agelaki S, Kakolyris S, Souglakos J, Sarra E, Vardakis N, Hatzidaki D, Samonis G, Georgoulas V: Frontline treatment of advanced gastric cancer with docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a phase II trial
Am J Clin Oncol. 2000 Aug;23(4):341-4

9. Kouroussis C, Agelaki S, Mavroudis D, Souglakos J, Kakolyris S, Kalbakis K, Vardakis N, Reppa D, Hatzidaki D, Samonis G, Georgoulas V: A dose escalation study of weekly docetaxel in patients with advanced solid tumors
Cancer Chemother Pharmacol. 2000;46(6):488-92
10. Kakolyris S, Kouroussis C, Kalbakis K, Mavroudis D, Souglakos J, NVardakis, Kremos S, Georgoulas V: Salvage treatment of advanced non-small cell lung cancer previously treated with docetaxel-based front-line chemotherapy with irinotecan (CPT-11) in combination with cisplatin
Ann Oncol. 2000 June;11(6):757-60
11. Kakolyris S, Papadakis E, Tsiadaki X, Kalofonos C, Rapti A, Toubis M, Bania E, Kouroussis C, Chainis K, Androulakis N, Agelaki S, Sarra E, Vardakis N, Georgoulas V: Docetaxel in combination with gemcitabine plus rhG-CSF support as second-line treatment in non-small cell lung cancer. A multicenter phase II study
Lung Cancer. 2001 May;32(2):179-87
12. Kakolyris S, Souglakos J, Kouroussis C, Androulakis N, Mavroudis D, Kalbakis K, Kotsakis A, Vardakis N, Koukourakis M, Romanos J, Georgoulas V: A dose-finding study of irinotecan (CPT-11) plus a four-day continuous 5-fluorouracil infusion in advanced colorectal cancer
Oncology. 2001;60(3):207-13
13. Kouroussis C, Souglakos J, Kakolyris S, Mavroudis D, Malamos N, Kalbakis K, Androulakis N, Agelaki A, Vardakis N, Samonis G, Georgoulas V: Oxaliplatin in combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorin every 2 weeks as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer: a phase II study
Oncology. 2001;61(1):36-41
14. Kakolyris S, Kouroussis C, Souglakos J, Mavroudis D, Agelaki S, Kalbakis K, Androulakis N, Vardakis N, Vamvakas L, Georgoulas V: A phase I clinical trial of Topotecan given every 2 weeks in patients with refractory solid tumors
Oncology. 2001;61(4):265-70
15. Kakolyris S, Kouroussis C, Souglakos J, Agelaki S, Kalbakis K, Vardakis N, Vamvakas , Georgoulas V: Cisplatin and irinotecan (CPT-11) as second-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer
Lung Cancer. 2001 Dec;34 Suppl 4:S71-6
16. Souglakos J, Mavroudis D, Kakolyris S, Kouroussis Ch, Vardakis N, Androulakis N, Agelaki S, Kalbakis K, Tsetis D, Athanasiadis N, Samonis G, Georgoulas V: Triplet combination with irinotecan plus oxaliplatin plus continuous infusion fluorouracil and leucovorin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II trial
J. Clin Oncol. 2002 Jun 1;20(11):2651-7
17. Kakolyris S, Kouroussis C, Koukourakis M, Kalbakis K, Mavroudis D, Vardakis N, Georgoulas V: A dose-escalation study of irinotecan (CPT-11) in combination with gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with a cisplatin-based front line chemotherapy
Anticancer Res. 2002 May-Jun;22(3):1891-6

18. Kakolyris S, Kouroussis C, Koukourakis M, Mavroudis D, Malas K, Vardakis N, Bozionelou V, Kalbakis K, Georgoulas V: Adose-escalation study of oxaliplatin and vinorelbine in patients with advanced solid tumors
Oncology. 2002;63(3):213-8
19. Kouroussis C, Souglakos J, Mavroudis D, Papadouris S, Kakolyris S, Panopoulos C, Vardakis N, Sarra E, Georgoulas V: Oxaliplatin with high-dose leucovorin and infusional 5-fluorouracil in irinotecan-pretreated patients with advanced colorectal cancer (ACC)
Am J Clin Oncol. 2002 Dec;25(6):627-31
20. Mavroudis D, Pavlakou G, Blazoyiannakis G, Veslemes M, Apostolopoulou F, Kouroussis Ch, Kakolyris S, Agelaki S, Androulakis N, Vardakis N, Magkanas E, Samonis G, Georgoulas V: Sequential administration of cisplatin/etoposide followed by topotecan in patients with extensive stage small cell lung cancer. A multicenter phase II study
Lung Cancer. 2003 Jan;39(1):71-6
21. Giannakakis T, Kakolyris S, Theodoropoulos E, Kouroussis C, Michailakis E, Papadouris S, Tsitoura M, Kalbakis K, Souglakos J, Agelaki S, Vardakis N, Georgoulas V: A multicenter phase II study of docetaxel and carboplatin combination as front-line treatment in advanced non-small cell lung cancer
Anticancer Res. 2002 Nov-Dec;22(6B):3743-8
22. Mavroudis D, Pappas P, Kouroussis C, Kakolyris S, Agelaki S, Kalbakis K, Androulakis N, Souglakos J, Vardakis N, Nikolaidou M, Samonis G, Marselos M, Georgoulas V: A dose-escalation and pharmacokinetic study of gemcitabine and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors
Ann Oncol. 2003 Feb;14(2):304-12
23. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos M, Kouroussis C, Kakolyris S, Apostolaki S, Vardakis N, Lianidou E, Georgoulas V: Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer
Ann Oncol. 2003 Jun;14(6):849-55
24. Souglakos J, Androulakis N, Mavroudis D, Kouroussis C, Kakolyris S, Vardakis N, Kalbakis K, Pallis A, Ardavanis A, Varveris C, Georgoulas V: Multicenter dose-finding study of concurrent capecitabine and radiotherapy as adjuvant treatment for operable rectal cancer
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003 Aug 1;56(5):1284-7
25. Kakolyris S, Souglakos J, Kouroussis C, Androulakis N, Samonis G, Vardakis N, Amarantidis K, Agelaki S, Mavroudis D, Xenidis N, Georgoulas V: Dose escalation study on oxaliplatin and capecitabine (Xeloda) in patients with advanced solid tumors
Oncology. 2004;66(4):253-9
26. Agelaki S, Syrigos K, Christophylakis C, Boukovinas J, Varthalitis J, Pavlakou G, Athanasiadis a, Kouroussis C, Vardakis N, Maltezas G, Milaki G, Georgoulas V: Lung Cancer Subgroup, Hellenic Oncology Research Group A multicenter phase II study of the combination of irinotecan and gemcitabine in previously treated

patients with small-cell lung cancer
Oncology. 2004;66(3):192-6

27. Souglakos J, Syrigos K, Potamianou A, Polyzos A, Boukovinas I, Androulakis N, Kouroussis Ch, Vardakis N, Christophylakis Ch, Kotsakis A, Georgoulas V: Combination of irinotecan (CPT-11) plus oxaliplatin (L-OHP) as first-line treatment in locally advanced or metastatic gastric cancer: a multicenter phase II trial
Ann Oncol. 2004 Aug;15(8):1204-9
28. Kouroussis C, Kalbakis K, Androulakis N, Agelaki S, Vamvakas L, Malas K, Souglakos J, Vardakis N, Georgoulas V: A dose escalation study of leucovorin (LV) and 48-hour continuous infusion of 5-fluorouracil in combination with cyclophosphamide and vinorelbine in pretreated patients with metastatic breast cancer
Anticancer Res. 2004 Nov-Dec;24(6):4217-21
29. Souglakos J, Kakolyris S, Vardakis N, Androulakis N, Mavroudis D, Vamvakas L, Kouroussis C, Agelaki S, Saridaki Z, Georgoulas V: A dose escalating study of Oxaliplatin and high dose weekly leucovorin and 5-fluorouracil in patients with advanced solid tumors
Cancer Invest. 2005;23(6):505-10
30. Kakolyris S, Ziras N, Vamvakas L, Varthalitis J, Papakotoulas P, Syrigos K, Vardakis N, Kalykaki a, Amarantidis K, Georgoulas V: Gemcitabine plus oxaliplatin combination (GEMOX regimen) in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a multicenter phase II study
Lung Cancer. 2006 Dec;54(3):347-52. Epub 2006 Oct 9.
31. Pallis AG, Christophylakis Ch, Tselepatiotis E, Agelaki S, Vamvakas L, Souglakos J, Vardakis N, Kalykaki A, Kotsakis A, Argiraki A, Mavroudis D, Georgoulas V: Sequential administration of docetaxel followed by maintenance gefitinib, as salvage treatment in patients with advanced NSCLC: a multicenter phase II trial
Lung Cancer. 2007 Jan;55(1):101-7. Epub 2006 Oct 17
32. Souglakos J, Kalykaki A, Vamvakas L, Androulakis N, Kalbakis K, Agelaki S, Vardakis N, Tzardi M, Kotsakis AP, Gioulbasanis J, Tsetis D, Sfakiotaki G, Chatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulas V: Phase II trial of capecitabine and oxaliplatin (CAPOX) plus Cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer who progressed after oxaliplatin-based chemotherapy
Ann Oncol. 2007 Feb;18(2):305-10. Epub 2006 Nov 1
33. Souglakos J, Vardakis N, Androulakis N, Kakolyris S, Kouroussis Ch, Mavroudis D, Pallis A, Agelaki S, Kalbakis K, Georgoulas V: Irinotecan plus weekly 5-fluorouracil and leucovorin as salvage treatment for patients with metastatic colorectal cancer: A phase II trial
J BUON. 2005 Jan-Mar;10(1):47-52
34. Gkioulbasanis I, Souglakos J, Vardakis N, Kotsakis A, Saridaki Z, Kentepozidis N, Polyzos A, Giassas S, Ignatiadis M, Bozionelou , Christophylakis C, Georgoulas V: Dose escalating clinical study of high dose infusional 5-fluorouracil and leucovorin (AIO regimen) plus alternate weekly administration of oxaliplatin and

irinotecan in patients with advanced tumors of the gastrointestinal tract
J BUON. 2007 Apr-Jun;12(2):197-202

35. Kotsakis A, Kouroussis Ch, Androulakis N, Agelaki S, Kalbakis K, Vamvakas L, Vardakis N, Kalykaki A, Polyzos A, Georgoulas V, Mavroudis D: a dose-escalation study of pegylated liposomal doxorubicin and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors
Oncology. 2006;71(3-4):190-6. Epub 2007 Jul 18.
36. Kalykaki A, Vamvakas L, Agelaki S, Kalbakis K, Vardakis N, Sfakiotaki G, Ignatiadis M, Saridaki Z, Karabeazis A, Mavroudis D, Georgoulas V: A dose escalation study of gemcitabine plus pemetrexed administered biweekly in patients with solid tumors
Oncology. 2006;71(3-4):197-203. Epub 2007 Jul 19.
37. Karampeazis A, Vamvakas L, Agelaki S, Kentepozidis N, Papadimitraki E, Gioulbasanis I, Vardakis N, Ignatiadis M, Mavroudis D, Georgoulas V: A dose Escalation study of Biweekly oral Vinorelbine and Gemcitabine in Patients with Solid Tumors
Oncology. 2006; 71(5-6): 347-53. Epub 2007, Sep 3
38. Saridaki Z, Bozionelou V, Kentepozidis N, Kotsakis A, Vardakis N, Kalykaki A, Gioulbasanis I, Karabeazis A, Vamvakas L, Georgoulas V, Mavroudis D: A dose Escalation Study of the Biweekly Administration of Paclitaxel, Oxaliplatin and Capecitabine in Patients with Advanced Solid Tumors
Oncology 2007; 72(1-2): 45-50. Epub 2007 Nov 12
39. Kalbakis K, Pappas P, Kouroussis C, Vamvakas L, Kalykaki A, Vardakis N, Nikolaidou M, Marselos M, Georgoulas V, Mavroudis D: A dose escalation and pharmacokinetic study of biweekly pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors
Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Aug;62(3):449-56.
40. Kalykaki A, Papakotoulas P, Tsousis S, Boukovinas I, Kalbakis K, Vamvakas L, Kotsakis A, Vardakis N, Papadopoulou P, Georgoulas V, Mavroudis D: Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) in pretreated patients with advanced ovarian cancer: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group (HORG).
Anticancer Res. 2008 Jan-Feb;28(1B):495-500
41. Pallis AG, Agelaki S, Kakolyris S, Kotsakis A, Kalykaki A, Vardakis N, Papakotoulas P, Agelidou A, Geroyianni A, Agelidou M, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulas V: Hellenic Oncology Research Group (HORG). Chemotherapy-induced neutropenia as a prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with front-line docetaxel-gemcitabine chemotherapy.
Lung Cancer. 2008 Dec;62(3):356-63. Epub 2008 May 22
42. S. Kakolyris, J. Souglakos, A. Polyzos, A. Ardavanis, N. Ziras, A. Athanasiadis, Varthalitis, K. Amarantidis, S. Tsousis, L. Vamvakas, N. Vardakis, V. Georgoulas: Modified CAPOX (Capecitabine plus Oxaliplatin) Regimen Every 2 Weeks as Second-Line Treatment in Patients with Advanced Colorectal Cancer Previously Treated with Irinotecan-Based Front-Line Therapy: A Multicenter Phase II Study

Oncology 2008;74(1-2):31-6. Epub 2008 Jun 10

43. Kouroussis C, Vamvakas L, Vardakis N, Kotsakis A, Kalykaki A, Kalbakis K, Saridaki Z, Kentepozidis N, Giassas S, Georgoulas V. : Continuous administration Of low dose temozolamide in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase II study
Oncology. 2009;76(2):112-17. Epub 2009 Jan 14
44. Saridaki Z, Pappas P, Souglakos J, Nikolaidou M, Vardakis N, Kotsakis A, Marselos M, Georgoulas V, Mavroudis D : A dose escalation and pharmacokinetic study of the Biweekly administration of paclitaxel, gemcitabine and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors.
Cancer Chemother Pharmacol. 2009 Dec;65(1):121-8. Epub 2009 May 5
45. Xenidis N, Kotsakis A, Kalykaki A, Christophyllakis Ch, Giassas S, Kentepozidis N, Polyzos A, Chelis L, Vardakis N, Vamvakas L, Georgoulas V, Kakolyris S.: Etoposide Plus cisplatin followed by concurrent chemo-radiotherapy and irinotecan plus cisplatin For patients with limited-stage small cell lung cancer: A multicenter phase II study
Lung Cancer. 2010 Jun;68(3):450-4. Epub 2009 Ser 23
46. Pallis AG, Chandrinou V, Pavlakou G, Xenidis N, Varthalitis I, Vardakis N, Vamvakas L, Kontopodis E, Rovithi M, Georgoulas V.: A multicenter phase I trial of metronomic oral vinorelbine plus cisplatin in patients with NSCLC.
Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Aug 10. [Epub ahead of print]
47. Karachaliou N, Polyzos A, Kentepozidis N, Kakolyris S, Ziras N, Vardakis N, Kalykaki A, Milaki G, Georgoulas V, Androulakis N.: A multicenter phase II trial with irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment for inoperable/metastatic cancer of the biliary tract.
Oncology. 2010;78(5-6):356-60. Epub 2010 Aug 26.
48. Xenidis N, Vardakis N, Varthalitis I, Giassas S, Kontopodis E, Ziras N, Gioulbasanis I, Samonis G, Kalbakis K, Georgoulas V.: A multicenter phase II study of pegylated liposomal doxorubicin in combination with irinotecan as second-line treatment of patients with refractory small-cell lung cancer.
Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Sep 10. [Epub ahead of print]
49. Polyzos A, Kalbakis K, Kentepozidis N, Giassas S, Kalykaki A, Vardakis N, Bozionelou V, Saloustros E, Kontopodis E, Georgoulas V, Mavroudis D.: Salvage treatment in metastatic breast cancer with weekly paclitaxel and bevacizumab.
Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Oct 5. [Epub ahead of print]
50. Kotsakis A, Hatzidaki D, Vamvakas L, Vardakis N, Kalykaki A, Bozionelou V, Androulakis N, Kalbakis K, Saridaki Z, Georgoulas V, Agelaki S.: A retrospective analysis of non-platinum-based first- and second-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.
Anticancer Res. 2010 Oct;30(10):4335-42.
51. Kotsakis A, Agelaki S, Vardakis N, Stathopoulos G, Vamvakas L, Kalykaki A, Kentepozidis N, Kontopodis E, Sfakiotaki G, Mavroudis D, Georgoulas V.: A dose-escalation study of pemetrexed and docetaxel in non-small-cell lung cancer.

Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]

52. Vardakis N, Messaritakis I, Papadaki C, Agoglossakis G, Sfakianaki M, Saridaki Z, Apostolaki S, Koutroubakis I, Perraki M, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J.: Prognostic significance of the detection of peripheral blood CEACAM5mRNA-positive cells by real-time polymerase chain reaction in operable colorectal cancer (CRC). Clin Cancer Res. 2011 Jan 1;17(1):165-73.