

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιατρική Σχολή

Β' Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Π.Ν.Α.  
«Αρεταίειο» & Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του  
Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο»

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
**«Χειρουργική Ογκολογία»**

Διπλωματική Εργασία

**«Η έκφραση του συνδέτη του μορίου  
προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-L1  
(programmed cell death ligand-1)  
στον κολο-ορθικό καρκίνο»**

**Αθανάσιος Μαρίνης**

(ΑΜ: 20161083)

Υπεύθυνος Επιβλέπων

κ. Θεοδόσιος Θεοδοσόπουλος

Καθηγητής Χειρουργικής,

Β' Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Π.Ν.Α. «Αρεταίειο»

Αθήνα, 2020

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ - ACKNOWLEDGMENTS

Κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών «Χειρουργική Ογκολογία» αποκτήθηκαν όλες οι απαραίτητες γνώσεις για την προσέγγιση των θεμάτων του πεδίου αυτού, τόσο των ήδη γνωστών, όσο και των νεότερων.

Στα πλαίσια της Διπλωματικής Εργασίας που είναι στις υποχρεώσεις κάθε μεταπτυχιακού φοιτητή και με την καθοδήγηση του υπευθύνου της ομάδας μου Καθηγητή Χειρουργικής κ. Θεοδόση Θεοδοσόπουλο, αποφασίσθηκε από κοινού η μελέτη ενός σχετικά νέου μορίου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-L1 σε ασθενείς με κολο-ορθικό και γαστρικό καρκίνο στο Τζάνειο Νοσοκομείο του Πειραιά. Το νέο αυτό μόριο αποτελεί ένα από τα σημεία ανοσολογικού ελέγχου στο οποίο δρουν στοχευμένα τα νεότερα φάρμακα της ανοσοθεραπείας.

Η εργασία αυτή θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί χωρίς την υποστήριξη και την ενεργό συμμετοχή της Διευθύντριας του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του ΓΝΠ Τζανείου κ. Αδαμαντίας Ζήζη-Σερμπετζόγλου. Με την επιμέλεια της ίδιας, μέρος της εργασίας παρουσιάσθηκε ως ανακοίνωση στο 31<sup>ο</sup> Ευρωπαϊκό Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής (P. Tziakou, Thanasis Marinis, E. Arkoumani, A. Zizi-Sermpetzoglou. PDL-1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability. 31st European Congress of Pathology, 7 – 11 September 2019, Nice, France).

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή της Χειρουργικής κ. Θεοδόση Θεοδοσόπουλο για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Η εισαγωγή νέων φαρμάκων που στοχεύουν στο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να αλλάζει το τοπίο στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Πέντε ανοσολογικά σημεία ελέγχου έχουν εντοπιστεί ως πιθανοί στόχοι της ανοσοθεραπείας: το μόριο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1 (programmed cell death), ο συνδέτης του PD-L1 (PD ligand), η πρωτεΐνη 4 σχετιζόμενη με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), το γονίδιο ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων LAG-3 (lymphocyte activation gene) και η διοξυγενάση της ινδολαμίνης IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase).

**Στόχος:** Να μελετηθεί η έκφραση του μορίου PD-L1 σε παθολογοανατομικά δείγματα από γαστρικό και κολο-ορθικό καρκίνο.

**Μέθοδος:** Η έκφραση του μορίου PD-L1 μετρήθηκε με ειδική ανοσοϊστοχημική μέθοδο και βαθμονομήθηκε σε ένα σύστημα τριών επιπέδων: α) έκφραση < 1% (απουσία έκφρασης), β) έκφραση 1-49% (χαμηλή έκφραση) και γ) έκφραση > 50% (υψηλή έκφραση). Όλα τα δείγματα γαστρικού καρκίνου ήταν αρνητικά για έκφραση του μορίου PD-L1, οπότε και δεν συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη.

**Αποτελέσματα:** Μελετήθηκαν 32 δείγματα ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο, 16 άνδρες και 16 γυναίκες, με μέση ηλικία 71,4 έτη (45-93). Ιστολογικά, τα περισσότερα νεοπλάσματα ήταν μέτριας διαφοροποίησης (24) και λιγότερα χαμηλής διαφοροποίησης (8). Η έκφραση του μορίου PD-L1 ήταν απύσα σε 21 ασθενείς (65,6%), χαμηλή σε 5 (15,6%) και υψηλή σε 6 ασθενείς (18,75%). Σε όλους τους ασθενείς με υψηλή έκφραση του PD-L1 ανευρέθηκε υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high).

**Συμπεράσματα:** Η έκφραση του μορίου PD-L1 ανευρίσκεται συνήθως αυξημένη στην υπο-ομάδα των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο που έχει μικροδορυφορική αστάθεια.

**Λέξεις – κλειδιά:** PD-1, PD-L1, κολο-ορθικός καρκίνος, γαστρικός καρκίνος, ανοσοθεραπεία

## ABSTRACT

**Introduction:** The development of new therapeutic agents aiming at pathways of the immune system seem to change the treatment of several cancers. Five immune check-points have been found as possible targets of immunotherapy: the programmed cell death molecule PD-1, its ligand PD-L1, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), the lymphocyte activation gene (LAG-3) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO).

**Aim:** To study the expression of PD-L1 in histological specimens of gastric and colorectal cancers.

**Methods:** The expression of PD-L1 was measured with a standardized immunohistochemical method and was categorized in three levels: a) expression < 1% (absence of expression), b) expression 1-49% (low expression), and c) expression > 50% (high expression). All specimens of gastric cancers were negative for expression of PD-L1 and were not included finally in this study.

**Results:** Thirty-two (32) specimens of patients with colorectal cancer were studied, 16 males and 16 females, with a medium age of 71,4 years (45-93). Histologically, most cancers were moderately differentiated (24) and the remaining (8) were poorly differentiated. Expression of PD-L1 was absent in 21 patients (65,6%), low in 5 (15,6%) and high in 6 patients (18,75%). All patients with a high expression of PD-L1 expressed high microsatellite instability (MSI-high).

**Conclusion:** High expression of PD-L1 is usually associated with high microsatellite instability in patients with colorectal cancer.

**Keywords:** PD-1, PD-L1, colorectal cancer, gastric cancer, immunotherapy

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Τίτλος.....	1
Ευχαριστίες.....	2
Ελληνική περίληψη.....	3
English abstract.....	4
Περιεχόμενα.....	5
Συνομεύσεις.....	6
Κεφάλαιο 1. Κολο-ορθικός καρκίνος	
1.1. Επιδημιολογία.....	7
1.2. Παθογένεση.....	9
1.3. Εντόπιση του καρκίνου (sideness).....	15
1.4. Μοριακή ταξινόμηση.....	17
Κεφάλαιο 2. Ανοσολογική απάντηση στον κολο-ορθικό καρκίνο	
2.1. Ανοσολογική απάντηση.....	19
2.2. Διαφυγή του καρκίνου από την ανοσο-επιτήρηση.....	20
2.3. Ανοσολογικά σημεία ελέγχου.....	21
Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	23
Μεθοδολογία.....	24
Αποτελέσματα.....	26
Συζήτηση.....	30
Συμπεράσματα.....	32
Βιβλιογραφία.....	33

## **ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ**

PD-1 (programmed cell death-1)

PD-L1 (programmed cell death ligand-1)

HDI (human development index)

SDI (sociodemographic index)

CIN (chromosomal instability)

APC (adenomatous polyposis coli)

HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer)

MSI (microsatellite instability)

MMR (mismatch repair)

CIMP (CpG Island Methylator Phenotype)

MCC (mutated in colorectal cancer)

SSA (sessile serrated adenomas)

FAP (familial adenomatous polyposis)

TILs (tumor-infiltrating lymphocytes)

CMS (consensus molecular subtypes)

CTLs (cytotoxic lymphocytes)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΟΛΟ-ΟΡΘΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο κολο-ορθικός καρκίνος είναι ο τρίτος πιο συχνός καρκίνος στους άνδρες και ο δεύτερος στις γυναίκες παγκοσμίως (1,8 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις το 2018), με τη θνητότητά του να είναι μικρότερη από τη συχνότητά του (880 χιλιάδες το ίδιο έτος), φαινόμενο που αντανακλά την σχετικά καλή πρόγνωση των ασθενών<sup>1</sup>. Γενικά, η συχνότητα εμφάνισης κολο-ορθικού καρκίνου φαίνεται πλέον ξεκάθαρα να σχετίζεται με την αλλαγή του τρόπου ζωής των χωρών που αναπτύσσονται κοινωνικο-οικονομικά, με τυπικό παράδειγμα τις βιομηχανοποιημένες χώρες. Ο δείκτης ανθρώπινης ανάπτυξης (human development index, HDI) ή κοινωνικο-δημογραφικός δείκτης (sociodemographic index, SDI) φαίνεται να επηρεάζει θετικά την συχνότητα της νόσου<sup>2</sup>. Έτσι, η συχνότητα του κολο-ορθικού καρκίνου σε χώρες με υψηλό δείκτη HDI, όπως η Αυστραλία και η Ευρωπαϊκές χώρες, είναι 5 φορές μεγαλύτερη (24-42/100.000) από χώρες με χαμηλότερο δείκτη HDI, όπως σε χώρες της Δυτικής Αφρικής και της Νότιας Ασίας (4-7/100.000)<sup>3</sup>. Όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης του κολο-ορθικού καρκίνου στα δυο φύλα, γενικά είναι συχνότερη στους άνδρες, αν και το κλάσμα εμφάνισης μεταξύ ανδρών και γυναικών εξαρτάται από τον δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης των χωρών HDI, ο οποίος είναι 1,6 σε χώρες με υψηλό δείκτη και 1 σε χώρες με χαμηλό δείκτη. Η συχνότητα εμφάνισης του κολο-ορθικού καρκίνου αυξάνεται προοδευτικά της ηλικίας: το 10% εμφανίζεται σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 50 ετών, το 59% σε ηλικίες 50-74 έτη και το 31% σε ασθενείς μεγαλύτερους των 75 ετών<sup>3</sup>.

Ένα φαινομενικά παράδοξο γεγονός είναι ότι σε χώρες με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης κολο-ορθικού καρκίνου (με υψηλό HDI), η θνητότητα είναι μικρότερη από τις χώρες που έχουν μικρότερη συχνότητα της νόσου (με χαμηλό HDI). Όμως, αυτό εξηγείται πολύ λογικά, διότι στις χώρες με αυξημένη συχνότητα κολο-ορθικού καρκίνου η οργάνωση του συστήματος υγείας όσον αφορά τόσο στην πρόληψη, όσο και στην αντιμετώπιση της νόσου είναι πολύ καλύτερες, με αποτέλεσμα την ελάττωση της συνολικής θνητότητας σε σχέση με χώρες που οι δομές υγείας είναι λιγότερο οργανωμένες<sup>4</sup>. Πάρα ταύτα, ακόμα και εντός των χωρών με υψηλό δείκτη

HDI παρατηρείται διαφορά στη θνητότητα του κολο-ορθικού καρκίνου, με μικρότερη επιβίωση σε ασθενείς που προέρχονται από χαμηλότερες κοινωνικο-οικονομικές τάξεις<sup>5</sup>. Συνολικά, όμως, φαίνεται ότι η βελτίωση της ποιότητας της αντιμετώπισης των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο, τόσο όσον αφορά στην εφαρμογή ογκολογικά ορθότερων χειρουργικών επεμβάσεων, όσο και στη βελτίωση της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας, με την εισαγωγή νεότερων φαρμάκων, αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες στην αύξηση της επιβίωσης από τη νόσο. Δυστυχώς, οι ασθενείς που προέρχονται από χαμηλές κοινωνικο-οικονομικές τάξεις ή ζουν σε υποανάπτυκτες χώρες έχουν αδυναμία πρόσβασης σε υψηλής ποιότητας υπηρεσίες υγείας, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σε προχωρημένα στάδια της νόσου και να έχουν, εν τέλει, χειρότερη πρόγνωση και επιβίωση.

Τέλος, από μια αναδρομική μελέτη κοορτης από την Αμερικανική βάση δεδομένων SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results)<sup>6</sup> προκύπτει το συμπέρασμα ότι η συχνότητα εμφάνισης κολο-ορθικού καρκίνου αυξάνεται σε ασθενείς νεότερους των 50 ετών. Οι συγγραφείς υπολογίζουν ότι η συχνότητα θα αυξηθεί κατά 90% για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και κατά 124,2% για τον ορθικό καρκίνο στις ηλικίες 20-34 έτη μέχρι το 2030, χωρίς να είναι εμφανής η αιτία αυτής της τάσης. Επίσης, υπάρχει η τάση να αυξάνεται η συχνότητα του κολο-ορθικού καρκίνου και των αδενωμάτων στο εγγύς παχύ έντερο προϊούσης της ηλικίας γενικά<sup>7</sup>, αλλά και σε νεότερες γυναίκες<sup>8,9</sup>. Αυτά κι άλλα παρόμοια αποτελέσματα και δεδομένα έχουν αναδείξει την αξία του προσυμπτωματικού ελέγχου (screening), ο οποίος έχει ιδιαίτερη σημασία στο γενικό πληθυσμό μεταξύ 50-75 έτη ηλικίας. Όμως, η μη συμμόρφωση με το συνιστώμενο προληπτικό αυτό μέτρο είναι μεγάλη κι αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της αύξησης της θνητότητας από κολο-ορθικό καρκίνο, ειδικά σε χαμηλότερες κοινωνικο-οικονομικές τάξεις.



## 1.2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

### Σποραδικός κολο-ορθικός καρκίνος

Ο κολο-ορθικός καρκίνος είναι μια ετερογενής νόσος, με την πλειονότητα των ασθενών να έχουν σποραδικούς καρκίνους. Η παθογένεση του σποραδικού κολο-ορθικού καρκίνου γίνεται γενικά με δυο μοριακά μονοπάτια: α) την κλασική εξέλιξη αδενώματος προς καρκίνο (adenoma-carcinoma pathway) ή μονοπάτι της χρωμοσωμιακής αστάθειας (chromosomal instability, CIN), που περιλαμβάνει το 70-75% των σποραδικών καρκίνων, και β) το οδοντωτό μονοπάτι (serrated pathway), που περιλαμβάνει το 25-30% των σποραδικών περιπτώσεων.

Ο κολο-ορθικός καρκίνος αναπτύσσεται μετά από συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, που οδηγούν στην μεταμόρφωση του φυσιολογικού βλεννογόνου του παχέος εντέρου και του ορθού σε διηθητικό καρκίνο. Οι περισσότεροι κολο-ορθικοί καρκίνοι αναπτύσσονται σε προϋπάρχοντα αδενώματα που φέρουν επιγενετικές αλλαγές. Το χρονικό διάστημα να εξελιχθεί ένας καλοήθης πολύποδας σε ένα καρκίνο είναι 10-15 χρόνια, γεγονός που ευνοεί τον εντοπισμό και την αφαίρεσή τους στο προσυμπτωματικό έλεγχο. Ο χρόνος εξέλιξης προς καρκίνο διαφέρει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του πολύποδα. Υψηλού κινδύνου χαρακτηριστικά των πολυπόδων που εξαλλάσσονται γρήγορα σε καρκίνο είναι τα εξής: μεγάλο μέγεθος ( $\geq 1$  εκ. σε διάμετρο), πολλαπλά αδενώματα ( $\geq 3$ ), αδενώματα με λαχνωτές αλλαγές (villous change) και αδενώματα με υψηλόβαθμη δυσπλασία<sup>10</sup>.

Στο μοριακό μονοπάτι παθογένεσης του κολο-ορθικού καρκίνου<sup>11</sup> έχουν περιγραφεί διάφορα μοντέλα: α) Στο πρώτο **μοντέλο της χρωμοσωμιακής αστάθειας (CIN)**, που προτάθηκε από τους Fearon και Vogelstein, η παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου περιλαμβάνει τρία βασικά χαρακτηριστικά: ενεργοποίηση ογκογονιδίων με αμοιβαία απενεργοποίηση ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, μεταλλάξεις σε τουλάχιστον 4-5 διαφορετικά γονίδια και, τέλος, συσσώρευση μεταλλάξεων<sup>12</sup>, β) Το δεύτερο μοντέλο αφορά στη **μικροδορυφορική αστάθεια (MSI, microsatellite instability)** ως αποτέλεσμα ελλειμματικών γονιδίων MMR (mismatch repair), που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό μιας υπο-ομάδας του κληρονομικού καρκίνου και

στο 15% του σποραδικού κολο-ορθικού καρκίνου, και γ) Το μοντέλο των επιγενετικών αλλαγών και πιο συγκεκριμένα την υπερμεθυλίωση, με αποτέλεσμα την σίγαση της λειτουργίας ορισμένων γονιδίων. Η μεθυλίωση των CG δινοκλεοτιδίων στην περιοχή του εκκινήτη (promoter) πολλαπλών γονιδίων καλείται CpG Island Methylator Phenotype (**CIMP**).

Ο Jass<sup>13</sup> ταξινόμησε τον κολο-ορθικό καρκίνο με βάση την παρουσία MSI και CIMP, περιγράφοντας πέντε μοριακούς υποτύπους, ο καθένας με διαφορετικό μοριακό προφίλ και ιδιαίτερα κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά:

- 1) CIMP high / MSI high (12% των κολο-ορθικών καρκίνων): εμφανίζεται σε οδοντωτά αδενώματα και χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη του *BRAF* και μεθυλίωση του *MLH1*,
- 2) CIMP high / MSI low ή μικροδορυφορική σταθερότητα (8%): εμφανίζεται σε οδοντωτά αδενώματα και χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη του *BRAF* και μεθυλίωση πολλών γονιδίων,
- 3) CIMP low / MSI low ή μικροδορυφορική σταθερότητα (20%): εμφανίζεται σε σωληνώδη, σωληνολαχνωτά ή οδοντωτά αδενώματα και χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμιακή αστάθεια, μετάλλαξη του *KRAS* και μεθυλίωση του *MGMT*,
- 4) CIMP negative / MSI low ή μικροδορυφορική σταθερότητα (57%): εμφανίζεται στα κλασικά αδενώματα και χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμιακή αστάθεια, και
- 5) CIMP negative / MSI high – Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC): δεν έχουν μεταλλάξεις του *BRAF*.

### **Μονοπάτι χρωμοσωμιακής αστάθειας**

Η χρωμοσωμιακή αστάθεια είναι η κυριότερη αιτία της γονιδιακής αστάθειας που χαρακτηρίζει την παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου και ευθύνεται για το 65-70% των σποραδικών καρκίνων. Η χρωμοσωμιακή αστάθεια προκύπτει από διάφορα ελλείματα των χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανευπλοειδίας, διαταραχή των τελομερών ή διαταραχή στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA<sup>14</sup>. Μεγάλες αυξήσεις (amplifications) ανιχνεύονται στα χρωμοσώματα 7,

8q, 13q, 20 και X, ενώ αντίστοιχα μεγάλα ελλείματα (deletions) αναγνωρίζονται στα χρωμοσώματα 1, 4, 5, 8p, 14q, 15q, 17p, 18, 20p και 22q. Επίσης, τοπικές αλλαγές (σημειακές μεταλλάξεις) παρατηρούνται σε σημαντικά γονίδια καρκίνου, όπως τα *VEGF*, *MYC*, *MET*, *LYN*, *PTEN* και άλλα. Τα χρωμοσώματα 1, 5, 8, 17 και 18 έχουν την μεγαλύτερη συχνότητα απώλειας αλληλίων (46-78%), ενώ το χρωμόσωμα 18 συχνά μπορεί να λείπει τελείως. Μαζί με όλες αυτές τις ανωμαλίες του καρυοτύπου εμφανίζονται και οι μεταλλάξεις στα ογκογονίδια και τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια, κυρίως του *APC* (adenomatous polyposis coli) και του *KRAS*.

**Το πρωτο-ογκογονίδιο *KRAS*.** Η μετάλλαξη του ογκογονιδίου *KRAS* εμφανίζεται κατά προτίμηση στις αρχικές φάσεις της αλληλουχίας αδενώματος-καρκίνου. Οι μεταλλάξεις του *KRAS* ανιχνεύονται στο 30-60% των κολο-ορθικών καρκίνων και το 50% των μεγάλων πολυπόδων και φαίνεται ότι βοηθά στην εξέλιξη της προόδου του αδενώματος. Η ενεργοποίηση του *KRAS* επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες, ειδικά εκείνες που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, επιβίωση, απόπτωση, οργάνωση του κυτταροσκελετού και την φλεγμονή<sup>13</sup>.

**Απώλεια του 5q αλληλίου.** Η απώλεια αυτή έχει περιγραφεί στο 20-50% του σποραδικού κολο-ορθικού καρκίνου. Δυο πολύ σημαντικά γονίδια εντοπίζονται πάνω στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5: το *APC* και το *MCC* (*mutated in colorectal cancer*). Οι μεταλλάξεις του *APC* εμφανίζονται στο 60-80% των κολο-ορθικών καρκίνων και στα περισσότερα αδενώματα, γεγονός που επισημαίνει ότι γίνονται νωρίς στην καρκινογένεση. Για την απενεργοποίηση του *APC* απαιτείται η απώλεια και των δυο αλληλίων. Το *APC* εμπλέκεται στο μονοπάτι του Wnt, στο οποίο σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την β-κατενίνη, την AXIN και την glycogen synthase kinase 3 (GSK3)<sup>15</sup>.

**Το μονοπάτι Wnt.** Το μονοπάτι αυτό έχει κεντρικό ρόλο στην ανανέωση του εντερικού επιθηλίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες το ογκο-κατασταλτικό γονίδιο *APC* συνδέεται με την β-κατενίνη, ευνοώντας την καταστροφή της. Όταν όμως προκύψει

μετάλλαξη του *APC* που το απενεργοποιεί, η β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και συνδέεται με το T cell factor/lymphoid enhancer factor, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Wnt σηματοδότησης που επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες, ειδικά εκείνες που αφορούν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και την απόπτωση<sup>16</sup>. Οι μεταλλάξεις του *APC* ανιχνεύεται στο 30-70% των αδενωμάτων και πάνω από 70% των κολο-ορθικών καρκίνων.

Εκτός από την μετάλλαξη του *APC* υπάρχουν κι άλλα ερεθίσματα που ενεργοποιούν το Wnt, όπως οι μεταλλάξεις της β-κατενίνης που την καθιστούν ανθεκτική στη καταστροφή της (σε λιγότερο από το 5% των κολο-ορθικών καρκίνων), μεταλλάξεις των *AXIN1-AXIN2* (που ευθύνονται για τη καταστροφή της β-κατενίνης), μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον TCF-4<sup>17</sup> και η απενεργοποίηση του γονιδίου *MCC* (υπερμεθυλίωση του εκκινήτη), το οποίο θεωρείται ως ένα από τα γονίδια – οδηγούς (driver genes) στην καρκινογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου στα πειραματικά μοντέλα των αρουραίων<sup>18</sup>. Έτσι, φαίνεται ότι το μονοπάτι του Wnt είναι πολύ σημαντικό τόσο στην εκκίνηση, όσο και στην εξέλιξη του κολο-ορθικού καρκίνου.

**Απώλεια του 8p αλληλίου.** Η απώλεια αυτή παρατηρείται στο 50% των κολο-ορθικών καρκίνων και αφορά ένα συγκεκριμένο σημείο στο 8p21, όπου υπάρχουν ογκο-κατασταλτικά γονίδια. Η απώλεια του 8p αλληλίου συνδέεται με προχωρημένη νόσο και προδιάθεση για μεταστάσεις, με την τοποθεσία 8p21-22 να αποτελεί hotspot για την εξέλιξη και μετάσταση του καρκίνου<sup>19</sup>.

**Απώλεια του 17p αλληλίου.** Η απώλεια αυτή περιγράφεται στο 75% των κολο-ορθικών καρκίνων, αλλά όχι στα αδενώματα. Το σημείο αυτό του χρωμοσώματος 17 περιλαμβάνει το ογκο-κατασταλτικό γονίδιο *p53*, η μετάλλαξη του οποίου γίνεται όψιμα και οδηγεί στη μετατροπή του αδενώματος σε καρκίνο<sup>20,21</sup>.

**Απώλεια του 18q αλληλίου.** Ο μακρύς βραχίονας του χρωμοσώματος 18 περιλαμβάνει πολλά ογκο-κατασταλτικά γονίδια, όπως τα *Cables*, *Deleted in Colorectal Cancer (DCC)*, *SMAD2* και *SMAD4*. Η απώλεια του 18q εμφανίζεται στο 50-7-9% των κολο-ορθικών καρκίνων και αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για τους ασθενείς σταδίων II και III<sup>22</sup>.

### **Μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας.**

Οι μικροδορυφόροι (microsatellites) είναι βραχείες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες νουκλεοτιδίων που βρίσκονται παντού στο γονιδίωμα και είναι πολύ επιρρεπείς σε λάθη κατά την φάση της αντιγραφής τους, λόγω της επαναλαμβανόμενης συμπεριφοράς τους. Το σύστημα επιδιόρθωσης των μη ταιριαστών ζευγών βάσεων στο DNA (MMR, mismatch repair) κατά τη φάση της αντιγραφής του μπορεί να εμφανίσει αδυναμία επιδιόρθωσης των βλαβών των μικροδορυφόρων, λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων MMR. Μέλη του συστήματος MMR είναι τα εξής: MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, MLH3, MSH3, PMS1 και το Exo1<sup>23</sup>. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων MMR σχετίζονται τόσο κυρίως με το HNPCC, όσο και με τον σποραδικό κολο-ορθικό καρκίνο (15%).

Τον Δεκέμβριο του 1997 το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου διοργάνωσε το “The International Workshop on Microsatellite Instability”, στο οποίο περίπου 120 ερευνητές συναντήθηκαν για να συζητήσουν για την μικροδορυφορική αστάθεια MSI<sup>24</sup>. Από αυτή τη συνάντηση προέκυψαν οι ακόλουθες συστάσεις: α) η μορφή γενετικής αστάθειας που σχετίζεται με ελλειμματική επιδιόρθωση του DNA mismatch θα καλείται μικροδορυφορική αστάθεια MSI, β) πέντε μικροδορυφορικοί τόποι - δείκτες (τα μονονουκλεοτίδια BAT25 και BAT26, καθώς και τα δινουκλεοτίδια D5S346, D2S123 και D17S250) συστήθηκαν για την διευκρίνιση της μικροδορυφορικής κατάστασης ως εξής: **MSI-high** ορίζεται από την αστάθεια τουλάχιστον δυο δεικτών, **MSI-low** ορίζεται από την αστάθεια ενός δείκτη, ενώ οι όγκοι θεωρούνται **MSS** όταν δεν υπάρχει κάποια εμφανής αστάθεια. Οι MSI-low κολο-ορθικοί καρκίνοι σχετίζονται με χειρότερη επιβίωση των ασθενών, όταν συγκρίνονται με τους καρκίνους που είναι MSS<sup>25</sup>.

**MSI-high όγκοι.** Οι σποραδικοί αυτοί κολο-ορθικοί καρκίνοι που είναι MSI-high εμφανίζονται συχνότερα σε ηλικιωμένες γυναίκες κι εντοπίζονται συνηθέστερα στο δεξιό κόλον, κεντρικότερα της σπληνικής καμπής<sup>26</sup>. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά είναι η μεγάλη διήθηση με λεμφοκύτταρα (μια αντίδραση που ομοιάζει με εκείνη της νόσου Crohn), η παρουσία βλέννης ιστολογικά και η κακή

διαφοροποίηση<sup>27</sup>. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν την αντίσταση των MSI-high όγκων στα χημειοθεραπευτικά, ιδιαίτερα της 5-φλουορακίλης (5-FU)<sup>28,29</sup> και της σισπλατίνης<sup>30</sup>, ενώ κλινικά έχει διαπιστωθεί πτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-FU<sup>31</sup>. Παρόλα αυτά οι όγκοι αυτοί σχετίζονται με σχετικά καλή πρόγνωση και επιβίωση<sup>32</sup>.

### ***Μονοπάτι του CIMP***

Οι επιγενετικές αλλαγές είναι αλλαγές που αφορούν στην έκφραση ή λειτουργία των γονιδίων, χωρίς να αλλάζει η αλληλουχία του DNA. Στους ανθρώπους οι επιγενετικές αλλαγές προκαλούνται συνήθως από μεθυλίωση του DNA ή τροποποιήσεις της ιστόνης<sup>33</sup>. Η μεθυλίωση στη περιοχή του εκκινήτη (promoter) έχει ως αποτέλεσμα τη σίγαση του γονιδίου, που αποτελεί έναν μηχανισμό διακοπής της λειτουργίας των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, όπως *APC*, *MCC*, *MLH1*, *MGMT* και άλλα. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι η υπερμεθυλίωση του *MLH1* στο σποραδικό MSI-high κολο-ορθικό καρκίνο. Το κάπνισμα και η μεγάλη ηλικία αποτελούν τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μεθυλίωσης<sup>34</sup>.

Πέντε γονίδια έχουν επιλεγεί ως δείκτες για τη διάγνωση του CIMP: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* και *SOCS1*. Θετική CIMP θεωρείται όταν τουλάχιστον τρεις δείκτες είναι μεθυλιωμένοι. Οι όγκοι θετικοί στο CIMP (CIMP-high) αφορούν το 15-20% των σποραδικών κολο-ορθικών καρκίνων και είναι συχνότεροι στις γυναίκες και τους ηλικιωμένους ασθενείς, ενώ έχουν εντόπιση συνήθως στο δεξιό κόλον. Ιστολογικά, οι όγκοι αυτοί είναι κακής διαφοροποίησης, βλεννοπαραγωγικοί ή με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, μικροδορυφορική αστάθεια και φέρουν μετάλλαξη του *BRAF*. Οι ασθενείς αυτοί δεν έχουν όφελος από επικουρική χημειοθεραπεία με 5-FU. Οι προκαρκινικές βλάβες αφορούν στους άμισχους οδοντωτούς πολύποδες (sessile serrated adenomas, SSA).

***Μονοπάτι των άμισχων οδοντωτών πολύποδων.*** Το αρχικό γεγονός για την εμφάνιση των SSAs είναι η μετάλλαξη του ογκογονιδίου *BRAF* και η επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης mitogen-activated protein kinase (MAPK), με αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναστολή ελέγχου της απόπτωσης. Η

μετάλλαξη του *BRAF* σχετίζεται με τις επιγενετικές αλλαγές του CIMP, δηλ. μεθυλίωση του εκκινητή του *MLH1*, με αποτέλεσμα έναν φαινότυπο MSI-high και την ανάπτυξη κυτταρικής δυσπλασίας<sup>35</sup>, ενώ η σίγαση του *p16* σχετίζεται με την ανάπτυξη υψηλόβαθμης δυσπλασίας ή διηθητικού καρκινώματος<sup>36</sup>.

### **Κληρονομικός κολο-ορθικός καρκίνος**

Τα κληρονομικά σύνδρομα που σχετίζονται με τον κολο-ορθικό καρκίνο αποτελούν λιγότερο από το 5% όλων των περιπτώσεων, με συχνότερα τα εξής δυο: το σύνδρομο οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης (FAP, familial adenomatous polyposis) και το σύνδρομο Lynch ή HNPCC. Το γονίδιο *APC* είναι ένα ογκο-κατασταλτικό γονίδιο που ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q21 και κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης που ρυθμίζει την κυτταρική ομοιόσταση, ρυθμίζοντας την καταστροφή της β-κατενίνης. Η μετάλλαξη του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση της β-κατενίνης, την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt, με αποτέλεσμα την διαταραχή στην έκφραση διαφόρων γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Το *APC* επίσης ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους και κατ' επέκταση τα χρωμοσώματα.

### **1.3. ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (SIDENESS)**

Υπάρχουν δεδομένα από την SEER<sup>37</sup> και άλλες μεγάλες βάσεις δεδομένων<sup>38,39</sup> ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου διακρίνεται κλινικά σε δυο διαφορετικές οντότητες, με διαφορετική ιστοπαθολογική και κλινική εμφάνιση, μοριακούς δείκτες, πρόγνωση κι επιβίωση: ο καρκίνος του δεξιού κόλου (right-sided colon cancer) και ο καρκίνος του αριστερού κόλου (left-sided colon cancer)<sup>40</sup>. Διάφορες θεωρίες έχουν περιγραφεί προκειμένου να εξηγηθεί αυτή η διαφοροποίηση.

Από **εμβρυογενετική άποψη**, η διαφορετική ιστοπαθολογία ερμηνεύεται από το γεγονός ότι το δεξιό κόλον (από το τυφλό έως το κεντρικό 2/3 του εγκαρσίου κόλου) προέρχεται από το μέσο έντερο (mid-gut), ενώ το αριστερό κόλον έως το ορθό προέρχεται από το τελικό έντερο (hind-gut).

Από **κλινικής απόψεως**, οι δεξιοί καρκίνοι είναι πιο πιθανό να είναι εξωφυτικοί και πιο ογκώδεις, εμφανίζονται με αναιμία και είναι ιστολογικά κακής διαφοροποίησης ή βλεννοπαραγωγείς, ενώ οι αριστεροί καρκίνοι είναι συχνότερα τοπικά διηθητικοί, κυκλοτερώς αναπτυσσόμενοι, προκαλώντας συμπτώματα από απόφραξη<sup>39</sup>.

Από **μοριακή άποψη**, οι δεξιοί καρκίνοι έχουν περισσότερη μικροδορυφορική αστάθεια, περισσότερες μεταλλάξεις του *BRAF* και συχνότερη έκφραση του *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), ενώ οι αριστεροί καρκίνοι έχουν περισσότερη χρωμοσωμιακή αστάθεια και μεταλλάξεις των *KRAS*, *P13KCA*, *SMAD2*, *SMAD4*, *APC* και εκείνων που καταστέλλουν το *p53*<sup>39,41,42,43</sup>. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high) των δεξιών καρκίνων του παχέος εντέρου τους κάνει ιδιαίτερα ανοσογονικούς με αποτέλεσμα την αυξημένη διήθησή τους από τα T-λεμφοκύτταρα, ενώ οι αριστεροί καρκίνοι έχουν ένα ψυχρό ανοσολογικό καρκινικό μικροπεριβάλλον.

Από **μορφολογική και ιστολογική άποψη**, οι αριστεροί καρκίνοι εμφανίζονται ως σωληνώδη ή λαχνωτά αδενοκαρκινώματα, ενώ οι δεξιοί ως άμισχα οδοντωτά βλεννοπαραγωγά αδενοκαρκινώματα, που είναι συνήθως επίπεδα ή πλαγίως αναπτυσσόμενα (laterally spreading or growing tumors). Η μετάλλαξη του *KRAS* φαίνεται να ενέχεται στη δημιουργία της εξωφυτικής ανάπτυξης και μορφολογίας, ενώ η απουσία της σχετίζεται με την επίπεδη μορφολογία των όγκων<sup>44</sup>.

**Επιδημιολογικά**, οι δεξιοί καρκίνοι εμφανίζονται συνήθως σε γυναίκες και μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς, ενώ οι αριστεροί σε νεότερης ηλικίας ασθενείς και άνδρες. Οι αριστεροί καρκίνοι διαγιγνώσκονται συχνότερα (70%), ενώ οι δεξιοί καρκίνοι φαίνεται ότι έχουν χειρότερη πρόγνωση.



#### 1.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Όπως έγινε αντιληπτό από την παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου στο προηγούμενο κεφάλαιο, ειδικές μεταλλάξεις των γονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα ξεχωριστούς μοριακούς τύπους κολο-ορθικού καρκίνου, με ξεχωριστή σημασία στη θεραπεία και τη πρόγνωση των ασθενών. Έτσι, ασθενείς που έχουν κολο-ορθικό καρκίνο του ίδιου σταδίου, σύμφωνα με την διεθνή ταξινόμηση TNM, δείχνουν διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση, γεγονός που αντανακλά την μοριακή ετερογένεια του καρκίνου αυτού.

Έτσι, το 2015 μια διεθνής συνεργασία επιστημόνων από όλο τον κόσμο (CRCSC, colorectal cancer subtyping consortium) μελέτησε τις υπάρχουσες μέχρι τότε μοριακές ταξινομήσεις του κολο-ορθικού καρκίνου (που βασίζονταν στην γονιδιακή έκφραση) και συμφώνησε και ταξινόμησε τον κολο-ορθικό καρκίνο σε τέσσερις μοριακούς υποτύπους (CMS, consensus molecular subtypes) με ξεχωριστά χαρακτηριστικά<sup>45</sup>:

1. **CMS 1:** Το 14% των ορθο-κολικών καρκίνων περιλαμβάνονται σε αυτή την κατηγορία, με τους περισσότερους να είναι σποραδικοί και τους υπόλοιπους σχετιζόμενους με το σύνδρομο Lynch. Οι CMS1 ορθο-κολικοί καρκίνοι έχουν μεγάλα ποσοστά υπερμεταλλάξεων είτε από υπερμεθυλίωση, είτε από μετάλλαξη των εκκινητών των γονιδίων MMR. Επίσης, συχνά το *BRAF* μεταλλάσσεται. Εντοπίζονται συνήθως στο δεξιό κόλον. Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού του υποτύπου ορθο-κολικού καρκίνου είναι η έκφραση γονιδίων που μεσολαβούν στην αυξημένη ανοσολογική απάντηση, με διήθησή τους από T-λεμφοκύτταρα (helper 1 και cytotoxic), γεγονός που εξηγεί την ανταπόκρισή τους στην ανοσοθεραπεία και την καλύτερη επιβίωση<sup>46</sup>. Για τον ίδιο λόγο (ενεργοποιημένη ανοσολογική απάντηση), οι ασθενείς σταδίου II έχουν χειρότερη πρόγνωση με την επικουρική (adjuvant) χημειοθεραπεία λόγω της αρνητικής επίδρασης που έχει η τελευταία στο ανοσολογικό σύστημα. Αν και γενικά η πρόγνωση των ασθενών με κολο-ορθικούς καρκίνους CMS1 είναι καλή (πενταετής επιβίωση 73%), δεν ισχύει το ίδιο για την υποκατηγορία των όγκων που φέρουν μετάλλαξη στο *BRAF*<sup>47</sup>, όπως και στη περίπτωση της υποτροπής.

2. **CMS 2:** Αυτή είναι η μεγαλύτερη κατηγορία που περιλαμβάνει το 39% των περιπτώσεων ορθο-κολικού καρκίνου και είναι γνωστή ως κανονική (canonical). Χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμιακή αστάθεια με μικρή συχνότητα υπερμεταλλάξεων και σχετίζεται με το μονοπάτι αδενώματος-καρκίνου με πρόωμη απώλεια του *APC*, που ακολουθείται από μετάλλαξη του *KRAS* και τελικά από απώλεια του γονιδίου *tp53*. Εμφανίζεται συχνότερα σε αριστερούς καρκίνους του παχέος εντέρου και το ορθού, με την καλύτερη πρόγνωση από όλους τους υποτύπους: πενταετής επιβίωση 77% και συνολική επιβίωση περίπου 3 έτη σε ασθενείς με μεταστατική νόσο. Λόγω μεταλλάξεων του *EGFR* οι ασθενείς μπορεί να ανταποκριθούν καλά στη θεραπεία έναντι αυτού.
3. **CMS 3:** Αυτός ο υποτύπος είναι γνωστός και ως μεταβολικός και περιλαμβάνει το 13% των περιπτώσεων. Χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια (λιγότερο από τον υποτύπο CMS1, αλλά περισσότερη από τους άλλους δυο) και μεταλλάξεις του *KRAS* στο 68% των περιπτώσεων, που ευθύνεται για την αντίσταση στις αντι-*EGFR* θεραπείες. Η πενταετής επιβίωση είναι καλή και κυμαίνεται στο 75%.
4. **CMS 4:** Ο υποτύπος αυτός είναι γνωστός και ως μεσεγχυματικός και περιλαμβάνει το 23% των περιπτώσεων. Οι ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο CMS4 τείνουν να διαγιγνώσκονται καθυστερημένα, με αποτέλεσμα να έχουν πενταετή επιβίωση στο 62% και να έχουν την χειρότερη συνολική και μετά από υποτροπή επιβίωση. Ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία πρωτεϊνών που διηθούν το στρώμα και υπερενεργοποιούν το μεσέγχυμα και την αγγειογένεση, με αποτέλεσμα να ανταποκρίνεται καλύτερα σε θεραπείες με αναστολείς της αγγειογένεσης, χωρίς όμως ανταπόκριση στην επικουρική χημειοθεραπεία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ ΚΟΛΟ-ΟΡΘΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

#### 2.1. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Ένας βασικός ρόλος του ανοσολογικού συστήματος είναι να εντοπίζει και να περιορίζει και καταστρέφει τους αναπτυσσόμενους όγκους. Τα καρκινικά αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν τέσσερα είδη: α) ογκο-ειδικά αντιγόνα (tumor-specific antigens, TSAs), που κωδικοποιούνται από γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά από καρκινικά κύτταρα, β) ογκο-σχετιζόμενα αντιγόνα (tumor-associated antigens, TAAs), που παράγονται από μεταλλάξεις φυσιολογικών γονιδίων, γ) αντιγόνα που εκφράζονται σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης ή μόνο από ορισμένες διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές, και δ) αντιγόνα που υπερεκφράζονται σε συγκεκριμένους όγκους.

Τρία κύτταρα-κλειδιά περιλαμβάνονται στην **ανοσολογική απάντηση**: α) **τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting cells)**, όπως τα δενδριτικά κύτταρα που αναγνωρίζουν, προσλαμβάνουν και παρουσιάζουν (μέσω των μορίων τάξης I του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, MHC I) τα «ξένα» αντιγόνα στα T-κύτταρα, β) **τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CTLs, cytotoxic lymphocytes)**, που ενεργοποιούνται από τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα και αναγνωρίζουν και καταστρέφουν τα κύτταρα που έχουν «ξένα» αντιγόνα TAA, και γ) **τα B-λεμφοκύτταρα**, που παράγουν ειδικά αντισώματα για τα αντιγόνα TAA. Υπάρχουν κι άλλα ανοσοτροποποιητικά κύτταρα, όπως τα T-ρυθμιστικά κύτταρα, τα φυσικά κύτταρα φονείς (natural killer cells), τα μακροφάγα και τα μυελογενή κατασταλτικά κύτταρα. Όλα αυτά τα κύτταρα σε συνδυασμό με τα στρωματικά κύτταρα που περιβάλλουν τον όγκο, δημιουργούν **το μικροπεριβάλλον του όγκου** και συμμετέχουν στην ανοσολογική επίβλεψη του καρκίνου<sup>48</sup>.

Η ανοσολογική απάντηση στον καρκίνο είναι ένας κύκλος που ανατροφοδοτείται, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται οι ανοσοδιεγέρτες και να αυξάνεται η δράση και απάντηση των T-κυττάρων. Ο κύκλος της ανοσολογικής απάντησης περιλαμβάνει και ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, που δρουν ρυθμιστικά στον περιορισμό ή την

παύση της απάντησης. **Ο κύκλος της ανοσολογικής απάντησης στον καρκίνο** διαιρείται σε επτά φάσεις-βήματα<sup>49</sup>:

1. Απελευθέρωση των αντιγόνων ΤΑΑ από τα καρκινικά κύτταρα, που δεσμεύονται από τα δενδριτικά κύτταρα,
2. Παρουσίαση των ΤΑΑ στα Τ-κύτταρα,
3. Ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων και απάντηση στα αντιγόνα ΤΑΑ,
4. Μετανάστευση των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων στο περιβάλλον του όγκου,
5. Διείσδυση των Τ-κυττάρων εντός του όγκου (TILs, tumor-infiltrating lymphocytes),
6. Αναγνώριση και σύνδεση των Τ-κυττάρων στα καρκινικά κύτταρα, και
7. Καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.

### ***ΔΙΑΦΥΓΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟ-ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ***

Παρά την ανοσολογική επιτήρηση των όγκων, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς για να διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης κι απάντησης, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται σε ένα περιβάλλον φυσιολογικής ανοσολογικής λειτουργίας. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται για τους εξής λόγους: α) τα αντισώματα που παράγονται έναντι των καρκινικών αντιγόνων προσδένονται στα τελευταία, με αποτέλεσμα να τα «κρύβουν» από τα CTLs, β) η παρουσία των αντισωμάτων οδηγεί σε εξαφάνιση των καρκινικών αντιγόνων από την επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, ενώ επανεμφανίζονται μετά την απομάκρυνση των αντισωμάτων, γ) τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εκφράζουν χαμηλά επίπεδα μορίων ΜHC τάξης I, με αποτέλεσμα την μικρότερη παρουσίαση των αντιγόνων, και δ) τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να μην παρέχουν επαρκή σήματα για την διέγερση της ανοσολογικής απάντησης (συνδιεγερτικά σήματα).

Η θεωρία της ανοσολογικής προσαρμογής και τροποποίησης του όγκου (**concept of tumor immunoediting**) είναι η αναθεωρημένη προσέγγιση στο ζήτημα της ανοσοδιαφυγής<sup>50</sup>. Η θεωρία αυτή χωρίζει σε τρεις φάσεις την ανοσολογική προσαρμογή του όγκου: α) η **φάση της εξαφάνισης του όγκου (elimination phase)** μπορεί να είναι πλήρης, όταν όλα τα καρκινικά κύτταρα καθαίρονται, ή ατελής, όταν μόνο ένα μέρος των καρκινικών κυττάρων τελικά καταστρέφονται, οπότε

αναπτύσσεται μια β) **φάση ισορροπίας (equilibrium phase)** μεταξύ του ανοσολογικού συστήματος και του όγκου, στην οποία τα καρκινικά κύτταρα είτε παραμένουν αδρανή, είτε συνεχίζουν να εξελίσσονται, συσσωρεύοντας περαιτέρω αλλαγές (μεταλλάξεις στο DNA, αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, κλπ.), με αποτέλεσμα το ανοσολογικό σύστημα να δρα επιλεκτικά σε ευαίσθητους κυτταρικούς κλώνους του όγκου με στόχο τον πλήρη έλεγχο και καταστροφή του όγκου. Στη περίπτωση, όμως, της αδυναμίας να ελέγξει η ανοσία την εξέλιξη του όγκου, τότε επιλεκτικές καρκινικές κυτταρικές σειρές αντιστέκονται ή αναστέλλουν την αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση, οδηγώντας στην γ) **φάση της διαφυγής (escape phase)**, στην οποία δεν υπάρχει κανένας έλεγχος στην ανάπτυξη και πρόοδο του όγκου.

### ***ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ***

Αυτή η διαδικασία της ανοσολογικής προσαρμογής και τροποποίησης (immunoediting) ρυθμίζεται από μια σειρά **υποδοχέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου (immune checkpoint receptors)**<sup>51</sup>, στην οποία περιλαμβάνονται τα παρακάτω πέντε: α) το μόριο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1 (programmed cell death), β) ο συνδέτης του PD-L1 (PD ligand), γ) η πρωτεΐνη 4 σχετιζόμενη με τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), δ) το γονίδιο ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων LAG-3 (lymphocyte activation gene) και ε) η διοξυγενάση της ινδολαμίνης IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase). Τα ανοσολογικά σημεία ελέγχου μπορούν να τροποποιήσουν την Τ-κυτταρική απάντηση, τροποποιώντας την επικοινωνία μεταξύ Τ-κυττάρων και αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα διεισδύουν στο ανοσολογικό σύστημα και το «σβήνουν» τη στιγμή που ετοιμάζει την απάντησή του έναντι αυτών. Οι αναστολείς των ανοσολογικών σημείων ελέγχου (πχ. Ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, κλπ.) αναστέλλουν το μηχανισμό αυτό, αποφεύγοντας έτσι το «σβήσιμο» του ανοσολογικού συστήματος, ενεργοποιώντας την αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση.

Τα ανοσολογικά σημεία ελέγχου αναστέλλουν τα Τ-κύτταρα σε διάφορες φάσεις της ανοσολογικής απάντησης: α) Το CTLA4 εκφράζεται μόνο στα Τ-κύτταρα αμέσως μόλις αυτά ενεργοποιηθούν και ενώνεται με τις πρωτεΐνες CD80/CD86, αναστέλλοντας την λειτουργία τους και β) Το PD-1/PD-L1/PD-L2 σημείο ελέγχου με την σύνδεση του PD-1 με τους συνδέτες του PD-L1/PD-L2 ή τον υποδοχέα του PD-1 στα Τ-κύτταρα, απενεργοποιεί τα Τ-κύτταρα, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης. Επίσης, ο υποδοχέας του PD-1 εκφράζεται, εκτός από τα Τ-κύτταρα, στην επιφάνεια των μακροφάγων και των Β-κυττάρων, ενώ οι δυο συνδέτες του εκφράζονται από κύτταρα πολλών όγκων και φλεγμονώδη κύτταρα. Παρότι η έκφραση του PD-L1 σχετίζεται με κακή πρόγνωση, η θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι είτε του PD-1 (nivolumab, pembrolizumab), είτε του PD-L1 (atezolizumab, durvalumab) ως μονοθεραπεία φαίνεται ότι συρρικνώνουν τους όγκους σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τις παλαιότερα εφαρμοσθείσες ανοσοθεραπείες (εμβόλια, ACT, κυτταροκίνες), με καλύτερη και μακρόχρονη ανταπόκριση και λιγότερες σοβαρές παρενέργειες.

Σε αντίθεση με τον κολο-ορθικό καρκίνο με μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS), οι καρκίνοι με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high) έχουν ένα ιδιαίτερα ενεργό ανοσολογικό μικροπεριβάλλον, που περιλαμβάνει την παρουσία κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (CD8+) και ενεργοποιημένων T-helper 1 κυττάρων (CD4+). Παρά την έντονη ανοσολογική παρουσία, τα καρκινικά κύτταρα δεν καταστρέφονται χάριν της ενεργοποίησης των ανοσολογικών σημείων ελέγχου (cancer-specific upregulation) PD-1, CTLA4, LAG3 και IDO<sup>52</sup>. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς με κολο-ορθικούς καρκίνους MSI-high είναι πολύ καλοί υποψήφιοι για ανοσοθεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν να μελετηθεί η έκφραση του PD-L1 σε παθολογοανατομικά δείγματα από γαστρικό και κολο-ορθικό καρκίνο.

Για το λόγο αυτό, κατόπιν αιτήσεώς μου προς το Επιστημονικό Συμβούλιο του Τζανείου Νοσοκομείου Πειραιά για την (αριθμ. 13985/17-10-2017), έλαβα έγκριση διεξαγωγής μελέτης για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας με θέμα «Η έκφραση του μορίου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1 (programmed cell death) και του συνδέτη PD-L1 (PD ligand) στον γαστρικό και κολο-ορθικό καρκίνο» στα πλαίσια παρακολούθησης του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Χειρουργική Ογκολογία» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (απόσπασμα πρακτικών 53<sup>ης</sup> συνεδρίασης του Επιστημονικού Συμβουλίου της 24-10-2017, το οποίο συγκροτήθηκε σε σώμα με την αριθμ. 2570/22-2-2016 Πράξη του Διοικητή του ως άνω Νοσοκομείου).

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Αναζητήθηκαν περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο κολο-ορθικό και γαστρικό, στις οποίες έγινε μέτρηση της έκφρασης του συνδέτη του μορίου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-L1 (programmed cell death ligand-1). Σε όλα τα περιστατικά καταγράφηκαν τα επιδημιολογικά δεδομένα (ηλικία, φύλο), η εντόπιση του καρκίνου, η ιστολογική διάγνωση, ο βαθμός διαφοροποίησης, η σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης TNM, το είδος της επέμβασης και η έκφραση του PD-L1.

### *Ανοσοϊστοχημεία*

Από κάθε δείγμα υλικού ελήφθησαν τομές 5μm από κύβους παραφίνης, στους οποίους περικλειόταν ικανή ποσότητα νεοπλασματικής μάζας. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης σε τρία βήματα. Συγκεκριμένα, οι χρώσεις έγιναν με την ακόλουθη διαδικασία:

- 1) αποπαραφίνωση των τομών κι ενυδάτωση με κατιούσα σειρά αλκοολών,
- 2) έκπλυση σε αποσταγμένο νερό
- 3) Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με εμβάπτιση σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% σε tris buffered saline (TBS), pH: 7,60, για 15 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο
- 4) έκπλυση σε αποσταγμένο νερό
- 5) έκπλυση σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), pH: 7,60 3x5 λεπτά
- 6) εμβάπτιση των τομών σε κιτρικό οξύ και τοποθέτηση αυτών σε φούρνο μικροκυμάτων 650-700 W για 30 λεπτά
- 7) έκπλυση σε αποσταγμένο νερό
- 8) έκπλυση σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), pH: 7,60 3x5 λεπτά
- 9) επώαση με ορό χοίρου (Dakopatts) 1:5 σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), pH: 7,60 για 10 λεπτά
- 10) απομάκρυνση της περίσσειας του ορού και επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα για 60 λεπτά



- 11) έκπλυση σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), 3x10 λεπτά
- 12) επώαση με swine anti-rabbit Ig (Dakopatts) 1:50 σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), pH: 7,60 για 30 λεπτά
- 13) έκπλυση σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), για 3x10 λεπτά
- 14) επώαση με σύμπλεγμα υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (Pap-Dakopatts) 1:100 σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), pH: 7,60 για 30 λεπτά
- 15) έκπλυση σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), για 3x10 λεπτά
- 16) τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα DAB-χρωμογόνο (0,6mg% DAB) σε διάλυμα tris buffered saline (TBS), pH: 7,2 στο οποίο έχει προστεθεί 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 5-10 λεπτά
- 17) έκπλυση σε νερό βρύσης
- 18) αντίχρωση με αιματοξυλίνη
- 19) αφυδάτωση με ανιούσα σειρά αλκοολών, διαύγανση με ξυλόλη, κάλυψη με DPX.

Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας όπου αντί του ειδικού αντιορού, τοποθετήθηκε ο αντίστοιχος μη ειδικός αντιορός. Στη παρούσα ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήσαμε τον εξής αντιορό:

**PD-L1:** 1HC 22C3 (pharm Dx), code 8k006 (Dako).

#### *Αξιολόγηση και βαθμολόγηση υλικού*

Οι τομές εκτιμήθηκαν εκ νέου με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και επιβεβαιώθηκε η αρχική διάγνωση από δυο ανεξάρτητους παρατηρητές (παθολογοανατόμους). Η έκφραση του μορίου PD-L1 έγινε με ένα σύστημα τριών επιπέδων:

1. έκφραση < 1% (**απουσία έκφρασης**)
2. έκφραση 1-49% (**χαμηλή έκφραση**)
3. έκφραση > 50% (**υψηλή έκφραση**).

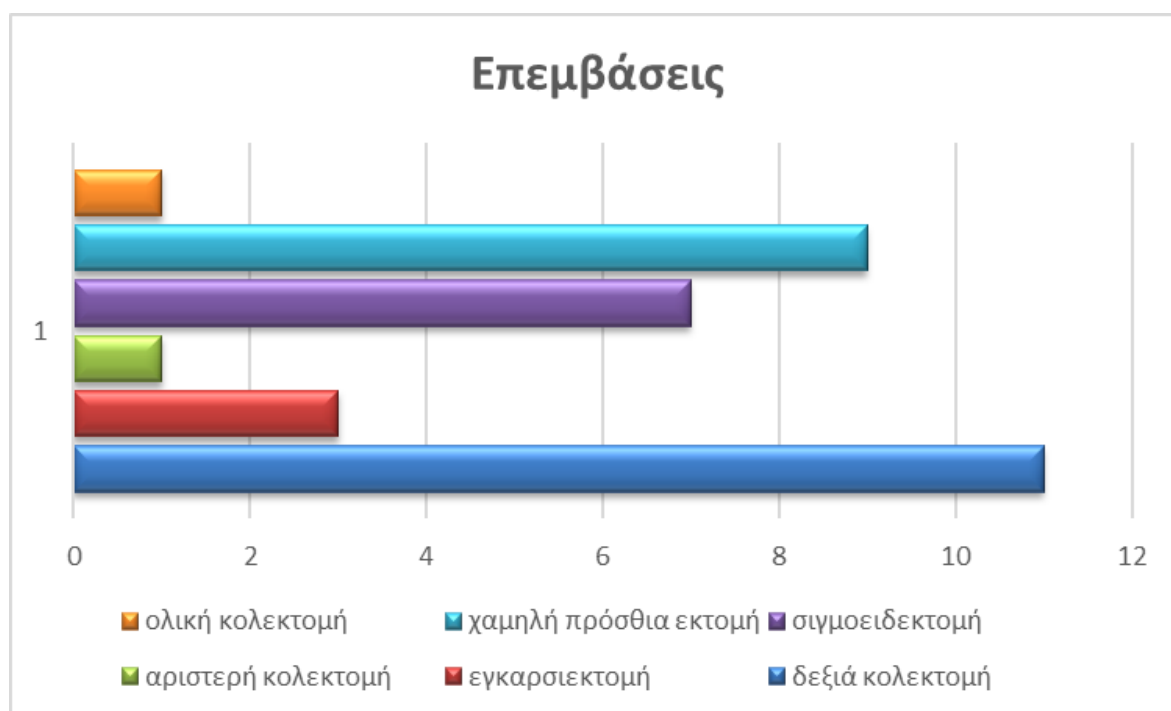
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την αναζήτηση των περιπτώσεων ασθενών, όλα τα περιστατικά με γαστρικό καρκίνο που μελετήθηκαν ήταν αρνητικά για έκφραση του μορίου PD-L1, οπότε και δεν συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη.

Η μελέτη αφορούσε σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο. Τα επιμέρους χαρακτηριστικά της ομάδας αυτής ασθενών παρουσιάζονται παρακάτω αναλυτικά:

**Φύλο-Ηλικία.** Μελετήθηκαν 32 ασθενείς, 16 άνδρες και 16 γυναίκες, ηλικίας 45-93 ετών (μέσος όρος 71,4 έτη).

**Είδος επέμβασης.** Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε δεξιά κολεκτομή (11), εγκάρσιεκτομή (3), αριστερή κολεκτομή (1), σιγμοειδεκτομή (7), χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθοσιγμοειδούς (9) και ολική κολεκτομή (1) (Σχήμα 1).



**ΣΧΗΜΑ 1.** Σχεδιάγραμμα με το είδος επέμβασης της ομάδας ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο.

**Ιστολογική διάγνωση.** Όλοι ασθενείς διαγνώστηκαν με αδενοκαρκίνωμα χαμηλής (8) και μέτριας (24) διαφοροποίησης.

**Σταδιοποίηση TNM.** Σύμφωνα με τη νεότερη σταδιοποίηση του καρκίνου (8<sup>th</sup> Edition AJCC Cancer Staging Manual), οι ασθενείς σταδιοποιήθηκαν ως εξής: στάδιο ΠΑ (15), ΠΙΒ (13) και ΠΙC (4).

**Έκφραση του PD-L1.** Η έκφραση του μορίου PD-L1 ήταν η εξής (Σχήμα 2):

- Απουσία έκφρασης: 21
- Χαμηλή έκφραση (3-30%): 5
- Υψηλή έκφραση: 6



**ΣΧΗΜΑ 2.** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του συνδέτη του μορίου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-L1 στην υπό μελέτη ομάδα ασθενών με κολο-ορθικό.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται συνολικά στον Πίνακα 1.

Παράμετροι	N	%
<b>Ηλικία (έτη)</b>		
μέσος όρος (εύρος)	71,4	(45-93)
<b>Φύλο</b>		
Άνδρες	16	50%
Γυναίκες	16	50%
<b>Είδος επέμβασης</b>		
Δεξιά Κολεκτομή	11	34,3
Εγκαρσιεκτομή	3	9,3
Αριστερή Κολεκτομή	1	3,1
Σιγμοειδεκτομή	7	21,9
Χαμηλή Πρόσθια Εκτομή	9	28,1
Ολική Κολεκτομή	1	3,1
<b>Ιστολογική Διαφοροποίηση</b>		
Μέτρια	24	75
Χαμηλή	8	25
<b>Σταδιοποίηση TNM</b>		
IIA	15	46,9
IIIB	13	40,6
IIIC	4	12,5
<b>Έκφραση PD-L1</b>		
< 1%	21	65,6
1 – 49%	5	15,6
> 50%	6	18,75

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.** Χαρακτηριστικά της υπό μελέτη ομάδας ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο.

Πρέπει να τονισθεί ότι οι 6 ασθενείς με **υψηλή έκφραση του μορίου PD-L1** είχαν ειδικότερα τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Άνδρες (4) ηλικίας 45-87 έτη και Γυναίκες (2), ηλικίας 61 και 67 ετών.
- Στάδιο ΙΙΑ (1) και στάδιο ΙΙΙΒ (5)
- Δεξιά κολεκτομή (3), εγκάρσιεκτομή (1) και σιγμοειδεκτομή (2)
- Ιστολογικά: μέτρια διαφοροποίηση (5) και χαμηλή (1)
- υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high) όλοι.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την μελέτη αυτή των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για κολο-ορθικό καρκίνο και εξετάστηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση του συνδέτη του μορίου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-L1 εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα: α) το μόριο του PD-L1 εκφράζεται υψηλά σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών 18,75%, β) όλοι αυτοί οι ασθενείς με υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση του PD-L1 έχουν μικροδορυφορική αστάθεια και γ) είναι κυρίως κολο-ορθικοί καρκίνοι μέτριας διαφοροποίησης.

Το μόριο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1 είναι ένας υποδοχέας που αποτελεί ανοσολογικό σημείο ελέγχου και βρίσκεται πάνω στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, B-κύτταρα και τα κύτταρα φονείς (natural killers) και συνήθως συνδέεται με τον συνδέτη του PD-L1 που βρίσκεται στα καρκινικά ή στρωματικά κύτταρα. Κατόπιν της σύνδεσης αυτής, το σύμπλεγμα PD-1/PD-L1 προκαλεί ένα ανασταλτικό σήμα που προκαλεί εξάντληση και απενεργοποίηση των T-κυττάρων<sup>53,54</sup>. Το μπλοκάρισμα ή αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης, αναστρέφει την εξάντληση των T-κυττάρων και προκαλεί ύφεση της εξέλιξης του όγκου, σε παθήσεις όπως το μελάνωμα, το μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα και το νεφρικό καρκίνωμα. Στο κολο-ορθικό καρκίνο, αν και αρχικά είχε διατυπωθεί η άποψη ότι δεν έχει θέση η ανοσοθεραπεία, διαπιστώθηκε ότι μια υπο-ομάδα κολο-ορθικού καρκίνου που είχε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high) είχε σημαντική ανταπόκριση στην θεραπεία με αναστολείς του PD-1/PD-L1<sup>55</sup>.

Η αξιοσημείωτη ανάπτυξη των ανοσοθεραπειών για πολλούς καρκίνους έχει αλλάξει τα τελευταία χρόνια το τοπίο της αντικαρκινικής θεραπευτικής. Ειδικότερα, η στόχευση στο μόριο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1 (PDCD1) και του συνδέτη του PD-L1 (CD274) έχει εξαιρετική ανταπόκριση πολλών όγκων<sup>56,57</sup>. Καθότι το ανοσολογικό αυτό σημείο ελέγχου PDCD1/CD274 θεωρείται κύριος μηχανισμός της ανοσολογικής απόκρισης στον καρκίνο, έχουν αναπτυχθεί μονοκλωνικά αντισώματα που το αναστέλλουν. Η ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία με anti-PD-1/PD-L1 αντισώματα φαίνεται ότι δεν γίνεται από την άμεση

επίδραση των αντισωμάτων *per se*, αλλά μέσω των αντιγονο-ειδικών T-κυττάρων τα οποία προηγουμένως έχουν μπλοκάρει από την αλληλεπίδρασή τους με το PD-1/PD-L1<sup>58,59</sup>. Με βάση την παρουσία ή απουσία των T-κυττάρων και της έκφρασης του PD-1 από τα καρκινικά κύτταρα, οι όγκοι ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες: α) PD-L1 (+), T-cell (+), β) PD-L1 (-), T-cell (+), γ) PD-L1 (+), T-cell (-) και δ) PD-L1 (-), T-cell (-)<sup>56,60</sup>. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του PD-L1 στους όγκους έχει μελετηθεί σε πολλές κλινικές μελέτες και θεωρείται πλέον ως ένας κλινικός δείκτης, με βάση τον οποίο επιλέγονται οι ασθενείς που πιθανά θα ανταποκριθούν στις ανοσοθεραπείες έναντι του PD-1/PD-L1. Πάρα ταύτα, υπάρχουν ασθενείς με θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του PD-1 που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία και άλλοι που είναι αρνητικοί και ανταποκρίνονται, γεγονός που τον κάνει όχι τέλειο κλινικό δείκτη. Επίσης, σε πολλές μελέτες θεωρήθηκε θετικός ο ιστός που σημάνθηκε ανοσοϊστοχημικά από 1-50%, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους<sup>61,62</sup>.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι το PD-L1 εκφράζεται ανοσοϊστοχημικά κυρίως σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο και μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high) και πολύ σπάνια σε μικροδορυφορικά σταθερά κολο-ορθικά νεοπλάσματα<sup>63,64</sup>. Αρχικά, οι Droeser *et al*<sup>65</sup> μελετώντας ανοσοϊστοχημικά 1420 χειρουργικά παρασκευάσματα ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο, διαπίστωσαν υψηλή έκφραση του PD-L1 σε 36% MMR-proficient και 29% MMR-deficient, με τα τελευταία (MMR-d) να σχετίζονται με περισσότερα επίπεδα TILs και καλύτερη πρόγνωση σε άλλη μελέτη<sup>52</sup>. Πράγματι, οι κολο-ορθικοί καρκίνοι που εκφράζουν υψηλά επίπεδα PD-L1 και συνοδεύονται από μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high) έχουν περισσότερα TILs και περινεοπλασματική αντίδραση με λεμφοκύτταρα (peritumoral lymphoid reaction) έχουν καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία με αναστολείς του PD-1/PD-L1<sup>60,66</sup>. Τέλος, σε μια πρόσφατη μελέτη 208 περιπτώσεων MSI-high κολο-ορθικών καρκίνων μετρήθηκε υψηλή έκφραση του PD-L1 τόσο στα καρκινικά κύτταρα (12,5%), όσο και στα ανοσολογικά κύτταρα (29,8%) και σχετίστηκε η πρώτη (PD-L1 tumor positivity) με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης, μεγαλύτερου σταδίου, με υπερμεθυλίωση (CIMP-high), ενώ η δεύτερη (PD-L1 immune cell positivity) με μεγαλύτερη συγκέντρωση TILs (T-κύτταρα και μακροφάγα) και peritumoral reaction<sup>64</sup>.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την διπλωματική αυτή εργασία που αφορούσε στην μέτρηση της έκφρασης του PD-L1 σε δείγματα από ασθενείς που χειρουργήθηκαν με κολο-ορθικό καρκίνο (το σκέλος του γαστρικού καρκίνου εξαιρέθηκε λόγω αρνητικών μετρήσεων) εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Το μόριο του PD-L1 εκφράστηκε υψηλά (>50%) στο 18,75% των περιπτώσεων με κολο-ορθικό καρκίνο.

- Η υψηλή έκφραση PD-L1 σχετίστηκε περισσότερο με:

- μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high)
- μέτρια ιστολογική διαφοροποίηση
- στάδιο ΙΙΒ κατά TNM, και
- το ανδρικό φύλο.

Οι ασθενείς με υψηλή έκφραση του PD-L1 είναι συνήθως καλοί υποψήφιοι για ανοσοθεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του PD-L1. Ειδικότερα, η υποομάδα των ασθενών αυτών που έχουν και μικροδορυφορική αστάθεια ανταποκρίνονται καλύτερα στην ανοσοθεραπεία και έχουν καλύτερη πρόγνωση και επιβίωση. Αυτό εξηγείται σε κυτταρικό επίπεδο από το γεγονός ότι έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα σε Τ-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο (high density of TILs), τα οποία απελευθερώνονται και επιτίθενται στον όγκο όταν εφαρμοσθεί η αντι-PD-L1 θεραπεία. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός υψηλής έκφρασης PD-L1 και μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-high) μπορεί να αποτελέσει έναν βιοδείκτη για την καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο στις νεότερες ανοσοθεραπείες έναντι του PD-L1.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Senore C, Segan N, Gunter M. Colorectal Cancer: decreasing disparities and promoting prevention are policy priorities. In: Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon: France: International Agency for Research on Cancer, 2020, p.344-55.
2. Fidler MM, Bray F, Vaccarella S, Soerjomataram I. Assessing global transitions in human development and colorectal cancer incidence. *Int J Cancer*. 2017 Jun 15;140(12):2709-2715.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424..
4. Sunkara V, Hébert JR. The colorectal cancer mortality-to-incidence ratio as an indicator of global cancer screening and care. *Cancer*. 2015 May 15;121(10):1563-9.
5. Manser CN, Bauerfeind P. Impact of socioeconomic status on incidence, mortality, and survival of colorectal cancer patients: a systematic review. *Gastrointest Endosc*. 2014 Jul;80(1):42-60.e9.
6. Manser CN, Bauerfeind P. Impact of socioeconomic status on incidence, mortality, and survival of colorectal cancer patients: a systematic review. *Gastrointest Endosc*. 2014 Jul;80(1):42-60.e9.
7. Senore C, Bellisario C, Segnan N. Distribution of colorectal polyps: Implications for screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Aug;31(4):481-488.
8. Koo JH, Leong RW. Sex differences in epidemiological, clinical and pathological characteristics of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jan;25(1):33-42.
9. Massat NJ, Moss SM, Halloran SP, Duffy SW. Screening and primary prevention of colorectal cancer: a review of sex-specific and site-specific differences. *J Med Screen*. 2013;20(3):125-48.
10. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2006 May-Jun;56(3):143-59

11. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep;27(9):1423-31
12. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67
13. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113-30
14. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72
15. Kolligs FT, Bommer G, Göke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*. 2002;66(3):131-44
16. Behrens J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans*. 2005 Aug;33(Pt 4):672-5
17. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*. 2006 Dec 4;25(57):7531-7
18. Starr TK, Allaei R, Silverstein KA, Staggs RA, Sarver AL, Bergemann TL, et al. A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science*. 2009 Mar 27;323(5922):1747-50.
19. Macartney-Coxson DP, Hood KA, Shi HJ, Ward T, Wiles A, O'Connor R, et al. Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level. *BMC Cancer*. 2008 Jul 1;8:187.
20. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32
21. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:101-28
22. Lanza G, Matteuzzi M, Gafá R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer*. 1998 Aug 21;79(4):390-5
23. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2073-2087.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064

- 
24. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248-57
  25. Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, et al. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1;23(10):2318-24
  26. Iacopetta B, Grieu F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2010 Dec;6(4):260-9
  27. Jass JR. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer.* 2004;3(2):93-100
  28. Warusavitarne J, Ramanathan P, Kaufman A, Robinson BG, Schnitzler M. 5-fluorouracil (5FU) treatment does not influence invasion and metastasis in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2006 Oct;21(7):625-31
  29. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, Boland CR. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology.* 1999 Jul;117(1):123-31
  30. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* 1996 Jul 1;56(13):3087-90
  31. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10;28(20):3219-26. doi: 10.1200/JCO.2009.27.1825. Epub 2010 May 24. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2010 Oct 20;28(30):4664
  32. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer.* 2010 Oct;46(15):2788-98
  33. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut.* 2007 Jan;56(1):140-8
  34. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer.

---

Semin Cancer Biol. 1999 Oct;9(5):349-57

35. Zoratto F, Rossi L, Verrico M, Papa A, Basso E, Zullo A, et al. Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumour Biol.* 2014 Jul;35(7):6195-206

36. Haque T, Greene KG, Crockett SD. Serrated neoplasia of the colon: what do we really know? *Curr Gastroenterol Rep.* 2014 Apr;16(4):380. doi:10.1007/s11894-014-0380-6

37. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 20;29(33):4401-9.

38. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H; Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum.* 2010 Jan;53(1):57-64.

39. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol.* 2008 Sep;15(9):2388-94.

40. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer.* 2017 Oct;84:69-80.

41. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg.* 2016 Mar;20(3):648-55..

42. Li P, Xiao Z, Braciak TA, Ou Q, Chen G, et al. A relationship to survival is seen by combining the factors of mismatch repair status, tumor location and age of onset in colorectal cancer patients. *PLoS One.* 2017 Mar 2;12(3):e0172799. doi: 10.1371/journal.pone.0172799.

43. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 19;18(1):197. doi: 10.3390/ijms18010197.

- 
44. Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, Saito K, Slezak P, Jaramillo E, et al. Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2676-83.
  45. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6.
  46. Gang W, Wang JJ, Guan R, Yan S, Shi F, Zhang JY, et al. Strategy to targeting the immune resistance and novel therapy in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2018 May;7(5):1578-1603.
  47. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J.* 2017 Summer;3(3):105-111.
  48. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015 Jan;5(1):43-51.
  49. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013 Jul 25;39(1):1-10.
  50. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8.
  51. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA Jr. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Oncologist.* 2016 Oct;21(10):1200-1211.
  52. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Dec;23(12):2965-70.
  53. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Apr;100:88-98.
  54. Aguiar PN Jr, Santoro IL, Tadokoro H, de Lima Lopes G, Filardi BA, Oliveira P, et al. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Immunotherapy.* 2016;8(4):479-88.

- 
55. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*. 2008 Apr;134(4):988-97.
56. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer--response. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5542.
57. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015 Apr;14(4):847-56.
58. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64..
59. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):568-71..
60. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015 Jun 1;75(11):2139-45.
61. Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria JC, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch*. 2016 May;468(5):511-25..
62. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al; KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1823-1833.
63. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*. 2016 Sep;29(9):1104-12.
64. Kim JH, Park HE, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016 Aug 9;115(4):490-6.
65. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Jun;49(9):2233-42.

---

66. Diaz LA Jr, Le DT. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med. 2015 Nov 12;373(20):1979.