

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**«Φαρμακογενετική ανάλυση ασθενών
με ορθοκολικό καρκίνο και συσχέτιση με ανταπόκριση στους
χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με ιρινοτεκάνη»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΕΚΤΑΣΙΔΗΣ Γ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΙΣΑΑΚΙΔΟΥ Φ. ΑΘΗΝΑ

ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	5
Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	6
ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
Εισαγωγή	13
1.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	14
2.ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ	16
3.ΠΡΟΛΗΨΗ	30
4.ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	37
5.ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ	39
6.ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	39
7.ΠΟΡΕΙΑ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ	40
8.ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	41
9.ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	44
9.1.ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	44
9.2.ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	54
10.ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	58
11.ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	62
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	69
Κριτήρια επιλογής ασθενών.....	69
Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης KRAS μεταλλάξεων και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των γονιδίων UGT1A1,DPD CD133.....	81
Στατιστική επεξεργασία	105
Αποτελέσματα.....	111
Συζήτηση.....	124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αφιερώνεται στον Αλέξανδρο και την υπόλοιπη οικογένειά μου που με ιδιαίτερη υπομονή αντέχουν τα απαιτητικά μου προγράμματα και την συνεχόμενη ανάγκη μου για μελέτη.

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ.κ. Πεκτασίδη, Θεοδωρόπουλο και Γαζούλη καθώς υπήρξαν υποστηρικτές και αρωγοί της προσπάθειας μου. Καθοριστική ήταν η συμβολή του κυρίου Αραβαντινού και των μελών της επταμελούς επιτροπής κ.κ. Γκόγκα Ε., Ψυρρή Δ., Παπαδημητρίου Χ. και Λυμπέρη Μ. καθώς ο καθένας εξ αυτών μου έχει προσφέρει με τον τρόπο του και από το πόστο του γνώση, εμπειρία και μεθοδολογία επιστημονικής προσέγγισης της ιατρικής γνώσης και πληροφορίας. Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη, καθώς χωρίς τη δική τους συγκατάθεση δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τίτλος : «**«Φαρμακογενετική ανάλυση ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και συσχέτιση με ανταπόκριση στους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με ιρινοτεκάνη»**

Σύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

- 1) κ. Πεκτασίδης Δημήτριος, Καθ. Παθολογίας – Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ
- 2) κ.Θεοδωρόπουλος Γεώργιος, Επ.Καθηγητής Χειρουργικής
- 3) κα Γαζούλη Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιολογίας

Κέντρο διεξαγωγής του πειραματικού τμήματος της μελέτης : Εργαστήριο Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Σύσταση Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

- 1) κ. Πεκτασίδης Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας – Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ
- 2) κ.Θεοδωρόπουλος Γεώργιος, Επ.Καθηγητής Χειρουργικής
- 3) κα Γαζούλη Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιολογίας
- 4) κα Γκόγκα Ελένη, Αν. Καθηγήτρια Παθολογίας Ογκολογίας
- 5) κα Ψυρρή Διαμάντω, Επ. Καθηγήτρια Παθολογίας Ογκολογίας
- 6) κ. Παπαδημητρίου Χρήστος, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας
- 7) κα Λυμπέρη Μαρία, Καθηγήτρια Πειραματικής Χειρουργικής

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΗΛΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΜΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΥΤΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΣΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΩ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΔΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ· ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο : ΑΘΗΝΑ ΙΣΑΑΚΙΔΟΥ

Ημερομηνία Γεννήσεως : 25/06/82

Τόπος Γεννήσεως : Αγία Πετρούπολη, Ρωσία

Οικογενειακή Κατάσταση : Έγγαμη

Διεύθυνση κατοικίας : Αγχιάλου 76, Πειραιάς,
18544

Τηλέφωνο : 6940 104353

Ηλεκτρονική διεύθυνση : athinaisaakidou@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- Μάρτιος 2013 - σήμερα: Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα: «Φαρμακογενετική ανάλυση ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και συσχέτιση με ανταπόκριση στους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με ιρινοτεκάνη»
- 2001 - 2008: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ (ομιλίες / μέλος οργανωτικής/επιστημονικής επιτροπής)

- 10-11/6/2016: «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2016» : Ομιλία «Ορθολογική χρήση αντιεμετικών κατά τη χημειοθεραπεία»
- 10-11/6/2016: «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2016» : Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής
- 21-23/4/2016: «3^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας»: Ομιλία «Μεταστατικός καρκίνος παχέος εντέρου- Πρωτόκολλα Ε.Ο.Π.Ε.»
- 21-23/4/2016: «3^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας»: Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής
- 29-31/1/2016: «Rehabilitation Conference»: Ομιλία «Rehabilitation of cancer patients», Crimea, Russia
- 20-21/11/2015: «Ουρολογικός καρκίνος»: Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής
- 6-7/11/2015: 3^η Μετεκπαιδευτική Συνάντηση για τον καρκίνο Νοτιοδυτικής Ελλάδος «Διαδραστική Ογκολογία: από τη θεωρία στην πράξη»: Ομιλία «Μεταστατικός μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα με ALK αναδιατάξεις»
- 12-13/6/2015 : «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2015» : Ομιλία « Δερματική τοξικότητα νεότερων αντineοπλασματικών φαρμάκων»
- 12-13/6/2015: «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2015»: Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής
- 12/2/2015: «Καρκίνος προστάτη. Νεότερες εξελίξεις. Περισσότερα διλήμματα» :Ομιλία «Μεταστατικός καρκίνος προστάτη»
- 13-14/6/2014: «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2014» : Ομιλία «Εμπύρετη Ουδετεροπενία»
- 13-14/6/2014: «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2014» : Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής
- 13-15/12/2013: 5^ο Κλινικό Φροντιστήριο για ειδικευόμενους Ογκολογίας «Καρκίνος μαστού», Ιωάννινα: Ομιλία «Καρκίνος μαστού. Υποτροπή»
- 5-6/07/2013: «Θερινή Ογκολογική Συνάντηση 2013»: Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής

- 5/12/2012: Scientific and practical conference “Multi-field hospital in the oncologic patient problems solution” : Ομιλία «Rehabilitation of cancer patients», Saint-Petersburg, Russia
- 2-3/07/2012: «10^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση»: Ομιλία «Εμπύρετη Ουδετεροπενία»
- 2-3/07/2012: «10^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση»: Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- First Certificate in English ,University of Cambridge
- Γνώση ρωσικής γλώσσας , επίπεδο άριστα
- Γνώση σουηδικής γλώσσας , επίπεδο A1

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Ιανουάριος 2015-σήμερα: Ογκολογική Κλινική 251 Γ.Ν.Α.: Ειδικευόμενη ιατρός
- Δεκέμβριος 2013- Ιούνιος 2014: Αιματολογική Κλινική Γ.Ν.Α. «Σισμανόγλειο-Αμαλία Φλέμινγκ»: Απόσπαση στην αιματολογία
- Νοέμβριος 2013-Αύγουστος 2014: Β΄ Παθολογική Κλινική Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι»: Ειδικευόμενη Ιατρός
- Σεπτέμβριος 2013 - Οκτώβριος 2013: Β΄ Παθολογική Κλινική Γ.Ν.Ν.Ι. «Κωνσταντοπούλειο»: Ειδικευόμενη ιατρός
- Οκτώβριος 2012 - Αύγουστος 2013: Παθολογική κλινική ΓΝ Πατησίων: Ειδικευόμενη ιατρός
- Αύγουστος 2012 : Β΄ Παθολογική –Ογκολογική Κλινική Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι»: Επιστημονικός συνεργάτης

- Ιούνιος 2012 - Οκτώβριος 2012: Ιδιωτική κλινική «Γαληνός»: Ιατρός παθολογικού τμήματος
- Αύγουστος 2011 - Ιούνιος 2012: Γ' Παθολογική - Ογκολογική Κλινική Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι»: Ειδικευόμενη Ιατρός
- Οκτώβριος 2010 - Αύγουστος 2011: Ε/Ο «Λατώ»: Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου
- Αύγουστος 2010 - Οκτώβριος 2010: Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Χανίων «Ο Άγιος Γεώργιος» : Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου
- Ιανουάριος 2010 - Ιούλιος 2010: Χειρουργική Κλινική Γενικού Νοσοκομείου Αμμοχώστου: Ασκούμενη Ιατρός
- Ιούλιος 2009 - Ιανουάριος 2010: Καρδιολογική/ Παθολογική Κλινική Γενικού Νοσοκομείου Αμμοχώστου: Ασκούμενη Ιατρός
- Οκτώβριος 2008 - Ιούλιος 2009: Ιατρείο πλαστικού χειρουργού Σπ.Ιωαννίδη «Μορφή»: Ιατρός
- Μάιος 2008 - Οκτώβριος 2008: «Laserline Clinics»: Ιατρός
- Μάιος 2007 - Φεβρουάριος 2008: «Knowledge Society»: Διοργάνωση σεμιναρίων, γραμματειακή υποστήριξη σεμιναρίων, υπεύθυνη ποιότητας ISO
- Άυγουστος 2004 - Σεπτέμβριος 2004: Ολυμπιακοί Αγώνες ΑΘΗΝΑ 2004: Τεχνική υποστήριξη

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

- Prediction of response to combination chemotherapy with irinotecan in Greek patients with metastatic colorectal cancer. **Isaakidou A**, Gazouli M, Aravantinos G, Pectasides D, Theodoropoulos GE., J Can Res Ther [serial online] 2016 [cited 2016 May 4];12:193-7.
- Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells from Colorectal Cancer Patients and Correlation with Primary Tumor Tissue. Lyberopoulou A, Aravantinos G, Efsthopoulos E P, Nikiteas N, Bouziotis P, **Isaakidou A**, et al. (2015), PLoS ONE 10(4): e0123902. doi:10.1371/journal.pone.0123902
- Association of CD133 polymorphisms and response to bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. Aravantinos G, **Isaakidou A**, Karantanos

T, Sioziou A, Theodoropoulos GE, Pektasides D, Gazouli M. Cancer Biomark. 2015 Nov 24;15(6):843-50. doi: 10.3233/CBM-150528.

- P31213 - Bilateral facial nerve palsy secondary to administration of nab-paclitaxel. D. Naoumis¹, I. Spanou¹, M. Antonopoulou¹, **A. Isaakidou**², N. Kentepozidis², E. Kouremenos¹; ¹251 Hellenic Air Force Hospital, Neurology, Athens/Greece, ²251 Hellenic Air Force Hospital, Oncology, Athens/Greece. 2nd Congress of the European Academy of Neurology 2016, Copenhagen, Denmark
- ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΕΞΩΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΧΡΙΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΣΥΝΟΔΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΟΠΑΘΕΙΑ. Χατζηδάκης Ι., ¹**Ισαακίδου Α.**, Μαρινέλλη Φ., Μοστράτου Ε., ¹Κεντεποζίδης Ν., Συμεωνίδης Ν. 3^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας 2016, Ιωάννινα, Ελλάδα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Από την WHO ως καρκίνωμα παχέος εντέρου ορίζεται το κακόηθες επιθηλιακό νεόπλασμα του παχέος εντέρου. Ως κακόηθες θεωρείται το νεόπλασμα που διηθεί τη βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα. Αναπτύσσεται στην εσωτερική επιφάνεια του παχέος εντέρου και στην πλειονότητα των περιπτώσεων αναπτύσσεται σε έδαφος προϋπαρχόντων πολυπόδων.

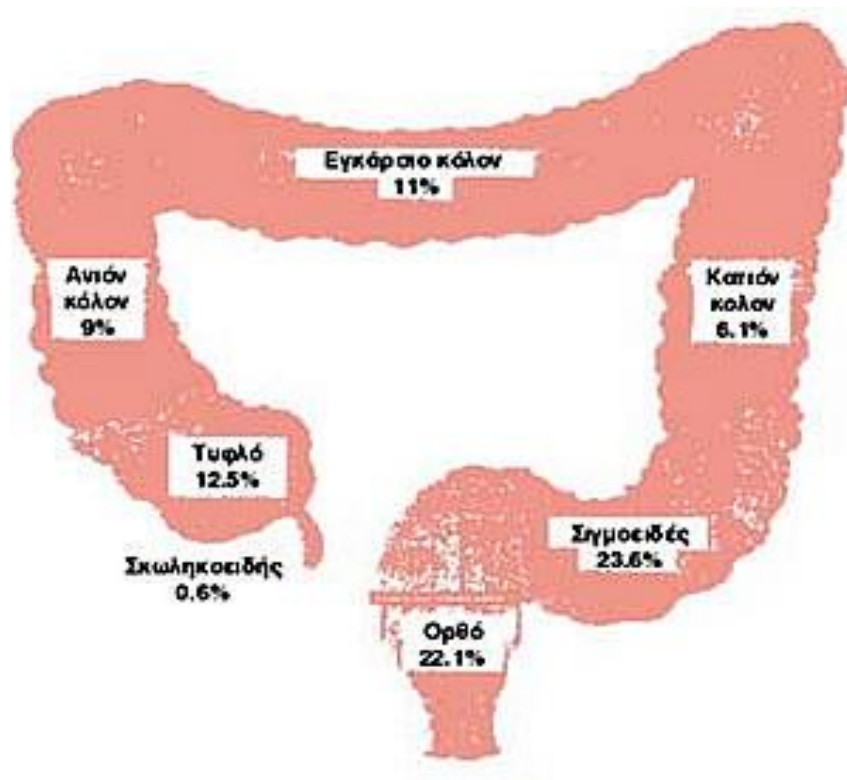
Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου εντοπίζονται κυρίως στο σιγμοειδές και στο ορθό αν και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των καρκινωμάτων που εντοπίζονται δεξιά. Η μακροσκοπική τους εικόνα ποικίλλει και εξαρτάται από τον τύπο του καρκινώματος, τη φυσική του ιστορία και το χρόνο της διάγνωσης. Μικροσκοπικά το καρκίνωμα του παχέος εντέρου σχηματίζει κυρίως αδενικούς σχηματισμούς διαφόρου μεγέθους και σχήματος που καλύπτονται από ένα ή περισσότερους στοιχείους κυττάρων με ή χωρίς παραγωγή βλέννης. Ο τύπος και το ποσοστό των αδενικών σχηματισμών, καθώς και η ατυπία των κυττάρων που τους επενδύουν καθορίζουν το βαθμό διαφοροποίησης.

Τα καρκινώματα αυτά επεκτείνονται τοπικά δια μέσου του τοιχώματος του οργάνου στον υποβλεννογόνιο και το μυϊκό χιτώνα, εξέρχονται στο περιτολικό λίπος και στη συνέχεια διασπούν τον ορογόνο. Λεμφαδενικές μεταστάσεις δίνουν μόνο όταν διηθήσουν τον υποβλεννογόνιο χιτώνα, ενώ επεκτείνονται αιματογενώς μέσα από την πυλαία και την κάτω κοίλη φλέβα.

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου είναι από τα συχνότερα νεοπλάσματα παγκοσμίως (3^{ος} στους άνδρες και 4^{ος} στις γυναίκες) και 2^{ος} από πλευράς θνητότητας καρκίνος στο δυτικό κόσμο. Ο καρκίνος αποτελεί το κύριο κακόηθες νεόπλασμα του εντέρου. Σπάνιοτερα στο παχύ έντερο μπορούν να αναπτυχθούν λεμφώματα, σαρκώματα, καρκινοειδή και μεταστατική νόσος.

Η συνηθέστερη εντόπιση του ορθοκολικού καρκίνου είναι το ορθοσιγμοειδές με ποσοστό 55% των περιπτώσεων με προοδευτική μείωση των περιστατικών τα τελευταία χρόνια. Η περιοχή τυφλού- ανιόντος κόλου είναι η δεύτερη σε συχνότητα η εντόπιση με ποσοστό 23% και ακολουθούν το εγκάρσιο με ποσοστό 11% και τέλος το κατión κόλον με ποσοστό 6%.



Εικ.1.Εντόπιση του καρκίνου παχέος εντέρου.

Τα αίτια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου είναι η διαίτα, ο δυτικός τρόπος ζωής, η Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του παχέος εντέρου και η ακτινοβολία. Επίσης επιβαρυντικοί παράγοντες είναι οι τροφές πλούσιες σε θερμίδες και ζωικό λίπος, η καθιστική ζωή, το κάπνισμα και η χρήση του αλκοόλ. Το 2-3% των ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα και Νόσο του Crohn πεθαίνει από τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει με την έκταση που καταλαμβάνει η νόσος και το χρόνο της εμφάνισης της, δηλαδή είναι μεγαλύτερος μετά την πρώτη δεκαετία και σε αυτούς που έχουν νοσήσει νέοι.

2. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η αιτιολογία εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου είναι πολυπαραγοντική. Πολλαπλοί παράγοντες επιδρούν στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου και οδηγούν στην εμφάνιση κακοήθειας. Η κληρονομικότητα και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, αλλά η ακριβής αλληλεπίδραση τους παραμένει άγνωστη. Είναι γνωστό ότι το καρκίνωμα του παχέος εντέρου προέρχεται από πολύ μικρά αδενώματα. Τα αδενώματα είναι ο πιο συχνός τύπος πολυπόδων του παχέος εντέρου αλλά θεωρούνται προκαρκινωματώδεις καταστάσεις γιατί μπορούν να εξαλλαγούν σε καρκίνο. Η καρκινογένεση στα περισσότερα επιθήλια αποτελεί μια μακροχρόνια πολυσταδιακή διαδικασία, όπου η άθροιση πολυάριθμων γενετικών μεταβολών και η απώλεια του ελέγχου κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση οδηγούν στη δημιουργία παθολογικών κυτταρικών κλώνων, οι οποίοι επικρατούν και στη συνέχεια αποκτούν την ικανότητα να διηθούν και να μεθίστανται. Η αναγνώριση μορφολογικών αλλοιώσεων είναι πολύ σημαντική για την πρόληψη του καρκίνου. Οι αλλοιώσεις αυτές είχαν παρατηρηθεί και είχαν περιγραφεί ως προκαρκινικές αλλοιώσεις πάνω από 50 χρόνια πριν, είναι τα αδενώματα σποραδικά ή στα πλαίσια οικογενούς πολυποδίας, και η επιθηλιακή δυσπλασία/νεοπλάσια, που παρατηρείται στις ΙΦΝΕ.

Η ανάπτυξη των περισσότερων καρκινωμάτων στο παχύ έντερο πιστεύεται ότι αρχίζει με απενεργοποίηση του γονιδίου της αδενωματούδους πολυποδίας ή δυσλειτουργία του οποίου οδηγεί σε διάφορες διαταραχές, όπως η διαταραχή στην ομοιόσταση της E-Cadherin και τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Η ενεργοποίηση των πρωτογονιδίων c-myc και k-ras και γενετικές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα

17 προκαλούν δυσλειτουργία του p53 με αποτέλεσμα διαταραχές στον έλεγχο λειτουργιών, όπως πολλαπλασιασμός και απόπτωση.

Μερικά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη απώλεια ή προσθήκη νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα ένα πολύ ασταθές DNA, αυτή η ιδιότητα είναι γνωστή ως μικροδορυφορική ασταθεια (MSI). Η μικροδορυφορική αστάθεια ελέγχεται με την ανίχνευση πέντε τουλάχιστον νουκλεοτιδίων (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) και κατατάσσει τα καρκινώματα του παχέος εντέρου σε καρκινώματα χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια (MSS), σε καρκινώματα με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και σε καρκινώματα με μικροδορυφορική αστάθεια με υψηλή συχνότητα (MSI-H). Στα καρκινώματα με μικροδορυφορική αστάθεια με υψηλή συχνότητα περιγράφεται άλλη οδός καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, μέσω κυρίως υπερμεθυλίωσης του DNA με μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS και ABRAF, και έχουν μορφολογικούς χαρακτήρες κοινούς με τους μεταπλαστικούς/υπερπλαστικούς πολύποδες του παχέος εντέρου.

Επίσης, γενετικοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη ορθοκολικού καρκινώματος, ενώ οι διαιτητικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να καθορίσουν ποιά από τα παραπάνω άτομα που είναι σε κίνδυνο τελικά θα εμφανίσουν καρκίνο του παχέος εντέρου.

Μπορεί κανείς να διακρίνει από άποψης κινδύνου δύο ομάδες. 1) Ομάδα συνήθους κινδύνου: Αφορά ασθενείς με ηλικία >50 έτη χωρίς ιστορικό (ατομικό ή οικογενειακό) ορθοκολικού καρκίνου, χωρίς ιστορικό ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (ΙΦΝΕ) και 2) Ομάδα υψηλού κινδύνου: Υπάρχει ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό ορθοκολικού καρκίνου, πολύχρονη νόσηση από ελκώδη κολίτιδα ή γενετική προδιάθεση (FAP, LYNCH κ.λ.π). Η θνησιμότητα από καρκίνο του

παχέος εντέρου μειώνεται διαρκώς τα τελευταία 20 χρόνια. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα νέα περιστατικά είναι λιγότερα, διαγιγνώσκονται σε πρωιμότερο στάδιο και οι θεραπείες έχουν βελτιωθεί κατά πολύ. Η 5-ετής επιβίωση είναι 90% για τους ασθενείς που ο καρκίνος τους εντοπίζεται και αντιμετωπίζεται σε αρχικά στάδια, πριν εξαπλωθεί. Αλλά μόνο περίπου 40% του καρκίνου του παχέος εντέρου εντοπίζονται σε αρχικά στάδια. Γι' αυτό είναι πολύ σημαντικό να γίνεται έγκαιρη διάγνωση.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου.

Αύξηση κινδύνου σχετίζεται με:

- α)Κακή διατροφή (υψηλή περιεκτικότητα σε ζωικό λίπος και κόκκινο κρέας, χαμηλή σε φυτικές ίνες)
- β)Παχυσαρκία
- γ)Κάπνισμα
- δ)Έλλειψη σωματικής άσκησης
- ε)Αυξημένη χρήση αλκοόλ (ιδιαίτερα μπύρας – συσχέτιση με καρκίνο ορθού)

Αντίθετα, μείωση κινδύνου σχετίζεται με:

- α)Κατανάλωση αντιοξειδωτικών βιταμινών
- β)Κατανάλωση φρούτων και λαχανικών
- γ)Χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονώδων φαρμάκων
- δ)Δίαιτα υψηλή σε ασβέστιο και φυλλικό οξύ
- ε)Τακτική σωματική άσκηση

Κλινική και Γενετικοί παράγοντες κινδύνου:

Η σποραδική μορφή που αποτελεί περίπου 75% των περιπτώσεων σχετίζεται με τη γήρανση και εμφανίζεται κατά την 7^η δεκαετία της ζωής,

Το οικογενειακό ιστορικό μπορεί να αντιπροσωπεύει κάποια γενετική ανωμαλία, την παρουσία ενός κοινού περιβαλλοντικού παράγοντα ή το συνδιασμό των δύο παραγόντων. Περίπου το 15% του κολορθικού καρκίνου εμφανίζεται σε ασθενείς που έχουν συγγενή πρώτου βαθμού με κολορθικό καρκίνο. Άτομα με συγγενή που πάσχει από κολορθικό καρκίνο έχουν διπλάσια πιθανότητα να αναπτύξουν τη νόσο.

Στις 25% των περιπτώσεων υπάρχει οικογενειακό ιστορικό αλλά μόνο στη μειοψηφία των περιπτώσεων μπορεί να τεκμηριωθεί συγκεκριμένο κληρονομικό σύνδρομο. Η κληρονιμική μορφή του καρκίνου παχέος εντέρου αφορά περίπου στο 5% . Η μορφή αυτή υποδιαιρείται με βάση την παρουσία των πολυπόδων ως κύρια ή όχι εκδήλωση της νόσου.

Τα περισσότερα καρκινώματα του παχέος εντέρου προέρχονται από αδενωματώδεις πολύποδες, που αντιμετωπίστηκαν πάντα ως κύρια προκαρκινική αλλοίωση στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Η μελέτη της σχέσης αδενώματος-καρκινώματος απέδωσε αξιόλογες παρατηρήσεις, που βοήθησαν στην κατανόηση της καρκινογένεσης στα επιθήλια. Εμφανίζονται κυρίως σποραδικά αλλά και σε κληρονομικά νοσήματα, όπως η οικογενής πολυποδίαση. Η εξέλιξη προς τον καρκίνο ξεκινά από υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου, δημιουργία αδενώματος, ανάπτυξη και εμφάνιση δυσπλασίας, κακοήθη εξαλλαγή και τέλος διηθητικό καρκίνο. Τα γενετικά στάδια από τον πολύποδα στη δυσπλασία,

στο καρκίνωμα in situ και στο διηθητικό καρκίνο έχουν καθοριστεί και περιλαμβάνουν: σημειακή μετάλλαξη στο πρωτοογκογονίδιο K-ras, υπομεθυλίωση του DNA που οδηγεί σε ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης, απώλεια αλληλίου στο γονίδιο APC (ογκοκατασταλτικό), απώλεια αλληλίου στο DDC γονίδιο στο χρωμόσωμα 18 και απώλεια με μετάλλαξη του p53 στο χρωμόσωμα 17.



Εικ.2. Εξέλιξη πολύποδα σε καρκινό παχέος εντέρου.

Η συχνότητα των αδενωμάτων στο γενικό πληθυσμό δεν είναι γνωστή επειδή τα περιστατικά δεν καταγράφονται σε αρχείο νεοπλασιών και λόγω της διάγνωσής τους κυρίως σε συμπτωματικούς ασθενείς. Είναι συχνότερα στους άνδρες από τις γυναίκες εκτός από τα αδενώματα του ορθού, τα οποία προσβάλλουν με την ίδια συχνότητα και τα δύο φύλα.

Ιστολογικά οι πολύποδες χαρακτηρίζονται ως νεοπλασματικοί, ή μη νεοπλασματικοί. Οι μη νεοπλασματικοί πολύποδες δεν έχουν κακόηθες δυναμικό και περιλαμβάνουν υπερπλαστικούς πολύποδες, αμαρτώματα και φλεγμονώδεις πολύποδες. Οι νεοπλασματικοί πολύποδες (ή αδενωματώδεις πολύποδες) κατατάσσονται ως σωληνώδη, λαχνωτά ή σωληνολαχνωτά αδενώματα.

Τα σωληνώδη αδενώματα εμφανίζονται περίπου στο 30% των ενηλίκων. Είναι μισχωτά ή άμισχα και συνήθως είναι ασυμπτωματικά. Περίπου στο 5% προκαλεί αφανή απώλεια αίματος στα κόπρανα, ενώ μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη. Ο συνολικός κίνδυνος κακοήθους εξαλλαγής συσχετίζεται με το μέγεθός τους (<2% σε διάμετρο <1,5 εκ., >10% σε διάμετρο >2,5 εκ.) και είναι υψηλότερος στους άμισχους πολύποδες. Το 65% των περιπτώσεων ανευρίσκεται στο ορθοσιγμοειδές.

Τα λαχνωτά αδενώματα είναι μεγαλύτερα από τα σωληνώδη κατά τη διάγνωση και συχνά είναι άμισχα. Υπάρχει υψηλός κίνδυνος κακοήθειας (έως και 30% όταν είναι >2 εκ.). Εμφανίζονται συχνότερα στο αριστερό κόλον. Ενίοτε σχετίζονται με εκκριτική διάρροια πλούσια σε κάλιο.

Οι υπερπλαστικοί πολύποδες εμφανίζονται σε άτομα χωρίς ιστορικό κληρονομικότητας και είναι ασυμπτωματικοί. Αποτελούν συνήθως τυχαίο εύρημα στην κολonosκόπηση. Σπάνια είναι > 5 χιλιοστά και θεωρούνται χωρίς κακήθες δυναμικό, αν και πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι πιθανώς μια μικρή και μη καλά χαρακτηρισμένη ομάδα με πολυάριθμους, ευμεγέθεις υπερπλαστικούς πολύποδες του δεξιού κόλου μπορεί να έχει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου.

Οι ασθενείς με πολυποδίαση περιλαμβάνουν τα οικογενή σύνδρομα αδενωματούδους πολυποδιάσεως: α) Οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση- FAP: Familial Adenomatous Polyposis, σύνδρομο Gardner και σύνδρομο Turcott και β) Οικογενή σύνδρομα αμαρτωματούδους πολυποδιάσεως (Peutz-Jeghers, νεανική πολυποδίαση, νόσος Cowden).

Το σύνδρομο οικογενούς αδενωματούδους πολυποδιάσεως – ΣΟΑΠ χαρακτηρίζεται από την παρουσία εκατοντάδων έως χιλιάδων πολυπόδων σε όλη την έκταση του παχέος εντέρου με ιστολογικά χαρακτηριστικά τυπικών αδενωμάτων. Η μέση ηλικία

ανάπτυξης πολυπόδων είναι τα 25 έτη. Η μέση ηλικία εμφάνισης συμπτωμάτων είναι 33 έτη, ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης διηθητικού καρκίνου είναι τα 42 έτη. Το ΣΟΑΠ συνοδεύεται επίσης από μια πληθώρα εξωεντερικών εκδηλώσεων, όπως οστεώματα της γνάθου, πολύποδες του ανώτερου πεπτικού σωλήνα, συγγενή υπερτροφία του επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς, καθώς και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης άλλων νεοπλασμάτων, όπως ο καρκίνος του φύματος του Vater, ο θηλώδης και θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς, ο γαστρικός καρκίνος και το μυελοβλάστωμα και ηπατοβλάστωμα στα παιδιά. Η γενετική προδιάθεση, η οποία ευθύνεται για το σύνδρομο, είναι η γαμετική μετάλλαξη του γονιδίου APC στο χρωμόσωμα 5p21, η οποία κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό επικρατούντα τύπο με υψηλή διεισδυτικότητα. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις σχετίζονται με την προεξάρχουσα κλινική εικόνα, π.χ. μεταλλάξεις στα κωδόνια 1250-1464 συνοδεύονται από εμφάνιση χιλιάδων πολυπόδων, ενώ η μεταλλάξεις στο κωδόνιο 1465-1466 προδιαθέτουν στην εμφάνιση εξωεντερικών εκδηλώσεων. Ασθενείς με θετικό ιστορικό για ΣΟΑΠ πρέπει να ελέγχονται για μετάλλαξη του APC και σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος να υποβάλλονται σε έλεγχο με ενδοσκόπηση από ηλικία των 12 ετών. Εμφάνιση καρκίνου παχέος εντέρου από κακοήγη εξαλλαγή πολύποδα σε ποσοστό 100% έως την ηλικία 40 ετών. Η μόνη ριζική θεραπευτική αγωγή είναι η ολική κολεκτομή στη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους και είναι προτιμότερο οι ασθενείς αυτοί να αντιμετωπίζονται σε κέντρα εξειδικευμένα στην γενετική καθοδήγηση.

Το ΣΟΑΠ με μικρότερο αριθμό πολυπόδων (< 100) και εμφάνιση καρκίνου σε μεγαλύτερη ηλικία σε σχέση με τους ασθενείς του κλασσικού ΣΟΑΠ λέγεται εξασθετισμένο ΣΟΑΠ. Το σύνδρομο οφείλεται σε μετάλλαξη του APC σε περιοχές

κοντά στο 5' (κωδώνιο 158) και 3' (κωδώνιο 1596). Ο μέσος αριθμός πολυπόδων είναι 25, η διάμεση ηλικία διάγνωσης του καρκίνου είναι 58 έτη, ενώ το 69% των ασθενών εμφανίζει κολοορθικό καρκίνο έως την ηλικία των 80 ετών.

Ίδιες κλινικές εκδηλώσεις από το έντερο παρουσιάζει και το σύνδρομο Gardner, οι εξωεντερικές εκδηλώσεις όμως είναι περισσότερο έκδηλες και ποικίλες και περιλαμβάνουν οστεώματα των μακρών οστών, δεσμοειδείς όγκους, επιδερμοειδείς κύστες, λιπώματα και ίνωση του μεσεντερίου, η οποία καταλήγει σε θάνατο στο 8-11% των περιπτώσεων. Υψηλότερη επίπτωση γαστροδωδεκαδακτυλικών πολυπόδων και αδеноκαρκινώματος.

Σύνδρομο Turcot χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νεοπλασμάτων στο παχύ έντερο και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Υπάρχουν 2 τύποι του συνδρόμου: α) ΣΟΑΠ και πολύμορφο γλοιοβλάστωμα λόγω μεταλλάξεων του APC και β) καρκίνος παχέος εντέρου και αστροκύττωμα λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων διόρθωσης αποτυχημένου συνταιριάσματος (MMR, miss match repair).

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση μελανίνης πέριξ χειλέων, την μύτη, τον στοματικό βλεννογόνο, τα πέλματα και τις παλάμες. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμαρτωμάτων σε όλο το γαστρεντερικό σωλήνα (στόμαχος, λεπτό έντερο, κόλον) αν και συχνότερα στο λεπτό έντερο, τα οποία μπορούν να εκδηλωθούν με αιμορραγία, απόφραξη ή εγκολεασμό. Περίπου το 50% των ασθενών αναπτύσσουν ορθοκολικό ή γαστρικό καρκίνο, νεοπλάσματα εντέρου και σπανιότερα καρκίνο του παγκρέατος με μέση ηλικία διάγνωσης τα 50 έτη. 5-12% των περιπτώσεων αναπτύσσουν ωθητικές κύστες και νεοπλάσματα εμβρυϊκής προέλευσης των ωθηκών. Υπεύθυνη θεωρείται η γαμετική μετάλλαξη ενός γονιδίου, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19p 13.3 και κωδικοποιεί μια

κινάση με δράση σερίνης/θρεονίνης (LKB1 ή STK11). Η ακριβής δράση αυτής της κινάσης δεν είναι γνωστή, πιθανολογείται πως έχει ογκοκατασταλτική δράση και υπάρχει δυνατότητα σήμερα να γίνεται ο γενετικός έλεγχος

Οι ασθενείς με κληρονομικό ορθοκολικό καρκίνο χωρίς την ταυτόχρονη ανεύρεση πολλαπλών πολυπόδων στη διάγνωσή τους ανήκουν στον κληρονομικό μη-πολυποσικό ορθοκολικό καρκίνο (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer, HNPCC ή σύνδρομο LYNCH) συνδέεται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου και οι γενετικές μεταλλάξεις οι οποίες το χαρακτηρίζουν έχουν αναγνωριστεί.

Ο HNPCC είναι συχνότερος από την FAP και αποτελεί 2-3% όλων των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου.

Ένα ακόμα κληρονομικό πολυποσικό σύνδρομο έχει περιγραφεί, το σύνδρομο αυτό κληρονομείται με αυτόσωμο υπολειπόμενο χαρακτήρα και σχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου MYH.

Οι γαμετικές μεταλλάξεις σε ένα από έξι γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης αποτυχημένου συνταιριάσματος του DNA (Mis Match Repair – MMR) φαίνεται να είναι η κύρια ελλοχεύουσα γενετική βλάβη στις οικογένειες οι οποίες εμφανίζουν το σύνδρομο. Τα γονίδια του συστήματος MMR είναι τα:

- hMSH 2 (human mutS homolog 2), το οποίο ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p16
- hMLH1 (human mutL homolog 1), το οποίο ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p21
- hPMS1 και hPMS2 (human postmeiotic segregation 1 and 2), τα οποία βρίσκονται στα χρωμοσώματα 2q31 και 7p22, αντιστοίχως

- hMSH6 (human mutS homolog6), το οποίο ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p16 και
- hMLH3, ένα γονίδιο, το οποίο αλληλεπιδρά με MLH1 αν και μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο δεν έχουν ακόμη αναγνωρισθεί σε ασθενείς με HNPCC.

Οι γαμετικές ετεροζυγωτικές μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2 και λιγότερο συχνά στο MSH6, είναι οι συχνότερες οι οποίες προσδιορίζονται στους ασθενείς με HNPCC. Μια βάση δεδομένων με όλες τις καταχωρημένες μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ανευρεθεί σε οικογένειες με HNPCC.

Η αδρανοποίηση και των δύο αλληλόμορφων γονιδίων ενός γονιδίου MMR έχει συνέπεια την ελαττωματική λειτουργία του. Κατά κανόνα οι ασθενείς με HNPCC έχουν μια γαμετική μεταλλαγή σε ένα αλληλόμορφο ενός γονιδίου MMR και το δεύτερο αλληλόμορφο γονίδιο αδρανοποιείται με μετάλλαξη, απώλεια ετεροζυγωτίας ή επιγενώς από την μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων. Νεοπλασία έχει περιγραφεί επίσης στους ασθενείς με ομοζυγωτία. Οι ομοζυγώτες ή οι ασθενείς με σύνθετες γαμετικές ετεροζυγωτικές μεταλλάξεις των MLH1, MSH2 και MSH6 αναπτύσσουν καρκίνο προώρως και χαρακτηρίζονται από τυπικές καφεοειδείς κηλίδες στο δέρμα. Τέτοιοι ασθενείς παρουσιάζουν σπάνια καρκίνο του ορθού και του κόλου πιθανώς λόγω πρόωρου θανάτου από αιματολογικούς καρκίνους. Οι ομοζυγώτες ή σύνθετοι ετεροζυγώτες των μεταλλαγών του PMS2 αναπτύσσουν πρόωρως νεοπλασίες του αιμοποιητικού ή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα γονίδια MMR συστήματος επιδιορθώνουν τα λάθη τα οποία επισυμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA (περίπου σε 10^6 βάσεις). Η πλημμελής λειτουργία του συστήματος του MMR οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο μεταλλαγών σε πολλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων τα οποία ελέγχουν την κυτταρική

ανάπτυξη (TGF-β και IGF), αυτών τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική απόπτωση (Caspase 5, Bax), αλλά και των υπολοίπων μη μεταλλαγμένων γονιδίων MMR (hMSH3, hMSH6).

Ο όρος αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (Micro Satellite Instability-MSI) αναφέρεται σε απώλεια ή προσθήκη βάσεων σε περιοχές βραχέων επαναλαμβανομένων ακολουθιών DNA (συνήθως μόνο- ή δι- νουκλεοτιδίων) σε σημεία του γονιδιώματος, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (μικροδορυφόροι). MSI έχει παρατηρηθεί σε περισσότερα από 90% του ιστού των όγκων ασθενών με HNPCC. Η παρουσία MSI καταδεικνύει ότι υπάρχει απώλεια λειτουργίας σε ένα γονίδιο συνταιριάσματος του DNA, αλλά η ανεύρεση της δεν θέτει την διάγνωση HNPCC, καθώς MSI παρατηρείται σε ποσοστό μέχρι και 15% του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου. Στην τελευταία ομάδα το MSI αποδίδεται χαρακτηριστικά στη μεθυλίωση της περιοχής των υποκινητών του hMLH1 γονιδίου. Σε περιπτώσεις όγκων που εμφανίζουν MSI έχουν καλύτερη επιβίωση και πιθανότατα δεν ωφελούνται από την συμπληρωματική χημειοθεραπεία με 5-FU.

Η ανάλυση για την παρουσία MSI στον ιστό όγκων ή αδενωμάτων του παχέος εντέρου δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως αρχική διαγνωστική εξέταση στους ασθενείς, οι οποίοι πιθανότατα πάσχουν από HNPCC. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης MSI αναφέρονται ως MSI-high, MSI-low ή MSS (microsatellite stable). Κλινικώς αξιολογούνται οι ασθενείς στους οποίους ανιχνεύεται το MSI-H και στη συνέχεια πρέπει να υποβληθούν σε ανάλυση της αλληλουχίας του DNA για μεταλλαγές των γονιδίων MMR. Αν η ανίχνευση μεταλλαγμένων γονιδίων hMSH2 και hMLH1 είναι αρνητική ,τότε πρέπει να γίνει έλεγχος για πιθανές μεταλλάξεις σε άλλα

γονίδια MMR, όπως το hMSH6 και το PMS2. Η ανίχνευση MSI-L ή MSS δεν απαιτεί περαιτέρω γενετικό έλεγχο.

Το σύνδρομο υποδιαιρείται σε δύο ομάδες για κλινικούς λόγους: α) τον κληρονομικό καρκίνο του παχέος εντέρου ή σύνδρομο Lynch I και β) το οικογενειακό σύνδρομο καρκίνου του παχέος εντέρου ή σύνδρομο Lynch II. Και οι δύο υποομάδες χαρακτηρίζονται από παρόμοια εμφάνιση καρκίνου στο παχύ έντερο, από νεαρή ηλικία εμφάνισης καρκίνου στο δεξιό κόλον. Οι όγκοι αυτοί συνήθως είναι χαμηλής διαφοροποίησης και εξελίσσονται από τα κολοορθικά αδενώματα, τα οποία συνήθως έχουν θηλώδη ιστολογία, η οποία συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο κακοήθους μετασχηματισμού έναντι της σωληνοειδούς ιστολογίας. Όμως τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης είναι υψηλότερα από αυτά του σποραδικού κολοορθικού καρκίνου επομένως η βιολογία των HNPCC είναι διαφορετική. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι 48 έτη και σπανιότερα η αρχική διάγνωση γίνεται στη δεύτερη δεκαετία της ζωής. Το ποσοστό που ο όγκος αναπτύσσεται εγγύτερα της σπληνικής καμπής φτάνει 70% και 10% παρουσιάζουν σύγχρονους ή μεταγενέστερους καρκίνους. Το σύνδρομο Lynch II διαφοροποιείται από τον υψηλό κίνδυνο των εξωκολικών όγκων, όπως ο καρκίνος ενδομητρίου που εμφανίζεται στις προσβεβλημένες οικογένειες σε ποσοστό 43%. Επίσης υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση νεοπλασίας ωοθηκών, στομάχου, λεπτού εντέρου, χοληφόρου δένδρου, νεφρικής πυέλου, ουρητήρα και προστάτη.

Για τη διάγνωση του HNPCC χρησιμοποιούνται τα κριτήρια II του Αμστερνταμ .

Οι ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια αυτά αλλά δεν παρουσιάζουν ανιχνεύσιμη ανωμαλία σε ένα γονίδιο MMR συστήματος έχουν χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με εκείνους στους οποίους προσδιορίζεται μια μετάλλαξη. Από

το 1996 προτάθηκαν κριτήρια Bethesda για τον προσδιορισμό των ασθενών οι οποίοι πρέπει να υποβληθούν σε γενετικό έλεγχο για HNPCC.

Έως το 25% των περιπτώσεων του κολοορθικού καρκίνου υπάγεται σε οικογενή μορφή εκτός κληρονομικών συνδρόμων, δηλαδή υπάρχει οικογενειακό ιστορικό κολοορθικού καρκίνου αλλά η μορφή δεν εντάσσεται σε κάποιο από τα κληρονομούμενα σύνδρομα. Τα άτομα αυτά παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, ο οποίος είναι σημαντικά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο των κληρονομούμενων συνδρόμων. Η ύπαρξη ενός πρώτου βαθμού συγγενή με κολοορθικό καρκίνο συνεπάγεται αύξηση κινδύνου ανάπτυξης κολοορθικού καρκίνου κατά 1,7 φορές συγκριτικά με γενικό πληθυσμό. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται επιπλέον αν υπάρχουν δύο προσβεβλημένοι συγγενείς πρώτου βαθμού ή αν το πρώτο περιστατικό στην οικογένεια έχει διαγνωστεί πριν από την ηλικία 55ετών.

Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Τα ΙΦΝΕ ευθύνονται μόνο για 1% των περιπτώσεων του ορθοκολικού καρκίνου. Ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου παχέος εντέρου είναι αυξημένος σε ασθενείς με ελκώδη πανκολίτιδα (προσβολή παχέος εντέρου πέραν της αριστερής κολικής καμπής) διάρκειας μεγαλύτερης των 7-8 ετών και σε ασθενείς με περιφερική ελκώδη κολίτιδα διάρκειας μεγαλύτερης των 12-15 ετών. Ποσοστό ανάπτυξης καρκίνου σε ασθενείς με ελκώδη πανκολίτιδα ανέρχεται σε 3% στα πρώτα 10 έτη και στη συνέχεια αυξάνει κατά 1% κατά έτος. Η ελκώδης κολίτιδα είναι μία φλεγμονώδης νόσος του βλεννογόνου του παχέος εντέρου, που στο ορθό παρουσιάζει σχεδόν πάντα εκτεταμένη φλεγμονώδη διήθηση, κατά συνέχεια ιστού χωρίς ενδιάμεσες

φυσιολογικές περιοχές. Η δυσπλασία που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση των κυττάρων εντός των κρυπτών, η ατυπία των πυρήνων και οι αυξημένες μιτώσεις, μπορεί να υποδηλώσουν την ανάπτυξη πρώιμου καρκίνου παχέος εντέρου.

Η νόσος Crohn χαρακτηρίζεται από διατοιχωματική φλεγμονή, πάχυνση του τοιχώματος του εντέρου, γραμμοειδείς εξελκώσεις και υποβλεννογόνια πάχυνση που δημιουργεί εικόνα πλακόστρωτου. Η κατανομή της νόσου είναι ασυνεχής με παρεμβολή φυσιολογικών περιοχών και περιορίζεται κυρίως στο παχύ έντερο. Ασθενείς με τη νόσο Crohn έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου ανάλογο με τον κίνδυνο των ασθενών με ελκώδη κολίτιδα.

Άλλοι πιθανοί παράγοντες κινδύνου.

Διάφορες νοσολογικές καταστάσεις έχουν συσχετισθεί κατά καιρούς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου, όπως η χαμηλή χολοπεπτική αναστόμωση, η χολοκυστεκτομή, η υφολική γαστρεκτομή, η υπεργαστριναιμία, η μεγαλακρία, ο υπερπαραθυρεοειδισμός, ο οισοφάγος Barrett και η ακτινοβόληση της πυέλου.

Παρά την πληθώρα γνωστών παραγόντων κινδύνου, στην πλειονότητα των περιπτώσεων του ορθοκολικού καρκίνου δεν είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί ο παράγων που πυροδοτεί τη νεοπλασματική εκτροπή.

3. ΠΡΟΛΗΨΗ

Εκτός από την ενημέρωση του πληθυσμού σχετικά με την υγιεινή διατροφή για την πρόληψη καρκίνου του παχέος εντέρου πρέπει τα άτομα ανάλογα με την ομάδα κινδύνου που ανήκουν να υποβάλλονται σε εξετάσεις.

Προτείνεται η κατανάλωση λαχανικών και φρούτων με αντιοξειδωτικές ουσίες και μη επεξεργασμένων δημητριακών.

Οι επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι το φολικό οξύ σε ποσότητα 400 mg ημερησίως μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το ασβέστιο παίζει ρόλο στην καρκινογένεση επειδή είναι αναγκαίο για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης οι προσταγλανδίνες συσχετίζονται με αυξημένο πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη των κυττάρων του εντέρου. Για το λόγω αυτό η ασπιρίνη μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης του κολοορθικού καρκίνου λόγω τροποποίησης των δράσεων των προσταγλανδινών. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα μειώνουν την επίπτωση και επανεμφάνιση των αδενωμάτων. Σε αδενώματα και σε καρκίνο του παχέος εντέρου υπερεκφράζεται η κυκλοοξυγενάση-2 (Cox-2) . Έχει μελετηθεί η χρήση της Cox-2 ως χημειοπροφύλαξη για αδενώματα παχέος εντέρου με θετικά αποτελέσματα. Όμως δε συνιστάται η χρήση των αναστολέων της Cox-2 λόγω αυξημένου κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια.

Μέθοδοι προληπτικού ελέγχου

Σε ασυμπτωματικό πληθυσμό οι μέθοδοι ελέγχου για ανεύρεση πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο στάδιο περιλαμβάνουν:

Δακτυλική εξέταση του εντέρου. Δεν επαρκεί ως μόνη εξέταση επειδή άνω των 90% των βλαβών εντοπίζονται σε υψηλότερο σημείο.

Δοκιμασία ανίχνευσης της αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα (δοκιμασία γουιακόλης, Faecal occult blood test- FOBT). Πριν το τεστ ο ασθενής ακολουθεί ειδική δίαιτα χωρίς κόκκινο κρέας, ασπιρίνη και ΜΣΑΦ, λαχανικά, όπως το μπρόκολο και ραπανάκια. Ο ασθενής συλλέγει 2 δείγματα κοπράνων στο σπίτι. Δυστυχώς η δοκιμασία αυτή δεν μπορεί να δείξει αν το αίμα που ανιχνεύεται στα κόπρανα οφείλεται σε καρκίνο ή σε άλλη καλοήγη κατάσταση, όπως για παράδειγμα οι αιμορροΐδες. Σε ποσοστό 6% των ασθενών με θετικό αποτέλεσμα την πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι έχουν καρκίνο παχέος εντέρου. Επίσης το τεστ δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσει όλους τους καρκίνους παχέος εντέρου επειδή σε μεγάλο ποσοστό οι καρκίνοι αυτοί δεν αιμορραγούν, επιπλέον οι πολύποδες σπάνια αιμορραγούν και επομένως είναι λιγότερο πιθανό να ανιχνευτούν οι πολύποδες. Η χρήση της δοκιμασίας αυτής προτιμάται παράλληλα με άλλες εξετάσεις.

Εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση. Με την σιγμοειδοσκόπηση εξετάζονται τα τελευταία 60 εκατοστά του παχέος εντέρου, όπου συνήθως εντοπίζονται τα 2/3 των πολυπόδων και των καρκίνων. Προ της εξέτασης χορηγείται καθαρτικό. Η εξέταση μπορεί να γίνει στο ιατρείο, είναι σχετικά ανώδυνη εξέταση χωρίς αναισθησία. Ο κίνδυνος κατά τη σιγμοειδοσκόπηση για διάτρηση του εντέρου είναι χαμηλός (2 στα 10.000 περιστατικά). Όμως δεν μπορούν να ανιχνευτούν πολύποδες ή καρκίνος άνω του σιγμοειδούς.

Ακτινογραφία παχέος εντέρου (βαριούχος υποκλυσμός με διπλή αντίθεση). Προ της εξέτασης γίνεται προετοιμασία με υπακτικά και υποκλυσμό. Το σκιαγραφικό (βάριο) χορηγείται εντός του εντέρου με υποκλυσμό, κατόπιν πραγματοποιείται

εμφύσηση αέρα και στη συνέχεια λαμβάνονται ακτινογραφίες. Η εξέταση δεν είναι πολύ ασφαλής και το κυριότερο της μειονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχει δυνατότητα λήψης βιοψιών από τις ύποπτες για κακοήθεια βλάβες.

Κολονοσκόπηση. Προηγείται καθαρισμός του εντέρου με υπακτικό και υποκλυσμό. Η εξέταση πραγματοποιείται με εισαγωγή εύκαμπτου κολονοσκοπίου από το ορθό και υπάρχει δυνατότητα λήψης βιοψίας και αφαίρεσης της βλάβης. Το κυριότερο πλεονέκτημα της εξέτασης είναι ότι διερευνάται όλο το παχύ έντερο.

Εικονική κολονοσκόπηση. Η εξέταση αυτή απεικονίζει το παχύ έντερο με αξονική ή μαγνητική τομογραφία μετά από ανασύνθεση και ανάλυση των εικόνων με ειδικά προγράμματα λογισμικού. Με την εικονική κολονοσκόπηση ανιχνεύεται το 75% των πολυπόδων και ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό καρκινωμάτων παχέος εντέρου, με καλύτερη ευαισθησία για πολύποδες διαμέτρου άνω του ενός εκατοστού.

Προληπτικός έλεγχος ατόμων

Άτομα μέσου κινδύνου.

Σύμφωνα με την American Cancer Society η δευτερογενής πρόληψη αφορά σε άνδρες και γυναίκες ηλικίας 50 ετών και θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα από τα παρακάτω:

- Κολονοσκόπηση ανά 10 έτη
- Δοκιμασία ανίχνευσης της αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα ανά έτος και ορθοσιγμοειδοσκόπηση κάθε 5 έτη
- Ακτινογραφία παχέος εντέρου (βαριούχος υποκλυσμός με διπλή αντίθεση) ανά 5 έτη

Άτομα ομάδας αυξημένου κινδύνου

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ	ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ	ΣΧΟΛΙΑ
ΑΥΞΗΜΕΝΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ			
Άτομα με ένα μικρό αδένωμα <1εκ	3-6 έτη κατόπιν αφαίρεσης του αδενώματος	Κολονοσκόπηση	Εάν φυσιολογική, παρακολουθείται όπως μέσου κινδύνου
Άτομα με ένα μεγάλο αδένωμα ή πολλαπλά αδενώματα ή αδενώματα με μεγάλου βαθμού δυσπλασία	Μετά 3 έτη από την αφαίρεσή τους	Κολονοσκόπηση	Εάν φυσιολογική, τότε επαναλαμβάνεται σε 5 έτη. Εάν πάλι φυσιολογική, τότε παρακολουθείται ως μέσου κινδύνου
Ιστορικό Ca παχέος εντέρου χειρουργηθέν	Εντός έτους κατόπιν του χειρουργείου	Κολονοσκόπηση	Εάν φυσιολογική, τότε επαναλαμβάνεται σε 3 έτη. Εάν πάλι φυσιολογική, τότε επανάληψη ανά 5 έτη
Ca παχέος εντέρου σε οποιοδήποτε με α'βαθμού συγγένεια η σε 2 άτομα β'βαθμού συγγένειας σε οποιαδήποτε ηλικία	40 ετών ή 10 έτη νωρίτερα από την εμφάνιση καρκί- νου παχέος εντέ- ρου σε άτομα α'βαθμού συγγένειας	κολονοσκόπηση	Ανά 5 έτη

ΙΦΝΕ	Αυξημένος κίνδυνος εμφάνησης καρκίνου κατόπιν 8 ετών από την έναρξη της νόσου	Κολονοσκόπηση με βιοψίες για δυσπλασίες	Ανά 1-2 έτη
------	--	---	-------------

Άτομα ομάδας κληρονομικού υψηλού κινδύνου

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ	ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ	ΣΧΟΛΙΑ
ΑΥΞΗΜΕΝΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ			
Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση	Εφηβεία	Σιγμοειδοσκόπηση ανά έτος και γενετικός γονιδιακός έλεγχος	Εάν ο γονιδιακός έλεγχος είναι θετικός, τότε συνιστάται κολεκτομή
Κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος παχέος εντέρου	21 ετών	Κολονοσκόπηση και γονιδιακός έλεγχος	Εάν ο γονιδιακός έλεγχος είναι θετικός ή δεν έγινε γονιδιακός έλεγχος, κολονοσκόπηση κάθε 1-2 έτη έως την ηλικία των 40, μετά ανά έτος

ΓΕΝΕΤΙΚΗ και ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η διαδικασία εκτίμησης ενός ατόμου με υποψία κληρονομικού καρκίνου αρχίζει με τη λήψη οικογενειακού ιστορικού και την πιστοποίηση των ιστολογικών εξετάσεων.

Για να προχωρήσει κανείς σε γενετικό έλεγχο πρέπει να προηγηθεί γενετική συμβουλευτική και λήψη συγκατάθεσης. Η διάγνωση ενός συγκεκριμένου κληρονομικού συνδρόμου δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί χωρίς την ανεύρεση μιας μετάλλαξης, που αδρανοποιεί ένα γονίδιο, το οποίο είναι γνωστό ότι προκαλεί το σύνδρομο. Αν βρεθεί μια τέτοια μετάλλαξη τότε οι υπόλοιποι συγγενείς μπορούν να ελεγχθούν ακόμα και αν είναι ασυμπτωματικοί. Σχεδόν όλα τα γονίδια που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα.

Διάφορα γονίδια εμπλέκονται στην παθογένεια συνδρόμων που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου όπως αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα:

Κληρονομικό Σύνδρομο	Χρωμόσωμα	Γονίδιο
Familial adenomatous polyposis	5q21	APC
Juvenile polyposis	10q22	BMPR1A
	10q23	PTEN
	18q21	SMAD4
Cowden syndrome	10q23	PTEN
Peutz-Jeghers syndrome	19p13	STK11

Hereditary mixed polyposis	6q	Unknown
Hereditary nonpolyposis colon cancer	2p22	MSH2
	3p21	MLH1
	2q31	PMS1
	7p22	PMS2
	14q24	MLH3(15)

Απαιτείται προσοχή στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων των μοριακών εξετάσεων, καθώς μπορεί να υπάρχουν λάθη, όπως η λανθασμένη διάγνωση του κλινικού συνδρόμου, ανακριβές οικογενειακό ιστορικό ή ακόμα και λανθασμένο δείγμα.

4. ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η κλινική εικόνα του ορθοκολικού καρκίνου εξαρτάται κυρίως από την εντόπισή του. Καρκίνος στο τυφλό, ανιόν ή εγκάρσιο κόλο συνήθως εμφανίζεται με συμπτώματα υπόχρωμης μικροκυτταρικής αναιμίας, δηλαδή εύκολη κόπωση, δύσπνοια, στηθάγχη. Αργότερα μπορούν να εμφανιστούν άτυπα κοιλιακά συμπτώματα έως και ψηλαφητή μάζα. Σπάνια παρατηρείται απόφραξη του εντέρου.

Συνήθως η πρώτη εκδήλωση του καρκίνου στο κατίον, σιγμοειδές ή ορθό είναι διαταραχές κενώσεων (δυσκοιλιότητα και/ή διάρροιες) και σημεία απόφραξης (κωλικοειδές κοιλιακό άλγος). Οι διάρροιες οφείλονται στην περιοδική διαφυγή μικρών ποσοτήτων υδαρών κοπράνων πέραν του σημείου στένωσης από τον όγκο (ψευδοδιάρροιες). Επίσης μπορεί να εμφανιστεί απώλεια ερυθρού αίματος στα κόπρανα, αιματοχεσία, πλήρης απόφραξη και διάτρηση του εντέρου. Καρκίνοι του ορθοσιγμοειδούς σε προχωρημένα στάδια μπορούν να διηθούν γειτονικά όργανα (ουροδόχος κύστη, κόλπος) ή νέυρα στην ελάσσονα πύελο και να εκδηλωθούν με τα συμπτώματα από τα όργανα αυτά, επίσης με πόνο στο περίνεο και την ιερά χώρα. Τεινισμός συνοδεύει συχνά τον καρκίνο του ορθού.

Συχνά ο ορθοκολικός καρκίνος αναπτύσσεται βραδέως και παραμένει χωρίς συμπτώματα για χρόνια και πολλές φορές η μόνη εκδήλωσή του είναι η υποκλινική απώλεια αίματος. Πολλά από τα συμπτώματα του δεν είναι ειδικά και αποδίδονται σε καλοήθεις καταστάσεις που συνυπάρχουν, όπως οι αιμορροΐδες (αίμα στα κόπρανα) ή ευερέθιστο έντερο και εκκολπωμάτωση (διαταραχές κενώσεων, κοιλιακό άλγος) με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της διάγνωσης του καρκίνου. Σε

ασθενείς ηλικίας άνω των 40 ετών με σιδηροπενική αναιμία, αίμα στα κόπρανα και πρόσφατη έναρξη κοιλιακού άλγους ή διαταραχών κενώσεων πάντοτε η διαφορική διάγνωση πρέπει να περιλαμβάνει τον ορθοκολικό καρκίνο.

Εργαστηριακά ευρήματα

Τα συνήθη εργαστηριακά ευρήματα δεν είναι ειδικά της νόσου. Συνήθως υπάρχει εικόνα υπόχρωμης, μικροκυτταρικής αναιμίας στη γενική εξέταση αίματος. Από τον βιοχημικό έλεγχο μπορεί να παρατηρείται αύξηση τρανσαμινασών και χολοστατικών ενζύμων σε περίπτωση ηπατικών μεταστάσεων. Οι καρκινικοί δείκτες CEA και Ca 19-9 χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη αλλά έχει σχετικά χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα και πολύ χαμηλή προγνωστική αξία στον έλεγχο ασυμπτωματικών ατόμων.

5. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ

Η διαγνωστική προσπέλαση είναι σχετικά ευχερής σε άτομα με υποψία κολοορθικού καρκίνου. Μέθοδος εκλογής είναι η κολονοσκόπηση γιατί α) έχει καλύτερη ευαισθησία για αποκάλυψη μικρών νεοπλασμάτων, β) παρέχει τη δυνατότητα για άμεση λήψη βιοψιών και ιστολογική επιβεβαίωση της νεοπλασίας και γ) επιτρέπει την ανίχνευση και ταυτόχρονη ενδοσκοπική αφαίρεση άλλων προκαρκινικών βλαβών (αδενωμάτων).

6. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διαφορική διάγνωση πριν από τη διενέργεια κολονοσκόπησης εξαρτάται από το προβάλλον σύμπτωμα.

1. Απόφραξη του παχέος εντέρου λόγω στένωσης μπορεί να συνοδεύει ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (νόσο Crohn), ισχαιμική κολίτιδα και μετακτινική κολίτιδα.
2. Απώλεια αίματος από το ορθό εμφανίζεται και σε εκκολπωμάτωση, ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, λοιμώδη κολίτιδα, ισχαιμική κολίτιδα, αιμορροειδοπάθεια και μονήρες έλκος ορθού.
3. Κοιλιακό άλγος συχνά συνοδεύει ευερέθιστο έντερο, εκκολπωματίτιδα, ισχαιμική κολίτιδα και ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.
4. Διαταραχές των κενώσεων μπορεί να οφείλονται σε ευερέθιστο έντερο, φάρμακα, ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και λοιμώδη αίτια.
5. Κοιλιακή μάζα μπορεί να οφείλεται σε καλόγητες νεόπλασμα ή να είναι απότοκος εντερικών φλεγμονών (εκκολπωματώσεως, ιδιοπαθούς

φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, ισχαιμικής κολίτιδας ή ειδικών λοιμωδών κολίτιδων – φυματίωση, αμοιβάδωση κλπ.)

7. ΠΟΡΕΙΑ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η πορεία των ασθενών με κολοορθικό καρκίνο εξαρτάται κυρίως από α) το στάδιο, β) ιστολογικά χαρακτηριστικά του, γ) τη μορφολογία του, δ) τη διήθηση αγγείων και νεύρων, ε) την παρουσία και το είδος συμπτωμάτων, ζ) την εντόπιση του όγκου, η) την ηλικία, θ) τα προεγχειρητικά επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου και ι) γενετικούς δείκτες.

Χειρότερη πρόγνωση έχουν οι όγκοι, που εκδηλώνονται με πλήρη απόφραξη ή διάτρηση εντέρου, ενώ οι ασυμπτωματικοί ασθενείς ή ασθενείς με απώλεια αίματος από το ορθό έχουν καλύτερη πρόγνωση.

Ο καρκίνος του ορθού έχει τη χειρότερη πρόγνωση λόγω συχνών τοπικών υποτροπών, επίσης ο καρκίνος δεξιού κόλου έχει δυσμενέστερη πρόγνωση από τον καρκίνο αριστερού κόλου.

Οι ασθενείς ηλικίας κάτω των 30 ετών έχουν χειρότερη πρόγνωση.

Υψηλά επίπεδα CEA σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση.

Μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 18q, p53, DCC και/ή ανευπλοειδία επιδεινώνουν την πρόγνωση.

8. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου ταξινομείται σύμφωνα με το σύστημα TNM και κατά Dukes

. TNM σύστημα σταδιοποίησης

T umour (όγκος), N ode (λεμφαδένες), M etastases (μεταστάσεις).

- T περιγράφει το μέγεθος του όγκου και το κατά πόσο έχει εξαπλωθεί στο τοίχωμα του εντέρου.
- N περιγράφει το εάν και κατά πόσον ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες.
- M περιγράφει το εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε ένα άλλο όργανο του σώματος, όπως το ήπαρ ή στους πνεύμονες (μεταστατικός καρκίνος).

Όγκος

-Tis: καρκίνωμα in situ (αποκλειστικά στον βλεννογόνο)

-T1: επέκταση της διήθησης έως τον υποβλεννογόνιο χιτώνα.

-T2: επέκταση της διήθησης έως τον μυϊκό χιτώνα.

-T3: επέκταση της διήθησης έως τον ορογόνο ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος
επέκταση προς τους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς

-T4a: ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο

- T4β: ο όγκος διηθεί κατ' επέκταση άλλα όργανα

Λεμφαδένες

-N0: δεν υπάρχει μετάσταση σε επιχώριους (τοπικούς) λεμφαδένες

-N1: μετάσταση σε 1-3 επιχώριους λεμφαδένες

-N2: μετάσταση σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες

N2a: σε 4 με 6 λεμφαδένες

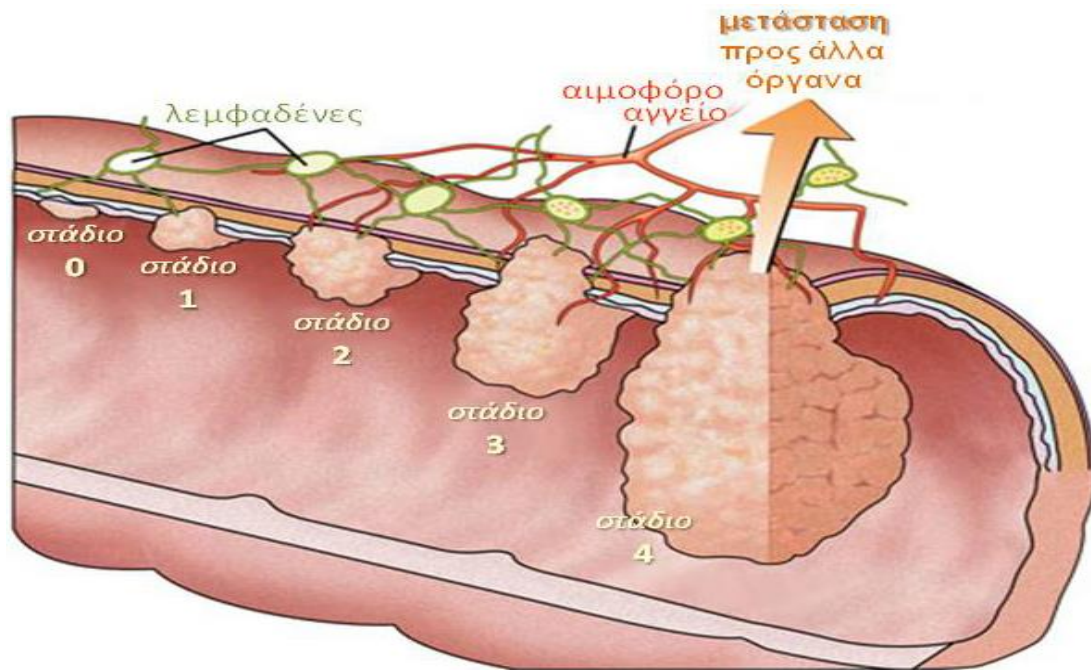
N2b: σε 7 ή περισσότερους λεμφαδένες

Μεταστάσεις

-M0: δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

-M1: υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

Clinical Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
IIIB	T3-T4	N1	M0
IIIC	Any T	N2	M0
IV	Any T	Any N	M1



Εικ.3.Σταδιοποίηση του καρκίνου παχέος εντέρου.

Το σύστημα σταδιοποίησης κατά Dukes

Στάδιο Α περιλαμβάνονται οι όγκοι που διηθούν έως και τμήμα του μυϊκού χιτώνα,

Στάδιο Β οι όγκοι που διηθούν όλο το μυϊκό χιτώνα και τον ορογόνο και επεκτείνονται πέραν αυτού στο περιτολικό λίπος,

Στάδιο C οι όγκοι που έχουν διηθήσει λεμφαδένες του μεσεντερίου και

Στάδιο D ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε ένα άλλο όργανο του σώματος όπως το ήπαρ ή τους πνεύμονες (μεταστατικός καρκίνος)

9. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

9.1 Χειρουργική αντιμετώπιση

Η χειρουργική αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου χωρίζεται σε θεραπευτική και παρηγορητική. Στην πρώτη περίπτωση της θεραπευτικής προσέγγισης, σκοπός είναι η πλήρης απομάκρυνση της νόσου από το σώμα και ίαση του ασθενούς. Στην δεύτερη περίπτωση, αυτή της παρηγορητικής προσέγγισης, λόγω απομακρυσμένων μεταστάσεων που δέν εξαιρούνται με ασφάλεια ή τοπικά προχωρημένης νόσου, εκτελείται μια επέμβαση παράκαμψης ώστε να αποκατασταθεί η συνέχεια του πεπτικού σωλήνα. Έτσι αποφεύγεται ένας μελλοντικός αποφρακτικός ειλεός από ένα όγκο που φράσσει μερικώς τον αυλό του εντέρου. Σε αυτήν την κατηγορία, της παρηγορητικής προσέγγισης, ανήκει και η συμπληρωματική στην χημειοθεραπεία εκτομή όσο το δυνατόν περισσότερου παθολογικού ιστού (ογκομειωτική επέμβαση).

Η χειρουργική προσέγγιση σε έναν ασθενή με καρκίνο του παχέος εντέρου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι σημαντικότεροι είναι η ηλικία του ασθενούς, η γενική του κατάσταση, οι διάφορες συνοδές παθήσεις που μπορεί τυχόν να κάνουν δύσκολη την αναισθησία, η επιθυμία του ασθενούς να χειρουργηθεί, η εντόπιση του όγκου και η τοπική του επέκταση, η παρουσία ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων και η εξαιρεσιμότητα αυτών.

Πριν από την χειρουργική επέμβαση είναι απαραίτητος ένας καλός μεταστατικός έλεγχος. Η καλή κλινική εξέταση μπορεί να αποκαλύψει ηπατομεγαλία, ασκίτη ή

ψηλαφητούς λεμφαδένες. Ο απεικονιστικός έλεγχος είναι απαραίτητος για τη ανάδειξη τυχόν μεταστάσεων. Η ακτινογραφία θώρακος μπορεί να αποκαλύψει πνευμονικές μεταστάσεις. Ο υπερηχογραφικός έλεγχος της κοιλιάς μπορεί να αποκαλύψει ηπατικές μεταστάσεις και ασκίτη. Η λήψη βιοψιών υπό υπερηχογραφικό έλεγχο από ηπατικά μορφώματα είναι δυνατή για την ιστολογική ταυτοποίηση και αποκλεισμό δευτεροπαθών εντοπίσεων. Απαραίτητος στις ημέρες μας είναι ο έλεγχος με αξονική τομογραφία. Αυτή η εξέταση μπορεί να αναδείξει ηπατικές μεταστάσεις με ακρίβεια, χαρακτηρίζοντας τον αριθμό και την ακριβή θέση τους καθώς και η σχέση τους με τα μεγάλα αγγεία και χοληφόρα. Η παρουσία αυτών των μεταστάσεων που κάποτε έκριναν ανεγχείρητο έναν καρκίνο του παχέος εντέρου σήμερα λόγω της αναλυτικής απεικόνισης και περιγραφής τους από την αξονική τομογραφία μπορούν πολλές φορές να εξαιρεθούν με ασφάλεια και να συμβάλλουν στο θεραπευτικό στόχο μίας επέμβασης. Πέραν των ηπατικών μεταστάσεων η αξονική τομογραφία μπορεί να απεικονίσει περιτοναϊκές εμφυτεύσεις και ασκитική συλλογή εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας που μπορούν τελικά να κρίνουν μη εξαιρέσιμο έναν όγκο. Η τοπική επέκταση του όγκου μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια και η τυχόν διήθηση του όγκου γειτονικών οργάνων μπορεί να απεικονισθεί. Η μαγνητική τομογραφία απεικονίζει επίσης με μεγάλη ακρίβεια το ηπατικό παρέγχυμα με ελαφρώς ανωτερότητα της αξονικής τομογραφίας. Λόγω υψηλού κόστους όμως δεν περιλαμβάνεται στον συνηθισμένο προεγχειρητικό έλεγχο του καρκίνου του παχέος εντέρου. Σημαντική θέση όμως έχει όταν ο όγκος ανευρίσκεται στο όρθό όπου η ανωτερότητα της στην απεικόνιση της τοπικής επέκτασης του όγκου και η σχέση του όγκου με τα γειτονικά όργανα είναι δεδομένη. Ο ενδοσκοπικός υπέρηχος έχει γίνει σημαντικό εργαλείο στην

εκτίμηση των σχέσεων ενός όγκου του ορθού με τους σφιγκτήρες και τα άλλα γειτονικά όργανα όπως ο προστάτης, η μήτρα και οι σπερματικές κύστεις. Σημαντική βοήθεια μπορεί να προσφέρει ο ενδοσκοπικός υπέρηχος επίσης στη περίπτωση των ηπατικών μεταστασεων που δέν προσφέρονται για διαδερμική βιοψία και η έκθεσή τους με αυτήν την μέθοδο είναι καλύτερη. Ο έλεγχος για απομακρυσμένες μεταστάσεις μπορεί να συμπληρωθεί με PET-CT.

Ο στόχος του χειρουργού όταν εκτελεί μια θεραπευτική επέμβαση σε ένα πρωτοπαθές όγκο του παχέος εντέρου είναι η εκτομή ενός χειρουργικού παρασκευάσματος, σε ένα συνολικό τεμάχιο (en bloc), το οποίο περιλαμβάνει ολόκληρο τον όγκο με ικανό μήκος φυσιολογικού εντέρου κεντρικά και περιφερικά του, ικανά πλάγια όρια σε περίπτωση εξωαυλικής επέκτασης του όγκου, και ικανής ποσότητας λεμφαγγειακού ιστού που να περιλαμβάνει τους επιχώριους λεμφαδένες. Εάν επιτευχθεί αυτός ο στόχος η πιθανότητα τοπικής υποτροπής της νόσου μειώνεται σημαντικά.

Τα όρια της εκτομής και το μήκος του φυσιολογικού εντέρου που πρέπει να αφαιρεθούν έχουν υπάρξει θέμα συζητήσεων για πολλά χρόνια. Σε πολλές παθολογοανατομικές έρευνες σε πτώματα σπανίως αναφέρεται η επέκταση του όγκου ενδοτοιχωματικά πέραν των δύο εκατοστών. Για τον λόγο αυτό, παραδοσιακά “ασφαλή όρια” θεωρούνται τα πέντε εκατοστά κεντρικά και περιφερικά του όγκου. Στην πραγματικότητα τα όρια εκτομής θα κριθούν από τον βαθμό του λεμφαδενικού καθαρισμού. Τα λεμφογάγγλια που ωφείλουν να αφαιρεθούν είναι αυτά που ανευρίσκονται κατά μήκος των τροφοφόρων αγγείων που αδρεύουν το τμήμα του εντέρου που βρίσκεται ο όγκος. Σε περίπτωση που ο

όγκος βρίσκεται ανάμεσα από περιοχές που αδρεύονται από ξεχωριστά αγγεία, είναι στην κρίση του χειρουργού εάν και οι δύο περιοχές θα πρέπει να αφαιρεθούν ή όχι. Η εκτεταμένες εκτομές με αφαίρεση οπισθοπεριτοναϊκών λεμφογάγγλιων έχει ελάχιστο ογκολογικό όφελος αλλά προσθέτει σημαντικά στην μετεγχειρητική θνησημότητα και θνητότητα.

Η προετοιμασία του εντέρου με καθαρτικά και η προεγχειρητική χορήγηση αντιβιοτικών κλασσικά ήταν απαραίτητο κομμάτι της προετοιμασίας για το χειρουργείο. Μετά από πολλές συζητήσεις και μελέτες αποδείχθηκε ότι ήταν ασφαλής η κολεκτομή χωρίς εντερική προετοιμασία. Η θεωρία αυτή όμως ανατράπηκε μετά από πρόσφατη εθνική μελέτη στις Η.Π.Α. η οποία συμπεραίνει ότι η μηχανική προετοιμασία και η προεγχειρητική χορήγηση αντιβιοτικών μειώνουν σημαντικά την θνησημότητα.

Κατά την διάρκεια του χειρουργείου πρέπει να γίνεται ένας καλός έλεγχος ολόκληρης της περιτοναϊκής κοιλότητας. Το ήπαρ πρέπει να ελέγχεται επιμελώς για τυχόν μεταστάσεις που δέν απεικονίστικαν στον προεγχειρητικό έλεγχο. Η ανεύρεση ασκτικής συλλογής είναι πολλές φορές ενδεικτικό πυλαίας υπέρτασης λόγω παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων. Ολοκληρη η περιτοναϊκή κοιλότητα πρέπει να ελέγχεται για περιτοναϊκές εμφυτεύσεις με επιμελή έλεγχο όλων των σπλάγχχνων και του κοιλιακού τοιχώματος εκ των έσω. Η διήθηση του όγκου γειτονικών οργάνων πρέπει να αποκλεισθεί πριν την εξαίρεση. Σε περίπτωση διήθησης, το όργανο που διηθείται μπορεί να αφαιρεθεί και αυτό, μερικώς ή και ολόκληρο, το οποίο θα το κρίνει ο χειρουργός διεχειρητικά. Έτσι σε περίπτωση διήθησης ενός όγκου του κοιλιακού τοιχώματος, μπορεί να αφαιρεθεί αυτό το

τμήμα μαζί με τον όγκο. Σε παρόμοιες περιπτώσεις μπορεί ο πρωτοπαθής όγκος να διηθεί (κατά συνέχεια με τον όγκο) το λεπτό έντερο, το επίπλουν, τους ουρητήρες, τα νεφρά, τον σπλήνα, το πάγκρεας, το δωδεκαδάκτυλο, το στομάχι, τη χοληδόχο κύστη, το ήπαρ, τη μήτρα, τις ωοθήκες, τον προστάτη, και την ουροδόχο κύστη.

Η χειρουργική εκτομή όγκων του παχέος εντέρου σε διάφορες εντοπίσεις επιβάλλει προσοχή σε ανατομικές λεπτομέρειες. Η εκτομή του όγκου και αναστόμωση των εναπομείναντων άκρων του εντέρου σε ένα χρόνο είναι η επέμβαση εκλογής σε όγκους του παχέος εντέρου και του ανώτερου ορθού. Οι τεχνικές της αναστόμωσης ποικίλουν και είναι στην προτίμηση του χειρουργού ποία θα εκτελεστεί. Παραδοσιακά οι αναστομώσεις κατασκευάζονταν στο χέρι με ραφές από διάφορα υλικά. Από την δεκαετία του 90 και μετά, επήλθε μια τεχνολογική επανάσταση με την εισαγωγή στη χειρουργική του παχέος εντέρου των αυτόματων κοπτορράπτων (staplers). Η αναστόμωση γινόταν σε λιγότερο χρόνο και σε σημεία που προηγουμένως θεωρούνταν τεχνικά δύσκολα (2 κατώτερα τριτημόρια ορθού). Το κόστος αυτής της τεχνικής προφανώς εκτοξεύεται. Πολλοί χειρουργοί σήμερα χρησιμοποιούν την κλασσική μέθοδο της αναστόμωσης “στο χέρι”.

Όγκοι του τυφλού και του ανιόντος κόλου αντιμετωπίζονται με δεξιά ημικολεκτομή. Η απολίνωση των ειλεοκολικών, των δεξιών κολικών και των δεξιών κλάδων των μέσων κολικών αγγείων είναι απαραίτητη. Σε περιπτώσεις όγκων της δεξιάς (ηπατικής) καμπής, απολινώνεται και τα μέσα κολικά αγγεία (εκτεταμένη δεξιά κολεκτομή). Ο χειρουργός πρέπει να είναι προσεκτικός στην κινητοποίηση του εντέρου λόγω κοντινής απόστασης σημαντικών οργάνων που μπορούν ενδεχομένως να τραυματιστούν όπως ο δεξιός ουρητήρας, το δωδεκαδάκτυλο, η κάτω κοίλη

φλέβα, τα σπερματικά αγγεία και τα άνω μεσεντέρια αγγεία. Στη συνέχεια δημιουργείται μία ειλεο-εγκαρσία αναστόμωση για την αποκατάσταση της συνέχειας του γαστρεντερικού σωλήνα.

Για όγκους του εγκαρσίου κόλου, η εγκαρσιεκτομή ενδείκνεται με απολίνωση των μέσων κολικών αγγείων. Ο καρκίνος της αριστερής (σπληνικής) καμπής μπορεί να αντιμετωπισθεί με τμηματική εκτομή απολινώνοντας τα αριστερά κολικά αγγεία, αφήνοντας τα μέσα κολικά αγγεία. Αναστομόνεται το περιφερικό εγκάρσιο κόλον με την μεσότητα του κατιόντος κόλου. Πολλή προσοχή από τον χειρουργό απαιτείται σε αυτήν την περίπτωση ώστε να αποφευχθεί τραυματισμός του σπληνός, του αριστερού νεφρού και της ουράς του παγκρέατος.

Η αριστερή κολεκτομή έχει ένδειξη σε όγκους του κατιόντος κόλου. Σε αυτήν τη επέμβαση αφαιρείται η περιοχή του παχέος εντέρου από την μεσότητα του εγκαρσίου κόλου έως το άπω σιγμοειδές κόλον. Η υψηλή απολίνωση των κάτω μεσεντέρων αγγείων είναι απαραίτητη για να υπάρχει καλό ογκολογικό αποτέλεσμα. Για όγκους του σιγμοειδούς κόλου, θέση έχει και η τμηματική εκτομή με απολίνωση των αντίστοιχων σιγμοειδικών αγγείων κοντά στην έκφυσή τους. Η αναστόμωση θα γίνει μεταξύ του εγκαρσίου με το απώτερο σιγμοειδές ή ανώτερο ορθό.

Για όγκους του ανώτερου ορθού η κατάλληλη επέμβαση είναι η πρόσθια εκτομή ορθού με την διάνοιξη του περιτοναίου στην ανάκαμψή του στην πύελο και η παρασκευή του εντέρου κυκλωτερώς, απολινώνοντας και τα μέσα αιμορροϊδικά αγγεία. Κεντρικά η απολίνωση των αγγείων γίνεται στο ύψος των σιγμοειδικών

αγγείων. Η αναστόμωση γίνεται ανάμεσα στο περιφερικό σιγμοειδές κόλον και την μεσότητα του ορθού.

Για όγκους της μεσότητας του ορθού η χαμηλή πρόσθια εκτομή με τελικο-τελική κολο-πρωκτική αναστόμωση είναι η επέμβαση εκλογής. Τα χειρουργικά όρια είναι ίδια με την προηγούμενη επέμβαση με την μόνη διαφορά στα κατώτερα όρια εκτομής του ορθού. Η εμφάνιση των κυκλικών αυτόματων κοπτορράπτων έχει φέρει την επανάσταση στην επέμβαση αυτή κάνοντας αυτήν την αναστόμωση που κάποτε την θεωρούσαν και οι πιο έμπειροι χειρουργοί ως μεγάλου βαθμού δυσκολίας, επέμβαση ρουτίνας ακόμα και σε μικρότερα κέντρα. Επίσης η θεωρία της ολικής εκτομής το μεσο-ορθού (Total Mesorectal Excision TME), έχει αλλάξει κατά πολύ την προσέγγιση του χειρουργού στον καρκίνο του ορθού. Η τεχνική αυτή η οποία συμπεριλαμβάνει την εκτομή της σύντηξης των προϊερών περιτονιών με το περοτόναιο που καλύπτει το ορθό στην οπίσθια επιφάνειά του έχει γίνει αναπόσπαστο κομμάτι αυτής της επέμβασης, η οποία θεωρείται ατελής χωρίς την εκτομή αυτή. Η τεχνική αυτή έχει αποδειχθεί ότι μειώνει κατά μεγάλο ποσοστό τις τοπικές υποτροπές και μπορεί να θεωρηθεί πως “κάνει την δουλειά της χημειοθεραπείας” στον έλεγχο της τοπικής νόσου.

Ο καρκίνος του κατώτερου ορθού, δηλαδή έως 4 εκατοστά από τον πρωκτικό δακτύλιο αντιμετωπίζεται με κοιλιοπερινεϊκή εκτομή με μόνιμη κολοστομία. Η επέμβαση αυτή γίνεται με τον ασθενή σε θέση λιθοτομής και σε δύο χρόνους, ένας κοιλιακός και ένας περινεϊκός. Στον κοιλιακό χρόνο, αφού ανοιχθεί το περιτόναιο στην ανάκαμψή του, παρασκευάζεται το όρθο κυκλωτερώς έως τον πυθμένα της πύελου, τον ανελκτήρα μυ του ορθού. Ακολουθεί περινεϊκός χρόνος με τομή

ρομβοειδής με κέντρο το πρωκτό. Παρασκευάζεται ο κυταρολιπώδης ιστός πέριξ του ορθοπρωκτικού σωλήνα έως που θα συναντηθεί με την κοιλιακή εκτομή. Το σφηγκτηριακό σύστημα θυσιάζεται σε αυτήν την περίπτωση και η πύελος μένει χωρίς περιεχόμενο στο οπίσθιο τμήμα. Η επέμβαση αυτή η οποία είναι και ακρωτηριαστική, έχει πολλές πιθανές διεγχειρητικές επιπλοκές, λόγω της γειτνίασης άλλων οργάνων όπως ο προστάτης και η ουροδόχος κύστη στον άνδρα και τον κόλπο, την μήτρα και η ουροδόχος κύστη στη γυναίκα. Γίνεται προσπάθεια να κλεισθεί το περιτόναιο στην ανάκαμψή του ώστε να συγκρατεί τις έλικες του λεπτού εντέρου εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας. Έτσι προστατεύεται το λεπτό έντερο σε πιθανή μελλοντική ακτινοβολία από την δημιουργία ακτινικής εντερίτιδας, μιας νόσου που συνοδεύει συχνά αυτές τις περιπτώσεις. Η κοιλότητα που παραμένει στο τέλος αυτής της εκτομής παροχετεύεται, συχνά με κλειστές παροχετεύσεις κενού. Παρ'όλα αυτά πολύ συχνά αυτή η περιοχή δεν έχει καλή επούλωση και φέρει μαζί της μεγάλη θνησημότητα από επιπλοκές. Η ακτινοβολία που συχνά ακολουθεί συμβάλλει στην καθυστερημένη επούλωση.

Οι 3 αρχές για τη δημιουργία μιας καλής αναστόμωσης είναι η καλή αιμάτωση των 2 άκρων του εντέρου που αναστομώνονται, να μην υπάρχει τάση μεταξύ των 2 άκρων, και να μην υπάρχει εκτροφή του βλεννογόνου στη γραμμή συρραφής. Πολλές φορές, όταν μία αναστόμωση θεωρηθεί επισφαλής, δηλαδή οι πιθανότητες να υποστεί ρήξη όταν περάσει από αυτή εντερικό περιεχόμενο, δημιουργείται μία προσωρινή προφυλακτική στομία κεντρικότερα της αναστόμωσης, με σκοπό την επούλωση της αναστόμωσης σε συνθήκες ηρεμίας, χωρίς δηλαδή να διέρχεται διά αυτής εντερικό περιεχόμενο, και να είναι ουσιαστικά μη λειτουργική. Η

αποκατάσταση της συνέχειας του πεπτικού σωλήνα γίνεται με δεύτερη επέμβαση μετά από 3-6 μήνες . Μία αναστόμωση θεωρείται επισφαλής όταν η αιμάτωσή της δεν είναι καλή όπως στην περίπτωση που βρίσκεται πολύ κοντά στην οδοντωτή γραμμή όπου η αιμάτωση είναι φτωχή λόγω απολίνωσης των μέσων αιμορροϊδικών αγγείων. Άλλοι παράγοντες που κάνουν μία αναστόμωση επισφαλής είναι άμα δημιουργείται σε περιβάλλον φλεγμονής. Άν έχει υποστεί ρήξη ένας προχωρημένος όγκος και έχει δημιουργηθεί απόστημα στην περιοχή, το περιβάλλον δεν ευνοεί την καλή επούλωση μιας αναστόμωσης.

Οι προφυλακτικές στομίες είναι 2 ειδών, ειλεοστομίες και κολοστομίες. Η ειλεοστομία έχει μεγαλύτερη θνησιμότητα λόγω αποβολής μεγάλης ποσότητας υδαρού περιεχομένου καθημερινά και αυξημένες ανάγκες σε υγρά και ηλεκτρολύτες. Αφυδάτωση και ηλεκτολυτικές διαταραχές είναι συχνές. Η κολοστομία είναι προτιμότερη διότι δεν συνοδεύεται από αυτές τις επιπλοκές. Το περιεχόμενο της κολοστομίας είναι συνήθως πιο στερεό. Η επέμβαση της επανασύνδεσης του εντέρου ή αποκατάσταση της συνέχειας του πεπτικού μπορεί να γίνει σε 3-6 μήνες από το πρώτο χειρουργείο. Η χημειοθεραπεία και η θεραπευτική ακτινοβολία πολλές φορές αναβάλλουν το χειρουργείο αυτό για περισσότερο χρόνο. Όταν δέν είναι δυνατόν να γίνει μία αναστόμωση, όπως για παράδειγμα στην κοιλιοπερινεϊκή εκτομή, η κολοστομία ονομάζεται μόνιμη.

Όταν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις, μονήρης ή πολλαπλές, πρέπει να γίνεται σωστός απεικονιστικός έλεγχος για την αναζήτηση της εξαιρεσιμότητάς τους. Πριν από κάποια χρόνια οι ηπατικές και η πνευμονικές μεταστάσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου έκριναν τον όγκο ανεγχείρητο και ο

ασθενής προχωρούσε σε παρηγορητική χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Αργότερα σε πολλά εξειδικευμένα κέντρα ξεκίνησε η εκτομή ηπατικών μεταστάσεων (μεταστεκτομή) από έμπειρους χειρουργούς ήπατος. Ομοίως, οι θωρακοχειρουργοί εφαρμόζαν πνευμονικές λοβεκτομές για την εξαίρεση πνευμονικών μεταστάσεων. Οι κατευθυντήριες οδηγίες για την μεταστεκτομή έχουν αλλάξει πολλές φορές τα τελευταία χρόνια αλλά οι τελευταίες οδηγίες του NCCN για το 2016 θέτουν ένδειξη για μεταστεκτομή όταν όγκος μπορεί να εξαιρεθεί πλήρως, με επαρκές εναπομείναντα λειτουργικό ηπατικό παρέγχυμα. Αυτό συμπεριλαμβάνει σε ορισμένες περιπτώσεις πολλαπλών μεταστάσεων, μεγάλες ηπατεκτομές πολλών ηπατικών τμημάτων με υπολλειπόμενα μόνο ελάχιστα ηπατικά τμήματα για την απαραίτητη ηπατική λειτουργία. Μπορεί να γίνει συνδυασμένη κολεκτομή και μεταστεκτομή σε μία επέμβαση ή σε στάδια. Σε περιπτώσεις που το υπολοιπόμενο ηπατικό παρέγχυμα μετά από ηπατεκτομή δεν επαρκεί για την σωστή ηπατική λειτουργία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εμβολισμός της πυλαίας φλέβας ή κατάλυση με μικροκύματα (RF ablation) διαδερμικά ή διεγχειρητικά των μεταστάσεων. Μπορεί επίσης να γίνει προεγχειρητική χημειοθεραπεία ή και ακτινοθεραπεία (neoadjuvant) και εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου και των ηπατικών μεταστάσεων.

Στις περιπτώσεις που ο αρχικός όγκος είναι μη εξαιρέσιμος λόγω διήθησης γειτονικών οργάνων ή η νόσος είναι μεταστατική και οι μεταστάσεις δεν αφαιρούνται, μπορεί να ακολουθήσει ένα χειρουργείο παρηγορητικό. Αυτό μπορεί να συμπεριλάβει μία παράκαμψη του όγκου για την αποφυγή μελλοντικής απόφραξης. Σε άλλες περιπτώσεις συνιστάται η εκτομή του όγκου με όσο το δυνατόν περισσότερο παρακείμενο διηθημένο ίστο σε προσπάθεια ογκομειωτικής

κυττάρων. Σε άλλες περιπτώσεις δημιουργείται μια κολοστομία κεντρικά του όγκου χωρίς καμία παρέμβαση στον όγκο. Πολλές φορές επιλέγεται να μην χειρουργηθεί ο ασθενής και τοποθετείται αυτοδιατεινόμενη ενδοπρόθεση (colonic stent) ώστε να παραμείνει ο αυλός του εντέρου ανοιχτός και να αποφεύγεται ο αποφρακτικός ελβεός.

9.2 Ογκολογική προσέγγιση

1. Συμπληρωματική χημειοθεραπεία .

Η συμπληρωματική χημειοθεραπεία βελτιώνει την κλινική έκβαση των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του παχέος εντέρου και, ως εκ τούτου, ενδείκνυται μετεγχειρητικά σε ασθενείς με νόσο σταδίου III, αλλά και υψηλού κινδύνου για υποτροπή σταδίου II. Η χημειοθεραπεία πρέπει να ξεκινά 3 έως 5 εβδομάδες μετά το χειρουργείο.

Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες στην συμπληρωματική χημειοθεραπεία.

α) 5-φθοριοουρακίλη

Η προσθήκη της λευκοβορίνης ενδοφλεβίως σταθεροποιεί τη σύνδεση του αντιμεταβολίτη 5-FU με τη θυμιδική συνθετάση, ενισχύοντας την αναστολή της σύνθεσης του DNA. Η χορήγηση μετεγχειρητικά 5-FU σε συνδιασμό με leucovorin ως συμπληρωματικής χημειοθεραπείας έχει παρουσιάσει σημαντική βελτίωση της πενταετούς επιβίωσης έναντι μόνο της χειρουργικής αντιμετώπισης, όπως και ελάττωση της πιθανότητας υποτροπής κατά 41% και της συνολικής θνησιμότητας κατά 33% με διάρκεια χορήγησης 6 μήνες.

Η από του στόματος χορηγούμενη καπεσιταμπίνη είναι φθοριοπυριμιδίνη, η οποία μετατρέπεται σε 5-FU μέσω της φωσφορυλάσης της θυμιδίνης, ενός ενζύμου ενεργού στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, με αποτέλεσμα η χρήση της να συνοδεύεται από σχετικά προβλέψιμη και αποδεκτή τοξικότητα.

β) οξαλιπλατίνη

Η οξαλιπλατίνη αποτελεί πλατινούχο παράγοντα τρίτης γενιάς που σε συνδιασμό με 5-FU και leucovorin έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικότερο έναντι του συνδιασμού 5-FU και leucovorin με απόλυτο όφελος στην ελεύθερη από υποτροπή της νόσου τριετή επιβίωση 6-8% για σταδίου III νόσο και 2-3% για σταδίου II νόσο.

Η κύρια τοξικότητα της οξαλιπλατίνης περιλαμβάνει νευροπάθεια δύο διαφορετικών τύπων. Ο πρώτος συναντάται σε οξεία νευροτοξικότητα, η οποία εκδηλώνεται με δυσαισθησίες σχετιζόμενες με το ψύχος και είναι παροδικού χαρακτήρα. Ο δεύτερος τύπος χαρακτηρίζεται από δόσοεξαρτώμενη αισθητική νευροπάθεια, η οποία σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών μπορεί να είναι μη αναστρέψιμη. Η εμφάνιση της ουδετεροπενίας είναι συχνότερη σε σχήματα που περιλαμβάνουν την οξαλιπλατίνη σε σχέση με τα σχήματα, που περιέχουν μόνο 5-φθοριοουρακίλη.

2. Χημειοθεραπεία μεταστατικής νόσου.

Η πενταετής επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατική νόσο (σταδίου IV) παραμένει περίπου 10%. Οι συνηθέστερες εστίες μεταστατικής διασποράς είναι το ήπαρ, το περιτόναιο και οι πνεύμονες. Ο καρκίνος του ορθού μεθίσταται στους πνεύμονες εξίσου συχνά με το ήπαρ, ενώ οι εγκεφαλικές μεταστάσεις είναι γενικά σπάνιες.

Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες

α) 5-φθοριοουρακίλη

Η 5-FU αποτέλεσε τη βασική θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου κατά το δεύτερο ήμισυ του 20^{ου} αιώνα και ο συνδιασμός 5-FU/LV αποτελούσε τη μοναδική διαθέσιμη δραστική επιλογή. Η συνεχή ενδοφλέβια χορήγηση της 5-FU παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης της νόσου και πλεονέκτημα στο διάστημα έως την εξέλιξη της νόσου, έναντι της ταχείας ενδοφλέβιας χορήγησης.

β) οξαλιπλατίνη

Έχει περιορισμένη δραστηριότητα ως μονοθεραπεία όμως εμφανίζει συνεργική δράση σε συνδιασμό με 5-FU, στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου.

γ) ιρινοτεκάνη

Πρόκειται για αναστολέα της τοποϊσομεράσης I με δραστηριότητα στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο οποίος βελτίωσε την επιβίωση κατά 36% από 15% με χορήγηση 5-FU ως μονοθεραπεία και την ποιότητα ζωής των ασθενών με προχωρημένη νόσο. Ο συνδιασμός ιρινοτεκάνης με 5-FU ή καπεσιταμπίνη έχει όμοια δραστηριότητα με διάμεση συνολική επιβίωση 16 έως 19 μήνες. Η κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια της ιρινοτεκάνης είναι η διάρροια, η οποία εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ασθενών και είναι βαθμού 3 ή 4 στο 22% έως 44% των περιπτώσεων.

Επιλογή παραγόντων και συνδιασμών.

Οι θεραπευτικές αποφάσεις σε σχέση με την καλύτερη επιλογή στηρίζονται, κυρίως, στη γενική κατάσταση των ασθενών, την ηλικία τους, τα συνοδά προβλήματα και τις προτιμήσεις τους. Δεν τεκμηριώνεται κάποιος συνδιασμός παραγόντων ή αλληλουχία σχημάτων που να θεωρούνται ιδανικές επιλογές, έναντι των υπολοίπων. Πρακτικά, η πλειονότητα των ασθενών με μεταστική νόσο θα λάβει έναν αριθμό χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως 5-FU, capecitabine, oxaliplatin, irinotecan (FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, XELIRI, FOLFOXIRI) αλλά και νεότερους παράγοντες μοριακής στόχευσης όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα cetuximab, panitumumab, bevasizumab, regorafenib και aflibercept.

10. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχουν επιτευχθεί σημαντικές εξελίξεις στην αντιμετώπιση ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο με χημειοθεραπεία, αρκετοί περιορισμοί εξακολουθούν να υφίστανται σχετικά με συγκεκριμένη μορφή θεραπείας. Επομένως η ερεύνα έχει στραφεί στη μελέτη μιας ποικιλίας μοριακών στόχων, όπως είναι ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor – EGFR), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor- VEGF) και ο υποδοχέας αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor- VEGFR). Το 2004 έλαβαν έγκριση για την αντιμετώπιση του μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου δύο νέοι μοριακοί παράγοντες: το Cetuximab, το οποίο συνδέεται στην εξωκυττάρια μοίρα του EGFR και αναστέλλει τη σύνδεση προσδετών, όπως ο EGF και ο TGF- α , καθώς και το Bevasizumab, το οποίο δεσμεύει τον ελεύθερο VEGF.

Στοχευμένες θεραπείες έναντι του EGFR

Ο υποδοχέας EGFR αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας των epidermal growth factor receptors. Πρόκειται για μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία χαρακτηρίζεται από εξωκυττάρια, διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική μοίρα με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης. Μετά από σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυττάρια μοίρα, ακολουθεί δημιουργία διμερών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησης της δραστικότητας της τυροσινικής κινάσης στην ενδοκυττάρια μοίρα του υποδοχέα, την αυτοφωσφορυλίωση και έναρξη ενός καταρράκτη μετάδοσης ενδοκυττάρων μηνυμάτων μέσω διαφορετικών οδών. Υπερέκφραση του υποδοχέα παρατηρείται

σε ποικιλία επιθηλιακών νεοπλασματικών και κλινικά έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς, με αποτέλεσμα ο υποδοχέας EGFR να αποτελεί δυνητικά στόχο μοριακής στόχευσης στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του EGFR.

Cetuximab

Το cetuximab αποτελεί χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της εξωκυττάριας μοίρας του EGFR, το οποίο συνδεόμενο με τον υποδοχέα εμποδίζει τη δέσμευση του φυσικού προσδέτη και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση του EGFR. Οι κυριότερες παρενέργειες του cetuximab είναι εξάνθημα τύπου ακμής ή θυλακίτιδα σε συχνότητα 50-60% (grade 1/2) και 5-10% (grade 3), διάρροια και σοβαρές αντιδράσεις υπερευαισθησίας (grade 3/4) σε ποσοστό 1,2-2,2%.

Panitumumab

Το panitumumab είναι ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της εξωκυττάριας μοίρας του EGFR, το οποίο λιγότερο συχνά παρουσιάζει αλλεργικές αντιδράσεις κατά την έγχυση του φαρμάκου. Η χρήση του panitumumab συνοδεύεται από δοσοεξαρτώμενο δερματικό εξάνθημα τύπου ακμής και διάρροια.

Στοχευμένες θεραπείες έναντι του VEGF

Η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πολλών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Ο VEGF συνδέεται σε μεμβρανικούς υποδοχείς (vascular endothelial growth factor receptors VEGFRs), η ενεργοποίηση των οποίων προάγει τη διαδικασία της

αγγειογένεσης, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο παράγοντας αυτός έχει ανιχνευθεί σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, ενώ η υπερέκφρασή του συσχετίζεται με επιθετικότερη συμπεριφορά της νόσου και δυσμενή πρόγνωση.

Bevasizumab

Το bevasizumab αποτελεί ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης του bevasizumab δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος, πιθανολογείται ότι το αντίσωμα οδηγεί σε αντινεοπλασματική δράση μέσω υποστροφής του παθολογικού αγγειακού δικτύου του όγκου, ομαλοποίησης του διαταραγμένου αγγειακού δικτύου και αναστολής ανάπτυξης νέων αγγείων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η παροχή χημειοθεραπευτικών παραγόντων στον όγκο. Οι παρενέργειες περιλαμβάνουν αιμορραγία στον όγκο, θρομβώσεις, διάτρηση στο γαστρεντερικό σωλήνα, υπέρταση και πρωτεϊνουρία.

Aflibercept

Το aflibercept είναι μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης που δρα ως διαλυτός υποδοχέας και δεσμεύει τον Αγγειακό Ενδοθηλιακό Αυξητικό Παράγοντα-A (VEGF-A), τον VEGF-B και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (PlGF). Στην κλινική μελέτη VELOUR που αξιολογούσε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου που είχαν λάβει θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη, το aflibercept σε συνδυασμό με FOLFIRI (5-φθοριοουρακίλη, λευκοβορίνη, ιρινοτεκάνη) έδειξε μία στατιστικά σημαντική βελτίωση στη συνολική επιβίωση, στην επιβίωση χωρίς

πρόοδο της νόσου και στο συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης του όγκου σε σύγκριση με τη λήψη εικονικού φαρμάκου σε συνδυασμό με το σχήμα FOLFIRI.

Regorafenib

Το regorafenib είναι αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών, που είναι απαραίτητες για την αιμάτωση του όγκου. Η αντιαγγειογενετική του δράση πραγματοποιείται μέσω διπλού αποκλεισμού των VEGFR2-TIE2 τιροσινικής κινάσης. Χορηγείται από του στόματος.

11.ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η φαρμακογενετική μελετά την επίδραση των γενετικών παραγόντων στην ανταπόκριση των ατόμων στη φαρμακευτική αγωγή. Είναι η επιστήμη, που εξελίσσει την εξατομικευμένη θεραπεία. Στοχεύει την εξασφάλιση μέγιστης αποτελεσματικότητας των φαρμάκων με τις ελάχιστες παρενέργειες, βασιζόμενη στο μοναδικό γενετικό προφίλ κάθε ατόμου.

Κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η μη ανταπόκριση ή η αυξημένη τοξικότητα που παρουσιάζουν οι ασθενείς στα διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα μπορεί να οφείλεται σε πολυμορφισμούς ή μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό τους (Lee et al., 2005).

CD 133

Ο παράγοντας CD133 (γνωστός και ως prominin-1) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με πέντε διαμεμβρανικές περιοχές μοριακού βάρους 120 kDa και εντοπίζεται στην κορυφαία πλασματική μεμβράνη των εμβρυονικών επιθηλιακών κυττάρων. Ο CD133 πρωτοανακαλύφθηκε σε φυσιολογικά ανθρώπινα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα από το 1997, αλλά παρόλα αυτά η βιολογική λειτουργία της εξακολουθεί μέχρι σήμερα να παραμένει άγνωστη (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997).

Το 2007 ο O'Brien και οι συνεργάτες του έδειξαν πως ένας CD133⁺ υποπληθυσμός καρκινικών κυττάρων είναι εμπλουτισμένος σε κύτταρα με ογκογόνο δυναμικό στο κόλον (human colon cancer-initiating cell, CC-IC). Ο πληθυσμός των CD133⁺ αντιπροσωπεύει περίπου το 2,5% κυττάρων του όγκου και εκτιμάται πως 1 στα 262 CD133⁺ κύτταρα CRC διαθέτουν ουσιαστικά ογκογόνες ιδιότητες. Τα CC-ICs εντός

του CD133⁺ πληθυσμού έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης, της διαφοροποίησης και τη δυνατότητα να αποκαθιστούν την ετερογένεια των όγκων κατόπιν διαδοχικής μεταμόσχευσης (O'Brien et al, 2007). Η ταυτοποίηση των καρκινικών αρχέγονων κυττάρων του παχέος εντέρου τα οποία διακρίνονται από τα υπόλοιπα κύτταρα του όγκου συνέβαλε στην υπόθεση για την ύπαρξη ενός μοντέλου ιεραρχικής οργάνωσης του ανθρώπινου καρκίνου του παχέος εντέρου, σύμφωνα με το οποίο μόνο ένα υποσύνολο των καρκινικών κυττάρων του κόλου, τα καρκινικά αρχέγονα κύτταρα, διαθέτει τη δυναμικότητα να εκκινεί και να συντηρεί την καρκινική ανάπτυξη. Επιπλέον, η ύπαρξή τους υποδηλώνει ότι για να είναι αποτελεσματικές οι θεραπείες, πρέπει να στοχεύουν τα εν λόγω καρκινικά αρχέγονα κύτταρα.

Το 2013 ο Chen σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση του CD133 συνδέεται με τοπικά προχωρημένη νόσο, αγγειακή διήθηση, φτωχή συνολική επιβίωση και μειωμένα ποσοστά διαστήματος ελεύθερο νόσου (Chen et al., 2013).

Πρόσφατα ο Pohl και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν το ρόλο της έκφρασης του CD133 καθώς και τρεις πολυμορφισμούς του CD133 (rs3130, rs2286455 και rs2240688) ως προς την ανταπόκριση στην χορήγηση των χημειοθεραπευτικών σχημάτων με FOLFOX ή XELOX και στην μπεβασιζουμάμπη (Pohl et al., 2013). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι υψηλότερα επίπεδα του CD133 συνδέονται με αυξημένη ανταπόκριση του όγκου, ενώ οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν το γονότυπο CC στους πολυμορφισμούς rs2286455 και rs3130 ή τον συνδυασμό των CT είτε με CT ή TT παρουσίαζαν αυξημένη συνολική επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου σε σύγκριση με τους ασθενείς με γονότυπο CC σε ένα πολυμορφισμό και CT

ή TT στον άλλο (Pohl et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί πως η παρουσία του CC γονοτύπου στον πολυμορφισμό rs2286455 συσχετίστηκε με χαμηλότερη έκφραση του CD133 στην ίδια μελέτη (Pohl et al., 2013).

Με βάση αυτά τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη τον γνωστό ρόλο του CD133 στην εξέλιξη του κολοορθικού καρκίνου και την αγγειογένεση η αξιολόγηση της επίδρασης των σημειακών πολυμορφισμών του CD133 σχετικά με την ανταπόκριση στη μπεβασιζουμάμπη μπορεί να είναι κρίσιμη για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας του στοχευμένου παράγοντα σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου.

UGT1A1

Το γονίδιο UGT1A1 κωδικοποιεί το ένζυμο που καταλύει την γλυκουρονιδίωση του ενεργού μεταβολίτη ιρινοτεκάνης, του SN-38, ο οποίος βιομετατρέπεται στο ήπαρ σε μια ανενεργό μορφή, την SN-38G προκειμένου να απεκκριθεί (Innocenti et al., 2009). Το ένζυμο που κωδικοποιείται από το UGT1A1 γονίδιο και εμπλέκεται στο περίπλοκο μεταβολισμό της ιρινοτεκάνης ονομάζεται uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 (Mathijssen et al., 2001).

Η αποτελεσματικότητα της ιρινοτεκάνης εξαρτάται από τον παράγοντα SN-38 ο οποίος ασκεί την κυτταροτοξική του δράση του μέσω της αναστολής του πυρηνικού ενζύμου τοποϊσομεράση Ι, που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Mathijessen et al., 2001; Miners et al., 2002; Toffoli et al., 2003)

Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο UGT1A1 μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα διαταραχές της διαδικασίας γλυκουρονιδίωσης με επιπτώσεις στη δυνατότητα του ατόμου να μεταβολίσει αποτελεσματικά την ιρινοτεκάνη και στη συνέχεια να εμφανίσει τοξικότητα από το φάρμακο. Περισσότερες από 50 γενετικές παραλλαγές στον υποκινητή και σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου UGT1A1 είναι σήμερα γνωστές (Kadacol et al., 2000). Μεταξύ αυτών ο πολυμορφισμός UGT1A1 * 28 αποτελεί ένα σύνηθες αλληλόμορφο με επτά διαδοχικές επαναλήψεις TA [A(TA)₇TAA] στον υποκινητή του UGT1A1 σε σύγκριση με το αλληλόμορφο άγριου τύπου UGT1A1*1 που διαθέτει έξι διαδοχικές επαναλήψεις TA (Miners et al., 2002; Toffoli et al., 2003; Beutler et al., 1998). Ο πολυμορφισμός UGT1A1 *28 σχετίζεται με μειωμένη γονιδιακή μεταγραφή και έκφραση του UGT1A1 γονιδίου καθώς και μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του SN-38 ή σε παρατεταμένη παρουσία του SN-38, της δραστικής μορφής της IRI λόγω μειωμένης γλυκουρονιδίωσης (Beutler et al., 1998; Iyer et al., 1999; Ando et al., 2002; Innocenti et al., 2004; Iyer et al., 2002)

Επειδή ο πολυμορφισμός UGT1A1*28 επηρεάζει τον μεταβολισμό της ιρινοτεκάνης είναι αναμενόμενο το UGT1A1*28 αλληλόμορφο να σχετίζεται με την θεραπευτική αποτελεσματικότητα της ιρινοτεκάνης και με τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών (Dias et al., 2012; Innocenti et al., 2004). Αρκετοί ερευνητές έχουν διερευνήσει την αποτελεσματικότητα της ιρινοτεκάνης σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου που φέρουν διαφορετικούς γονότυπους UGT1A1*28 (Swen et al., 2011; Braun et al., 2008; Liu et al., 2013).

DPD

Το ένζυμο αφυδρογονάση διυδροπυριμιδίνης (DPD), το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο της DPD (DPYD), παίζει καθοριστικό ρόλο στην φαρμακολογία των φθοροπυριμιδινών καθώς αποικοδομεί έως και το 85% της χορηγηθείσας δόσης 5-FU σε 5,6-διυδρο-5-φθοριοουρακίλη (Heggie et al., 1987; Diasio, 2001; Van Kuilenburg et al., 2000). Η αποικοδόμηση της 5-FU λαμβάνει χώρα στο ήπαρ μέσω ενός μεταβολικού μονοπατιού πολλαπλών βημάτων όπου η DPD αποτελεί το αρχικό ένζυμο. Ανεπάρκεια αυτής της οδού αποικοδόμησης της πυριμιδίνης οδηγεί σε συσσώρευση τοξικών συγκεντρώσεων της 5-FU στους ασθενείς. Γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της DPYD μπορεί επίσης να οφείλονται για τη θανατηφόρο τοξικότητα των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με καπεσιταβίνη (Saif et al., 2006). Έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα περισσότεροι από 40 πολυμορφισμοί στο γονίδιο της DPYD, μερικοί από τους οποίους συνδέονται με την μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου και τον ατελή μεταβολισμό της 5-FU (Van Kuilenburg et al., 2000; 2004; Maekawa et al., 2007). Αν μερικοί από τους πολυμορφισμούς έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για τοξικότητα, η κλινική σημασία για την πλειονότητα αυτών παραμένει ασαφής. Επιπλέον, δεδομένα σχετικά με τη συσχέτιση των πολυμορφισμών της DPYD με την επιβίωση και τα δοσολογικά σχήματα της καπεσιταβίνης είναι λιγοστά.

Η κυριότερη μετάλλαξη εμφανίζεται στο ιντρόνιο 14 του γονιδίου, η οποία είναι γνωστή ως IVS14+1 G>A, DPYD*2A και αποτελεί μια αντικατάσταση νουκλεοτιδίου G> εντός της 5'- θέσης ματίσματος του ιντρονίου. Η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται στο 1-3% του γενικού πληθυσμού και στο 52% των ασθενών που παρουσιάζουν

έλλειψη της DPYD (Van Kuilenburg et al., 2001; Collie-Duguid et al., 2000). Κατά συνέπεια η περικομμένη πρωτεΐνη που σχηματίζεται δεν διαθέτει δραστικότητα DPD (Vreken et al., 1996; Wei et al., 1996). Επιπρόσθετα, η δραστικότητα του ενζύμου DPD στα ετερόζυγα άτομα για IVS14+ 1G> A είναι μειωμένη κατά κατά μέσο όρο περίπου 50% σε σύγκριση με το μέσο όρο του πληθυσμού (Etienne et al., 1994; Lu et al., 1993; Van Kuilenburg et al., 2002).

Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες γνωστές παρανοηματικές μεταλλάξεις που επιδρούν απευθείας στην πρωτεϊνική δομή, στη δέσμευση του συμπαραγόντα και στη μεταφορά ηλεκτρονίων του ενζύμου DPD (π.χ. C85 T> C, c496 A> G, C703 C> T, c1601 G> A, c1679 T> G, c 1896 T> C, c2846 A> T) (Van Kuilenburg et al., 2002; Vreken et al., 1997).

Τέλος, πολλαπλές φαρμακογενετικές μελέτες (Boisdron-Celle et al., 2007; Largillier et al., 2006; Morel et al., 2006; Schwab et al., 2008; Deenen et al., 2011) που υποδηλώνουν ένα σημαντικά αυξημένο εγγενή κίνδυνο για την εκδήλωση σοβαρής, δυνητικά θανατηφόρας τοξικότητας για τους ετερο- ή/και ομόζυγους ασθενείς IVS14+1G>A που έλαβαν συνήθεις δόσεις φθοροπυριμιδινών, αν και υπάρχουν και μελέτες που δεν κατόρθωσαν να επιβεβαιώσουν αυτή τη συσχέτιση (McLeod et al., 2010).

Η γνώση της κλινικής επίδρασης των πολυμορφισμών των DPYD και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική των φθοροπυριμιδινών μπορεί να προσφέρει ευκαιρίες για τη χημειοθεραπευτικά σχήματα προσαρμοσμένα στο γενετικό υπόβαθρο του κάθε ασθενούς, με αποτέλεσμα την μειωμένη συχνότητα εμφάνισης σοβαρών παρενεργειών, τη

μείωση του αριθμού των διαλειμάτων της θεραπείας ή της διακοπής της και ενδεχομένως να οδηγήσουν στην αύξηση της πιθανότητας επιβίωσης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Κριτήρια επιλογής ασθενών

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (CRC). Η συλλογή των δειγμάτων αίματος και ιστού έγινε κατά τα έτη 2005 (αφορά τους ιστούς) έως 2013. Το στάδιο της νόσου τεκμηριώθηκε ιστολογικά (βιοψία μέσω κολονοσκόπησης ή χειρουργικής επέμβασης) και απεικονιστικά (αξονικές τομογραφίες θώρακα, άνω και κάτω κοιλίας και κάποιες φορές με μαγνητική τομογραφία κοιλίας). Στην μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς φθοριοπυριμιδών με ιρινοτεκάνη (irinotecan), με ή χωρίς προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος πανιτουμουμάμπης (panitumumab) ή μπεβασιζουμάμπης (bevacizumab), ανεξάρτητα από το προσδόκιμο χρόνο επιβίωσης. Όλοι οι ασθενείς έπρεπε να είχαν συμπληρώσει το δέκατο όγδοο έτος της ηλικίας τους. Πριν την ένταξη των ασθενών στη μελέτη, ήταν υποχρεωτική η φυσική τους εξέταση και η αναλυτική λήψη ιστορικού.

Οι ασθενείς που επιλέχθηκαν έπρεπε να έχουν επαρκή λειτουργία του νωτιαίου μυελού, του ήπατος και των νεφρών η οποία αξιολογήθηκε βάσει των ακόλουθων εργαστηριακών τιμών αναφοράς: αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) $\geq 2500/\mu\text{L}$, απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων (ANC) $\geq 1500/\mu\text{L}$, αριθμός αιμοπεταλίων $\geq 100.000/\mu\text{L}$, κρεατινίνη ορού $\leq 1.5 \times$ ανώτερο επιτρεπτό όριο (ULN), πρωτεΐνη ούρων $\leq 2 \text{ g}/24 \text{ h}$, ολική χολερυθρίνη ορού $\leq 3 \text{ mg/dL}$, AST (SGOT)/ALT (SGPT) $\leq 2 \times$ ULN.

Έτσι στην μελέτη, συμπεριλήφθησαν 57 άντρες και 37 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας τα 67,42 έτη (εύρος 39-86 έτη) που έλαβαν χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς φθοριοπυριμιδών με ιρινοτεκάνη, με ή χωρίς προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος πανιτουμουμάμπης ή μπεβασιζουμάμπης. Από τους 94 ασθενείς, οι 80 υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου (85,1%) ενώ η πλειοψηφία αυτών δεν έλαβε συμπληρωματική χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία (84/94, 89,4%). Η εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας ήταν με τη σειρά συχνότητας στο σιγμοειδές (48,9%), στο ανιόν, στο εγκάρσιο και στο κατión κόλον (28,7%) και στο ορθό στο 23,4% των ασθενών. Αναφορικά με τα σημεία της μετάστασης, αυτά εντοπίστηκαν κυρίως στο ήπαρ και στους πνεύμονες, στο 39,4% και 26,6% των ασθενών αντίστοιχα, καθώς και στους λεμφαδένες και στο περιτόναιο, ενώ ταυτόχρονες πολλαπλές εντοπίσεις εμφανίστηκαν σε 15 από τους 94 ασθενείς (16%). Στον Πίνακα 1 περιλαμβάνονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

Χαρακτηριστικά			Αριθμός ασθενών	Ποσοστό %
Ηλικία (έτη)	Μέσος όρος		67.42	
	Εύρος		39-86	
Φύλο	Άντρες		57	60.6
	Γυναίκες		37	39.4
Χειρουργική	εξαίρεση	Ναι	80	85.1
πρωτοπαθούς όγκου		Όχι	14	14.9
Συμπληρωματική		Ναι	10	10.6
χημειοθεραπεία/ακτινοβολία		Όχι	84	89.4

Εντόπιση εστίας	πρωτοπαθούς	Σιγμοειδές	45	47.9
		Ορθό	22	23.4
		Κόλον	27	28.7
Σημείο μετάστασης		Συκώτι	37	39.4
		Πνεύμονας	25	26.6
		Περιτόναιο	6	6.4
		Λεμφαδένες	10	10.6
		Πολλαπλά σημεία	15	15.9

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη

1.2 Θεραπευτικά σχήματα

Από τους 94 ασθενείς, οι 55 (58,5%) λάμβαναν μπεβασιζουμάμπη, ιρινοτεκάνη και την καρβαμιδική φθοριοπυριμιδίνη, καπεσιταβίνη (capecitabine) - θεραπευτικό σχήμα XELIRI-BEVASIZUMAB, 13 ασθενείς (13,8%) έλαβαν ιρινοτεκάνη και καπεσιταβίνη σε συνδυασμό με το μονοκλωνικό αντίσωμα πανιτουμουμάμπη (θεραπευτικό σχήμα XELIRI-PANITUMUMAB), 17 ασθενείς (18,1%) έλαβαν ιρινοτεκάνη σε συνδυασμό με μπεβασιζουμάμπη και λευκοβορίνη/5-φθοριοουρακίλη (5-fluorouracil-5-FU) - θεραπευτικό σχήμα FOLFIRI-BEVASIZUMAB, ενώ 9 ασθενείς (9,6%) έλαβαν ιρινοτεκάνη σε συνδυασμό με πανιτουμουμάμπη και λευκοβορίνη/5-φθοριοουρακίλη (θεραπευτικό σχήμα FOLFIRI-PANITUMUMAB).

Συγκεκριμένα, το θεραπευτικό σχήμα XELIRI-BEVASIZUMAB είχε χορηγηθεί ανά 21 ημέρες και περιλάμβανε τη χορήγηση των ακόλουθων φαρμάκων με τη σειρά που αναφέρονται:

1. Ιρινοτεκάνη σε δόση 210 mg/m^2 , με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 1.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
2. Μπεβασιζουμάμπη σε δόση $7,5 \text{ mg/kg}$, με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 30min, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
3. Καπεσιταβίνη από του στόματος (πρωί-βράδυ), σε δόση 800 mg/m^2 (δύο φορές την ημέρα), τις ημέρες 1-14 του κύκλου θεραπείας.

Το θεραπευτικό σχήμα XELIRI-PANITUMUMAB είχε χορηγηθεί ανά 21 ημέρες και περιλάμβανε τη χορήγηση των ακόλουθων φαρμάκων με τη σειρά που αναφέρονται:

1. Ιρινοτεκάνη σε δόση 210 mg/m^2 , με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 1.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
2. Πανιτουμουμάμπη σε δόση 9 mg/kg , με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 30min, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας .
3. Καπεσιταβίνη από του στόματος (πρωί-βράδυ), σε δόση 850 mg/m^2 (δύο φορές την ημέρα), τις ημέρες 1-14 του κύκλου θεραπείας.

Το θεραπευτικό σχήμα FOLFIRI-BEVASIZUMAB είχε χορηγηθεί ανά 15 ημέρες και περιλάμβανε τη χορήγηση των ακόλουθων φαρμάκων με τη σειρά που αναφέρονται:

1. Ιρινοτεκάνη σε δόση 180 mg/m^2 , με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 1.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
2. Λευκοβορίνη σε δόση 400 mg/m^2 , με ενδοφλέβια έγχυση (σε 500ml N/S, 0,9%) διάρκειας 2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.

3. 5-φθοριοουρακίλη σε δόση 400 mg/m², με στιγμιαία ενδοφλέβια ένεση, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
4. Μπεβασιζουμάμπη σε δόση 5 mg/kg, με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 30min, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
5. 5-φθοριοουρακίλη σε δόση 2400 mg/m², με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση για 46 h, τις ημέρες 1 και 2 του κύκλου θεραπείας.

Το θεραπευτικό σχήμα FOLFIRI-PANITUMUMAB είχε χορηγηθεί ανά 15 ημέρες και περιλάμβανε τη χορήγηση των ακόλουθων φαρμάκων με τη σειρά που αναφέρονται:

1. Ιρινοτεκάνη σε δόση 180 mg/m², με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 1.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
2. Λευκοβορίνη σε δόση 400 mg/m², με ενδοφλέβια έγχυση (σε 500ml N/S, 0,9%) διάρκειας 2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
3. 5-φθοριοουρακίλη σε δόση 400 mg/m², με στιγμιαία ενδοφλέβια ένεση, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
4. Πανιτουμουμάμπη σε δόση 6 mg/kg, με ενδοφλέβια έγχυση (σε 250ml N/S, 0,9%) διάρκειας 30min, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας.
5. 5-φθοριοουρακίλη σε δόση 2400 mg/m², με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση για 46 h, τις ημέρες 1 και 2 του κύκλου θεραπείας.

Αρχικά, η έγχυση της μπεβασιζουμάμπης και πανιτουμουμάμπης είχε διάρκεια 90 min. Εάν η πρώτη έγχυση ήταν καλά ανεκτή, η διάρκεια των επακόλουθων εγχύσεων μειωνόταν στα 60 ή 30 min. Σε καμία περίπτωση η διάρκεια της έγχυσης δεν ήταν μικρότερη των 30 min. Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού συνδυασμού

συνεχίζεται μέχρι την εξέλιξη της υποκείμενης νόσου ή μη αποδεκτής τοξικότητας, με μέγιστη διάρκεια τους οκτώ κύκλους. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται τα θεραπευτικά σχήματα που χορηγήθηκαν στην παρούσα μελέτη ενώ στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται μία σχηματική απεικόνιση των θεραπευτικών σχημάτων που έλαβαν οι ασθενείς.

Θεραπευτικό σχήμα

Σχήμα	Αριθμός ασθενών	Irinoteca n	Capecitabine	Bevacizumab	Panitumumab	5-fluorouracil	Leucovorin
XELIRI-BEV	55	+	+	+			
XELIRI-PAN	13	+	+		+		
FOLFIRI-BEV	17	+		+		+	+
FOLFIRI-PAN	9	+			+	+	+

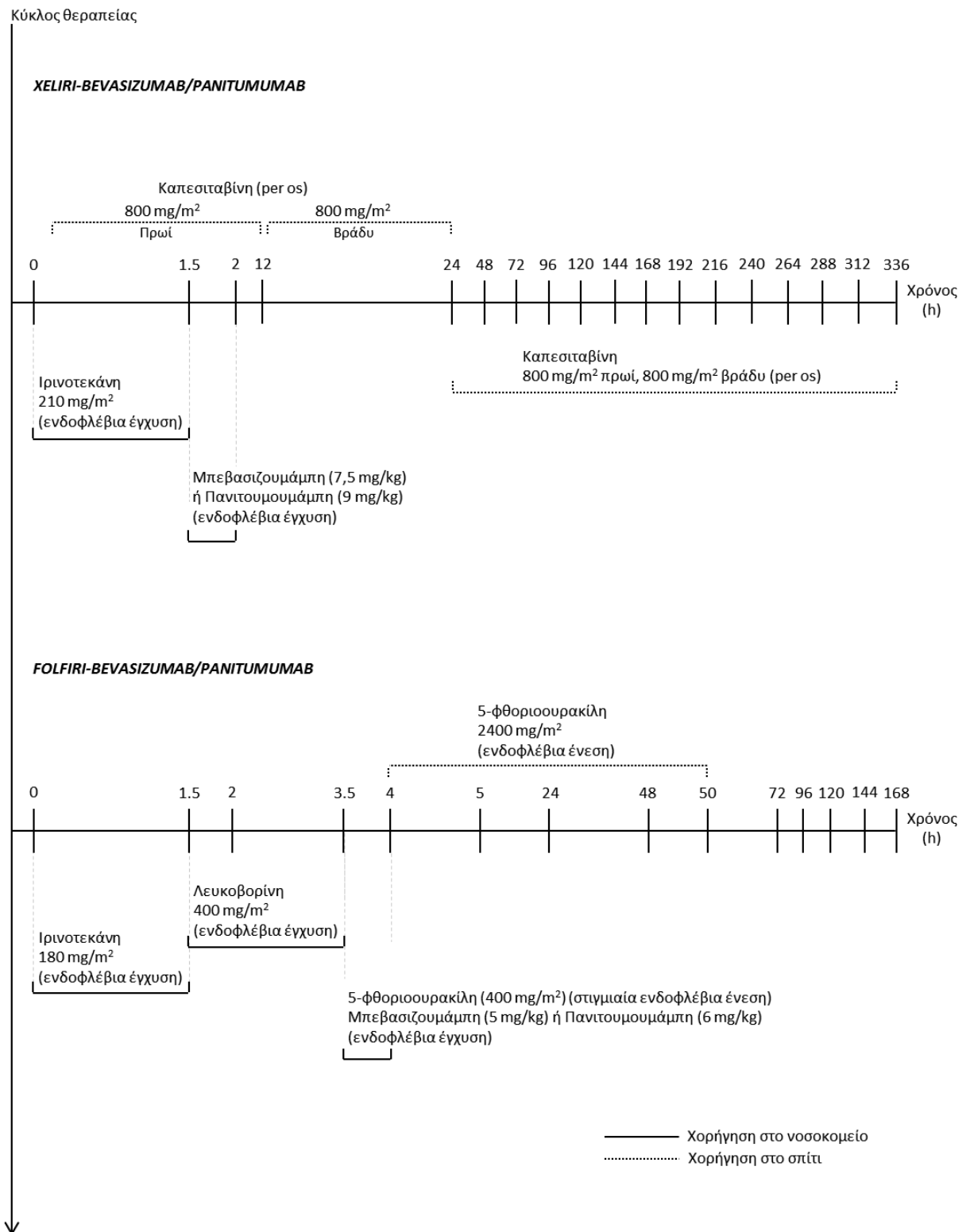
Δόση Irinotecan (gm^{-2})

Μέσος όρος 296

Διάμεσος 300

Εύρος 100-480

Πίνακας 2: Θεραπευτικά σχήματα πρώτης γραμμής



Εικόνα 1: Θεραπευτικά σχήματα που έλαβαν οι συμμετέχοντες στη μελέτη ασθενείς

1.3 Δειγματοληψίες

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος για τη μελέτη του συσχετισμού των πολυμορφισμών DPD IVS14 + 1G > A (rs3918290), UGT1A1*28 (rs8175347) και CD133 (rs3130 και rs2286455) με την ανταπόκριση των ασθενών στους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με ιρινοτεκάνη, πραγματοποιήθηκε σε καθορισμένες χρονικές στιγμές, κατά τις ημέρες προγραμματισμένης προσέλευσης των ασθενών για κλινική εξέταση και θεραπεία (συνήθως σε διάστημα 2-3 εβδομάδων, ανάλογα με το θεραπευτικό σχήμα).

Τα δείγματα όγκων λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της χειρουργικής εξαίρεσης τους από 3 κυρίως θέσεις του παχέως εντέρου, που περιλάμβαναν το σιγμοειδές, το ανιόν, εγκάρσιο και κατιόν κόλον καθώς και το ορθό. Τμήματα των εξαιρεθέντων ιστών στάλθηκαν για παθολογοανατομική εξέταση. Τα δείγματα ιστών στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 4% και εγκλείστηκαν σε παραφίνη ή καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την απομόνωση του DNA.

1.4 Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του φαρμακευτικού σχήματος

Η ανταπόκριση των ασθενών στην χορήγηση των χημειοθεραπευτικών σχημάτων με ιρινοτεκάνη καθορίστηκε σύμφωνα με τα Κριτήρια Αξιολόγησης της Ανταπόκρισης στους Συμπαγείς Όγκους (RECIST-Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) [1]. Οι δημοσιευμένοι αυτοί κανόνες καθορίζουν πότε οι καρκινικοί όγκοι σε έναν ασθενή μειώνονται, παραμένουν ίδιοι ή αυξάνονται σε απόκριση σε ένα

φαρμακευτικό σχήμα. Το φορτίο της νόσου αντιπροσωπεύεται από τις επιλεγμένες βλάβες-στόχους. Προκειμένου για τις μη μετρήσιμες βλάβες απλά σημειώνεται η παρουσία ή απουσία τους κατά την διάρκεια της παρακολούθησης.

Έτσι η νόσος έπρεπε να ήταν μετρήσιμη σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST. Δηλαδή, οι συμμετέχοντες στη μελέτη ασθενείς έπρεπε να είχαν τουλάχιστον μία αλλοίωση που θα μπορούσε να μετρηθεί με ακρίβεια με τη βοήθεια αξονικής (CT) ή μαγνητικής τομογραφίας (MRI) σε τουλάχιστον μία διάσταση (≥ 10 mm με σπειροειδή αξονική τομογραφία). Όλες οι μετρήσιμες βλάβες, με μέγιστο αριθμό των πέντε αλλοιώσεων ανά όργανο και δέκα αλλοιώσεις στο σύνολο, αντιπροσωπευτικών για όλα τα προσβληθέντα όργανα, χαρακτηρίστηκαν ως βλάβες-στόχοι, οι οποίες καταγράφηκαν και μετρήθηκαν (με CT ή MRI) κατά την έναρξη της μελέτης. Το άθροισμα της μεγαλύτερης διαμέτρου (Sum of the Longest Diameter-SLD) για όλες τις βλάβες-στόχους υπολογίστηκε και αποτελεί το SLD κατά την έναρξη της θεραπείας. Το αρχικό SLD χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και σύγκρισης για τον χαρακτηρισμό της απόκρισης των όγκων στα φαρμακευτικά σχήματα. Σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST, η αξιολόγηση της πορείας των βλαβών-στόχων κατηγοριοποιήθηκε ως εξής:

- *Πλήρης Ανταπόκριση (Complete Response -CR):* Εξάλειψη όλων των βλαβών-στόχων.
- *Μερική Ανταπόκριση (Partial Response-PR):* Μείωση $\geq 30\%$ στο αρχικό SLD των βλαβών-στόχων.
- *Προοδευτική νόσος (Progressive Disease-PD):* Αύξηση κατά $\geq 20\%$ στο SLD των βλαβών-στόχων. Ως σημείο αναφοράς λαμβάνεται το μικρότερο SLD

που καταγράφηκε από το χρονικό σημείο έναρξης της θεραπείας ή από την καταγραφή μίας ή περισσότερων νέων αλλοιώσεων.

- *Σταθερή νόσος (Stable Disease-SD)*: Όταν δεν παρατηρείται επαρκής συρρίκνωση των βλαβών-στόχων ώστε να ανήκουν στην PR κατηγορία αλλά παράλληλα δεν παρατηρείται επαρκής αύξηση ώστε να κατηγοριοποιηθούν στην PD. Ως σημείο αναφοράς λαμβάνεται το μικρότερο SLD των βλαβών-στόχων από το διάστημα έναρξης της θεραπείας.

Πέρα από την εκτίμηση των βλαβών-στόχων έγινε και η αναφορά των αλλοιώσεων που δεν αποτελούν στόχοι. Οι αλλοιώσεις αυτές έχουν καταγραφεί αλλά δεν έχουν ληφθεί οι κατάλληλες μετρήσεις όπως έχει συμβεί στις βλάβες-στόχους. Η εκτίμηση των μη μετρήσιμων βλαβών έγινε ως εξής σύμφωνα με τα κριτήρια ανταπόκρισης RECIST:

- *Πλήρης ανταπόκριση (Complete Response -CR)*: Εξάλειψη όλων των βλαβών-μη στόχων και πτώση των επιπέδων ανίχνευσης των καρκινικών δεικτών στα φυσιολογικά επίπεδα.
- *Ατελής ανταπόκριση/Σταθερή νόσος (SD)*: Παραμονή μίας ή περισσότερων μη μετρήσιμων βλαβών ή/και διατήρηση των επιπέδων ανίχνευσης των καρκινικών δεικτών πάνω από τα φυσιολογικά όρια.
- *Προοδευτική νόσος (PD)*: Καταγραφή μίας ή περισσότερων νέων αλλοιώσεων και/ή σαφής επιδείνωση κάθε προϋπάρχουσας μη μετρητής βλάβης.

Για την κατηγοριοποίηση της πορείας της νόσου στην CR ή PD κατάσταση, οι αλλαγές στις μετρήσεις του όγκου πρέπει να επιβεβαιώνονται με

επαναλαμβανόμενες αξιολογήσεις που θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε χρονική περίοδο όχι μικρότερη των 4 εβδομάδων από την στιγμή που ελήφθησαν τα πρώτα κριτήρια ανταπόκρισης. Όσον αφορά την περίπτωση της Σταθερής Νόσου (SD), οι μετρήσεις που λαμβάνονται μετά την πρώτη εξέταση θα πρέπει να ικανοποιούν τα SD κριτήρια τουλάχιστο μια φορά μετά την έναρξη της μελέτης μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (όχι μικρότερο από 6-8 εβδομάδες), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ανταπόκρισή τους, σε Σταθερή Νόσο (SD) και Προοδευτική Νόσο (PD). Ο χρόνος επιβίωσης και η πρόοδος της νόσου υπολογίστηκε από την 1^η μέρα θεραπείας.

1.5. Εκτίμηση Τοξικότητας

Η τοξικότητα είναι η διαβάθμιση της δυνατότητας μια ουσίας να προκαλέσει βλάβη σε έναν οργανισμό. Σύμφωνα με το National Cancer Institute (NCI) πιο σωστά χρησιμοποιείται η λέξη ανεπιθύμητη ενέργεια (Adverse Event) αντί της λέξης τοξικότητα. Έτσι σύμφωνα με το NCI ως ανεπιθύμητη ενέργεια θεωρείται οποιοδήποτε αρνητικό σύμπτωμα, σημάδι ή νόσος, συμπεριλαμβανομένων και των μη φυσιολογικών εργαστηριακών ευρημάτων, που συνδέεται χρονικά με την χορήγηση μιας ιατρικής θεραπείας ή διαδικασίας, που μπορεί να θεωρηθεί ή όχι ότι σχετίζεται με την καθεαυτή λήψη της θεραπείας ή διαδικασίας [2].

Το NIC και το The Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) σε συνεργασία με το European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) έχουν

θέσει κάποια κριτήρια με βάση τα οποία καθορίζεται ο βαθμός τοξικότητας κάθε χημειοθεραπείας με βάση την εμφάνιση συγκεκριμένων παρενεργειών για κάθε ιστό ή όργανο ξεχωριστά [3].

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μιας θεραπείας έχουν χωριστεί σε δύο κύριες ομάδες με βάση το χρονικό διάστημα μετά το οποίο εμφανίζονται. Αυτές οι ομάδες είναι:

- Παρενέργειες που εμφανίζονται άμεσα από την έναρξη της χημειοθεραπείας (μέρα 1 έως μέρα 90) (*ACUTE Radiation Morbidity*).
- Παρενέργειες που εμφανίζονται μετά από 90 μέρες από την έναρξη της χημειοθεραπείας (*LATE Radiation Morbidity*).

Η κλίμακα με βάση την οποία γίνεται η εκτίμηση της τοξικότητας στην χημειοθεραπεία ξεκινά κλιμακωτά από το 0, όπου δεν υπάρχουν συμπτώματα και βαθμιαία με βάση την ένταση των παρενεργειών φτάνει μέχρι το 5 όπου αντιστοιχεί σε θάνατο που οφείλεται στις παρενέργειες της χημειοθεραπείας.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες στην παρούσα μελέτη διαβαθμίστηκαν σύμφωνα με τα κοινά κριτήρια τοξικότητας για τις ανεπιθύμητες ενέργειες του RTOG/ EORTC.

Η εκτίμηση της τοξικότητας γίνεται κάθε φορά μετά το τέλος του κάθε κύκλου θεραπείας με την χρήση ειδικών ερωτηματολογίων και εργαστηριακών εξετάσεων.

1.6. Ερευνητικά κέντρα

Τα ερευνητικά κέντρα επιλέχθηκαν βάσει της δυνατότητάς τους να εντάξουν έναν ικανοποιητικό αριθμό ασθενών που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής της μελέτης. Τα κέντρα αυτά ήταν τα ακόλουθα:

- Β' Παθολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο», Αθήνα
- Β' Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι», Νέα Κηφισιά

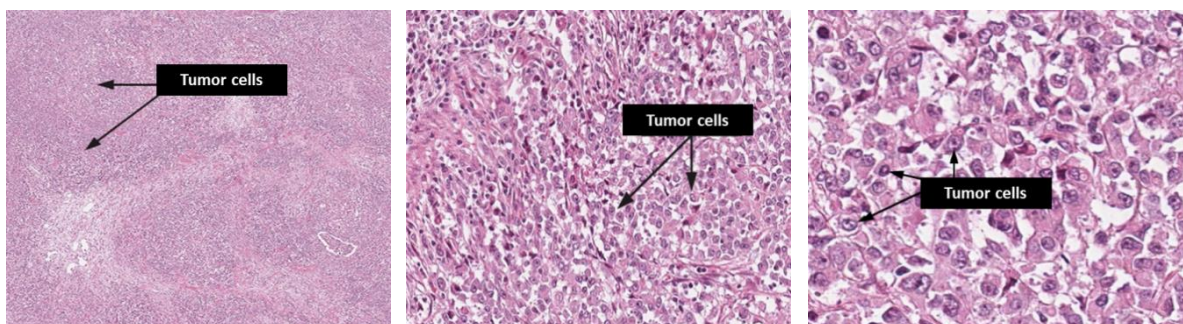
2. Μοριακές τεχνικές ανίχνευσης KRAS μεταλλάξεων και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των γονιδίων UGT1A1, DPD και CD133.

Οι μοριακές τεχνικές που ακολουθούν, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση γενομικού DNA από ολικό αίμα ή ιστό με την χρήση ειδικών συστημάτων αντιδράσεων (kit), τον πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) και την χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών για την ανίχνευση των πολυμορφισμών (Restriction fragment length polymorphism-RFLP).

2.1 Υλικό

Για την ανίχνευσή των KRAS μεταλλάξεων το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιστός που απομονώθηκε από όλους τους ασθενείς της μελέτης μέσω βιοψίας (κυρίως μέσω κολονοσκόπησης). Οι ιστοί αυτοί μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 4% και στην συνέχεια εγκλείστηκαν σε παραφίνη, από τους παθολογοανατόμους. Από το κάθε κύβο παραφίνης ελήφθησαν τομές, με την χρήση μικροτόμου, πάχους 5μm που τοποθετήθηκαν σε ειδικές αντικειμενοφόρους

πλάκες. Στην συνέχεια ακολουθεί εντόπιση του καρκινικού ιστού, μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης, στα παρασκευάσματα, μετά την χρώση τους με ειδικές χρωστικές (αιμοτοξυλίνη–ηωσίνη) (Εικόνα 1). Επιλέχθηκαν περιοχές στα παρασκευάσματα όπου ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων ήταν >30%.



Εικόνα 1: Παράδειγμα παρασκευάσματος αδενοκαρκινώματος σταδίου II μετά την χρώση του με αιμοτοξυλίνη – ηωσίνη. Οι φωτογραφίες προέρχονται από μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (ghtfield Brightfield microscopy) σε αυξανόμενη μεγέθυνση.

Μετά την παρατήρηση των παρασκευασμάτων, τον εντοπισμό των κατάλληλων περιοχών που είναι πλούσιες σε καρκινικά κύτταρα και την σημείωση αυτών των περιοχών, ακολούθησε απομόνωση του DNA από τον αντίστοιχο για κάθε ασθενή, κύβο παραφίνης.

Η ανίχνευση των πολυμορφισμών στα γονίδια UGT1A, DPD και CD133 έγινε σε γενομικό DNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στην παρούσα μελέτη. Τα δείγματα αίματος (3-5 ml) συλλέχθηκαν σε σωληνάκια συλλογής αίματος σε κενό και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την ανάλυσή τους. Μετά την συλλογή των απαραίτητων δειγμάτων ακολούθησε η απομόνωση του γενομικού DNA.

2.2. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από αίμα ή ιστό.

Η απομόνωση ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο σύστημα αντιδράσεων Nucleospin® Tissue (για τον ιστό) και Nucleospin® Blood (για αίμα) της εταιρείας Macherey-Nagel. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει την λύση των κυττάρων του ιστού ή αίματος με διαδοχικές επωάσεις των δειγμάτων σε διαλύματα πρωτεΐνάσης K και SDS. Για τα δείγματα ιστών σε παραφίνη έχει προηγηθεί η αποπαραφινοποίησή τους με διάλυμα ξυλενίου. Μετά την λύση των κυττάρων ακολουθεί προσθήκη στο διάλυμα, RNase για να διασπαστεί το RNA που περιέχουν τα κύτταρα του ιστού. Στο δείγμα προσθέτουμε αλκοολούχο διάλυμα χαοτροπικών αλάτων, που προκαλεί την πρόσδεση του DNA στη στήλη πυριτίου και κατόπιν ξεπλένουμε τη στήλη με δύο διαδοχικά ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να απομακρυνθούν οι προσμίξεις. Το ολικό DNA συλλέγεται με έκλουση, με θερμό αλκαλικό διάλυμα και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ώστε να ελεγχθεί η ποιότητά του. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητά του υπολογίζεται μετά από φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280nm.

Τα διαλύματα B3, BW, B5 και BE που αναφέρονται στο πρωτόκολλο που ακολουθεί, παρέχονται από την εταιρία Macherey-Nagel, χωρίς να αναλύεται η σύνθεσή τους.

Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού γενομικού DNA από ιστό ή αίμα (Macherey-Nagel)

Τα πρώτα βήματα αφορούν την αποπαραφινποίηση των ιστών και δεν αφορούν την απομόνωση του γενομικού DNA από δείγμα αίματος. Τα βήματα που ακολουθούμε σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι τα εξής:

- Ζυγίζουμε ~25 mg από τον εγκλεισμένο στην παραφίνη ιστό.
- Τοποθετούμε τον ιστό σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5ml και προσθέτουμε 1ml n-octane ή ξυλένιο σε κάθε σωληνάριο.
- Αναδεύουμε δυνατά σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).
- Επωάζουμε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου (RT), ενώ αναδεύουμε ανα τακτά χρονικά διαστήματα.
- Φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 3min.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα.
- Προσθέτουμε 1ml αιθανόλη (96–100 %) σε κάθε Eppendorf και αναδεύουμε αρκετές φορές.
- Φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 3min.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα.
- Επαναλαμβάνουμε το βήμα με την πλύση με αιθανόλη (96–100%) και την φυγοκέντρωση.
- Επωάζουμε τα δείγματα στους 37°C με ανοιχτά καπάκια μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη από τα σωληνάρια (~15min).

Με την μέχρι τώρα διαδικασία απελευθερώσαμε τον ιστό από την παραφίνη. Τα επόμενα βήματα είναι κοινά για την απομόνωση γενομικού DNA από ιστό και αίμα. Για την απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα του αίματος απαιτείται ποσότητα

αίματος >200μl. Πιθανές διαφοροποιήσεις αναφέρονται σε παρένθεση. Τα επόμενα βήματα που ακολουθήσαμε είναι τα εξής:

- Προσθέτουμε στα Eppendorf 180μl διαλύματος T1 (μόνο για τον ιστό) και 25μl Proteinase K.
- Αναδεύουμε σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).
- Επωάζουμε τα δείγματα για 3 ώρες στους 56°C αναδεύοντας σε τακτά χρονικά διαστήματα (μόνο για τον ιστό).
- Προσθέτουμε 200μl διαλύματος B3.
- Αναδεύουμε σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).
- Επωάζουμε στους 70°C για ~10min.
- Προσθέτουμε 210μl αιθανόλης (96%-100%) και αναδεύουμε έντονα σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).
- Μεταφέρουμε το διάλυμα σε στήλη πυριτίου, φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 1min.
- Απομακρύνουμε το υποκείμενο διάλυμα της στήλης από το σωληνάριο συλλογής.
- Προσθέτουμε 500μl διαλύματος BW, φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 1min.
- Απομακρύνουμε το υποκείμενο διάλυμα της στήλης από το σωληνάριο συλλογής.
- Προσθέτουμε 600μl διαλύματος B5, φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 1min.

- Απομακρύνουμε το υποκείμενο διάλυμα της στήλης από το σωληνάριο συλλογής.
- Φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 1min.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5ml και προσθέτουμε 100μl θερμού διαλύματος BE (70°C).
- Επιάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
- Φυγοκεντρούμε στις 11000 στροφές για 1min.
- Συλλέγουμε το υποκείμενο διάλυμα που περιέχει το καθαρό απομονωμένο DNA το φωτομετρούμε και το αποθηκεύουμε στους -20°C, για περαιτέρω χρήση.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στη βασική της μορφή η αντίδραση PCR είναι μια χημική παρά βιολογική μέθοδος για τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε σχέση με άλλες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες υπάρχουν στο μείγμα της αντίδρασης. Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA ή cDNA μετά από αντίστροφη μεταγραφή μίας αλληλουχίας RNA, απαιτείται η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε μικρή έκταση γύρω από το τμήμα που αποτελεί το στόχο για ενίσχυση. Η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στην περιοχή στόχο αποτελεί τη βάση για το σχεδιασμό και κατασκευή δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων, οι οποίες χρησιμεύουν ως εκκινητές (primers) στην αντίδραση πολυμερισμού. Το μήκος (συνήθως 20-30 βάσεις) και η αλληλουχία των εκκινητών εξασφαλίζει στατιστικά ότι οι εκκινητές έχουν ελάχιστη πιθανότητα

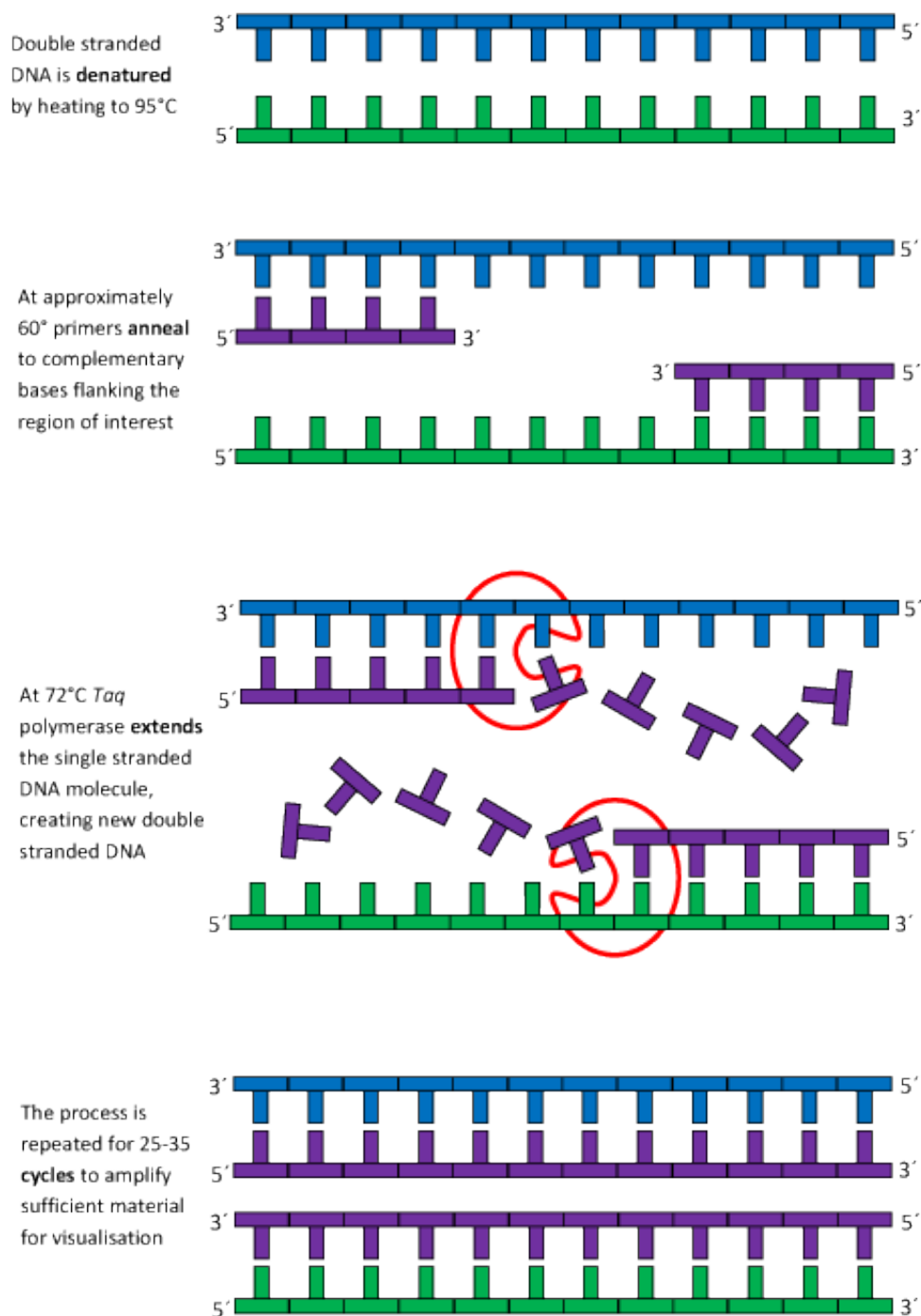
υβριδισμού με άλλες περιοχές του γονιδιώματος, εκτός από εκείνες που έχουν καθοριστεί γύρω από το επιλεγμένο τμήμα DNA. Η αντίδραση PCR εκτελείται με την επανάληψη θερμικών κύκλων που αποτελούνται από αυστηρά επιλεγμένα και καθορισμένα στάδια τα οποία περιγράφονται παρακάτω (Εικόνα 2):

- *Αποδιάταξη* (denaturation) στους $\sim 95^{\circ}\text{C}$: Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλινα μόρια DNA αποχωρίζονται πλήρως με αποτέλεσμα να παράγονται μονόκλωνες αλυσίδες που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν ως μήτρες για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση.
- *Επανασύνδεση* (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται έτσι ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μονόκλινα μόρια του DNA. Κάθε εκκινητής υβριδοποιείται με τον συμπληρωματικό του κλώνο αντίστοιχα, έχοντας το 3'-OH άκρο του στραμμένο το ένα προς το άλλο. Η θερμοκρασία εξειδίκευσης της αντίδρασης της PCR καθορίζεται από την σχέση $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$.
- *Σύνθεση* (extension): Στο βήμα αυτό η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C , που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θερμοανθεκτικής Taq (η οποία απομονώνεται από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*) DNA πολυμεράσης, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA στόχου που πρόκειται να ενισχυθεί.

2.3.1. Συνθήκες αντιδράσεων της PCR και εκκινητές

Γενικά, 0.5 έως 2 μg του εκχυλίσματος DNA από κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl . Η αντίδραση περιλάμβανε 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 150 μM από κάθε dNTP, 0.5 μM από κάθε εκκινητή, Mg^{++} σε τελική συγκέντρωση 2-3 mM και 1.25 U πολυμεράσης.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3) αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων γενετικών τόπων που αποτελούν στόχοι της παρούσας μελέτης ενώ στον Πίνακα 4 αναγράφονται οι συνθήκες της PCR.



Εικόνα 2: Απεικόνιση των βημάτων της Αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Γονίδιο	exon	Codon	Εκκινητές	Tm (°C)	PCR προϊόν (bp)	RFLP προϊόντα (bp)
KRAS	2	12	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA C CT-3' (S)	60	162	29/133 (wt)
			5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA-3' (A)			162 (mut)
		13	5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAA-3' (S)	50	159	85/48/26 (wt)
			5'-GTATCGTCAAGGCACTCTTGCCTA G G-3' (A)			85/74 (mut)
	Polymorphism RS number					
UGT1A1	rs8175347	5'-GCCAGTTCAACTGTTGTTGCC-3' (S)	62	315	Direct sequencing	
		5'-CCACTGGGATCAACAGTATCT-3' (A)				
DPD	rs3918290	5'-ATCAGGACATTGTGACA T ATGTTTC-3'(S)	60	198	181/17 (wt)	
		5'-CTTGTTTTAGATGTAAATCACAC A TA-3'(A)			154/27/17 (mut)	
CD133	rs3130	5'-AGAACTGCAATCTGCACATGA-3'(A)	60	100	100 (wt)	
		5'-TGATCAGCAATGAAGAACTGG-3'(A)			50/50 (mut)	
CD133	rs2286455	5'-ACGCCTCTTTGGTCTCCTTG-3'(A)	60	108	19/89 (wt)	
		5'-TCCATCCCAAGTCCCTTTAG-3'(A)			108 (mut)	

Πίνακας 3: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γενωμικού DNA, θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους, μέγεθος του PCR προϊόντος και των προϊόντων πέψης (wt: wild type, mut: mutant, S: sense, A: antisense). Με κόκκινο σημειώνονται οι μη ομόλογες βάσεις (mismatch) στους εκκινητές που ανιχνεύουν την κάθε αλληλουχία DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας θέσης αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση.

Συνθήκες PCR

Το πρόγραμμα της PCR για τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει είναι:

KRAS κωδικόνιο 12	KRAS κωδικόνιο 13	UGT1A1	DPD
95°C για 5min	95°C για 5min	98°C για 4min	96°C για 5min
95°C για 40sec	95°C για 40sec	93°C για 30sec	96°C για 30sec
60°C για 30sec	50°C για 30sec	62°C για 30sec	60°C για 30sec
72°C για 30 sec	72°C για 30 sec	72°C για 30 sec	72°C για 60 sec
72°C για 6min	72°C για 6min	72°C για 7min	72°C για 5min
35 κύκλοι	35 κύκλοι	25 κύκλοι	35 κύκλοι

Πίνακας 4: Συνθήκες Αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

2.4. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Για την ανίχνευση των KRAS μεταλλάξεων καθώς επίσης και του πολυμορφισμού rs3918290 στο DPD γονίδιο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP. Στην μέθοδο PCR αναφερθήκαμε παραπάνω, έτσι σε αυτό το κεφάλαιο θα ασχοληθούμε με την μέθοδο RFLP.

Η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP-Restriction fragment length polymorphism) αφορά στην ενζυμική κατάτμηση των PCR προϊόντων για την ανίχνευση γονοτύπων ως προς έναν πολυμορφισμό. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην στη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών (restriction enzymes). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που

αναγνωρίζουν συγκεκριμένες δίκλωνες αλληλουχίες DNA, τις θέσεις περιορισμού (restriction sites), και πέπτουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης, υδρολύοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και δημιουργώντας περιοριστικά θραύσματα (restriction fragments). Οι θέσεις περιορισμού είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, μήκους συνήθως 4-8 bp που συνήθως είναι παλίνδρομες. Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα έχουν απομονωθεί από βακτήρια, όπου συμμετέχουν στην προστασία τους από ιικές μολύνσεις, μέσω του συστήματος μετατροπής και μεθυλίωσης. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τη δραστηριότητα των περιοριστικών ενδονουκλεασών, στους οποίους περιλαμβάνονται το pH, η ιοντική συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (buffer) και η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η αντίδραση πέψης.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες βρίσκουν εφαρμογή σε θέματα σχετικά με τα RFLPs. Η αλλαγή της αλληλουχίας στο σημείο αναγνώρισης του ενζύμου, όπως η αντικατάσταση ή η απαλοιφή μιας βάσης, προκαλεί τον σχηματισμό θραυσμάτων διαφορετικών μεγεθών. Επομένως, σε περιπτώσεις που ένας SNP (Single-nucleotide polymorphism) εντοπίζεται στη θέση περιορισμού μιας ενδονουκλεάσης, η γονοτύπηση για αυτόν τον πολυμορφισμό μπορεί να γίνει με την τεχνική της PCR-RFLP. Οι αναλύσεις γονοτύπησης που γίνονται με PCR-RFLP περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

- Πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA που περικλείει τον πολυμορφισμό με PCR.
- Κατάτμηση των PCR προϊόντων με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού.

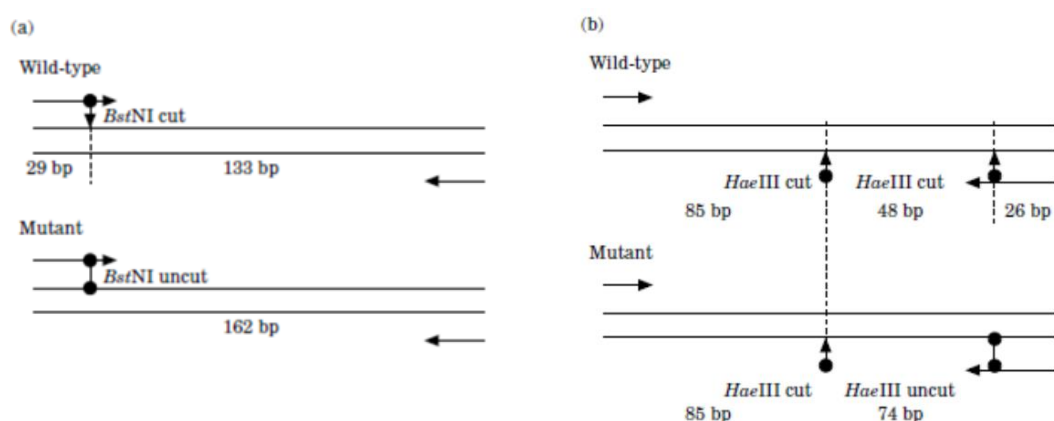
- Διαχωρισμός των θραυσμάτων που προκύπτουν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.4.1. Ανίχνευση μετάλλαξης στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου

Για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 και 13 του KRAS έγινε εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης (mismatch) στους εκκινητές που ανιχνεύουν το κάθε κωδικόνιο (Πίνακας 3) με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstN I για το κωδικόνιο 12 και μία θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης HaeIII για το κωδικόνιο 13 (φέρει ενδογενώς άλλη μία θέση αναγνώρισης της HaeIII που λειτουργεί ως «μάρτυρας»). Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η λανθασμένη εκτίμηση μίας ατελούς πέψης και η εύρεση ψευδών μεταλλάξεων. Η εισαγωγή αυτής της ένθεσης έγινε γιατί δεν υπάρχουν ενδογενώς θέσεις αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες που να περιλαμβάνουν το κωδικόνιο 12 ή το κωδικόνιο 13, με αποτέλεσμα να πρέπει να δημιουργηθούν τεχνητά. Για την ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12, εκκινητής που βρίσκεται στο 5' άκρο (K5') έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο C αντί για G στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11, δημιουργώντας έτσι μια θέση αναγνώρισης για το BstN I (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Σημειακή μετάλλαξη σε μία από τις δύο αυτές θέσεις καταστρέφει τη θέση αναγνώρισης του BstN I (Εικόνα 3a) ενώ σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο νουκλεοτίδιο, το οποίο δεν ελέγχεται με το συγκεκριμένο ένζυμο, είναι «παρανοηματική» μετάλλαξη (non sense mutation). Αυτό συμβαίνει γιατί τα κωδικόνια: GGA, GGC, GGT και GGG

κωδικοποιούν όλα για το αμινοξύ γλυκίνη (Gly). Για το κωδικόνιο 13 έγινε εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης στον αντινοσηματικό (antisense) εκκινητή με αποτέλεσμα την δημιουργία μίας θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης HaeIII (GGCC) στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου (wt) (Εικόνα 3b).

Μέρος των προϊόντων PCR (10-40 μ l) υφίσταται πέψη με 30 U BstN I ή 30 U HaeIII αντίστοιχα, στους 60°C για το ένζυμο BstN I και στους 37°C για το ένζυμο HaeIII, για 16 ώρες, οπότε προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα DNA για το φυσιολογικό (wt) και το μεταλλαγμένο γονίδιο (mut) (Πίνακας 3). Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



Εικόνα 3: Χάρτης περιορισμού των προϊόντων πολλαπλασιασμού του εξωνίου 1 του KRAS γονιδίου που προέκυψε μετά από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα (PCR-RFLP). (a) Χάρτης περιορισμού για το κωδικόνιο 12 μετά την πέψη με το ένζυμο BstN I, (b). Χάρτης περιορισμού για το κωδικόνιο 13 μετά την πέψη με το ένζυμο HaeIII [4].

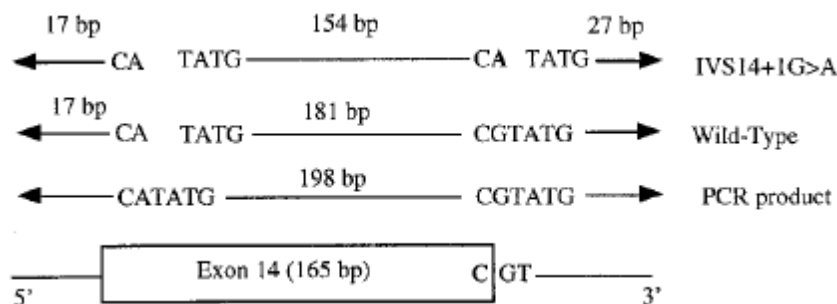
2.4.1. Ανίχνευση πολυμορφισμού DPD IVS14 + 1G > A (rs3918290) στο DPD γονίδιο

Για την ανάλυση της DPD IVS14 + 1G > A μετάλλαξης, έγινε εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης (mismatch) στον αντινοσηματικό εκκινητή (G→A) με αποτέλεσμα τη

δημιουργία μίας θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης NdeI (CATATG) για το εξόνιο 14. Με αυτό τον τρόπο έγινε μία άμεση ανίχνευση του IVS1411G.A πολυμορφισμού με την μέθοδο RFLP. Προς αποφυγή λανθασμένης εκτίμησης μίας ατελούς πέψης καθώς και της εύρεσης ψευδών μεταλλάξεων, εισήχθη στο 5'άκρο του PCR προϊόντος μία επιπλέον θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης NdeI μέσω της εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης στον νοηματικό (sense) εκκινητή (A →T). Η νέα αυτή θέση αποτελεί τον «μάρτυρα».

Το μήκος του προϊόντος που προκύπτει από την PCR έχει μέγεθος 198bp, πριν την πέψη με το ένζυμο NdeI. Μετά την πέψη, το αγρίου τύπου αλληλόμορφο (wt) παράγει δύο τμήματα μήκους 181 και 17bp. Αντίθετα, το προϊόν της PCR που θα φέρει την σημειακή μετάλλαξη (G→A) στο εξόνιο 14 (mut), θα παράγει τρία τμήματα μήκους 17 bp, 154 bp και 27 bp, μετά την πέψη με το ένζυμο NdeI (Πίνακας 3-Εικόνα 4).

Μέρος των προϊόντων PCR (10-40 μl) υφίσταται πέψη με 30 U NdeI, στους 37°C για 16 ώρες, οπότε προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα DNA για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο γονίδιο (Πίνακας 3). Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



Εικόνα 4: Χάρτης περιορισμού των προϊόντων πολλαπλασιασμού του εξονίου 14 του DPD γονιδίου που προέκυψε μετά από πέψη με το ένζυμο NdeI (PCR-RFLP) [5]

2.4.2. Ανίχνευση των πολυμορφισμών rs3130 και rs2286455 στην 3'UTR περιοχή του CD133 γονιδίου.

Για την ανάλυση του rs3130 πολυμορφισμού, έγινε εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης (mismatch) με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI. Έτσι έγινε μία άμεση ανίχνευση του rs3130 πολυμορφισμού με την μέθοδο RFLP.

Το μήκος του προϊόντος που προκύπτει από την PCR έχει μέγεθος 100bp, πριν την πέψη με το ένζυμο EcoRI. Μετά την πέψη των PCR προϊόντων με EcoRI το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (mut) δίνει δύο κομμάτια μήκους 50bp το καθένα, ενώ το φυσιολογικό αλληλόμορφο (wt) δεν φέρει θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού και δίνει ένα κομμάτι μεγέθους 100bp.

Όσον αφορά την ανίχνευση του rs2286455 πολυμορφισμού, εισήχθη με την χρήση των κατάλληλων εκκινητών (Πίνακας 3) μία θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού MboI. Το μήκος του προϊόντος που προκύπτει από την PCR έχει

μέγεθος 108bp, πριν την πέψη με το ένζυμο MboI. Στο φυσιολογικό αλληλόμορφο (wt) υπάρχει μία θέση αναγνώρισης για το ένζυμο MboI και μετά από πέψη του PCR προϊόντος προκύπτουν δύο κομμάτια με μέγεθος 19 bp και 89 bp. Αντίθετα στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (mut) αυτή η MboI θέση αναγνώρισης καταστρέφεται και έτσι το PCR προϊόν δεν πέπτεται (μέγεθος προϊόντος 108bp).

Μέρος των προϊόντων PCR (10-40 µl) υφίσταται πέψη με 30 U EcoRI ή MboI αντίστοιχα, στους 37°C για 16 ώρες, οπότε προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα DNA για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (Πίνακας 3). Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

.

2.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα αποτελέσματα της PCR και της μεθόδου RFLP αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση DNA μορίων. Μόρια DNA μεγέθους 200 b έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κινείται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μοριακού του βάρους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Το DNA γίνεται ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA.

Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης ολικού DNA

- Προσθέτουμε 2g αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος 1xTBE (Tris/Borate/EDTA: 0.09M TrisHCl, 0.09M boric acid, 2.5mM EDTA, pH 8.3)
- Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως.
- Προσθέτουμε 10 μl χρωστικής GelRed (10 mg/ml stock διάλυμα) ή EtBr (0,25 μg\ml) και αναδεύουμε καλά.
- Το διάλυμα ψύχεται σε τρεχούμενο νερό βρύσης, μέχρι τους 50-60°C.
- Τοποθετούμε το διάλυμα στο εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης και περιμένουμε, μέχρι να ψυχθεί και να σχηματιστεί το στερεό πήκτωμα.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης
- Αναμιγνύουμε 15μl ολικού DNA με 2 μl διαλύματος φόρτωσης (bromophenol blue) και τοποθετούμε το μίγμα στην κατάλληλη θέση του πηκτώματος.
- Ρυθμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε τάση 80mV και χρόνο 1 ώρα.
- Μεταφέρουμε το πήκτωμα σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζουμε το πήκτωμα σε ψηφιακή κάμερα.

2.6. Μέθοδος της ανάλυσης πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP- Single Strand Conformational Polymorphism)

Για την ανίχνευση του UGT1A1*28 (rs8175347) πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-SSCP (Εικόνα 5).

Η ανάλυση SSCP είναι μια από τις πιο απλές μεθόδους ανίχνευσης άγνωστων μεταλλάξεων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μικρών ελλειμμάτων ή ενθέσεων καθώς και μονονουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών. Η χρήση της βασίζεται στην αρχή ότι η δευτεροταγής δομή του μονόκλωνου DNA, που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, είναι χαρακτηριστική της συγκεκριμένης αλληλουχίας του μορίου του DNA. Έτσι η διαμόρφωση μορίων DNA που διαφέρουν έστω και κατά μια βάση είναι διαφορετική και έχει σαν αποτέλεσμα την μετακίνησή τους με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, απουσία αποδιατακτικών ουσιών.

Η ακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία του N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδη, ενός μορίου διασυνδέτη. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός πορώδους πηκτώματος.

Η περιοχή που ελέγχεται για την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων ενισχύεται με PCR. Πριν την ηλεκτροφόρησή των PCR προϊόντων, αυτά υφίστανται αποδιάταξη με θέρμανση ώστε να σχηματιστούν οι μονόκλωνες αλυσίδες. Στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση, η οποία πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με διάλυμα νιτρικού αργύρου.

Υπάρχουν παράγοντες που επηρεάζουν την διακριτική ικανότητα της SSCP μεθόδου. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με την διαμόρφωση του μονόκλωνου τμήματος DNA και πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την εφαρμογή της SSCP. Έτσι, η θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση είναι

κρίσιμη, καθώς υψηλές θερμοκρασίες, λόγω αποδιατακτικών επιδράσεων, μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της τριτοταγούς δομής με αποτέλεσμα τη μείωση της διακριτικής ικανότητας. Επίσης, επίδραση στη διακριτική ικανότητα έχει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, που επιλέγεται κυρίως βάση του μεγέθους του DNA και καθορίζεται τόσο από την συγκέντρωσή του πηκτώματος όσο και από την αναλογία της N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης. Όσον αφορά το μέγεθος του υπό ανάλυση DNA, αυτό επηρεάζει την διακριτική ικανότητα της μεθόδου αντιστρόφως ανάλογα. Έτσι όσο αυξάνει το μήκος του προϊόντος τόσο παρατηρείται μείωση της διακριτικής ικανότητας. Όταν υπάρχουν κομμάτια μεγαλύτερα σε μέγεθος, τότε χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα τα οποία κόβουν το κομμάτι σε άλλα μικρότερα. Τέλος σημαντικό ρόλο παίζουν και οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης καθώς η υψηλή τάση (volt) οδηγεί σε υπερθέρμανση του πηκτώματος με αποτέλεσμα την όχι καλή αποδιάταξη του DNA.

Όταν το τμήμα του DNA που ελέγχεται με τη μέθοδο αυτή δεν φέρει σημειακές μεταλλάξεις εμφανίζονται στο πήκτωμα δύο ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Όταν έχουμε δείγματα τα οποία φέρουν μία συγκεκριμένη μετάλλαξη, το πρότυπο των ζωνών που λαμβάνεται είναι διαφορετικό: Για ομοζυγώτη, για την συγκεκριμένη μετάλλαξη, εμφανίζονται πάλι δύο ζώνες διαφορετικής όμως κινητικότητας. Για ετεροζυγώτη, με δύο διαφορετικές μεταλλάξεις, εμφανίζονται τέσσερις ζώνες [6].

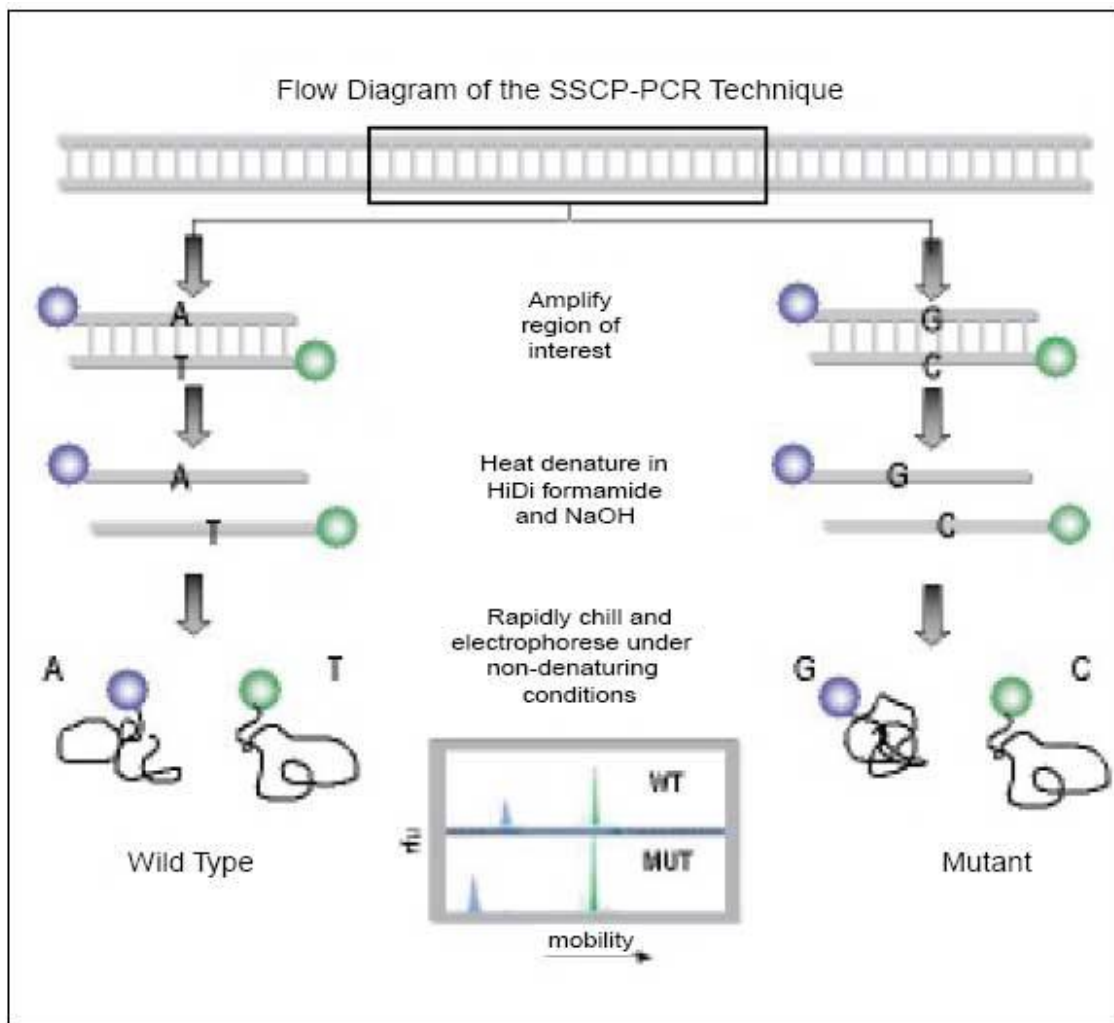
Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης μονόκλωνου DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου

- Σε ποτήρι ζέσεως παρασκευάζουμε το διάλυμα ακρυλαμίδης- N,N – μεθυλεν-δισ- ακρυλαμίδης τελικής συγκέντρωσης 38,5% (37,5gr ακρυλαμίδης και 1gr N,N – μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης σε H₂O σε τελικό όγκο 100ml).
- Παρασκευάζουμε το διάλυμα του πηκτώματος, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την συσκευή που χρησιμοποιούμε. Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών του είναι: 10% διαλύματος ακρυλαμίδης (εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα ηλεκτροφορηθούν), 0,5xTBE (10xTBE: 0,9M Trizma base, 0,9M boric acid, 20mM EDTA pH 8.3), 5% γλυκερόλη. Για τον πολυμερισμό του πηκτώματος προσθέτουμε TEMED (που καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS) και ammonium persulfate (APS) (που ξεκινάει τον πολυμερισμό) σε τελική συγκέντρωση 0,1% v/v και τα δύο.
- Στερεοποίηση του πηκτώματος στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Προετοιμασία δειγμάτων: Σε 5μl προϊόντος PCR (~10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης) προσθέτουμε 10μl διαλύματος αποδιάταξης (95% φορμαμίδη, 10mM NaOH, 0,05% Bromophenol blue, 0,5% Xylene Cyanol), αποδιατάσσουμε τα δείγματα με θέρμανση στους 96°C για 10min και τα τοποθετούμε σε πάγο ώστε να διατηρηθεί η μονόκλωνη κατάστασή τους.
- Φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα και ηλεκτροφόρησή τους στα 220V στους 4°C, O/N (overnight).

Χρώση του πηκτώματος σε διάλυμα νιτρικού αργύρου

- Επώαση του πηκτώματος για 3min σε διάλυμα που περιέχει: 2% v/v αιθανόλη (96-100%) και 0,125% v/v οξικό οξύ, σε νερό. Σε αυτό το διάλυμα επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση του DNA στο πήκτωμα.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- Επώαση του πηκτώματος για ~30min σε διάλυμα που περιέχει: 1gr/lit AgNO₃. Σε αυτό το διάλυμα επιτυγχάνεται η σύνδεση του νιτρικού αργύρου με το DNA.
- Επώαση του πηκτώματος για 20min σε διάλυμα που περιέχει: 1,5% w/v NaOH, 0,005% w/v NaBH₄ και 0,5% v/v I HCHO. Σε αυτό το διάλυμα επιτυγχάνεται η αντίδραση της φορμαλδεΐδης παρουσία βάσης με τον AgNO₃, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των ζωνών.
- Εμφάνιση του πηκτώματος και φωτογράφιση των ζωνών σε ψηφιακή κάμερα.

Η επιβεβαίωση των γονοτυπικών αποτελεσμάτων έγινε με άμεση αλληλούχιση (direct sequencing).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανάλυσης πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP).

2.7. Άμεσος προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (direct Sequencing)

Η άμεση αλληλούχιση έγινε με τη μέθοδο των διδεοξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία έχουν ένα υδρογόνο (H) στον 3' άνθρακα του σακχάρου ριβόζης, αντί για τη φυσιολογική ομάδα υδροξυλομάδα (OH) που εντοπίζεται στα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) (Μέθοδος Sanger). Η ενσωμάτωση ενός ddNTP στην αυξανόμενη πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα έχει ως

αποτέλεσμα τον τερματισμό του πολυμερισμού, μιας και ο 5'→3' φωσφοδιεστερικός δεσμός δεν μπορεί να σχηματιστεί απουσία της υδροξυλομάδας.

Στην άμεση αλληλούχιση (direct sequencing) και οι 4 διδεοξυ αντιδράσεις επιτελούνται στο ίδιο σωληνάκι. Αυτό γίνεται λόγω του ότι κάθε ddNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) είναι σημασμένο με μία διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Συνεπώς, η χρωστική μέσα σε κάθε νεοσυντιθέμενο τμήμα αντιστοιχεί στη χρωστική που είναι προσδεδεμένη στο διδεοξυνουκλεοτίδιο, που προστέθηκε για να τερματίσει τη σύνθεση εκείνου του τμήματος. Μία ρομποτική συσκευή μετακινεί το sample tray, έτσι ώστε κάθε ένα από τα 16 πηγαδάκια να είναι σε επαφή με ένα δεύτερο τριχοειδές σωληνάκι γεμάτο με ένα πολυμερές. Το πολυμερές αντικαθιστά ένα διάδρομο της γέλης ηλεκτροφόρησης. Το σημασμένο DNA από αυτό το πηγαδάκι μετακινείται μέσα σε αυτό το τριχοειδές σωληνάκι, όπου τα μικρότερου μεγέθους σημασμένα τμήματα μετακινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Ένας μετρητής χρωστικής κι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής εντοπίζουν και καταγράφουν τη χρωστική που είναι προσδεδεμένη στα τμήματα τα οποία διατρέχουν τη γέλη. Η αλληλουχία καθορίζεται από τη σειρά με την οποία καταγράφονται οι χρωστικές από τη γέλη.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η διαδικασία της αλληλούχισης έγινε με την χρήση του συστήματος χρώσης ροδαμίνης (dRhodamine) (Rhodamine dye terminator cycle sequencing kit-Big Dye; Applied Biosystems). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιληπτικά είναι η εξής:

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με Sephadex microspin columns (Amersham Biosciences) και ακολούθησε δεύτερη αντίδραση PCR με τον ένα

εκκινητή, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυση μονόκλωνου PCR προϊόντος. Η αντίδραση έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή με την χρήση του συστήματος Rhodamine dye terminator cycle sequencing kit για 26 κύκλους. Ακολουθεί κατακρήμνιση του PCR προϊόντος με EDTA 125 mM και καθαρισμός με 70% αιθανόλη. Στην συνέχεια το ίζημα με το PCR προϊόν επαναδιαλύεται σε φορμαμίδη (βεβαιώνει ότι το DNA παραμένει γραμμικό). Οι κλώνοι αποδιατάχθηκαν για 5 min στους 95°C και τα PCR προϊόντα φορτώθηκαν στον γενετικό αναλυτή ABI 377 (Applied Biosystems). Οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν διπλά κάνοντας χρήση ξεχωριστά των πρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών κάθε φορά. Τα δεδομένα της αλληλούχισης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό ανάλυσης αλληλουχιών (Sequence Analysis 3.7, Applied Biosystems).

3. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων γονοτύπησης

Στην παρούσα μελέτη η στατιστική ανάλυση έγινε με την χρήση του προγράμματος στατιστικής ανάλυσης GraphPad version 3.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Ως πρώτο μέλημα κατά τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας, απαιτείται να διερευνηθεί αν οι υπό μελέτη πληθυσμοί μας για τον κάθε γενετικό τόπο που μας ενδιαφέρει βρίσκονται σε ισορροπία Hardy – Weinberg. Είναι σημαντικό να επικρατούν συνθήκες τυχαίας διασταύρωσης (random mating), αναφορικά με τον υπό μελέτη γενετικό τόπο, διαφορετικά ότι τα δεδομένα μας και η απορρέουσα στατιστική ανάλυση θα είναι «μεροληπτική» (biased). Για το σκοπό αυτό,

εφαρμόστηκε η δοκιμασία «chi square goodness of fit». Μόνο στην περίπτωση ικανοποίησης της ισορροπίας Hardy – Weinberg, έπεται συνέχεια στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας, εφαρμόζοντας τον αμφίπλευρο ακριβή έλεγχο του Fisher (two – tailed Fisher’s exact test), βάσει του μεγέθους των πληθυσμών μας. Η εν λόγω δοκιμασία θεωρείται «δοκιμασία ακρίβειας», διότι η σημαντικότητα της απόκλισης από τη «μηδενική υπόθεση» μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια.

Η ισορροπία Hardy-Weinberg

Σύμφωνα με τη διατύπωση αυτού του νόμου, σε σχετικά μεγάλους πληθυσμούς όπου δεν υπάρχει ουσιαστικά μετανάστευση, τα ζευγαρώματα θα γίνονται τυχαία απουσία επιλογής και μεταλλαγής και οι συχνότητες των γονιδίων θα παραμένουν οι ίδιες. Η ποικιλομορφία θα μπορούσε να διατηρηθεί κατά τη διάρκεια των γενεών. Ο νόμος αυτός ήταν στην ουσία μια προσπάθεια του μαθηματικού G. Harold Hardy να αποδείξει την παραπάνω θεωρία που πρότειναν γιατροί και βιολόγοι στην αρχή του 19ου αιώνα και αποτελεί μια προσπάθεια να συνδυαστούν η θεωρία της εξέλιξης του Δαρβίνου, η κληρονομικότητα κατά Mendel και οι σύγχρονες παρατηρήσεις για την εξέλιξη.

Στις περιπτώσεις που εξετάζουμε την ισορροπία Hardy-Weinberg ακολουθούμε την εξής διαδικασία. Οι γονοτυπικές συχνότητες κατανέμονται ανάλογα με τις συχνότητες των αλληλομόρφων στον πληθυσμό και παραμένουν σταθερές από γενεά σε γενεά. Έτσι, εάν p είναι η συχνότητα ενός αλληλομόρφου και q η συχνότητα του άλλου, τότε οι συχνότητες των τριών γονοτύπων δίνονται από το ανάπτυγμα του διωνύμου $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, όπου p^2 : η συχνότητα εμφάνισης του ενός ομοζυγώτη, $2pq$: η συχνότητα εμφάνισης του ετεροζυγώτη και q^2 : η

συχνότητα εμφάνισης του έτερου ομοζυγώτη. Ο πληθυσμός $p^2:2pq:q^2$ θεωρείται ότι βρίσκεται σε ισορροπία. Η ισχύς του νόμου ελέγχθηκε με τη στατιστική δοκιμασία «Chi square Goodness of fit».

Το κριτήριο χ^2

Η διερεύνηση της ισχύος του νόμου πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των παρατηρούμενων γονοτυπικών συχνοτήτων σε σχέση με τις αναμενόμενες υπό τις συνθήκες της ισορροπίας Hardy–Weinberg. Το κριτήριο χ^2 μας επέτρεψε να εκτιμήσουμε την απόκλιση ανάμεσα στις θεωρητικά αναμενόμενες συχνότητες και στις παρατηρούμενες κι εν γένει, εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\chi^2 = \sum (\Pi - A)^2 / A$$

όπου Π είναι οι παρατηρούμενες τιμές και A οι θεωρητικώς αναμενόμενες τιμές.

Η τιμή χ^2 δίνει για συγκεκριμένους βαθμούς ελευθερίας B.E. (οι οποίοι εκφράζουν κατά πόσους τρόπους μπορεί να μεταβληθεί ένα σύστημα) την πιθανότητα (P) συμφωνίας των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών με τις τιμές που παρατηρήθηκαν.

Στην παρούσα εργασία, ορίστηκε ως επίπεδο σημαντικότητας το 5 % (όρια εμπιστοσύνης 95 %). Πιθανότητα μεγαλύτερη του επιπέδου σημαντικότητας σημαίνει συμφωνία, δηλαδή στην πράξη, τα αποτελέσματά μας δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (η μηδενική υπόθεση είναι αποδεκτή, ο πληθυσμός για τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg). Αντίθετα, όταν η τιμή P που υπολογίζουμε είναι μικρότερη του επιπέδου σημαντικότητας

0,05, αυτό σημαίνει πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των θεωρητικών και πραγματικών τιμών (η μηδενική υπόθεση δεν γίνεται αποδεκτή). Αναφορικά με τον υπολογισμό των βαθμών ελευθερίας (d.f), αυτοί δίδονται από τη μαθηματική σχέση:

$$d.f. = k - 1 - m$$

όπου k: ο αριθμός των τάξεων και m: ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών. Για ένα σύστημα δυο αλληλομόρφων υπάρχουν τρεις τάξεις και μια ανεξάρτητη μεταβλητή και συνεπώς, έχουμε έναν βαθμό ελευθερίας.

Η τιμή του κριτηρίου χ^2 προκύπτει από το άθροισμα των επιμέρους τετραγώνων για κάθε τάξη, δηλαδή κάθε γονότυπο. Με βάση τον ακόλουθο μερικό πίνακα του κριτηρίου χ^2 για τις κριτικές τιμές (upper tail), η κριτική τιμή που θα καθορίσει την αποδοχή ή την απόρριψη της μηδενικής μας υπόθεσης είναι ίση του 3.841

^o d.f.	0.10	0.05	0.025	0.01	0.001
1	2.706	3.841	5.024	6.635	10.828
2	4.605	5.991	7.378	9.210	13.816
3	6.251	7.815	9.348	11.345	16.266
4	7.779	9.488	11.143	13.277	18.467
5	9.236	11.070	12.833	15.086	20.515

Πίνακας 5: Πίνακας κρίσιμων τιμών του κριτηρίου χ^2 (upper tail)

Αμφίπλευρος ακριβής έλεγχος του Fisher

Ο αμφίπλευρος ακριβής έλεγχος του Fisher είναι ένας μη παραμετρικός έλεγχος, ανεξαρτησίας και ομοιογένειας. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση διακριτών δεδομένων, όταν τα δυο ανεξάρτητα δείγματα έχουν μικρό μέγεθος. Τα αποτελέσματα αυτών των δειγμάτων αντιστοιχούν στη μια από τις δύο τυχαίες κατηγορίες και κάθε στοιχείο αυτών είναι δυνατό να έχει το ένα από τα δύο χαρακτηριστικά. Έστω n_1 , n_2 δυο ανεξάρτητα τυχαία δείγματα με $N = n_1 + n_2$.

Ο έλεγχος δεν εξετάζει μόνο την παρατηρούμενη περίπτωση, αλλά υπολογίζει την πιθανότητα πιο ακραίων περιπτώσεων με τα ίδια περιθώρια αθροίσματα. Έτσι, το p υπολογίζεται με το άθροισμα των πιθανοτήτων όλων των ακραίων περιπτώσεων και του δοσμένου πίνακα (στην παρούσα ανάλυση, της μορφής 3×2):

	Group 1	Group 2
Παρατήρηση A		
Παρατήρηση B		
Παρατήρηση C		

Εικόνα 5: Υπόδειγμα εισαγωγής συχνοτήτων για την πραγματοποίηση αμφίπλευρου ακριβή ελέγχου του Fisher, επέκταση 2×3 . Παρατηρήσεις, δηλαδή κατηγορία γονότυπου, στον άξονα του Y και πληθυσμιακή κατηγορία δείγματος (Group) στον άξονα του X.

Ο εν λόγω έλεγχος είναι ιδανικός στις περιπτώσεις που στον πίνακα ενδεχομένων έχουμε πολύ μικρά μεγέθη (δηλαδή έχω αριθμό μικρότερο του 5). Με τη χρήση του, λαμβάνουμε μια πιο ακριβή τιμή p , αν και χαρακτηρίζεται από πιο

πολύπλοκους υπολογισμούς, συγκριτικά με το κριτήριο χ^2 (το οποίο καταλήγει σε μια μόνο προσεγγιστική τιμή p).

Η μηδενική υπόθεση, εδώ, είναι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ X και Y , δηλαδή πληθυσμιακής κατηγορίας δείγματος και γονοτύπων. Το ερώτημα που ερευνούμε για την στατιστική του σημασία είναι συνεπώς το ακόλουθο: αν η μηδενική υπόθεση ήταν αληθής και επομένως, οποιαδήποτε σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών X και Y οφείλεται στην τύχη και μόνο, πόσο πιθανό είναι ότι θα καταλήξουμε σε ένα αποτέλεσμα, όπου εμπεριέχονται οι μεγαλύτερες δυνατές τιμές που μπορεί να παίρνουμε, αν καταγράφαμε όλους τους συνδυασμούς που οδηγούν στο άθροισμα των δειγμάτων μας; (δηλαδή, αν αθροίσουμε κάθε στήλη (X) και κάθε σειρά (Y) και χρησιμοποιήσουμε αυτές τις τιμές ως όρια της στήλης και της σειράς, αντίστοιχα).

Στην περίπτωση των γονοτύπων καταφύγαμε στην επέκταση του αμφίπλευρου ακριβή έλεγχου του Fisher 2×3 . Στην περίπτωση αυτή, εκτελούμε μια επέκταση Freeman-Halton της εν λόγω δοκιμασίας πιθανοτήτων, σε πίνακα με δύο γραμμές κι τρεις στήλες.

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε τις συχνότητες των αλληλομόρφων και γονοτύπων ασθενών, αντιπαραθέτοντας τες με την ανταπόκριση των ασθενών στο φαρμακευτικό σχήμα και την τοξικότητα.

Σκοπός

Σκοπός της προτεινόμενης εργασίας είναι η μελέτη της προγνωστικής αξίας γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με την τοξικότητα και την κλινική

απόκριση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο στους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με ιρινοτεκάνη.

Αποτελέσματα

Στην πρώτη ομάδα της μελέτης έχει πραγματοποιηθεί συλλογή δειγμάτων αίματος από 58 ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο που είχαν λάβει χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς φθοριοπυριμιδών με ιρινοτεκάνη με Bevasizumab. Ο γονότυπος τους αναλύθηκε με επιτυχία για τους πολυμορφισμούς rs3130 και rs2286455 του γονιδίου CD133. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων που παρατηρήθηκαν για τους δύο πολυμορφισμούς βρέθηκαν εντός των ορίων πιθανότητας της ισορροπίας Hardy-Weinberg (rs3130 $p=0.055$ και rs2286455 $p=0.146$). Η ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης (LD) έδειξε μια ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των δύο πολυμορφισμών ($D'=0.37$, $R_2=-0,186$, $p=0.04$). Δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα σε κλινοπαθολογικές παραμέτρους και στους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς.

Έχει γίνει κατανομή των ασθενών σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ανταπόκρισή τους (36,21%) ή μη (63,79%) στα χημειοθεραπευτικά σχήματα με ιρινοτεκάνη μετά από χρονικό διάστημα δώδεκα εβδομάδων σύμφωνα με τα κριτήρια ανταπόκρισης Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (R.E.C.I.S.T.). Από τους συνολικά 58 ασθενείς, οι 12 ασθενείς είχαν αποβιώσει. Ο μέσος όρος της παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών ήταν 38,5 μήνες (εύρος 12-96 μήνες).

Αναφορικά με την ύπαρξη μετάλλαξης στο KRAS γονίδιο οι 33 από το σύνολο των εξετασθέντων ασθενών ήταν φορείς του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στο κωδικόνιο 12 και 5 ασθενείς ήταν φορείς του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στο κωδικόνιο 13. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.28$) μεταξύ των φορέων μεταλλαγμένων αλληλόμορφων του KRAS ανάμεσα στους ασθενείς που είχαν στάσιμη νόσο (SD) και σε αυτούς που είχαν πρόοδο νόσου (PD) ($p=0,76$).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κατανομές των γονότυπων για τους πολυμορφισμούς rs3130, και rs2286455. Όμως όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 2, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών ανταπόκρισης και των γονότυπων των δύο πολυμορφισμών rs3130 και rs2286455. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών ανταπόκρισης και των rs3130/rs2286455 απλοτύπων (παγκόσμιος συσχετισμός απλοτύπων global haplotype association, $p=0,37$). Δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση με τα ποσοστά ανταπόκρισης όταν αναλύθηκαν ξεχωριστά οι συχνότητες των γονότυπων/απλοτύπων των 15 ασθενών που έλαβαν bevasizumab, ιρινοτεκάνη και 5-FU καθώς και των 43 ασθενών που έλαβαν bevasizumab, ιρινοτεκάνη και capecitabine. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3 η παρουσία του KRAS δεν συσχετίζεται με τους γονότυπους των rs3130 και rs2286455 των ασθενών.

Είναι σημαντικό να επισημανθούν οι πιο συχνές κύριες τοξικότητες που παρατηρήθηκαν και έχουν ως εξής:

- ναυτία (22 ασθενείς)
- ουδετεροπενία (14 ασθενείς)

Αναλυτικότερα, στον συνδυασμό bevasizumab, ιρινοτεκάνης και capecitabine 15 ασθενείς παρουσίασαν ναυτία και 10 παρουσίασαν ουδετεροπενία, ενώ από τους ασθενείς που έλαβαν τον συνδυασμό bevasizumab, ιρινοτεκάνη και 5-FU 7 από τους ασθενείς παρουσίασαν ναυτία και 4 ουδετεροπενία. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο προφίλ τοξικότητας και στους συνδυασμούς θεραπείας που χορηγήθηκαν ($p=1.00$, OR: 1.16, 95%CI: 0,27-5,06). Δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ εμφανιζόμενης τοξικότητας των γοντύπων των πολυμορφισμών rs3130 και rs2286455. Όμως, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p = 0.0017$) συσχέτιση με παρουσία του CC γονότυπου του πολυμορφισμού rs3130 με ασθενείς που παρουσίασαν μειωμένη τοξικότητα στις θεραπείες συνδυασμού bevasizumab. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της παρατηρούμενης ναυτίας και ουδετεροπενίας και των rs3130 και rs2286455 γονοτύπων/ απλοτύπων. Ο Πίνακας 4 απεικονίζει τη σχέση των γονοτύπων των δύο υπό μελέτη πολυμορφισμών με την τοξικότητα.

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η συσχέτιση των γονότυπων του γονιδίου CD133 με την συνολική επιβίωση (OS). Η επιβίωση υπολογίσθηκε από την ημερομηνία της πρώτης χορήγησης της θεραπείας με συνδυασμούς bevasizumab μέχρι τον θάνατο από οποιαδήποτε αιτία. Για τον πολυμορφισμό rs3130 η μέση επιβίωση για τον κάθε γονότυπο ήταν : TT απροσδιόριστος χρόνος, TC 96 μήνες και CC 24 μήνες. Όσο αφορά τον πολυμορφισμό rs2286455 η μέση επιβίωση για τον κάθε γονότυπο ήταν : GG 96 μήνες, GA απροσδιόριστος χρόνος και AA 62 μήνες.

Ο γονότυπος CC του πολυμορφισμού rs3130 βρέθηκε να σχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερη συνολική επιβίωση στη μελέτη μας ($p = 0,002$), ενώ για τον πολυμορφισμό rs226455 δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση .

Επίσης, δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση των ασθενών που έλαβαν χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς bevasizumab, ιρινοτεκάνη και 5-FU και bevasizumab, ιρινοτεκάνη και capecitabine με την επιβίωση.

Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier με τους γονότυπους παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.

Πίνακας 6. Οι κατανομές των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs3130 και rs2286455

Genotype	Cases/n	Percentage (%)	Differentiation			P	Metastasis			P
			Well	Modestly	Poor		Liver	Lung	Multiple sites	
CD 133 (rs3130)										
TT	17	29.31	3	9	5	0,96	0	5	2	,27
TC	35	60.35	5	16	4	1	2	8	1	
CC	6	10.34	1	3	2		2	3	1	
CD 133 (rs2286455)										
GG	34	58.62	4	14	6	,26	4	8	2	,77
GA	18	31.03	3	11	4		1	6	1	

					1			
AA	6	10.35	2	3	1	3	2	1

Πίνακα 7. Η σχέση μεταξύ των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs3130 και rs2286455 και της ανταπόκρισης των ασθενών στους συνδυασμούς θεραπείας με bevasizumab.

Genotype	SD/n	PD/n	P; OR (CI95%)
CD 133 (rs3130)			
TT	9	8	1.00 [Reference]
TC	10	25	0.13; 2.81 (0.84-9.34)
CC	2	4	0.64; 2.25 (0.32 - 15.76)
Dominant TT vs TC+CC			0.09; 2.72 (0.85-8.73)
CD133 (rs2286455)			
GG	11	23	1.00 [Reference]
AG	8	10	0.54; 0.59 (0.18-1.94)
AA	2	4	1.00; 0.96 (0.15-6.05)
Dominant GG vs			0.47; 0.67(0,23-

AG+AA	1,98)
-------	-------

Πίνακας 8. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου CD133 σε σχέση με την παρουσία του KRAS.

Genotype	KRAS wild	KRAS	P; OR (CI95%)
	type	mutated	
rs3130			
TT	5	12	1.00 [Reference]
			0.76; 0,71 (0.20-
TC	13	22	2.46)
			1.00; 0.83 (0.11-
CC	2	4	6.11)
Dominant TT			0.76; 0.72 (0.21-
vs TC+ CC			2.45)
rs2286455			
GG	14	20	1.00 [Reference]
			0.23; 2.45 (0.66-
AG	4	14	9.03)
			1.00; 1.4 (0.22-
AA	2	4	8.73)
Dominant GG			0.27; 2.1 (0.66-
vs AG + AA			6.63)

Πίνακας 9. Η σχέση μεταξύ των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs3130 και rs2286455 με την εμφανιζόμενη τοξικότητα στους συνδυασμούς θεραπείας με bevasizumab.

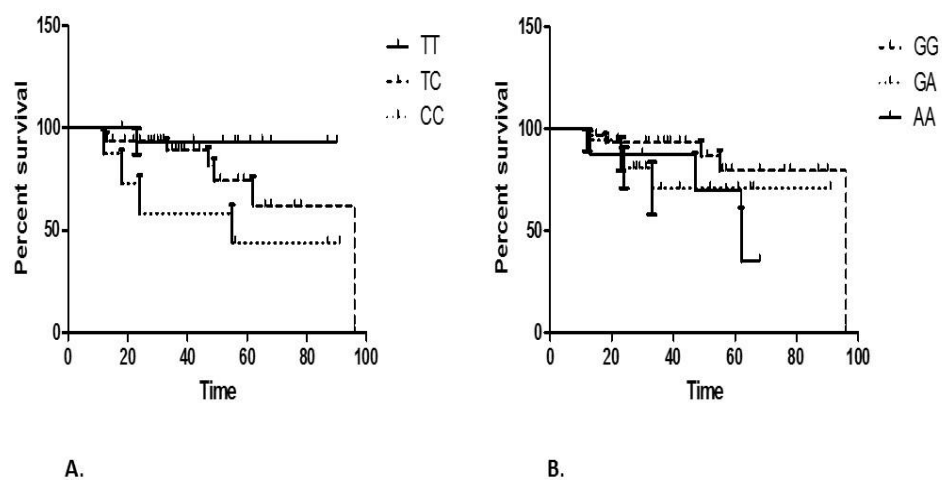
TT	1	93.33	1.00 (Reference)	
TC	7	82.93	0.37 (0.08-1.73)	0.374
CC	4	72.92	0.08 (0.012-0.593)	0.015
CD133 (rs2286455)				
GG	5	87.93	1.00 (Reference)	
GA	4	78.00	0.44 (0.09-1.96)	0.243
AA	3	65.00	0.31 (0.05-1.83)	0.360

a. Ποσοστά επιβίωσης που προέρχονται από την ανάλυση Kaplan-Meier.

Σχήμα 5. Α. Συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με τους γονότυπους του πολυμορφισμού rs3130 στο γονίδιο CD133. Η καμπύλη Kaplan-Meier αντιπροσωπεύει το ποσοστό επιβίωσης σε μήνες των ασθενών με μεταστατικό ΟΚΚ που έλαβαν συνδυασμούς θεραπείας με bevasizumab σε συνάρτηση με τους διαφορετικούς γονότυπους του πολυμορφισμού rs3130. Οι ασθενείς με γονότυπο CC έχουν σημαντικά χαμηλότερη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με εκείνους που έχουν γονότυπο TT ($p = 0,015$).

Β. Συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με τους γονότυπους του πολυμορφισμού rs226455 στο γονίδιο CD133. Η καμπύλη Kaplan-Meier αντιπροσωπεύει το ποσοστό επιβίωσης σε μήνες των ασθενών με μεταστατικό ΟΚΚ που έλαβαν συνδυασμούς θεραπείας με bevasizumab σε συνάρτηση με τους

διαφορετικούς γονότυπους του πολυμορφισμού rs226455. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης (OS) με τους διαφορετικούς γονότυπους του πολυμορφισμού rs226455.



Στη δεύτερη ομάδα μελέτης έχει πραγματοποιηθεί συλλογή δειγμάτων αίματος από 94 ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο που είχαν λάβει χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς φθοριοπυριμιδών με ιρινοτεκάνη με ή χωρίς προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος Panitumumab ή Bevasizumab.

Έχει γίνει κατανομή των ασθενών σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ανταπόκρισή τους (67,17%) ή μη (38,30%) στα χημειοθεραπευτικά σχήματα με ιρινοτεκάνη μετά από χρονικό διάστημα δώδεκα εβδομάδων σύμφωνα με τα κριτήρια ανταπόκρισης Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (R.E.C.I.S.T.).

Από 94 ασθενείς το 60,64% είναι άνδρες και 39,30% γυναίκες με μέση ηλικία 67,42 έτη. 86,17% των ασθενών είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου. Η πλειοψηφία των ασθενών δεν είχαν λάβει συμπληρωματική ΧΜΘ ή ακτινοβολία. Η εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας ήταν με τη σειρά συχνότητας στο σιγμοειδές, στο ορθό, στο ανιόν, στο εγκάρσιο και στο κατión κόλον. Οι μεταστάσεις εντοπιζόταν με τη σειρά συχνότητας στο ήπαρ, στους πνεύμονες, ταυτόχρονα σε πολλαπλές εντοπίσεις, στους λεμφαδένες και στο περιτόναιο.

Αναφορικά με την ύπαρξη μετάλλαξης στο KRAS γονίδιο οι 27 από το σύνολο των εξετασθέντων ασθενών ήταν φορείς του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στο κωδικόνιο 12 (28.72%) και 5 ασθενείς ήταν φορείς του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στο κωδικόνιο 13 (5.32%). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.28$) μεταξύ των φορέων μεταλλαγμένων αλληλόμορφων του KRAS ανάμεσα στους ασθενείς που είχαν στάσιμη νόσο (SD) και σε αυτούς που είχαν πρόοδο νόσου (PD). Κατά την ταξινόμηση των ασθενών με βάση το σχήμα χημειοθεραπείας που τους χορηγήθηκε, προέκυψε ότι από τους 22 ασθενείς που έλαβαν panitumumab οι 4 ήταν φορείς του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στο κωδικόνιο 12, αλλά και πάλι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.15$) ανάμεσα στους φορείς των KRAS μεταλλαγμένων αλληλόμορφων με στάσιμη νόσο και σε αυτούς με πρόοδο νόσου.

Στα πλαίσια της καταγραφής των αποτελεσμάτων στον πίνακα 6 αποτυπώνονται οι κατανομές των γενότυπων για τους DPD IVS14 + 1G > A (rs3918290) και UGT1A1*28 (rs8175347) πολυμορφισμούς, οι οποίες βρίσκονται σε

ισορροπία Hardy-Weinberg. Επιπρόσθετα, όπως καθίσταται εμφανές στον πίνακα 7, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 1.00$) στο βαθμό ανταπόκρισης ανάμεσα στους DPD και στους UGT1A1 γενότυπους. Αναφορικά με τον πολυμορφισμό DPD IVS14 + 1G > A (rs3918290), κατά την ταξινόμηση των ασθενών με βάση την χορήγηση ή μη 5-FU, επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με στάσιμη νόσο και των ασθενών με πρόοδο νόσου.

Τέλος, είναι σημαντικό να επισημανθούν οι πιο συχνές κύριες τοξικότητες που παρατηρήθηκαν και έχουν ως εξής:

- ναυτία (33 ασθενείς)
- ουδετεροπενία (20 ασθενείς)
- διάρροια (1 ασθενής).

Αλλά, όπως απεικονίζεται στον πίνακα 8, δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της τοξικότητας των γονότυπων DPD και UGT1A1.

Πίνακας 11. Οι κατανομές των γονοτύπων των DPD IVS14 + 1G> A (rs 3918290) και UGT1A1*28 (rs8175347) πολυμορφισμών.

Genotype		Cases/n	Percentage
DPD	IVS14+1G>A		
(rs3918290)			
GG		75	79.78
AA		16	17.02
AG		3	3.20
UGT1A1*28 (rs8175348)			

6/6	59	62.77
6/7	29	30.85
7/7	6	6.38

Πίνακας 12. Η σχέση μεταξύ των γονοτύπων των πολυμορφισμών του DPD IVS14 + 1G> A (rs3918290) και UGT1A1 * 28 (rs8175347) και της ανταπόκρισης των ασθενών με CRC που έλαβαν θεραπεία με συνδυασμούς ιρινοτεκάνης.

Genotype	SD/n	PD/n	P; OR (CI95%)
DPD IVS14+1G>A (rs3918290)			
GG	48	27	0.43; 1.6 (0.58-4.42)
GA+AA	10	9	
UGT1A1*28 (rs8175348)			
6/6	40	19	0.13; 1.98 (0.84-4.69)
6/7 + 7/7	18	17	

Πίνακας 13. Η σχέση μεταξύ των γονοτύπων των πολυμορφισμών του DPD IVS14 + 1G> A (rs3918290) και UGT1A1 * 28 (rs8175347) των ασθενών με CRC που έλαβαν θεραπεία με συνδυασμούς ιρινοτεκάνης και η παρατηρούμενη τοξικότητα.

Genotype	Toxicity/ No		P; OR (CI95%)
	n	toxicity/n	
DPD IVS14+1G>A (rs3918290)			
GG	45	30	0.44; 0.6 (0.22-1.65)
GA+AA	9	10	
UGT1A1*28 (rs8175348)			
6/6	32	27	0.52; 1.43 (0.61-3.36)
6/7 + 7/7	22	13	

Συζήτηση

Στα πλαίσια της συζήτησης αξίζει να επισημανθεί ότι η ανάδειξη προγνωστικών βιοδεικτών που θα σχετίζονται με την επίδραση συγκεκριμένων θεραπειών στην έκβαση της νόσου φαίνεται να είναι θεμελιώδους σημασίας. Συνεπώς η ταυτοποίηση νέων βιολογικών δεικτών ικανών να προβλέπουν την ανταπόκριση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες bevasizumab και ιρινοτεκάνη θα είναι κρίσιμοι για ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Οι προγνωστικοί βιοδείκτες που συσχετίζονται με την έκβαση μίας αντινεοπλασματικής αγωγής έχουν σημαντική κλινική χρησιμότητα καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερο

σχεδιασμό του θεραπευτικού πρωτοκόλλου με αποτέλεσμα βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και ελαχιστοποίηση ανεπιθύμητων ενεργειών.

Η πρώτη ομάδα της μελέτης αποτελούνταν από 58 ασθενείς που έλαβαν bevasizumab και ιρινοτεκάνη με capecitabine ή με 5-FU. Από αυτούς τους ασθενείς οι 33 ήταν φορείς για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του κωδικονίου 12 του KRAS ενώ οι 5 ήταν φορείς για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του κωδικονίου 13 του KRAS, χωρίς όμως να μπορούμε να αποδείξουμε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου KRAS και της ανταπόκρισης στην αγωγή που λάβανε. Αξιολογήσαμε τη συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων της βλαστικής σειράς του γονιδίου CD133 και την επίδραση αυτών στους συνδυασμούς θεραπείας με bevasizumab. Ιδιαίτερα αξιολογήθηκε η επίδραση των rs2286455 και rs3130 πολυμορφισμών στην κλινική ανταπόκριση και την τοξικότητα στη bevasizumab. Επιπλέον, μελετήσαμε την επίδρασή των πολυμορφισμών αυτών στη συνολική επιβίωση. Η ανταπόκριση και η τοξικότητα έχουν οριστεί με βάση τα κριτήρια RECIST, RTOG και EORTC αντίστοιχα. Καταλήξαμε πως οι πολυμορφισμοί που αξιολογήθηκαν δεν συσχετίζονταν σημαντικά με την ανταπόκριση στα θεραπευτικά σχήματα και με το προφίλ τοξικότητας. Ωστόσο, με βάση τα στοιχεία μας, η συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του γονοτύπου CC στον πολυμορφισμό rs3130 με την εμφάνιση χαμηλότερης τοξικότητας στους συνδυασμούς της μπεβασιζουμάμπης έφθασε σχεδόν στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0.0017$). Το πιο σημαντικό, αποδείξαμε ότι οι ασθενείς με CC γονότυπο παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη συνολική επιβίωση στα σχήματα της μπεβασιζουμάμπης ($p = 0.08$), παρά τη σχετικά χαμηλή τοξικότητα που παρουσίαζαν υποδηλώνοντας ότι η επιβίωση αυτών δεν μπορεί να αποδοθεί στην

αυξημένη τοξικότητα και πιθανότητα να αντιπροσωπεύει το αποτέλεσμα της θεραπευτικής αγωγής. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο Pohl και οι συνεργάτες του δεν απέδειξαν οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού με τη συνολική επιβίωση δεδομένου ότι καταπιάστηκαν με τους συνδυασμούς των γονότυπων δύο διαφορετικών πολυμορφισμών (Pohl et al., 2013).

Η δεύτερη ομάδα της μελέτης που συμπεριέλαβε 94 ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο που λαμβάνουν ιρινοτεκάνη σε συνδυασμό με bevasizumab ή panitumumab και capecitabine ή 5-FU. Προς αυτήτην κατεύθυνση, επιλέγησαν οι DPD IVS14 + 1G > A (rs3918290) και UGT1A1 * 28 (rs8175347) πολυμορφισμοί οι οποίοι φαίνεται να ασκούν επίδραση στη φαρμακοδυναμική των προαναφερθέντων φαρμάκων[7,8]. Σημειώνεται ότι διενεργήθηκε KRAS ανάλυση πριν από την έναρξη της θεραπείας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο βαθμό ανταπόκρισης των ασθενών με KRAS άγριου τύπου (wild type) συγκριτικά με τους φορείς του μεταλλαγμένου KRAS[13]. Αναφορικά με τον DPD IVS14 + 1G > A (rs3918290) πολυμορφισμό, έχει καταγραφεί ότι η τοξικότητα οφειλόμενη στην capecitabine σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο στους οποίους χορηγείται θεραπεία βασισμένη στην capecitabine σε συνδυασμό με στοχευμένους παράγοντες.[14] Παρόλα αυτά στο παρόν πόνημα δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε στο βαθμό της ανταπόκρισης ούτε στην τοξικότητα που παρατηρήθηκε στους εξετασθέντες ασθενείς. Η υπάρχουσα διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης έρευνας με τις προϋπάρχουσες αναφορές πιθανώς οφείλεται στην παρουσία επιπλέον γενετικών πολυμορφισμών, στο ρόλο μη γενετικών

παραγόντων, όπως το φορτίο νόσου, στη συννοσηρότητα, στην ηλικία, στο χορηγούμενο σχήμα χημειοθεραπείας και στις εκάστοτε δόσεις που επιλέγησαν. Θα μπορούσε, επίσης, να υποστηριχθεί ότι οι μελέτες σε μη τυχαιοποιημένους πληθυσμούς είναι δύσκολο να ανιχνεύσουν αξιόπιστους προγνωστικούς βιοδείκτες, εφόσον δεν μπορούν να διακρίνουν εάν οι διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα οφείλονται στη συμπεριφορά του υποκείμενου όγκου ή στην επίδραση της θεραπείας.

Έχει βρεθεί ότι ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός χαρακτηρίζει ασθενείς με χαμηλά επίπεδα SN-38 γλυκουρονίωσης και μεγαλύτερη τοξικότητα επαγόμενη από την ιρινοτεκάνη. Παρόλα αυτά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν πρέπει να γίνεται έλεγχος ρουτίνας για την παρουσία του UGT1A1 στα κύτταρα της γενετικής σειράς. Υπάρχουν δεδομένα ότι οι ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για UGT1A1*28 και είχαν λάβει ιρινοτεκάνη σε υψηλές δόσεις εμφάνιζαν μεγαλύτερο κίνδυνο για σοβαρή ουδετεροπενία. Στη δική μας μελέτη δεν φάνηκε καμία συσχέτιση μεταξύ UGT1A1*28 πολυμορφισμού και τοξικότητας ή ανταπόκρισης στην ιρινοτεκάνη. Τόσο τα δικά μας δεδομένα όσο και τα δεδομένα από άλλες μελέτες δείχνουν μη σκόπιμη τη χρήση μοριακών δεικτών όπως UGT1A1 στην προβλεψη της τοξικότητας και ανταπόκρισης στη θεραπεία με ιρινοτεκάνη.

Θα άξιζε να επεκταθεί η παρούσα μελέτη σε πληθυσμούς διαφορετικών φυλών αφού είναι πιθανό ο ρόλος των πολυμορφισμών να διαφέρει από πληθυσμό σε πληθυσμό. Επειδή ο μεταβολισμός της ιρινοτεκάνης είναι πολύπλοκος πολυάριθμα γονίδια πέρα του DPD και του UGT1A1 θα πρέπει να διερευνηθούν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228-47.
2. Common Toxicity Criteria, Version 2.0, Cancer Therapy Evaluation Program, National Cancer Institute (NCI), June 1, 1999.
3. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995 Mar 30;31(5):1341-6.
4. Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, Iliadis K, Kodaxis A, Papaioannou D, Labropoulos S, Vasilaki M, Kosmidis P, Saetta A, Mihalatos M, Nasioulas G. A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Mol Cell Probes*. 2001 Oct;15(5):243-7.
5. van Kuilenburg AB1, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, Baas F, Richel DJ, van Gennip AH. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res*. 2001 May;7(5):1149-53.
6. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ and Weghost CM. «Cold SSCP»: a simple, rapid and non-radioactive method for optimizing single strand conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids* 1993; 21(16): 3637-3642.

7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69–90. doi: 10.3322/caac.20107 [PubMed]
8. Pawlik TM, Choti MA. Surgical therapy for colorectal metastases to the liver. *J Gastrointest Surg.* 2007; 11: 1057–77. [PubMed]
9. Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumor cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods.* 2010; 50: 289–297. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.027 [PubMed]
10. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. 2006; *J Clin Oncol.* 24: 3756–62. [PubMed]
11. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011; 331: 1559–64. doi:10.1126/science.1203543 [PubMed]
12. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2010; 288: 99–106. doi: 10.1016/j.canlet.2009.06.027 [PubMed]
13. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 442–54. [PubMed]
14. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360: 1408–17. doi:10.1056/NEJMoa0805019 [PubMed]

15. Ciombor KK, Berlin J. Targeting metastatic colorectal cancer—present and emerging treatment options. *Pharmgenomics Pers Med*. 2014; 7: 137–44. doi:10.2147/PGPM.S47582 [PMC free article] [PubMed]
16. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2040–8.[PubMed]
17. European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for human use post-authorization summary of positive opinion for Erbitux. Available at:http://emea.europa.eu/pdfs/human/opinion/Erbitux_28040208en.pdf
18. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 2091–6. doi:10.1200/JCO.2009.21.9170 [PubMed]
19. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12: 594–603. doi:10.1016/S1470-2045(10)70209-6 [PubMed]
20. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 790–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2446 [PubMed]

21. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*. 2008; 122: 2255–9. doi: 10.1002/ijc.23388 [PubMed]
22. Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, Wang H, Bolt-de Vries J, Biermann K, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer*. 2013; 133: 130–41. doi: 10.1002/ijc.27987[PubMed]
23. Kalikaki A, Politaki H, Souglakos J, Apostolaki S, Papadimitraki E, Georgoulia N, et al. KRAS Genotypic Changes of Circulating Tumor Cells during Treatment of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2014; 9:e104902 doi: 10.1371/journal.pone.0104902[PMC free article] [PubMed]
24. Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, Rivera F, Valladares M, Massuti B, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist*. 2012;17: 947–55. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0048[PMC free article] [PubMed]
25. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1556–63. doi: 10.1200/JCO.2010.28.7045 [PubMed]

26. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4218–24. [PubMed]
27. Gutiérrez C, Rodríguez J, Patiño-García A, García-Foncillas J, Salgado J. KRAS mutational status analysis of peripheral blood isolated circulating tumor cells in metastatic colorectal patients. *Oncol Lett.* 2013; 6: 1343–1345. [PMC free article] [PubMed]
28. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 265–73. doi: 10.1038/nrc2620 [PubMed]
29. Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA, et al. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 1683–91. [PubMed]
30. Andrea C, Fausto P, Francesca BK, Mary C, Mara G, Veronica L, et al. Which strategy after first-line therapy in advanced colorectal cancer? *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 8921–8927. doi:10.3748/wjg.v20.i27.8921 [PMC free article] [PubMed]
31. Xia T, Jiang H, Li C, Tian M, Zhang H. Molecular imaging in tracking tumor stem-like cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 420364 doi:10.1155/2012/420364 [PMC free article] [PubMed]

32. Meregalli M, Farini A, Belicchi M, Torrente Y. CD133(+) cells isolated from various sources and their role in future clinical perspectives. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10: 1521–8. doi: 10.1517/14712598.2010.528386 [PubMed]
33. Pohl A, El-Khoueiry A, Yang D, Zhang W, Lurje G, Ning Y, et al. Pharmacogenetic profiling of CD133 is associated with response rate (RR) and progression-free survival (PFS) in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with bevacizumab-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2013; 13: 173–80. doi: 10.1038/tpj.2011.61 [PMC free article] [PubMed]
34. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2013; 73: 8–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3422 [PubMed]
35. Ning Y, Gerger A, Zhang W, Hanna DL, Yang D, Winder T, et al. Platin polymorphisms predict gender- and stage-specific colon cancer recurrence after adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13(2):528–39. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0646 [PMC free article] [PubMed]
36. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, et al. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res.* 2013; 73: 2059–69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0326 [PubMed]
37. Kaiser J. Medicine. Cancer's circulation problem. *Science.* 2010; 327: 1072–4. doi:10.1126/science.327.5969.1072 [PubMed]
38. Gazouli M, Lyberopoulou A, Pericleous P, Rizos S, Aravantinos G, Nikiteas N, et al. Development of a quantum-dot-labelled magnetic immunoassay method

- for circulating colorectal cancer cell detection. *World J Gastroenterol.* 2012; 18: 4419–26. doi:10.3748/wjg.v18.i32.4419 [PMC free article] [PubMed]
39. Mélin C, Perraud A, Akil H, Jauberteau MO, Cardot P, Mathonnet M, et al. Cancer stem cell sorting from colorectal cancer cell lines by sedimentation field flow fractionation. *Anal Chem.* 2012; 84: 1549–56. doi:10.1021/ac202797z [PubMed]
 40. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011; 50:700–10 doi:10.3109/0284186X.2010.549151 [PubMed]
 41. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011; 17:313–9. doi:10.1038/nm.2304 [PubMed]
 42. Satelli A, Brownlee Z, Mitra A, Meng QH, Li S. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin Chem.* 2015; 61:259–66. doi:10.1373/clinchem.2014.228122 [PMC free article][PubMed]
 43. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010; 15: 261–73. doi:10.1007/s10911-010-9174-0 [PubMed]
 44. Ren F, Sheng WQ, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 2603–11. doi:10.3748/wjg.v19.i17.2603 [PMC free article] [PubMed]

45. Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, Lazaris AC, Nasioulas G, Gazouli M. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res.* 2008; 28: 305–8.[PubMed]
46. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, 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: 6897–904. [PubMed]
47. Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20: 96–9. doi:10.1016/j.gde.2009.12.002 [PMC free article] [PubMed]
48. Devriese LA, Voest EE, Beijnen JH, Schellens JH. Circulating tumor cells as pharmacodynamic biomarker in early clinical oncological trials. *Cancer Treat Rev.* 2011; 37: 579–89. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.04.006 [PubMed]
49. Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, et al. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics.* 2006; 7: 216 [PMC free article][PubMed]
50. Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1508–11. doi:10.1200/JCO.2010.34.0026 [PubMed]
51. 49. Sinha N, Mukhopadhyay S, Das DN, Panda PK, Bhutia SK. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol.* 2013; 49: 854–62. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.06.010 [PubMed]

52. 50. Shah MM, Landen CN. Ovarian cancer stem cells: are they real and why are they important? 2014; Gynecol Oncol. 132: 483–9. doi: [10.1016/j.ygyno.2013.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.12.001)[PMC free article] [PubMed]
53. 51. Sugimachi K, Yokobori T, Iinuma H, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, et al. Aberrant Expression of Plastin-3 Via Copy Number Gain Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Circulating Colorectal Cancer Cells. Ann Surg Oncol. 2013; [Epub ahead of print]. [PubMed]
54. 52. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res. 2006; 66: 8319–26. [PubMed]
55. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63:11–30
56. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. Lancet. 2010;375:1030–1047
57. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105-11. Review.
58. Burkert J, Wright NA, Alison MR. Stem cells and cancer: an intimate relationship. J Pathol. 2006 Jul;209(3):287-97.
59. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2009;14:3–9. doi: [10.1007/s10911-009-9109-9](https://doi.org/10.1007/s10911-009-9109-9).
60. Fulda S, Pervaiz S. Apoptosis signaling in cancer stem cells. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42:31–38. doi: [10.1016/j.biocel.2009.06.010](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.06.010).

61. Rich JN, Bao S. Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1:353–355. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.011.
62. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65:10946–10951.
63. Nadal R, Ortega FG, Salido M, Lorente JA, Rodríguez-Rivera M, Delgado-Rodríguez M, et al. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*. 2013 Nov 15;133(10):2398-407.
64. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002–5012
65. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445:106–110.
66. Ricci-Vitiani L, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111–5.
67. Wang R, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010;468:829–833.
68. Elkhafif N, et al. CD133(+) human umbilical cord blood stem cells enhance angiogenesis in experimental chronic hepatic fibrosis. *APMIS*. 119(1):66–75.

69. Lim SH, Jang J, Park JO, Kim KM, Kim ST, Park YS, et al. CD133-positive tumor cell content is a predictor of early recurrence in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2014 Dec;5(6):447-56.
70. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008 Oct 21;99(8):1285-9.
71. Wang K, Xu J, Zhang J, Huang J. Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012 Dec 5;12:573.
72. Chen S, Song X, Chen Z, Li X, Li M, Liu H, Li J. CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56380.
73. Pohl A, El-Khoueiry A, Yang D, Zhang W, Lurje G, Ning Y, Pharmacogenetic profiling of CD133 is associated with response rate (RR) and progression-free survival (PFS) in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with bevacizumab-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2013 Apr;13(2):173-80.
74. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) *Eur J Cancer*. 2009;45:228–47
75. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31:1341-6

76. Tournigand C, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15; 22(2):229-37
77. Douillard JY, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000 Mar 25; 355(9209):1041-7
78. Skof E, Rebersek M, Hlebanja Z, Ocvirk J. Capecitabine plus irinotecan (XELIRI regimen) compared to 5-FU/LV plus irinotecan (FOLFIRI regimen) as neoadjuvant treatment for patients with unresectable liver-only metastases of metastatic colorectal cancer: a randomised prospective phase II trial. *BMC Cancer*. 2009;9:120, *Tumour Biol*. 2014 Dec 23.
79. Ding HH, Wu WD, Jiang T, Cao J, Ji ZY, Jin JH, Wang JJ. Meta-analysis comparing the safety and efficacy of metastatic colorectal cancer treatment regimens, capecitabine plus irinotecan (CAPIRI) and 5-fluorouracil/leucovorin plus irinotecan (FOLFIRI). *Tumour Biol*. 2014 Dec 23.
80. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1077–1085
81. Kabbinar FF, Hurwitz HI, Yi J, et al. Addition of bevacizumab to fluorouracil-based first-line treatment of metastatic colorectal cancer: pooled analysis of

cohorts of older patients from two randomized clinical trials. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):199–205

82. Petrelli F, et al. FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials. *Clin Colorectal Cancer.* 2013 Sep;12(3):145-51.
83. García Alfonso P, et al. Bevacizumab in Combination with Capecitabine plus Irinotecan as First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 2 Phase II Trials. *Onkologie.* 2013;36(6):363-7
84. Tebbutt NC, et al. Risk of arterial thromboembolic events in patients with advanced colorectal cancer receiving bevacizumab. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1834–1838,
85. Van Cutsem E, et al. Safety and efficacy of first line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol.* 2009;20(11):1842–1847
86. Ferrandina G, et al. Targeting CD133 antigen in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:823–37.
87. Pohl A, et al. Stem cells in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2008;7:92–8.
88. Tang KH, Ma S, Lee TK, Chan YP, Kwan PS, Tong CM, et al. CD133(+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling. *Hepatology.* 2012 Mar;55(3):807-20

89. Casado-Saenz E, Feliu J, Gomez-España MA, Sanchez-Gastaldo A, Garcia-Carbonero R. SEOM. SEOM clinical guidelines for the treatment of advanced colorectal cancer 2013. Clin Transl Oncol 2013;15:996-1003.

90. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. J Clin Oncol 2004;22:229-3

91. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A multicentre randomised trial. Lancet 2000;355:1041-7.

92. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colon cancer ver 2. 2014. [Internet]. Washington (PA): National Comprehensive Cancer Network; 2014 Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf [Last updated on 2013 Nov 6, Last cited on 2013 Nov 26].

93. Ratain MJ. Irinotecan dosing: Does the CPT in CPT-11 stand for "Can't Predict Toxicity"? J Clin Oncol 2002;20:7-8.

94. Glimelius B. Benefit-risk assessment of irinotecan in advanced colorectal cancer. Drug Saf 2005;28:417-33.

95. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, *et al.* The role of UGT1A1 * 28 polymorphism in the pharmacodynamics and

- pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3061-8.
96. Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J Int Med Res* 2010;38:870-83.
97. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47.
98. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1341-6.
99. Largillier R, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Ciccolini J, Nebbia JF, Ginot A, *et al.* Pharmacogenetics of capecitabine in advanced breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:5496-502.
100. Etienne-Grimaldi MC, Bennouna J, Formento JL, Douillard JY, Francoual M, Hennebelle I, *et al.* Multifactorial pharmacogenetic analysis in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based therapy together with cetuximab-irinotecan. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73:776-85.
101. Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, *et al.* Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:3455-68.

102. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramírez J, Karrison T, *et al.* UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002;2:43-7.
103. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, *et al.* Pharmacogenetics: From bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:662-73.
104. Braun MS, Richman SD, Quirke P, Daly C, Adlard JW, Elliott F, *et al.* Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: Results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2008;26:2690-8.
105. Liu X, Cheng D, Kuang Q, Liu G, Xu W. Association between UGT1A1 * 28 polymorphisms and clinical outcomes of irinotecan-based chemotherapies in colorectal cancer: A meta-analysis in Caucasians. *PLoS One* 2013;8:e58489.