



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**«MicroRNAs ΚΑΙ Long non-coding RNAs ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ
ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ ΙΩΑΝΝΑ

ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

Αφιερώνω την παρούσα διατριβή στην αγαπημένη μου οικογένεια η οποία δεν έχει πάψει όλα αυτά τα χρόνια να στηρίζει και να συμμερίζεται την ανησυχία μου προς την αναζήτηση μιας προσωπικής επιστημονικής «Ιθάκης».

Στους υπέροχους γονείς μου, Βασίλειο και Μελαχροινή.

Στις αγαπημένες μου αδελφές Τάνια και Ιωάννα και στα γλυκά ανηψάκια μου.

Στη μνήμη της γιαγιάς μου Μήτσας-φύλακα άγγελό μου.

Τέλος θέλω να αφιερώσω από καρδιάς, την παρούσα μελέτη σε όλους τους ογκολογικούς ασθενείς που μάχονται με γενναιότητα και αξιοπρέπεια καθημερινά με τον καρκίνο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την παρούσα διδακτορική διατριβή ολοκληρώνεται μια μεγάλη προσωπική προσπάθεια η οποία είχα την ευλογία να τύχει ουσιαστικής συνδρομής από πολλούς ανθρώπους. Οφείλω να απευθύνω ξεχωριστές ευχαριστίες για και να τους εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου για τη στήριξη που μου παρείχαν.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ.κ. Παπαδημητρίου Χρήστο, Θεοδοσόπουλο Θεοδόσιο και Γαζούλη Μαρία, Καθηγητές Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, για την εμπιστοσύνη, το χρόνο και την πολύτιμη συμβολή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την κ. Γαζούλη, η βοήθεια της οποίας υπήρξε καταλυτική για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ από καρδιάς για την αδιάκοπη επιστημονική καθοδήγηση, την ηθική υποστήριξη και την αγάπη που μου ενέπνευσε για τον δύσκολο χώρο της βιολογίας του καρκίνου. Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Οφείλω ιδιαίτερη αναφορά κι ευχαριστίες στον Δρ Γεράσιμο Αραβαντινό, Παθολόγο-Ογκολόγο, Συντ. Διευθυντή της Β' Ογκολογικής Κλινικής του ΓΟΝΚ «Άγιοι Ανάργυροι» για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα αυτά τα χρόνια. Δίπλα του γαλουχήθηκα στο δύσκολο χώρο της ογκολογίας, έτυχα του σεβασμού και αναγνώρισης όλων των ειδικοτήτων επιστημόνων υγείας, έχοντας την τιμή και χαρά να συνεργαστώ στενά με ένα μεγάλο Δάσκαλο και πλέον εγκάρδιο φίλο. Η παρούσα διατριβή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη στήριξη, αρωγή και ανοχή του.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους ασθενείς που συγκατέθεσαν να συμμετέχουν εθελοντικά στην παρούσα μελέτη και όλους τους εργαζόμενους της Β' Ογκολογικής Κλινικής του ΓΟΝΚ «Άγιοι Ανάργυροι», ιατρούς, νοσηλευτές, βοηθούς

θαλάμου και διοικητικό προσωπικό για την βοήθεια που μου προσέφεραν, ο καθένας από το πόστο εργασίας του, συμβάλλοντας στην περάτωση αυτής της εργασίας.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τίτλος: **MicroRNAs και Long non-coding RNAs ως βιοδείκτες στην πρόβλεψη της φαρμακευτικής ανταπόκρισης ασθενών με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο**

Σύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- 1) Παπαδημητρίου Χρήστος, Καθηγητής
- 2) Γαζούλη Μαρία, Καθηγήτρια
- 3) Θεοδοσόπουλος Θεοδόσιος, Καθηγητής

Κέντρο διεξαγωγής του πειραματικού μέρους της μελέτης: Εργαστήριο Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Σύσταση Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- 1) Παπαδημητρίου Χρήστος, Καθηγητής
- 2) Γαζούλη Μαρία, Καθηγήτρια
- 3) Θεοδοσόπουλος Θεοδόσιος, Καθηγητής
- 4) Θεοδωρόπουλος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 5) Κόντης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 6) Παπακωνσταντίνου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 7) Φιλίππου Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο:	Λαμπροπούλου Δήμητρα Ιωάννα
Πατρώνυμο:	Βασίλειος
Ημερομηνία γέννησης:	12 Οκτωβρίου 1981
Τόπος γέννησης:	Καλαμάτα
Διεύθυνση κατοικίας:	Ταυγέτου 2, Κηφισιά, 14562
Τηλέφωνο:	(+30) 694 733 80 52
Ηλεκτρονική διεύθυνση:	d_lambroulou@yahoo.gr

2. ΣΠΟΥΔΕΣ

Νοέμβριος 2017 έως σήμερα	Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής (Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)-Υπότροφος της Ελληνικής Εταιρείας Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας και της Εταιρείας Ογκολόγων-Παθολόγων Ελλάδος
Οκτώβριος 2008 έως και Απρίλιος 2012	Απόκτηση διπλώματος μεταπτυχιακών σπουδών (διετούς διάρκειας) με ειδίκευση στην «Κλινική Φαρμακευτική» με μέσο όρο βαθμολογίας 8.98 «Άριστα» από το τμήμα Φαρμακευτικής (Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)
Δεκέμβριος 2007	Απόκτηση αδείας άσκησης φαρμακευτικού επαγγέλματος με βαθμό «Λίαν Καλώς»
Οκτώβριος 2001 έως και Ιούλιος 2007	Απόκτηση πτυχίου με μέσο όρο βαθμολογίας 6.49 «Καλώς» από το τμήμα Φαρμακευτικής της Σχολής Επιστημών Υγείας (Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης)

Ιούνιος 1999

Αποφοίτηση από το Γενικό Λύκειο Χώρας Μεσσηνίας με βαθμό απολυτηρίου 19 και 2/10 «Άριστα»

3. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ιανουάριος 2021 έως σήμερα

ΜΕΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΝΤΥΠΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΗΜΙΣΗΣ ΕΟΦ

Νοέμβριος 2015 έως και σήμερα

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ / ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ- ΤΜΗΜΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ Β' ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ Γ.Ο.Ν.Κ. «ΑΓΙΟΙ ΑΝΑΡΓΥΡΟΙ»

Φεβρουάριος 2015 έως Σεπτέμβριος 2015

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ (HELLENIC OBSERVATORY OF CORPORATE GOVERNANCE) - ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΛΙΚΟΥ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (SYLLABUSES) ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΔΙΑΔΥΚΤΙΑΚΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ «ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ» ΚΑΙ «ΗΓΕΣΙΑΣ» (UNIVERSITY OF LIVERPOOL ΚΑΙ UNIVERSITY OF ROEHAMPTON)

Νοέμβριος 2011 έως Δεκέμβριος 2014

ΑΤΟΜΙΚΗ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΙΟΥ

4. ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

5. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλική γλώσσα σε επίπεδο Proficiency (Michigan 03 /1998)
(Cambridge 06 /1998)
- Γαλλική γλώσσα σε επίπεδο Unité A1: Expression Générale (05 /1997)

6. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ (PEER REVIEWED)

ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

1. **Lampropoulou DI**, Laschos K, Aravantinos G, Georgiou K, Papiris K, Theodoropoulos G, Gazouli M, Filippou D. Association between homeobox protein transcript antisense intergenic ribonucleic acid genetic polymorphisms and cholangiocarcinoma. *World J Clin Cases*. 2021 Mar 16;9(8):1785-1792. doi: 10.12998/wjcc.v9.i8.1785.
2. Sgouros J, Aravantinos G, Koliou GA, Pentheroudakis G, Zagouri F, Psyrii A, **Lampropoulou DI**, Demiri S, Pectasides D, Razis E, Fountzilas G, Samantas E. First Line Gemcitabine/Pazopanib in Locally Advanced and/or Metastatic Biliary Tract Carcinoma. A Hellenic Cooperative Oncology Group Phase II Study. *Anticancer Res*. 2020 Feb;40(2):929-938. doi: 10.21873/anticancerres.14026.
3. Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsantikidi K, Metaxa-Mariatou V, Stamou PE, Kladi-Skandali A, Kapeni E, Tsaousis G, Pentheroudakis G, Petrakis D, **Lampropoulou DI**, Aravantinos G, Varthalitis I, Kesisis G, Boukovinas I, Papakotoulas P, Katirtzoglou N, Athanasiadis E, Stavridi F, Christodoulou C, Koumarianou A, Eralp Y, Nasioulas G. Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients. *PLoS One*. 2019 Dec 20;14(12):e0226853. doi: 10.1371/journal.pone.0226853.
4. **Lampropoulou DI**, Aravantinos G, Laschos K, Theodosopoulos T, Papadimitriou C, Gazouli M. MiR-218 and miR-100 polymorphisms as markers of irinotecan-based chemotherapy response in metastatic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2019 Oct 9. doi: 10.1007/s00384-019-03401-3.
5. **Lampropoulou DI**, Aravantinos G., Katifelis H., Lazaris F., Laschos K., Theodosopoulos T., Papadimitriou C., Gazouli M. “Long non-coding RNA polymorphisms and prediction of response to chemotherapy based on irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer”. *Cancer Biomark*. 2019;25(2):213-221. doi: 10.3233/CBM-182383.

CASE REPORTS & LITERATURE REVIEWS

6. Laschos K, **Lampropoulou DI**, Aravantinos G, Piperis M, Filippou D, Theodoropoulos G, Gazouli M. Exosomal noncoding RNAs in cholangiocarcinoma: Laboratory noise or hope? *World J Gastrointest Surg.* 2020 Oct 27;12(10):407-424. doi: 10.4240/wjgs.v12.i10.407. PMID: 33194090; PMCID: PMC7642347.
7. Angelaki A, **Lampropoulou DI**, Aravantinos G. Immune-Related Dermatologic Toxicities: To Make a Long Story Short. *Cutan Ocul Toxicol.* 2019 Oct 24:1-8. doi: 10.1080/15569527.2019.1685536.
8. **Lampropoulou DI**, Laschos K., Amylidi A.L., Angelaki A., Soupos N., Boumpoucheropoulos S., Papadopoulou E., Nanou E., Zidianakis V., Nasioulas G., Fildissis G., Aravantinos G. "Fluoropyrimidine-induced toxicity and DPD deficiency. A case report of early onset, lethal capecitabine-induced toxicity and mini review of the literature. Uridine triacetate: Efficacy and safety as an antidote. Is it accessible outside USA?". *J Oncol Pharm Pract.* 2019 Aug 5, doi: 10.1177/1078155219865597.

POSTER PRESENTATIONS

1. J Sgouros, N Spathas , S Gkoura , S Kanellopoulou , **D.I. Lampropoulou**, M Belechri, N Miaris , D Kozompoli, M Tsoukra , G Stamoulis , G Aravantinos , E Samantas. "Recurrence rate in colorectal adenocarcinoma patients receiving adjuvant capecitabine monotherapy: do the number of chemotherapy cycles and relative dose intensity of the drug play a role?" *ESMO 21st World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Spain, 2019.*
2. **Lampropoulou D.I.**, Amillidi A.L, Angelaki A., Laschos K., Soupos N., Boumpoucheropoulos S., Papadopoulou E., Nasioulas G., Aravantinos G. "Capecitabine-induced life-threatening toxicity. Is the antidote accessible to Greek Medical Oncologists? A case report". *25th Hellenic Conference of Clinical Oncology. Athens, Greece, 2019.*
3. Karakonstantis K., **Lampropoulou D.I.**, Markantonis-Kyroudis SL., Katsarou M., Karagianni M., Xenos K. "Anthocyanin rich pomegranate extract benefits the lipid profiles of statin-treated patients". *6th International Conference on Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine. Andros, Greece, 2014.*

7. ΟΜΙΛΙΕΣ/ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ

-«Μηχανισμοί αλληλεπιδράσεων φαρμάκων σε ογκολογικούς ασθενείς» 17^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση, Ερέτρια 2016

-«Στρογγυλό τραπέζι: Κλινική Φαρμακευτική, Παρόν και Μέλλον» Συνεδριακό και Πολιτιστικό Κέντρο Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα,2016

-«Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων με αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKIs) σε ογκολογικούς ασθενείς» 11ο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, Αθήνα, 24-26 Νοεμβρίου 2016

-«Ο ρόλος του κλινικού φαρμακοποιού σε μια ογκολογική κλινική», 4ο Meeting «Debates on cancer treatments and cost effectiveness», Πόρτο Χέλι, 2017

-«Κλινικός Φαρμακοποιός: Απαραίτητος στις κλινικές;» 18^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση, Ερέτρια 2017

-«Ηπατοτοξικότητα προκαλούμενη από αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKIs)» Διλήμματα & Θέματα Αιχμής στην Ογκολογία, 29-30 Σεπτεμβρίου 2017, Αθήνα

-«Παραεμβατικές Κλινικές Μελέτες στη χώρα μας: Προκλήσεις και προοπτικές» 13ο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, Αθήνα, 28-29 Σεπτεμβρίου 2018

-«Uridine triacetate: Παρουσίαση περιστατικού». 20^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση, Ερέτρια 2019

-«Per os αντικαρκινική θεραπεία: Διαχείριση αλληλεπιδράσεων». 14ο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, Αθήνα, Νοέμβριος 2019

8. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΤΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

-17^η,18^η, 19^η, 20^η,21^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση, Ερέτρια 2016, 2017, 2018, 2019, 2020

-11^ο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, Αθήνα, 24-26 Νοεμβρίου 2016

-Διλήμματα & Θέματα Αιχμής στην Ογκολογία, 29-30 Σεπτεμβρίου 2017, Αθήνα

10. ΠΡΟΕΔΡΕΙΑ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1. 20^η και 21^η Θερινή Ογκολογική Συνάντηση, Ερέτρια 2019 και 2020

2. Διαδικτυακό Σεμινάριο: “FROM REGULATORY TO PHARMACOVIGILANCE”. PHARMACOVIGILANCE REFERRALS AND REGULATORY FRAMEWORK WITH FOCUS IN ONCOLOGY. Πανελλήνια Ένωση Φαρμακοποιών. 18 Νοεμβρίου 2020, Αθήνα

11. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Συμμετοχή σε περισσότερες από 50 διεθνείς παρεμβατικές και μη παρεμβατικές μελέτες ως Ερευνήτρια Φαρμακοποιός (Research Pharmacist)

12. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 2017 Ελληνική Εταιρεία Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας
- 2018 Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδα

13. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

General Pharmaceutical Council (UK)

Registration number: 2091660

Royal Pharmaceutical Society (UK)

Membership number: 9089237

Πανελλήνια Ένωση Φαρμακοποιών (GR)

Registration number: 4801

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
1.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	16
2. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	19
2.1. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	19
2.2. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	23
2.2.1 Μηχανισμός καρκινογένεσης ΚΠΕ-Ο.....	23
2.2.2 Η θεωρία των «δύο κτυπημάτων» του Kudson (The “Two-hit hypothesis”).....	24
2.2.3 Μονοπάτια καρκινογένεσης-Μοριακή ταξινόμηση.....	25
2.2.4 Κληρονομικά Σύνδρομα.....	28
2.3 ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΙΦΝΕ)	33
2.4 ΛΟΙΠΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	34
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ-SCREENING	34
4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	35
5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	37
6. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ	37
7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	40
7.1 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	40
7.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	42
7.2.1 Χημειοθεραπεία.....	43
7.2.2 Στοχευμένη θεραπεία.....	44

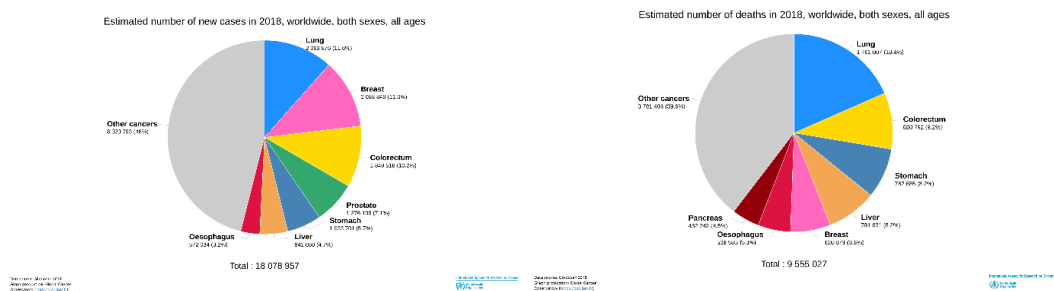
7.2.3 Ανοσοθεραπεία.....	47
8. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΠΕ-Ο	48
8.1 ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΛΙΠΙΔΙΑ.....	49
8.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	51
8.3 ΛΟΙΠΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	54
9. ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	55
10. ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAs (ncRNAs).....	61
10.1 <i>MicroRNAs</i> ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	62
10.2 <i>LncRNAs</i> ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	67
10.3 ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ <i>MicroRNAs</i> ΚΑΙ <i>LncRNAs</i> ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	75
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	78
2. ΜΕΘΟΔΟΣ-ΥΛΙΚΑ.....	79
2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	79
2.2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ.....	80
2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ.....	85
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	85
2.5 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	88
2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ (RFLP).....	90

2.7	ΑΛΛΗΛΟΕΙΔΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Allele Specific PCR, AS-PCR)	93
2.8	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	95
2.9	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΤΑ ΚΩΔΙΚΟΝΙΑ 12 ΚΑΙ 13 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ KRAS	96
2.10	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	99
2.10.1	Δοκιμασία χ^2	99
2.10.2	Ισορροπία Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg Equilibrium-HWE)	101
3.	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ	102
4.	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	103
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	104
5.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ rs11134527 miR-218 ΚΑΙ rs1834306 miR-100	104
5.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ HOTAIR rs4759314 ΚΑΙ MALAT1 rs3200401	108
6.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	114
7.	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ	121
8.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	121
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	123

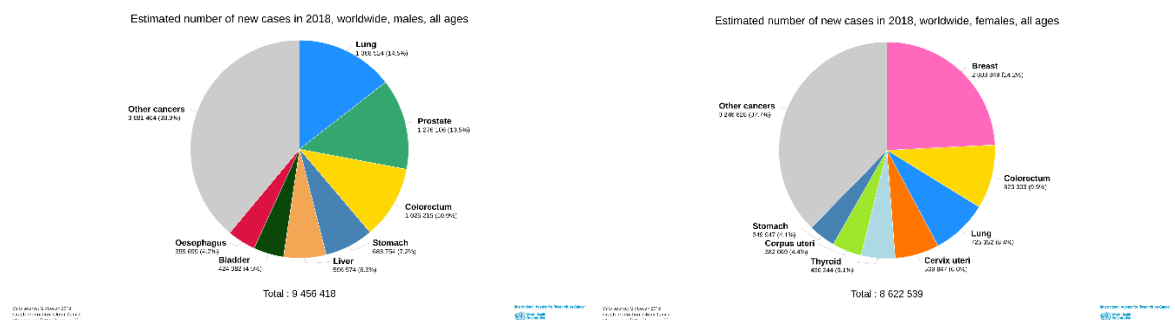
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο κολοορθικός καρκίνος (Colorectal Cancer-CRC) αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς τύπους νεοπλασίας και την 4^η αιτία θανάτου οφειλόμενη σε καρκίνο. Βάσει των πιο πρόσφατων επιδημιολογικών δεδομένων, το 2018 ο καρκίνος παχέος εντέρου-ορθού (ΚΠΕ-Ο) ήταν ο 3^{ος} σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνος (περισσότερα από 1.8 εκατομμύρια νεοδιαγνωσθέντα περιστατικά) μετά τον καρκίνο μαστού και πνευμόνων, με ποσοστό θνητότητας που ανέρχεται σε 9.2% (περίπου 900.000 θάνατοι) (Εικόνα 1). Η νόσος κατέχει την 3^η (10.9% του συνόλου των νεοπλασιών) σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνου εντόπιση στους άνδρες και την 2^η (9.5% του συνόλου των νεοπλασιών) στις γυναίκες παγκοσμίως (Εικόνα 2).



Εικόνα 1¹. Παγκόσμια επίπτωση και θνητότητα νεοπλασμάτων το 2018.

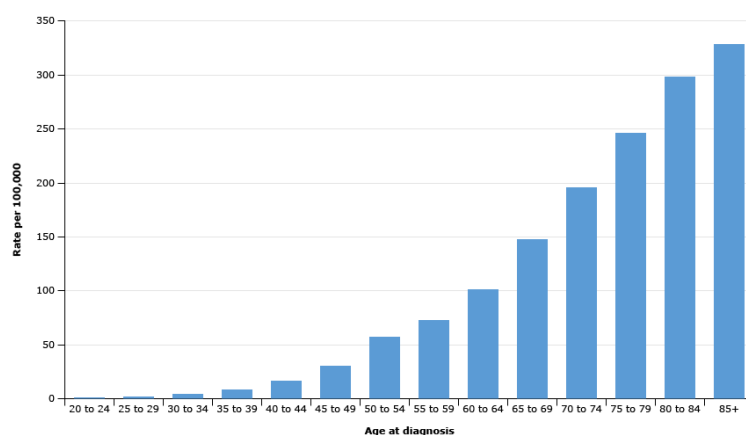


Εικόνα 2¹. Παγκόσμια επίπτωση κολοορθικού καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες το 2018.

Οι διακυμάνσεις στη συχνότητα εμφάνισης του ΚΠΕ-Ο μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών πληθυσμών αναδεικνύουν και ενισχύουν την ύπαρξη μιας σαφούς αιτιολογικής

συσχέτισης της επίπτωσης της νόσου με διάφορους παράγοντες (φυλή, εθνικότητα, γενετικοί, περιβαλλοντικοί και διαιτητικοί παράγοντες)². Για παράδειγμα η επίπτωση και η θνησιμότητα είναι κατά περίπου 17% και 6% αντίστοιχα υψηλότερη στους Άφρο-Αμερικανούς σε σχέση με την Καυκάσια φυλή³, ενώ οι Αμερικανοί Ισπανικής και Ασιατικής καταγωγής εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας σε σχέση με τους Καυκάσιους⁴. Βέβαια, αυτά τα στοιχεία χρήζουν προσεκτικής ανάγνωσης, δεδομένου ότι αυτές οι φυλετικές διαφοροποιήσεις τόσο στη συχνότητα εμφάνισης όσο και στη θνητότητα, μπορεί να αντανακλούν κυρίως κοινωνικοοικονομικές διαφορές. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν σαφείς συσχετίσεις σχετικά με το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο και τον τρόπο ζωής (παχυσαρκία, κάπνισμα, σωματική άσκηση) και την πιθανότητα διάγνωσης ΚΠΕ-Ο^{5,6}.

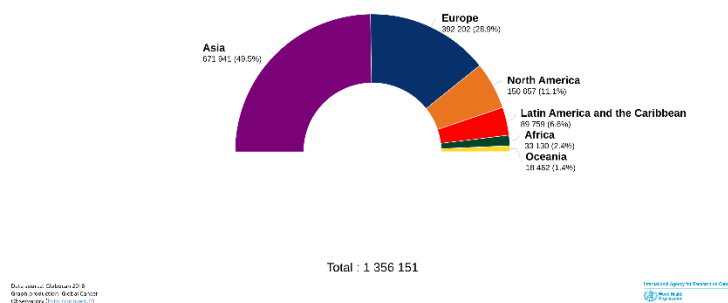
Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί μια αυξητική τάση στις στην συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε νεότερες ηλικίες (κάτω των 50 ετών)⁷, ο κίνδυνος εμφάνισης της σποραδικής μορφής συνεχίζει να συνδέεται ισχυρά με την ηλικία. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι μετά την ηλικία των 50 ετών η επίπτωση αυξάνεται και μάλιστα διπλασιάζεται ανά δεκαετία μέχρι την 8^η δεκαετία της ζωής (Εικόνα 3)².



Εικόνα 3². Συχνότητα εμφάνισης κολοορθικού καρκίνου μεταξύ 2004-2013 σε άνδρες και γυναίκες όλων των φυλών.

Η συχνότητα επίπτωσης κολοορθικού καρκίνου στην Ευρώπη για το 2018 ανέρχεται στο 28.9% (392.202 περιπτώσεις) (Εικόνα 4) και η θνησιμότητα για το ίδιο έτος υπολογίστηκε σε 27.5% (ήτοι 242.483 θάνατοι)¹. Ωστόσο, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, φαίνεται ότι τις τελευταίες δεκαετίες η θνητότητα του καρκίνου παχέος εντέρου-ορθού ακολουθεί φθίνουσα πορεία σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες⁸. Τούτο αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην υιοθέτηση της εφαρμογής μεθόδων προληπτικού προσυμπτωματικού ελέγχου από πολλές ευρωπαϊκές χώρες, παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχουν σαφείς οδηγίες για screening ασυμπτωματικών ασθενών κάτω των 50 ετών, χωρίς επιβαρυντικούς παράγοντες (οικογενειακό ιστορικό ή κάποιο κληρονομούμενο σύνδρομο). Σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει παίξει και η καλύτερη ενημέρωση του πληθυσμού σχετικά με την επίδραση διαφόρων παραγόντων κινδύνου (όπως κακή διατροφή, παχυσαρκία, κάπνισμα και αλκοόλ)⁹.

Estimated number of prevalent cases (1-year) in 2018, Colorectum, both sexes, all ages



Εικόνα 4¹. Συχνότητα επίπτωσης κολοορθικού καρκίνου μεταξύ ηπείρων το 2018.

Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει έως τώρα κάποια επίσημη εθνική βάση δεδομένων, όπως αντίστοιχα αρχεία νεοπλασιών σε χώρες του εξωτερικού, στην Ελλάδα η επίπτωση της νόσου είναι χαμηλότερη σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Βάσει των τελευταίων επιδημιολογικών δεδομένων του WHO, το 2018 εκτιμάται ότι διαγνώστηκαν στην Ελλάδα 7.319 νέα περιστατικά κολοορθικού καρκίνου (10.9% του συνόλου των καρκίνων),

καταλαμβάνοντας την 3^η πιο συχνή αιτία θανάτου από κακοήθη νεοπλάσματα και στα δύο φύλα¹.

2. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η αιτιολογία ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου-ορθού είναι πολυπαραγοντική και σύνθετη. Διαχρονικά έχουν περιγραφεί διάφοροι γενετικοί και περιβαλλοντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου. Ωστόσο, η ακριβής επίδραση ορισμένων περιβαλλοντικών και διαιτητικών παραγόντων κινδύνου δεν έχει πλήρως αποδειχθεί παρά το γεγονός ότι έχουν διαπιστωθεί αρκετές συσχετίσεις σε μελέτες παρατηρήσεις, συστηματικές ανασκοπήσεις και μετααναλύσεις, που εξηγούν και τις διαφορές στην επίπτωση της νόσου σε χώρες με διαφορετικό τρόπο ζωής.

Η σποραδική μορφή ανέρχεται στο 85% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου ενώ μόνο 5-10% των περιπτώσεων οφείλονται σε κληρονομούμενες μεταλλάξεις. Ωστόσο, έως 25% των ασθενών που διαγιγνώσκονται έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό¹⁰. Ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ-Ο στις δυτικές χώρες ανέρχεται σε 7%¹¹, ενώ άτομα που έχουν συγγενή πρώτου βαθμού που διαγνώστηκε με τη νόσο σε ηλικία μικρότερη των 50, έχουν τριπλάσια πιθανότητα να νοσήσουν. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται περαιτέρω σε άτομα που έχουν στο συγγενικό τους περιβάλλον 2 ή περισσότερους συγγενείς που έχουν προσβληθεί από ΚΠΕ-Ο^{12,13}.

2.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Είναι ευρέως γνωστό ότι η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με την προαγωγή της καρκινογένεσης και την αναστολή της απόπτωσης μέσω αρκετών μηχανισμών. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα της ινσουλίνης, των ινσουλινομιμητικών αυξητικών παραγόντων (Insulin-like Growth Factors- IGFs) και των οιστρογόνων επηρεάζονται σημαντικά από την παχυσαρκία. Αναφορικά με τον ΚΠΕ-Ο, μια αύξηση του Δείκτη Μάζας Σώματος (Body Mass Index-BMI) κατά 1 μονάδα αυξάνει το κίνδυνο εμφάνισης κατά 2-3%¹⁴ ενώ επίσης, η

κεντρικού τύπου παχυσαρκία ανήκει στους επιβαρυντικούς παράγοντες¹⁵. Συμπερασματικά, υπάρχουν αρκετές συνεπείς επιδημιολογικές ενδείξεις ότι η παχυσαρκία όντως αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη κολορθικού καρκίνου¹⁶.

Ο Burkitt, το 1971 περιέγραψε πρώτος τη χαμηλή επίπτωση της νόσου σε γηγενείς Αφρικανούς, συσχετίζοντάς την με την υψηλή σε περιεκτικότητα φυτικών ινών διατροφή τους. Έκτοτε, μια πλειάδα ερευνών έχουν διερευνήσει το ρόλο διάφορων διατροφικών παραγόντων στην ορθοκολική καρκινογένεση. Αποτελέσματα πολυάριθμων αναδρομικών και προοπτικών μελετών έχουν καταδείξει θετική συσχέτιση μεταξύ της μακροχρόνιας κατανάλωσης κόκκινου-επεξεργασμένου κρέατος και κινδύνου ΚΠΕ-Ο, κυρίως για όγκους που εντοπίζονται στο αριστερό κόλον^{17,18}. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι κατανάλωση 100-120 γραμμαρίων κόκκινου κρέατος και 25-50 γραμμαρίων επεξεργασμένου κρέατος αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωσης ΚΠΕ-Ο κατά 17-39% και 9-50% αντίστοιχα¹⁹. Κατά καιρούς έχουν περιγραφεί δε, αρκετοί υποκείμενοι μηχανισμοί μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η δημιουργία καρκινογόνων νιτροδών. Επίσης, το μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο, πιθανόν λόγω της δημιουργίας πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και άλλων ενώσεων με καρκινογόνο δράση.

Ομοίως, μέτρια (2-3 ποτά ημερησίως) και βαριά (≥ 4 ποτά ημερησίως) κατανάλωση αλκοόλ έχουν συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου κατά 20% και 50% αντίστοιχα²⁰. Ανάμεσα στους προτεινόμενους μηχανισμούς αναφέρονται η καρκινογόνος δράση της ακεταλδεϋδης (ενεργός μεταβολίτης της αιθανόλης), η παραγωγή προσταγλαδινών και η υπεροξειδωση των λιπιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου καθώς και η αυξημένη διαπερατότητα καρκινογόνων ουσιών στα κύτταρα του βλεννογόνου παρουσία αλκοόλης¹⁶.

Το κάπνισμα επίσης έχει συσχετιστεί με την αυξημένη επίπτωση και θνησιμότητα από ΚΠΕ-Ο. Μάλιστα η συσχέτιση και για τις δύο παραμέτρους βρέθηκε να είναι ισχυρότερη για

την εμφάνιση καρκίνου του ορθού σε σχέση με τον καρκίνο του κόλου²¹. Ο κίνδυνος εμφάνισης κολορθικού καρκίνου διπλασιάζεται σε καπνιστές και το 12% του συνόλου των θανάτων από ΚΠΕ-Ο οφείλεται στο κάπνισμα²².

Αντίστοιχα, διάφοροι παράγοντες έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης κολορθικού καρκίνου. Αποτελέσματα από μια μεταανάλυση καταδεικνύουν μια δόσο-εξαρτώμενη θετική συσχέτιση μεταξύ της καθημερινής κατανάλωσης προϊόντων ολικής άλεσης και φυτικών ινών και προστασίας από εμφάνιση της νόσου²³. Προστατευτική δράση έχει αναφερθεί επίσης μεταξύ άλλων και για φρούτα και λαχανικά υψηλής περιεκτικότητας σε βιταμίνη Α, C, E, φυλλικό οξύ καθώς και για το ασβέστιο. Ωστόσο, οι ενδείξεις αναφορικά με τη μείωση κινδύνου για πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με κάποιο τρόπο με την διατροφή σε αρκετές περιπτώσεις είναι πιθανές ή/και περιορισμένες, και τα αποτελέσματα επιδέχονται περαιτέρω διερεύνησης²⁴⁻²⁹. Για παράδειγμα, παρά το γεγονός ότι αρκετός λόγος έχει γίνει για τη συσχέτιση της κατανάλωσης ζωικού λίπους με τον κίνδυνο κολορθικού καρκίνου, λόγω της καρκινογόνου επίδρασης των δευτερογενών χολικών οξέων στο παχύ έντερο, μια πρόσφατη μεταανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση³⁰. Ως εκ τούτου, λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα της σύστασης των τροφίμων, τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των επιμέρους συστατικών τους και την πολυδιάστατη βάση της νόσου είναι περισσότερο χρήσιμο να προτείνεται ένα ισορροπημένο διατροφικό πρότυπο που αναφορικά με την πρόληψη του ΚΠΕ-Ο, φαίνεται ότι ταυτίζεται με τα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής³¹.

Αν και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος, αρκετοί άμεσοι και έμμεσοι βιολογικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί σχετικά με το ρόλο της σωματικής άσκησης στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η φυσική δραστηριότητα έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις, δρώντας άμεσα στο ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και έμμεσα λόγω μείωσης της παχυσαρκίας. Μια άλλη υπόθεση υποστηρίζει ότι η αύξηση

πρόσληψης νερού που προκαλείται από την άσκηση σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης αδενωμάτων και ΚΠΕ-Ο³², ενώ επίσης τακτική φυσική δραστηριότητα βελτιώνει την μεταβολική ικανότητα του σώματος και μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Τέλος, αρκετές κατηγορίες φαρμάκων έχει φανεί ότι μπορεί να δρουν προστατευτικά στην εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου. Μακροχρόνια λήψη ασπιρίνης (5 έτη) συνδέεται με σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης (20-40%) αδενωμάτων και ΚΠΕ-Ο σε άτομα με ενδιάμεσο κίνδυνο. Χαμηλές και υψηλότερες δόσεις συσχετίστηκαν με προστατευτική δράση κυρίως για αδενοκαρκινώματα που εντοπίζονται στο εγγύς κόλον, σε περιπτώσεις λήψης ασπιρίνης για χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα από 5 έτη³³. Παρόμοια αποτελέσματα ανακοινώθηκαν και κατόπιν ανάλυσης δεδομένων από τη μελέτη ελέγχου PLCO³⁴. Αντίστοιχα, η μελέτη CAPP2 έδειξε προστατευτική δράση ασπιρίνης (600mg/ημέρα) σε ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Lynch³⁵. Αν και ο σαφής μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί, έχει προταθεί ότι η ασπιρίνη προάγει την απόπτωση και αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου, μέσω της αναστολής της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2). Πρόσφατα, η χρήση ασπιρίνης και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) συσχετίστηκε με σημαντική μείωση του κινδύνου εμφάνισης ΚΠΕ-Ο μόνο στον υποπληθυσμό των ασθενών των οποίων η νόσος δεν χαρακτηρίζονταν από MSI (μικροδορυφορική αστάθεια) και ήταν RAS/BRAF άγριου τύπου³⁶. Επίσης ο συνδυασμός σουλινδάκης με erlotinib σε ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση (FAP) φάνηκε να σχετίζεται με σημαντικά μειωμένο φορτίο πολυπόδων δωδεκαδακτύλου μετά από 6 μήνες θεραπείας³⁷.

Ο ρόλος της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες^{38,39} καθώς και των στατινών ως προστατευτικοί παράγοντες για εμφάνιση ΚΠΕ-Ο, έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, τα δημοσιευμένα αποτελέσματα από τις έρευνες που έχουν διενεργηθεί είναι συχνά αντιφατικά και απαιτούν περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωση των ευρημάτων⁴⁰⁻⁴³.

2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

2.2.1 Μηχανισμός καρκινογένεσης ΚΠΕ-Ο

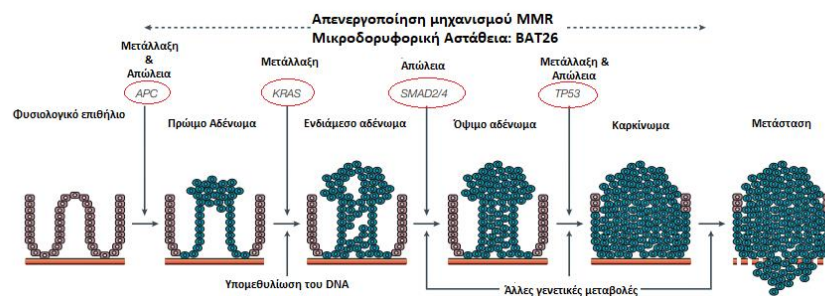
Οι περισσότεροι καρκίνοι παχέος εντέρου αναπτύσσονται σε έδαφος προϋπάρχοντων νεοπλασματικών αδενωματωδών πολυπόδων. Οι τελευταίοι θεωρούνται «προκαρκινικές» καταστάσεις καθώς σε όλα τα αδενώματα υπάρχει εξ' ορισμού κάποιος βαθμός δυσπλασίας και ως εκ τούτου υφίσταται δυναμικό κακοήθους εξαλλαγής. Τα αδενώματα ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, βάσει του μεγέθους τους: <1 εκ., 1 έως 2 εκ. και >2 εκ. Επίσης, ανάλογα με τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά χαρακτηρίζονται ως σωληνώδη (0-25% λαχνωτός ιστός) σωληνολαχνωτά (25-75% λαχνωτός ιστός) και λαχνωτά (75-100% λαχνωτός ιστός). Επί του συνόλου των αδενωμάτων το 5-15% είναι λαχνωτά, ενώ παρόμοιο είναι και το ποσοστό των σωληνολαχνωτών αδενωμάτων⁴⁴. Ο βαθμός δυσπλασίας διακρίνεται, ανάλογα με συγκεκριμένα κυτταρολογικά και αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά, σε ήπιος, μέτριος και σοβαρός.

Βάσει των ανωτέρω, παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου σε αδενώματα είναι⁴⁵:

- Μέγεθος >1 εκ.
- Υψηλόβαθμη δυσπλασία.
- >25% λαχνωτό στοιχείο.
- Άμισχοι σε σύγκριση με έμμισχους αδενωματώδεις πολύποδες.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης στον ορθοκολικό καρκίνο είναι μακροχρόνια και περιλαμβάνει μια αλληλουχία επιγενετικών, γενετικών και ιστολογικών μεταβολών. Το μοντέλο ορθοκολικής καρκινογένεσης, γνωστό και ως «ακολουθία αδενώματος-καρκινώματος» (adenoma-carcinoma sequence), πρώτοπεριγράφηκε από τον Vogelstein το 1990 (Εικόνα 5). Ουσιαστικά πρόκειται για τη συσσώρευση μιας σειράς γενετικών μεταβολών

που οδηγούν σε απορρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών με αποτέλεσμα την καρκινογένεση και τη διήθηση. Καθ' όλη αυτή τη διαδικασία λαμβάνουν χώρα διαταραχές σε αρκετά γονίδια (ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά αλλά και γονίδια ρυθμιστές της δράσης άλλων γονιδίων).

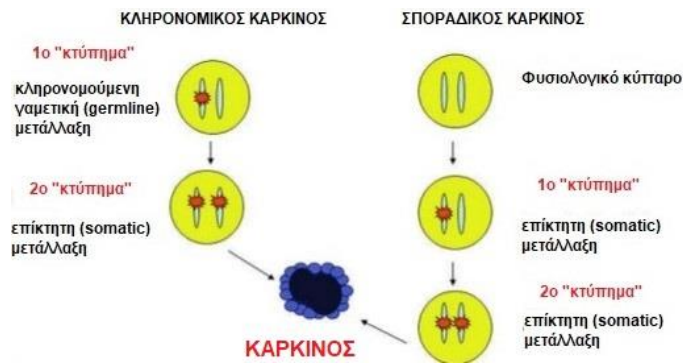


Εικόνα 5⁴⁶. Γενετικό μοντέλο ορθοκολικής καρκινογένεσης. Η εξέλιξη από φυσιολογικό επιθήλιο σε καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από μια σειρά γονιδιακών μεταλλαγών και γενετικών μεταβολών.

2.2.2 Η θεωρία των «δύο κτυπημάτων» του Kudson (The “Two-hit hypothesis”)

Σε συνέχεια της πρότασης του DeMars η οποία συσχέτισε την παρουσία μεταλλάξεων με την καρκινογένεση, ο Kudson το 1971 «διατύπωσε την θεωρία των δύο κτυπημάτων» αφού παρατήρησε ότι παιδιά που εμφάνισαν αμφοτερόπλευρο ρετινοβλάστωμα ήταν μικρότερης ηλικίας σε σχέση με εκείνα που είχαν εμφανίσει μόνο στον ένα οφθαλμό⁴⁷. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, θα πρέπει να λάβουν χώρα δύο γενετικά «κτυπήματα», προκειμένου να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό. Το δεύτερο «κτύπημα» (μετάλλαξη) είναι και το καθοριστικό που οδηγεί σε απώλεια ετεροζυγωτίας και συνεπώς καρκινογένεση. Έτσι λοιπόν στον κληρονομικό ορθοκολικό καρκίνο το ένα αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη (germline mutation) κληρονομείται («πρώτο κτύπημα»), ενώ το άλλο αλληλόμορφο απενεργοποιείται από κάποια τυχαία σωματική μετάλλαξη (δεύτερο κτύπημα). Η αυξημένη γενετική αστάθεια που προκαλείται από το πρώτο «κτύπημα» συμβάλει στην εκδήλωση και

του δεύτερου καθοριστικού «κτυπήματος» σε μικρότερη ηλικία, γι' αυτό ο κληρονομικός καρκίνος εκδηλώνεται νωρίτερα σε σχέση με τον σποραδικό. Στην τελευταία περίπτωση τα δύο «κτυπήματα» (somatic mutations) λαμβάνουν χώρα τυχαία σε επίπεδο σωματικών κυττάρων και ως εκ τούτου εκδηλώνεται σε μεγαλύτερη ηλικία (Εικόνα 6).



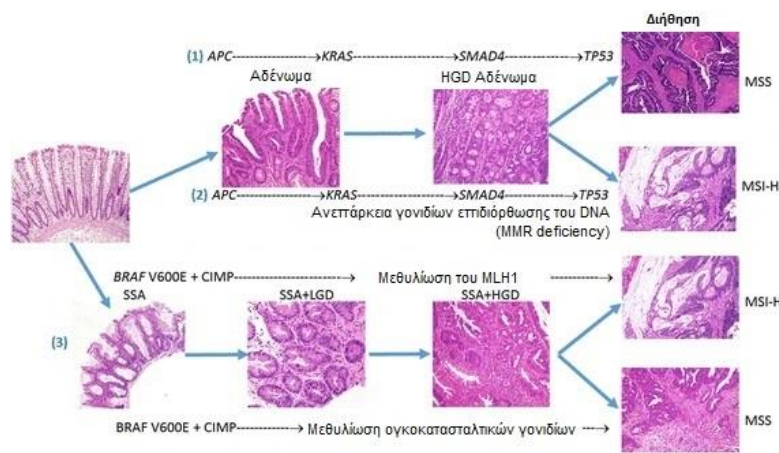
Εικόνα 6. Η "θεωρία των δύο χτυπημάτων" (two-hit hypothesis)

2.2.3 Μονοπάτια καρκινογένεσης-Μοριακή ταξινόμηση

Η γενετική αστάθεια αποτελεί ένα χαρακτηριστικό όλων των καρκίνων και σχετίζεται με την αδυναμία των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA να επιδιορθώσει τις βλάβες που προκαλούνται, με αποτέλεσμα την ογκογένεση. Αναφορικά με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, διακρίνουμε 2 τύπους γενετικής αστάθειας: α) τη χρωμοσωμική (Chromosomal instability - CIN) και την β) την αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (Microsatellite instability - MSI). Ωστόσο, παράλληλα με τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά το μετασχηματισμό του φυσιολογικού επιθηλίου του παχέος εντέρου σε πολύποδα → πολύποδα με αυξημένη δυσπλασία → αδενοκαρκίνωμα → διηθητικό καρκίνο, παρατηρούνται και επιγενετικές αλλοιώσεις, όπως η σχετιζόμενη με τον φαινότυπο (CpG island methylator phenotype). Στη συνέχεια θα ακολουθήσει μια σύντομη αναφορά σε αυτές τις τρεις κύριες οδούς που σχετίζονται με την ανάπτυξη του κολοορθικού καρκίνου (Εικόνα 6).

Η πλειοψηφία των όγκων παχέος εντέρου (55-70%) εμφανίζουν υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας, ανευπλοειδικό χαρακτήρα και παρουσία σωματικών μεταλλάξεων κυρίως στο ογκογονίδιο KRAS και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια APC και p53, ακολουθώντας το «κλασικό» μονοπάτι αδενώματος-καρκινώματος⁴⁸ [Εικόνα 6 (1)]. Χρωμοσωμική αστάθεια χαρακτηρίζει και το σύνδρομο οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης (FAP).

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί με τους οποίους το APC εμπλέκεται στην προαγωγή της χρωμοσωμικής αστάθειας. Σύμφωνα με τον πρώτο, μεταλλαγή/απώλεια του APC έχει σαν αποτέλεσμα λανθασμένη πρόσδεση των μικροσωληνίσκων και ως εκ τούτου διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο APC προκαλούν τη συσσώρευση β-κατενίνης, μέσω συνεχούς ενεργοποίησης του Wnt μονοπατιού. Τούτο έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του Wnt (όπως το γονίδιο c-Myc) και γονιδίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, προάγοντας τη χρωμοσωμική αστάθεια⁴⁹. Αυτό οδηγεί σε αυξημένο καρκινογενετικό δυναμικό λόγω της αντίστασης στην απόπτωση των κυττάρων και του συνεχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 6⁵⁰: Οι τρεις κύριες οδοί σχετιζόμενες με την ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου: (1) Κλασική οδός «αδενώματος-καρκινώματος» με την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου KRAS

και την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών APC, SMAD4 και TP53, οδηγώντας σε μικροδορυφορικά σταθερούς όγκους (MSS) (2) Μονοπάτι αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών με ανεπάρκεια πρωτεϊνών MMR σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch, οδηγώντας σε καρκίνους που διακρίνονται από υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) (3) Οδοντωτό μονοπάτι φαινοτύπου μεθυλίωσης των CpG νησιδίων (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP) οδηγώντας σε MSI-H καρκίνους (μεθυλίωση του επιδιορθωτικού MLH1 γονιδίου) ή MSS καρκίνους (μεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων). HGD (high-grade dysplasia): υψηλού βαθμού δυσπλασία, LGD (low-grade dysplasia): χαμηλού βαθμού δυσπλασία, SSA (sessile serrated adenoma): επίπεδο οδοντωτό αδένωμα.

Το 15% περίπου των όγκων παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, ευπλοειδικό χαρακτήρα και σωματικές μεταλλάξεις σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι οποίες εντοπίζονται τόσο σε κωδικοποιούσες περιοχές γονιδίων όσο και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές (ιντρόνια) ή ρυθμιστικές περιοχές (υποκινητές) γονιδίων. Η μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζεται με την διαταραχή γονιδίων επιδιόρθωσης της αναντιστοιχίας των βάσεων του DNA (mismatch repair, MMR defect) και μπορεί να χαρακτηρίζει οικογενείς καρκίνους που σχετίζονται με το σύνδρομο του Lynch ή σποραδικούς καρκίνους που σχετίζονται με τον φαινότυπο μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP) [Εικόνα 6 (2) (3)].

Οι επιγενετικές διαταραχές που παρατηρούνται κατά την διαδικασία της ορθοκολικής καρκινογένεσης έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό. Η CIMP αποτελεί ένα επιγενετικό φαινόμενο κατά το οποίο λαμβάνει χώρα υπερμεθυλίωση των νησιδίων CpG (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ζευγών βάσεων κυτοσίνης και γουανίνης) σε εκκινητές γονιδίων και συσχετίζεται με αποσιώπηση της έκφρασής τους. Στο μονοπάτι CIMP παρατηρείται καταστολή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16INK4a με αποτέλεσμα την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη νεοπλασματική εξεργασία⁵¹. Αυτό το

μοριακό προφίλ αποτελεί το τρίτο μονοπάτι ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου, γνωστό ως μονοπάτι φαινότυπου μεθυλίωσης των CpG νησιδίων και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα MSI-H καρκίνους στην περίπτωση μεθυλίωσης του γονιδίου MLH1 ή MSS καρκίνους σε περίπτωση μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων⁵⁰.

Συμπερασματικά τα ορθοκολικά καρκινώματα μπορούν να διακριθούν αδρά σε τρεις κατηγορίες βάσει του μονοπατιού καρκινογένεσης: α) την κλασική οδό (traditional) η οποία χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια (CIN), β) την εναλλακτική οδό (alternative), η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχές των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (MMR defect) και γ) την οδοντωτή (serrated) η οποία χαρακτηρίζεται από υπερμεθυλίωση (CIMP). Βέβαια υπάρχει και μια σπάνια τέταρτη κατηγορία που συνδυάζει χαρακτηριστικά και των τριών προαναφερθέντων κατηγοριών και αφορά κυρίως σε σποραδικούς κολοορθικούς καρκίνους.

2.2.4 Κληρονομικά Σύνδρομα

Σε κάθε περίπτωση, περίπου το 20% των ορθοκολικών καρκίνων σχετίζεται με κληρονομικούς προδιαθεσικούς παράγοντες που οφείλονται σε ύπαρξη μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια και οι φορείς αυτών διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε νεαρότερη ηλικία σε σχέση με τα σποραδικά περιστατικά⁵². Ως εκ τούτου, η ενδελεχής διερεύνηση του οικογενειακού ιστορικού, ο γενετικός έλεγχος και η γενετική συμβουλευτική είναι απαραίτητα βήματα σε κάθε νεοδιαγνωθέν περιστατικό ΚΠΕ-Ο.

Οικογενή σύνδρομα αδενωματοδούς πολυποδίασης

Το σύνδρομο οικογενούς πολυποδίασης (familial adenomatous polyposis-FAP) αντιπροσωπεύει μια αυτοσωμικά επικρατή νόσο και εμφανίζεται σε ποσοστό 1% του συνόλου των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου. Κλινικά χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλου αριθμού (εκατοντάδες έως και χιλιάδες) πολυπόδων σε όλο το μήκος του παχέος εντέρου και αναπτύσσονται σε νεαρή ηλικία (εφηβεία ή νεαρή ενήλικη ζωή) (Εικόνα 7). Η πιθανότητα

κακοήθους εξαλλαγής τους σε διηθητικό καρκίνο στην περίπτωση που δεν αφαιρεθεί χειρουργικά το παχύ έντερο ανέρχεται σε 100%⁵³.



Εικόνα 7. Χαρακτηριστική εικόνα από πολύποδες ασθενούς με FAP

Το σύνδρομο προκαλείται από γαμετική (germline) μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC και κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα με σχεδόν 100% διείσδυση. Ωστόσο, στο 30% των περιπτώσεων πρόκειται για de novo μεταλλάξεις, χωρίς την ύπαρξη γνωστού οικογενειακού ιστορικού⁵⁴. Το APC εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 5, στη θέση 5q21 και η απώλειά του σχετίζεται με την ανάπτυξη του συνδρόμου. Η πρωτεΐνη APC διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η ογκοκατασταλτική της δράση συνίσταται κυρίως στη ρύθμιση των επιπέδων της β-κατενίνης και στην ενεργοποίηση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού. Η διαδικασία της ογκογένεσης σε ασθενείς με FAP, έχει ως αφετηρία είτε σωματικές μεταλλάξεις του φυσιολογικού αλληλόμορφου του APC είτε απώλεια ετεροζυγωτίας σύμφωνα με τη «θεωρία των δύο κτυπημάτων του Knudson» που αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Θετική δοκιμασία μεταλλάξεων του APC σε άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ένδειξη για ενδοσκοπικό έλεγχο από την ηλικία των 12 ετών και η ολική κολεκτομή συνοδευόμενη από ειλεορθική αναστόμωση αποτελεί τη μόνη ριζική θεραπευτική αντιμετώπιση.

Διάφορες εξωεντερικές εκδηλώσεις, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στο κωδόνιο 1465-1466 αποτελούν συχνά ευρήματα στο σύνδρομο οικογενούς πολυποδίασης.

Αυτές μπορεί να είναι είτε ως καλοήθεις οντότητες υπεράριθμοι οδόντες, συγγενής υπερτροφία του αμφιβληστροειδούς, φλοιοεπινεφριδικά αδενώματα, κ.α, είτε ως κακοήθη νεοπλάσματα π.χ. καρκίνος φύματος του Vater, καρκίνος θυρεοειδούς, όγκοι εγκεφάλου κ.α.

Μια εξασθενημένη μορφή του συνδρόμου οικογενούς πολυποδίασης [Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP)] έχει επίσης περιγραφεί και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρότερου αριθμού πολυπόδων (μικρότερου από 100), δεξιά εντόπιση, εμφάνιση της νόσου σε μεγαλύτερη ηλικία (35-45 ετών) και σπανιότερες εξωεντερικές εκδηλώσεις. Σε αυτή την περίπτωση η μεταλλάξη του APC εντοπίζονται κυρίως πριν το κωδικόνιο 157, στο εξώνιο 9 και πριν το κωδικόνιο 1595⁵⁵.

Παρόμοιο με το FAP είναι το σύνδρομο Gardner, με περισσότερες εξωεντερικές εκδηλώσεις που περιλαμβάνουν δεσμοειδείς όγκους, οστεώματα μακρών οστών και επιδερμοειδείς κύστες. Το σύνδρομο Turcot χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό των πολυπόδων ή καρκινωμάτων του παχέος εντέρου με την ανάπτυξη όγκων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι τελευταίοι μπορεί να είναι είτε πολύμορφα γλοιωβλαστώματα είτε μυελοβλαστώματα. Υπάρχουν δε αναφορές ότι τα πρώτα συσχετίζονται με μεταλλάξεις σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (κυρίως στο MLH1) ενώ τα δεύτερα με μεταλλάξεις στο γονίδιο APC⁵⁶.

Δύο ακόμα σπάνια κληρονομούμενα οικογενή σύνδρομα ορθοκολικού καρκίνου είναι η πολυποδίαση που σχετίζεται με το γονίδιο MYH (γνωστή ως «MAP») και η πολυποδίαση σχετιζόμενη με την πολυμεράση (γνωστή ως PPAP). Το πρώτο κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, χαρακτηρίζεται από πολυάριθμους πολύποδες στο γαστρεντερικό σωλήνα και ως υπεύθυνη γενετική μεταβολή έχει χαρακτηριστεί η μετάλλαξη του MYH γονιδίου⁵⁷. Η PPAP χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλων αδενωματωδών πολυπόδων, εμφάνιση καρκίνου σε μικρή ηλικία και μεταλλάξεις στο γονίδιο POLE και POLD1⁵⁸.

Κληρονομικός μη-πολυποδιασικός κολοορθικός καρκίνος (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer, HNPCC ή σύνδρομο Lynch)

Μια ξεχωριστή οντότητα που ανέρχεται στο 3-5% του συνόλου των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου αποτελεί ο Κληρονομικός μη-πολυποδιασικός κολοορθικός καρκίνος γνωστός και ως σύνδρομο Lynch, το οποίο πρωτοπεριγράφηκε το 1913 από τον Warthin⁵⁹. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την παρουσία έως 100 πολυπόδων με συχνότερη εντόπιση το δεξιό κόλον, με κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής που αγγίζει το 80% και μέση ηλικία διάγνωσης τα 44 έτη. Μια παραλλαγή του συνδρόμου αποτελεί το σύνδρομο Lynch II και χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη παρουσία εξωεντερικών καρκίνων όπως του ενδομητρίου (25-60%), ωοθηκών (4-12%), στομάχου (6-13%), χοληφόρων, ουροποιητικού συστήματος και σπανιότερα δέρματος, εγκεφάλου και λεπτού εντέρου.

Το HNPCC αφορά σε μια αυτοσωμικά επικρατή διαταραχή, εμφανίζει 80% διείσδυση και οφείλεται σε μεταλλάξεις σε κάποιο από τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MMR genes). Τέτοιου είδους μεταλλάξεις οδηγούν σε μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability - MSI) (σε ποσοστό 90%) και αφορούν κυρίως στα γονίδια hMLH1 (3p21.3), hMSH2 (2p15-p22) και σε μικρότερο ποσοστό στα γονίδια hMSH6, hPMS1, hPMS2 και EPCAM.

Ο προσδιορισμός του συνδρόμου βασίζεται σε ένα σύνολο κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων, γνωστά ως κριτήρια του Amsterdam. Στην περίπτωση που τα κριτήρια αυτά πληρούνται θα πρέπει να ελεγχθούν τα μέλη του ασθενούς για μικροδορυφορική αστάθεια καθώς και να υποβάλλονται σε έλεγχο επιτήρησης με κολονοσκόπηση από νεότερη ηλικία.

Οικογενή Σύνδρομο Αμαρτωματώδους Πολυποδιάσης

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν σπάνια σύνδρομα που αντιπροσωπεύουν λιγότερο από 1% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου ετησίως.

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS) κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και ο χρόνος εμφάνισης εντοπίζεται στην παιδική ηλικία. Κλινικά οι ασθενείς έχουν ευμεγέθεις πολύποδες στο παχύ, το λεπτό έντερο και τον στόμαχο οι οποίοι δύναται να προκαλέσουν επεισόδια αιμορραγίας από το πεπτικό, απόφραξη ή εγκολεασμό, με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου περίπου στο 50% των περιπτώσεων. Άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι η παρουσία φακίδων στο δέρμα των χεριών, γύρω από το στόμα και τα μάτια, καθώς και στον βλεννογόνο του στόματος. Επίσης, ποσοστό 5-10% των πασχόντων μπορεί να εμφανίσουν νεοπλάσματα εμβρυϊκής προελεύσεως των ωοθηκών και σε μικρότερο ποσοστό αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και παγκρέατος. Το PJS οφείλεται σε κληρονομούμενες μεταλλάξεις στο γονίδιο LKB1/STK11 (Serine–threonine kinase 11), στο χρωμόσωμα 19p13.3, το οποίο κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης με ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην πολικότητα των κυττάρων και τον κυτταρικό μεταβολισμό⁶⁰.

Η οικογενής νεανική πολυποδίαση (familial juvenile polyposis-FJP), είναι μια αυτοσωμικά επικρατής νόσος όπου η κύρια εντόπιση των αμαρτωματώδων πολύποδων είναι το κόλον και εμφανίζεται επίσης κατά την παιδική ηλικία. Οι πολύποδες μπορεί να αιμορραγήσουν και να προκαλέσουν εγκολεασμό. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου είναι αυξημένος και για την εμφάνιση του συνδρόμου έχουν ενοχοποιηθεί μεταλλάξεις σε αρκετά γονίδια όπως τα PTEN, SMAD4 και BMPR1, του TGF-β μονοπατιού⁶¹.

Το σύνδρομο Cowden αντιπροσωπεύει ένα αυτοσωμικά επικρατές σύνδρομο με συχνότητα εμφάνισης 1:200.000. Αμαρτωματώδεις πολύποδες εντοπίζονται σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα με μικρό κίνδυνο εξαλλαγής σε καρκίνο. Ωστόσο, οι ασθενείς διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (50%) και θυρεοειδούς (10%). Κληρονομούμενες μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση του συνδρόμου⁶².

Τέλος σε ένα ποσοστό της τάξης του 20-30% των περιπτώσεων ενώ υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό ορθοκολικού καρκίνου, τα περιστατικά δεν σχετίζονται με κάποιο από τα γνωστά οικογενή σύνδρομα⁶³.

2.3 ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΙΦΝΕ)

Οι πάσχοντες από ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, δηλαδή ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κολοορθικού καρκίνου. Υπολογίζεται ότι ετησίως το 2% των περιπτώσεων ΚΠΕ αναπτύσσονται σε έδαφος ΙΦΝΕ.

Από ιστολογικής άποψης ο ορθοκολικός καρκίνος επί εδάφους ΙΦΝΕ εξελίσσεται διαφορετικά σε σχέση με τον σποραδικό καρκίνο που ακολουθεί όπως αναφέρθηκε, την γνωστή αλληλουχία αδένωμα → καρκίνωμα. Πιο συγκεκριμένα, συνήθως παρατηρείται μετάπτωση του φυσιολογικού βλεννογόνου σε χαμηλού και στη συνέχεια υψηλού βαθμού δυσπλαστικό βλεννογόνο χωρίς την παρουσία πολυπόδων και τελικά σε διηθητικό καρκίνο. Το καρκινογενετικό μονοπάτι του ΚΠΕ επί εδάφους ΙΦΝΕ έχει εξερευνηθεί λιγότερο και γενικά οι γενετικές και επιγενετικές μεταβολές και ο χρόνος εμφάνισής τους διαφέρουν επίσης σημαντικά.

Η ελκώδης κολίτιδα είναι μια χρόνια νόσος η οποία η οποία χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια φλεγμονής του βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Η φλεγμονή προσβάλλει σχεδόν πάντα τον βλεννογόνο του ορθού και μπορεί να επεκτείνεται κεντρικότερα προσβάλλοντας σε άλλοτε άλλο βάθος κατά συνέχεια ιστού το ολόκληρο το βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου είναι μεγαλύτερος σε ασθενείς με εκτεταμένη ελκώδη κολίτιδα ή πανκολίτιδα και η επίπτωσή του σε συνάρτηση με τη διάρκεια παρουσίας της νόσου ανέρχεται σε 2-5% για τα 10 πρώτα έτη και στη συνέχεια αυξάνεται 1-2% ανά έτος.

Η νόσος του Crohn αποτελεί μια πιο πολύπλοκη κλινική οντότητα. Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα όπου η φλεγμονή περιορίζεται συνήθως στο βλεννογόνο και υποβλεννογόνο, στη νόσο Crohn η φλεγμονή εκτείνεται διατοιχωματικά από το βλεννογόνο στον ορογόνο χιτώνα. Επίσης, μπορεί να προσβάλει ολόκληρο το γαστρεντερικό σωλήνα ενώ η κατανομή της είναι ασυνεχής με την παρεμβολή φυσιολογικών περιοχών. Ασθενείς με νόσο Crohn διατρέχουν τριπλάσιο κίνδυνο του φυσιολογικού για ανάπτυξη ΚΠΕ, και η χρόνια διάρκεια και η εμφάνιση της νόσου σε μικρότερη ηλικία αποτελούν παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος⁶⁴.

2.4 ΛΟΙΠΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Διαχρονικά, εκτός από τους περιβαλλοντικούς και κληρονομικούς παράγοντες διάφορες νοσολογικές καταστάσεις, πέραν των ΙΦΝΕ, έχουν συγκαταλέγει στον κατάλογο πιθανών προδιαθέσεων για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ορισμένες από αυτές είναι η χολοκυστεκτομή, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ουρητηροκολική αναστόμωση, η ακρομεγαλία, ο οισοφάγος Barrett και η ακτινοβολία στην περιοχή της πυέλου.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ-SCREENING

Η ηλικία έναρξης του προληπτικού ελέγχου για ΚΠΕ-Ο καθώς και η επιλογή της καταλληλότερης εξέτασης εξαρτάται από την περίπτωση του εξεταζόμενου ατόμου και την κατηγορία κινδύνου στην οποία ανήκει.

Ως εκ τούτου σε ασυμπτωματικό πληθυσμό, για την ανεύρεση πολυπόδων ή ΚΠΕ πρώιμου σταδίου, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως, η δακτυλική εξέταση εντέρου, ο έλεγχος μικροσκοπικής αιμορραγίας στα κόπρανα (fecal occult blood testing – FOBT), η εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση, η ακτινογραφία παχέος εντέρου (βαριούχος υποκλυσμός με διπλή αντίθεση), η κολονοσκόπηση και η εικονική κολονοσκόπηση. Κάθε μια από τις προαναφερθείσες μεθόδους έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Ενδεικτικά, η δακτυλική εξέταση αδυνατεί να εντοπίσει βλάβες που εντοπίζονται σε υψηλότερο σημείο, η FOBT μπορεί να

ανιχνεύει αίμα στα κόπρανα που προέρχεται από καλοήγη κατάσταση π.χ. αιμορροΐδες, με τη μέθοδο της εύκαμπτης σιγμοειδοσκόπησης ελέγχονται μόνο τα τελευταία 60 εκατοστά του παχέος εντέρου και η ακτινογραφία παχέος εντέρου με βαριούχο υποκλεισμό δεν αποτελεί πολύ ασφαλή μέθοδο και δεν επιτρέπει λήψη βιοψιών από ύποπτες βλάβες. Η πλέον αποτελεσματική μέθοδος θεωρείται η κολonosκόπηση, κατά την οποία πραγματοποιείται εισαγωγή εύκαμπτου κολonosκοπίου από το ορθό, εξετάζεται όλο το παχύ έντερο και υπάρχει δυνατότητα λήψης βιοψίας και αφαίρεσης της βλάβης. Ωστόσο, φαίνεται ότι είναι περισσότερο αποτελεσματική μέθοδος στην πρόληψη του καρκίνου αριστερής εντόπισης, ενδεχομένως λόγω κακής προετοιμασίας, ελλιπούς κολonosκόπησης και ανατομικών ιδιαιτεροτήτων του δεξιού κόλου αλλά και λόγω της διαφορετικής βιολογίας μεταξύ καρκίνου του δεξιού και του αριστερού παχέος εντέρου. Για παράδειγμα, οι οδοντωτοί πολύποδες ο οποίοι φέρουν συνήθως μεταλλάξεις BRAF V600E και εξελίσσονται σε MSI-H ΚΠΕ-Ο, εντοπίζονται συνήθως στο δεξιό κόλον και είναι δυσκολότερο να τους δούμε ενδοσκοπικά μια και είναι επίπεδοι.

4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Συχνά ο ΚΠΕ-Ο μπορεί να είναι ασυμπτωματικός για χρόνια λόγω της αργής εξέλιξής του, με μόνη εκδήλωση τη μικροσκοπική απώλεια αίματος. Πολλά από τα συμπτώματά του δεν είναι ειδικά για τη νόσο με αποτέλεσμα να συγχέονται σχετικά εύκολα με καλοήθεις παθήσεις του πεπτικού όπως οι αιμορροΐδοπάθεια, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και η εκκολπωματική νόσος, με αποτέλεσμα την καθυστερημένη διάγνωση της νόσου.

Τα ποσοστά εμφάνισης των συχνότερων συμπτωμάτων είναι⁶⁵:

- Κολικοειδές κοιλιακό άλγος 44%
- Αλλαγή συνηθειών εντέρου (Διάρροια ή/και δυσκοιλιότητα) 43%
- Αιματοχεσία 40%

- Κόπωση/Αδυναμία 20%
- Αναιμία 11%
- Απώλεια Βάρους Σώματος 6%

Τα συμπτώματα του ΚΠΕ-Ο εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου. Γενικά, καρκίνοι που εντοπίζονται στο εγγύς έντερο δίνουν πιο καθυστερημένα συμπτώματα σε σχέση με αυτούς που εντοπίζονται στο αριστερό κόλον και το ορθό⁶⁶. Επίσης, όταν ο όγκος αναπτύσσεται ενδοαυλικά, καταλαμβάνει κυκλοτερώς τον εντερικό αυλό, με αποτέλεσμα την εκδήλωση σημείων απόφραξης (κολικοειδές κοιλιακό άλγος, ναυτία, εμέτους, αλλαγή συνηθειών εντέρου). Συμπτώματα απόφραξης δεν είναι συνήθη σε όγκους με εντόπιση στο τυφλό ή το ανιόν κόλον. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις καρκινωμάτων του τυφλού ενδέχεται να αποφράξουν την ειλοτυφλική βαλβίδα προκαλώντας ειλεό λεπτού εντέρου. Επίσης, η προοδευτική στερεοποίηση των κοπράνων λόγω απορρόφησης ύδατος από το τοίχωμα του εντέρου, εξηγεί την εμφάνιση αποφρακτικών φαινομένων στους καρκίνους του σιγμοειδούς. Οι καρκίνοι που εντοπίζονται στο δεξιό κόλον εμφανίζονται συνήθως με συμπτώματα υπόχρωμης μικροκυτταρικής αναιμίας (κόπωση, δύσπνοια, ταχυκαρδία).

Η εξωαυλική ανάπτυξη του καρκίνου μπορεί να οδηγήσει διάτρηση και περιτονίτιδα με εικόνα οξείας κοιλίας, ενώ σε προχωρημένα στάδια η διήθηση και η επέκταση κατά συνέχεια ιστών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία συριγγίων (εντεροεντερικών, γαστροκολικών, εντεροκυστικών).

Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται επίσης η ανάπτυξη παρανεοπλασματικών συνδρόμων όπως σύνδρομο Cushing, υπερασβαστιαιμία, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, παρεγκεφαλιδική εκφύλιση κ.α.

Σχεδόν το 15-20% των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο διαγιγνώσκονται de novo μεταστατικοί. Οι μεταστάσεις ανευρίσκονται συνήθως στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στο περιτόναιο και σε λεμφαδένες, και ανάλογα με την εντόπισή τους μπορεί να είναι συμπτωματικές προκαλώντας άλγος δεξιού υποχονδρίου, κοιλιακή διάταση, πρόωρο κορεσμό ή λεμφαδενική διόγκωση. Η ύπαρξη συμπτωμάτων αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον ΚΠΕ-Ο.

5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση τίθεται με την ιστολογική επιβεβαίωση της κακοήθους νεοπλασίας και μέθοδος εκλογής για τη λήψη δείγματος ιστού αποτελεί η κολonosκόπηση. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (>90%) ο ιστολογικός τύπος που αναγνωρίζεται είναι το κλασικό αδενοκαρκίνωμα που εξορμάται από κυλινδρικό μονόστιβο επιθήλιο, ενώ σε μικρότερο ποσοστό αναγνωρίζονται άλλοι τύποι όπως, βλενώδες αδενοκαρκίνωμα, αδενοπλάκωδες, μυελοειδές και αδιαφοροποίητο καρκίνωμα⁶⁶.

6. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

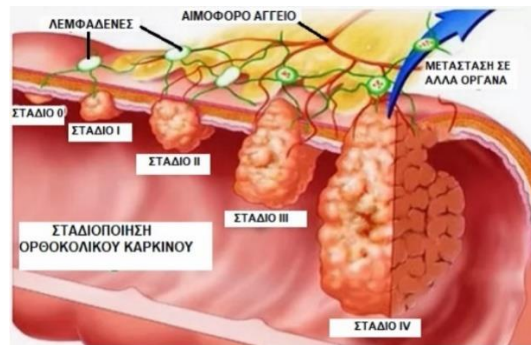
Η σταδιοποίηση της νόσου προϋποθέτει τη διενέργεια απεικονιστικών εξετάσεων ώστε να διαπιστωθεί η έκταση της νόσου και είναι απαραίτητη ώστε να εκτιμηθεί αντικειμενικά το φορτίο νόσου, η πρόγνωση καθώς και να επιλεγεί η περαιτέρω θεραπευτική στρατηγική. Το πρώτο σύστημα σταδιοποίησης αναφέρεται από τον Βρετανό παθολογοανατόμο Dukes το 1932 και διακρίνει 4 στάδια, χρησιμοποιώντας αμιγώς ανατομικά κριτήρια⁶⁷:

Στάδιο A: Απουσία επέκτασης πέρα από το μυϊκό χιτώνα (80% 5 ετής επιβίωση)

Στάδιο B: Επέκταση καρκινώματος πέρα από το μυϊκό χιτώνα χωρίς διήθηση επιχώριων λεμφαδένων (60-70% 5 ετής επιβίωση)

Στάδιο C: Διήθηση επιχώριων λεμφαδένων (30% 5 ετής επιβίωση)

Στάδιο D: Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (15% 2 ετής επιβίωση)



Εικόνα 8: Σταδιοποίηση ορθοκολικού καρκίνου

Έκτοτε η σταδιοποίηση έχει δεχτεί διάφορες τροποποιήσεις (Kirklin, Astler και Collier), με στόχο την ακριβέστερη περιγραφή της νεοπλασματικής έκτασης. Παρόλα αυτά, φάνηκε ότι παρά τις τροποποιήσεις, ασθενείς ίδιου σταδίου είχαν μεγάλες διαφορές στην πρόγνωση και στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Έτσι από το 1957 το σύστημα TNM (Tumor-Node-Metastasis) αποτελεί το βασικό σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου παγκοσμίως, με επικαιροποιήσεις ανά 6-8 χρόνια. Το σύστημα αυτό σταδιοποιεί τους όγκους με βάση α) το μέγεθος του όγκου και τον βαθμό διήθησης στο εντερικό τοίχωμα (T) β) την ύπαρξη και τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων (N) και γ) την ύπαρξη ή μη απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Ακολουθεί το σύστημα TNM κατά AJCC/ UICC⁶⁸:

Πρωτοπαθής όγκος

T0: απουσία ένδειξης παρουσίας πρωτοπαθούς εστίας

Tis: καρκίνωμα in situ: ενδοβλεννογόνιο καρκίνωμα

T1: ο όγκος διηθεί την υποβλεννογόνιο χιτώνα

T2: ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα

T3: ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα, τον ορογόνο και το περιεντερικό λίπος

T4a: ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο

T4b: ο όγκος διηθεί άλλα όργανα ή δομές

Επιχώριοι Λεμφαδένες

N0: απουσία μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες

N1: μεταστατική νόσος σε 1 έως 3 επιχώριους λεμφαδένες

N2: μεταστατική νόσος σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες

N2a: Μεταστάσεις σε 4-6 επιχώριους λεμφαδένες

N2b: Μεταστάσεις σε 7 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες

Απομακρυσμένη μεταστατική νόσος

M0: απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

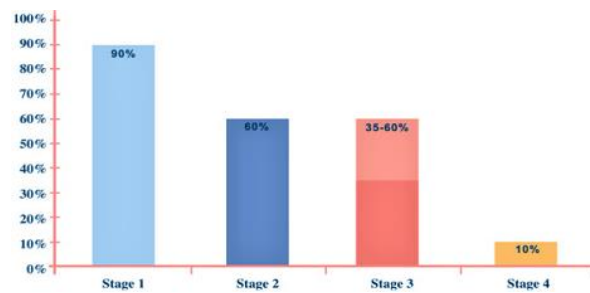
M1: απομακρυσμένη μεταστατική νόσος

Στάδιο	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T3	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	κάθε T	κάθε N	M1a
IVB	κάθε T	κάθε N	M1b
IVC	κάθε T	κάθε N	M1c

Εικόνα 9: Σταδιοποίηση κατά σύστημα TNM

Η πρόγνωση εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους οι οποίες ταξινομούνται βάσει του βαθμού βεβαιότητας της προγνωστικής τους αξίας. Έτσι ορισμένοι προγνωστικοί παράγοντες με ικανοποιητική προγνωστική αξία είναι α) τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, β) το στάδιο της νόσου, γ) η ύπαρξη υπολειπόμενης νόσου μετεγχειρητικά, δ) η διήθηση αγγείων και νεύρων, ε) η παρουσία ή μη συμπτωμάτων, ζ) η εντόπιση του όγκου, η) γενετικούς και μοριακούς δείκτες θ) η ηλικία ι) τα προεγχειρητικά επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου

(CEA). Στην εικόνα 10 φαίνεται η 5-ετής επιβίωση ανάλογα με το στάδιο του ορθοκολικού καρκίνου κατά τη διάγνωση.

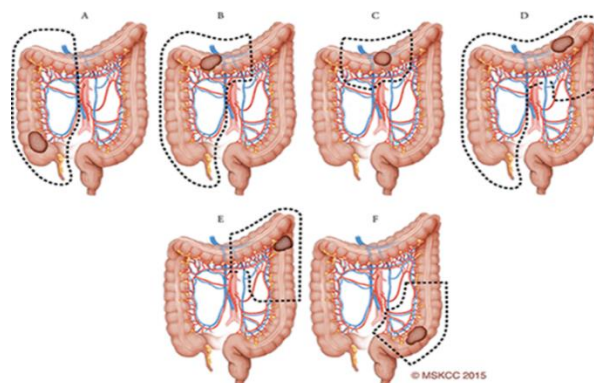


Εικόνα 10. 5-ετής επιβίωση ανάλογα με το στάδιο του ορθοκολικού καρκίνου κατά τη διάγνωση

7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

7.1 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Στόχος της χειρουργικής επέμβασης των διηθητικών καρκινωμάτων είναι η ριζική εκτομή του όγκου με «ασφαλή» όρια εκτομής καθώς και των παροχετευόμενων λεμφαδένων σε ένα συνολικό τεμάχιο (en bloc). Αν και εκτομή τουλάχιστον 5 cm εκατέρωθεν του όγκου κρίνεται επαρκής, πρόσφατες μελέτες προτείνουν αύξηση του ορίου έως 8- 10 cm. Η επιλογή της χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η εντόπιση και η έκταση του όγκου και η γενική κατάσταση του ασθενούς (Εικόνα 11)⁶⁹.



Εικόνα 11⁶⁹: (A-B) Δεξιά ημικολεκτομή (C) Εγκαρσιεκτομή (D) Εκτεταμένη Δεξιά Ημικολεκτομή (E) Αριστερή ημικολεκτομή (F) Σιγμοειδεκτομή

Η δεξιά ημικολεκτομή ενδείκνυται σε ασθενείς με καρκίνο του τυφλού και ανιόντος κόλου και γίνεται αφαίρεση του δεξιού κόλου, της ηπατικής καμπής και τμήματος του εγκάρσιου κόλου. Απαιτείται απολίνωση της ειλεοκολικής, δεξιάς κολικής αρτηρίας και του δεξιού κλάδου της μέσης κολικής αρτηρίας. Στη συνέχεια μια ειλεοεγκάρσια αναστόμωση προς αποκατάσταση της συνέχειας του γαστρεντερικού σωλήνα. Η εκτεταμένη δεξιά ημικολεκτομή έχει ένδειξη σε ασθενείς με καρκίνο της ηπατικής καμπής ή του εγκάρσιου κόλου, αφαιρείται επιπλέον το σύνολο του εγκάρσιου κόλου και απολινώνεται η μέση κολική αρτηρία. Κατά την κινητοποίηση της σπληνικής καμπής απαιτείται προσοχή καθώς υπάρχει κίνδυνος ιατρογενούς τραυματισμού του σπληνός. Στην περίπτωση που η εντόπιση του όγκου είναι στην σπληνική καμπή, προτείνεται τμηματική εκτομή απολινώνοντας τα αριστερά κολικά αγγεία. Για κακοήθειες της μεσότητας του εγκάρσιου κόλου ενδείκνυται εκτεταμένη δεξιά ημικολεκτομή ή εγκαρσιεκτομή με απολίνωση των μέσων κολικών αγγείων. Η εγκαρσιεκτομή αποτελεί σπάνια επέμβαση καθώς δεν ανευρίσκονται συχνά πρωτοπαθείς όγκοι με τέτοια εντόπιση. Αριστερή ημικολεκτομή διενεργείται σε κακοήθειες με εντόπιση στο κατιόν κόλον. Στην περίπτωση αυτή αφαιρείται τμήμα από τη μεσότητα του εγκάρσιου κόλου έως το άνω σιγμοειδές. Η υψηλή απολίνωση των αριστερών κολικών αγγείων ή της κάτω μεσεντερίου αρτηρίας κρίνεται απαραίτητη. Σε όγκους του σιγμοειδούς ενδείκνυται σιγμοειδεκτομή με απολίνωση των σιγμοειδικών αρτηριών στο ύψος της κάτω μεσεντερίου αρτηρίας. Στη συνέχεια αφού κινητοποιηθούν κατιόν και σπληνική καμπή γίνεται αναστόμωση του κατιόντος με το ορθό. Η χαμηλή πρόσθια εκτομή ορθού εκτελείται σε όγκους που εντοπίζονται στο άνω και μέσου τριτημορίου του ορθού. Με αυτή την επέμβαση αφαιρείται το σιγμοειδές και το εμπλεκόμενο τμήμα του ορθού με διατήρηση των σφιγκτήρων. Η υπολική κολεκτομή εφαρμόζεται σε σύγχρονους κολικούς όγκους σε διαφορετικά τμήματα του παχέος εντέρου. Πρόκειται για μια επέμβαση που απευθύνεται σε επιλεγμένους ασθενείς με FAP χωρίς προσβολή του ορθού και σε επιλεγμένους ασθενείς με σύνδρομο Lynch. Η

επέμβαση κατά Hartmann έχει ενδειξη σε παθολογικές περιπτώσεις του ορθοσιγμοειδούς που δεν επιτρέπουν την εκτέλεση αναστόμωσης. Περιλαμβάνει την εκτομή του πάσχοντος τμήματος και σύγκλειση του ορθικού κολοβώματος. Η αποκατάσταση της συνέχειας της πεπτικής οδού με αναστόμωση μεταξύ του κατιόντος κόλου με το ορθό λαμβάνει χώρα σε δεύτερο χρόνο (συνήθως μετά από 6 μήνες). Η κοιλιοπερινεϊκή εκτομή του ορθού διενεργείται σε νεοπλάσματα που εντοπίζονται πολύ κοντά στον δακτύλιο του πρωκτού που πιθανότατα διηθούν τους σφιγκτήρες. Πραγματοποιείται αφαίρεση του ορθοπρωκτικού σωλήνα και πραγματοποιείται μόνιμη τελική κολοστομία.

Σε περίπτωση σύγχρονης παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις όπως εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστάσεων στον ίδιο χρόνο, εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου αρχικά και ακολούθως των ηπατικών μεταστάσεων και εκτομή των μεταστάσεων αρχικά και σε δεύτερο χρόνο του πρωτοπαθούς όγκου (Liver First). Η επιλογή της βέλτιστης προσέγγισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη θέση του όγκου, την κλινική κατάσταση του ασθενούς και το ενδεχόμενο χορήγησης νέο-επικουρικής θεραπείας.

7.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες δε συνιστάται χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς σταδίου I, ενώ ασθενείς σταδίου II κατατάσσονται σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου και τούτο καθορίζει αν χρήζουν επικουρικής χημειοθεραπείας ή τίθενται υπό παρακολούθηση. Επιβεβλημένη θεωρείται η χορήγηση επικουρικής ΧΜΘ σε ασθενείς σταδίου III για 3-6 μήνες⁷⁰.

Στο στάδιο IV, σκοπός της θεραπείας είναι η παράταση του χρόνου επιβίωσης και η χορήγηση συστηματικής θεραπείας κρίνεται απαραίτητη. Ιδιαίτερη κατηγορία ανάμεσα στους ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο, αποτελούν αυτοί που πάσχουν από

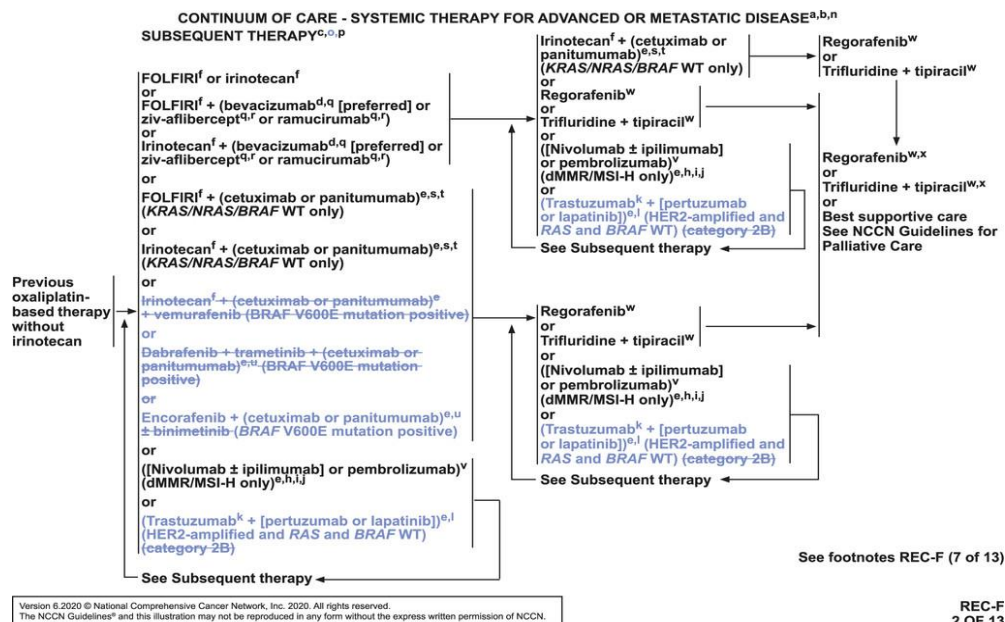
ολιγομεταστατική νόσο⁷¹. Ο στόχος για αυτούς τους ασθενείς είναι να μετατραπεί η νόσος σε δυνητικά χειρουργήσιμη ώστε ιδανικά να γίνει πλήρης εξαίρεση του όγκου και των μεταστάσεων στον ίδιο ή σε διαφορετικούς χειρουργικούς χρόνους, με σημαντική βελτίωση του PFS και της συνολικής επιβίωσης⁷².

Οι τελευταίες δεκαετίες χαρακτηρίζονται από σημαντική πρόοδο στη θεραπευτική διαχείριση ασθενών με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο. Λόγος επίσης γίνεται για το ρόλο του μοριακού προφίλ και τη θεραπευτική προσπέλαση με βάση τη θέση του όγκου. Φαίνεται ότι όγκοι που εντοπίζονται στο δεξιό κόλον παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοσοποιητική δραστηριότητα σε σύγκριση με αυτούς που ανευρίσκονται στο αριστερό κόλον και το ορθό. Για παράδειγμα, η εντόπιση στο δεξιό κόλον έχει συσχετιστεί πιο συχνά με CIMP/MSI/BRAF θετικότητα⁷³. Αναφορικά με τα θεραπευτικά σχήματα, το FOLFIRI φαίνεται να έχει παρόμοια δράση στον δεξιό και στον αριστερό ΚΠΕ, ενώ το FOLFOX φαίνεται να υπερτερεί σε καρκίνους με αριστερή εντόπιση. Ομοίως, το cetuximab δίνει μικρότερο PFS στους δεξιούς όγκους, ενώ το bevacizumab ωφελεί περισσότερο προχωρημένους αριστερούς όγκους⁷⁴. Σε κάθε περίπτωση, η εφαρμογή καθιερωμένων κυτταροτοξικών σχημάτων σε συνδυασμό με στοχευτικούς παράγοντες με τη βοήθεια νέων βιοδεικτών, οδήγησαν σε εξατομικευμένη αντιμετώπιση των ασθενών και σημαντική επιμήκυνση της μέσης συνολικής επιβίωσης τους.

7.2.1 Χημειοθεραπεία

Ναυαρχίδα της βασικής χημειοθεραπευτικής προσέγγισης του μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου αποτελούν σχήματα που περιλαμβάνουν φθοριοπυριμιδίνες [(ενδοφλέβια 5-FU/ λευκοβορίνη-LV ή από του στόματος καπεσιταμίνη + οξαλιπλατίνη (oxaliplatin) ή ιρινοτεκάνη (irinotecan)] εδώ και δεκαετίες. Αυτοί οι συνδυασμοί παρέχουν μεγαλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης (RR) και διαστήματα ελεύθερα προόδου νόσου (PFS) καθώς και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (OS)^{75,76}.

Το 2015, έλαβε έγκριση ένας νέος per os χορηγούμενος χημειοθεραπευτικός συνδυασμός (trifluridine και tipiracil), για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό κολορθικό καρκίνο, μετά από προηγούμενες θεραπείες με σχήματα φθοριοπυριμιδινών + οξαλιπλάτινα ή irinotecan, anti-VEGF παράγοντα, και anti-EGFR παράγοντα (σε RAS-wt όγκους). Πρόκειται για έναν συνδυασμό ενός νουκλεοσιδικού αναλόγου θυμιδίνης (trifluridine) και ενός αναστολέα της φωσφορυλάσης της θυμιδίνης (tipiracil). Μετά την πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα, η trifluridine ενσωματώνεται στο DNA, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στην εικόνα 12 φαίνονται οι θεραπευτικές επιλογές για την τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο, σύμφωνα με τις NCCN κατευθυντήριες οδηγίες.



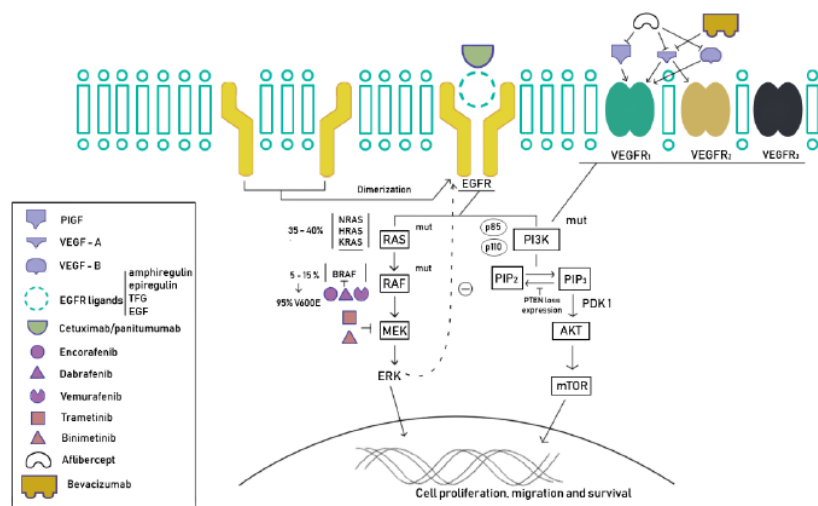
Εικόνα 12⁷⁷: Θεραπευτικός Αλγόριθμος National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology

7.2.2 Στοχευμένη θεραπεία

Περαιτέρω οφέλη στα ποσοστά ανταπόκρισης (RR), στο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) αλλά και στη συνολική επιβίωση (OS), παρατηρήθηκαν μετά την εισαγωγή βιολογικών παραγόντων στην αντιμετώπιση του μεταστατικού κολορθικού καρκίνου. Από τους πρώτους παράγοντες ήταν τα μονοκλωνικά αντισώματα κετουξιμάπη (cetuximab) και

πανιτουμουμάμπη (panitumumab) που στοχεύουν τον EGFR υποδοχέα και οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab) και aflibercept που στοχεύουν τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου VEGF⁷⁸⁻⁸².

Τα anti-EGFR αντισώματα συνδέονται με την εξωκυττάρια μοίρα του του EGFR, εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποδοχέα με το ενδογενή προσδέτη με αποτέλεσμα την αναστολή λειτουργίας του υποδοχέα και την επακόλουθη κυτταρική ανάπτυξη. Η χρήση τους περιορίζεται σε RAS-wt όγκους.



Εικόνα 13⁸³: Μηχανισμός δράσης στοχεύουσας θεραπείας στο μεταστατικό ΚΠΕ-Ο

Το bevacizumab είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με τον VEGF αναστέλλοντας τη σύνδεση του με τους υποδοχείς του VEGFR-1 και VEGFR-2. Αυτό οδηγεί σε αναστολή της αγγειοποίησης των όγκων, ομαλοποιεί το εναπομένον αγγειακό δίκτυο και αναστέλλει το σχηματισμό νέων αγγείων.

Το aflibercept δρα ως διαλυτός υποδοχέας δεσμεύοντας τον VEGF-A, τον VEGF-B και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (PIGF). Έτσι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ανάπτυξη νέων αγγείων που τροφοδοτούν τους όγκους με οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες.

Το ramucirumab είναι ένα ανθρώπινο αντίσωμα το οποίο συνδέεται και αναστέλλει τον VEGFR2. Έχει λάβει έγκριση σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη, σε μεταστατικό ΚΠΕ-Ο.

Το regorafenib είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος, ισχυρός αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600EPDGFR, FGFR) αναστέλλοντας την ογκογένεση και την αγγειογένεση.

Το vemurafenib είναι ένας BRAF αναστολέας. Μεταλλάξεις στο γονίδιο οδηγούν σε ενεργοποίηση των BRAF πρωτεϊνών, οι οποίες επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Χορηγείται σε όγκους θετικούς στη BRAF V600 μετάλλαξη.

Το encorafenib αναστέλλει τις πρωτεΐνες MEK1 και MEK2, οι οποίες είναι ανοδικοί ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού της ρυθμιζόμενης από εξωκυττάρια σήματα κινάσης (ERK), που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το 2020 το encorafenib έλαβε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία του μεταστατικού ΚΠΕ-Ο, σε συνδυασμό με cetuximab για όγκους που φέρουν τη μετάλλαξη BRAF V600. Αποτελεί τον τρίτο από του στόματος χορηγούμενο παράγοντα που έλαβε έγκριση για μεταστατικό CRC, μετά το regorafenib και το trifluridine/tipiracil. Η έγκριση βασίστηκε στα αποτελέσματα της μελέτης BEACON, στην οποία φάνηκε ότι ο τριπλός συνδυασμός encorafenib (BRAF αναστολέας), binimetinib (MEK αναστολέας) και cetuximab αύξησε σημαντικά τόσο το OS έναντι της χημειοθεραπείας (9,0 μήνες έναντι 5,4 μηνών του σκέλους της ΧΜΘ) όσο και το PFS (4,3 μήνες έναντι 1,5 αντίστοιχα). Παράλληλα τα ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης ήταν πολύ ανώτερα από τον τριπλό συνδυασμό (26% έναντι 2% με τη χημειοθεραπεία)⁸⁴.

Η γονιδιακή σύντηξη στην κινάση νευροτροφικών υποδοχέων τυροσίνης (NTRK) είναι σχετικά σπάνια και εκτιμάται ότι ορθοκολικοί καρκίνοι με θετική γονιδιακή σύντηξη TRK ανέρχονται στο 02-1% του συνόλου⁸⁵. Συνήθως συνυπάρχει σε όγκους RAS και BRAF-wt όγκους με MMR deficiency. Δύο στοχεύουσες θεραπείες έχουν λάβει έγκριση για συμπαγείς

όγκους όγκων με αυτή τη διαταραχή, το larotrectinib και το entrectinib. Και τα δύο αποτελούν θεραπευτικές επιλογές σε μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου με γονιδιακή σύντηξη NTRK (NTRK-fusion-positive tumors).

Αρκετοί άλλοι αναστολείς τυροσινικής κινάσης έχουν προταθεί ή/και βρίσκονται υπό διερεύνηση για την αποτελεσματικότητά τους στον μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο όπως το sorafenib, lapatinib, pazopanib, cobimetinib, donafenib, famitinib κ.α.

Επίσης, συνδυασμοί διπλής στόχευσης του HER-2 (trastuzumab με pertuzumab ή lapatinib) έχουν προταθεί ως θεραπευτική επιλογή για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο με ενίσχυση του γονιδίου Her-2/neu. Πρόσφατα μάλιστα οι NCCN κατευθυντήριες οδηγίες συμπεριέλαβαν στην κατηγορία σύστασης 2A (category 2A recommendation) τους συνδυασμούς αυτούς. Η πρόταση αυτή βασίστηκε στα αποτελέσματα 2 μελετών φάσης II. Η MyPathway ήταν μια basket μελέτη στα πλαίσια της οποίας συμπεριελήφθησαν 37 ασθενείς με HER2 θετικό μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου (μετά από προηγούμενες γραμμές θεραπείας). Αυτοί έλαβαν τον συνδυασμό trastuzumab/pertuzumab επιτυγχάνοντας ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης ORR 38% (95% CI, 23% - 55%)⁸⁶. Η HERACLES μελέτησε το συνδυασμό trastuzumab/lapatinib σε 27 previously treated ασθενείς με HER2 θετικό μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης ανήλθε στο 30% (95% CI, 14%–50%)⁸⁷.

7.2.3 Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο περιλαμβάνει την παθητική και την ενεργό ανοσοθεραπεία ανάλογα με το μηχανισμό δράσης του αντικαρκινικού παράγοντα. Οι αναστολείς των σημείων ελέγχου (Checkpoint inhibitors) περιλαμβάνονται στην ενεργό ανοσοθεραπεία. Τα T-κύτταρα διεγείρονται κατόπιν αναγνώρισης καρκινικών αντιγόνων στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Το CTLA-4 αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της ενεργοποίησης των T-κυττάρων. Επιπρόσθετα, το μονοπάτι που περιλαμβάνει την

αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 (PD-1) και τους προσδέτες της PD-L1/L2, οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και αυξημένη απόπτωση των T-κυττάρων. Στον καρκίνο, η αλληλεπίδραση PD-1/PD-L συμβάλλει στην αναστολή της αντικαρκινικής ανοσιακής απόκρισης, λόγω εξάντλησης των T-κυττάρων.

Το nivolumab και το pembrolizumab (anti-PD-1) και το ipilimumab (anti-CTLA4) παρεμποδίζουν τα CTLA-4 ή και PD-1/PD-L1 μεσολαβούμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, προστατεύοντας και διατηρώντας την ενεργοποίηση των T-κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η έγκριση των προαναφερθέντων παραγόντων περιορίζεται σε MSI-H/dMMR μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο και βασίστηκε στα αποτελέσματα μελετών α) για το pembrolizumab, φάσης Ib (KEYNOTE 012 και 028) και φάσης II (KEYNOTE-016, 164 και 158)⁸⁸ και β) για το nivolumab±ipilimumab, φάσης II (CheckMate 142)⁸⁹. Πρόσφατα, η μελέτη KEYNOTE-177 έδειξε ανωτερότητα της μονοθεραπείας με pembrolizumab έναντι ΧΜΘ ± bevacizumab or cetuximab, ως 1ης γραμμής θεραπεία ασθενών με MSI-H/dMMR μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο. Πιο συγκεκριμένα, η διάμεση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου στους ασθενείς που έλαβαν pembrolizumab ήταν 16,5 μήνες έναντι 8,2 μήνες σε αυτούς που έλαβαν (HR 0.60; 95% CI, 0.45-0.80; p=0.0002), ενώ το ποσοστό των ασθενών χωρίς πρόοδο νόσου στα 2 χρόνια ανήλθε στο 48,3 % στο σκέλος που έλαβε pembrolizumab σε σύγκριση με το 18,6% στο σκέλος χημειοθεραπείας⁹⁰.

8. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΠΕ-Ο

Ο όρος βιοδείκτες αναφέρεται σε ουσίες οι οποίες παράγονται τόσο από καρκινικούς όσο και από φυσιολογικούς ιστούς, εντοπίζονται σε ιστούς ή/και βιολογικά υγρά και παρέχουν πληροφορίες αναφορικά με μια φυσιολογική ή παθολογική διαδικασία. Ως εκ τούτου, μπορεί να είναι πρώιμης ανίχνευσης, διαγνωστικοί, προγνωστικοί, προβλεπτικοί, ή παρακολούθησης της ανταπόκρισης του ασθενούς στην εφαρμογή του εκάστοτε θεραπευτικού χειρισμού. Η λανθάνουσα περίοδος που μεσολαβεί από την έναρξη της νεοπλασίας σε κυτταρικό επίπεδο

έως την εμφάνιση κλινικής συνδρομής δυσχεραίνει την ανεύρεση αποτελεσματικών δεικτών στα πρώιμα στάδια του καρκίνου, αλλά αποτελεί συνάμα στόχο στο ερευνητικό πεδίο ανακάλυψης νέων βιοδεικτών.

Η αξιολόγηση των βιοδεικτών σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο είναι μείζονος σημασίας καθώς καθορίζει τους επακόλουθους θεραπευτικούς χειρισμούς. Το υλικό που χρησιμοποιείται είναι συνήθως αρχειακό δείγμα ιστού από το αρχικό χειρουργείο ή υλικό από την ενδοσκόπηση που έθεσε τη διάγνωση. Ωστόσο, σε ένα ποσοστό 20% των ασθενών στους οποίους δεν είναι διαθέσιμο, λαμβάνεται εκ νέου δείγμα ιστού από μεταστατική εστία ή νέο υλικό από την πρωτοπαθή εστία⁹¹. Επίσης, δεδομένου ότι οι βιοδείκτες δεν απαντώνται ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του όγκου, απαιτείται ενδελεχής έλεγχος του δείγματος ιστού από τον παθολογοανατόμο και επιλογή του πλέον κατάλληλου τμήματος με επαρκή αριθμό νεοπλασματικών κύτταρων ώστε να γίνει αξιόπιστη ανάλυση των βιοδεικτών και να αποφευχθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Ένα άλλο θέμα που έχει απασχολήσει την ιατρική κοινότητα και έχει διερευνηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία είναι η ύπαρξη ασυνέπειας στα αποτελέσματα έκφρασης βιοδεικτών ανάμεσα στην πρωτοπαθή και τη μεταστατική εστία. Βέβαια τα δεδομένα τείνουν στο συμπέρασμα ότι τόσο ο αρχειακός ιστός από τον πρωτοπαθή όγκο όσο και ιστός που λαμβάνεται από μεταστατική εστία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έλεγχο βιοδεικτών, με ποσοστό ασυμφωνίας περίπου 5%⁹². Στη συνέχεια θα αναφερθούν οι σημαντικότεροι βιοδείκτες που προτείνονται από τις τρέχουσες οδηγίες και χρησιμοποιούνται στην καθ' ημέρα κλινική πράξη.

8.1 ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΛΙΠΙΔΙΑ

Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόνο (CEA)

Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους και οι φυσιολογικές του τιμές στον όρο έχουν ανώτατο όριο τα 5ng/ml. Ανεύρεσκεται στο έντερο,

στο πάγκρεας και στο ήπαρ κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Οι τιμές του αυξάνονται σε καπνιστές, πάσχοντες από χρόνιες πνευμονοπάθειες, έλκη στομάχου, παγκρεατίτιδα, νόσο Crohn, ηπατικά νοσήματα, καλοήθεις πολύποδες παχέος εντέρου, καλοήθη υπερπλασία προστάτη και νεφρική ανεπάρκεια. Το γονίδιο του CEA έχει συσχετιστεί με την αναστολή απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και ως εκ τούτου την προαγωγή μεταστάσεων στον κολοορθικό καρκίνο⁹³. Ο βαθμός διαφοροποίησης έχει επίσης συσχετιστεί με τα επίπεδα CEA. Υψηλού βαθμού διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα έχουν υψηλές τιμές, ενώ χαμηλού βαθμού φυσιολογικές ή χαμηλές.

Η εκτίμησή του γίνεται προεγχειρητικά, αλλά και κατά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση. Μάλιστα υψηλές προεγχειρητικές τιμές συσχετίζονται άμεσα με την πρόγνωση της νόσου και αποτελούν κακό προγνωστικό παράγοντα ανεξάρτητο με το στάδιο νόσου⁹⁴. Επιπλέον υψηλές προεγχειρητικές τιμές CEA που δεν ομαλοποιούνται μετεγχειρητικά είναι ενδεικτικές για υπολειμματική νόσο. Οι κατευθυντήριες οδηγίες συστήνουν τη μετεγχειρητική εκτίμηση των επιπέδων CEA κάθε 3 μήνες σε ασθενείς σταδίου II/III για τουλάχιστον δύο χρόνια από τη διάγνωση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χρησιμότητά του παραμένει αμφισβητούμενη και υποστηρίζεται ότι πρέπει να περιορίζεται σε ασθενείς που μπορούν να υποβληθούν σε χειρουργική θεραπεία. Αυξημένες τιμές CEA, δεν δικαιολογούν από μόνες τους έναρξη συστηματικής θεραπείας, καθώς μπορεί να είναι ψευδείς (χημειοθεραπεία, κάπνισμα, άλλες παθολογικές καταστάσεις) και να μην υποδηλώνουν υποτροπή της νόσου. Στο μεταστατικό setting, ο προσδιορισμός CEA πρέπει να γίνεται κατά την έναρξη και κάθε 3 μήνες από την έναρξη της θεραπείας για τη μεταστατική νόσο⁹⁵. Εμμένουσες αυξημένες τιμές θα πρέπει να εγείρουν υποψία υποτροπής και να ξεκινά άμεσα διαδικασία επανασταδιοποίησης. Ωστόσο, θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή ειδικά κατά τις 4-6 πρώτες εβδομάδες νέας θεραπείας, αφού όπως αναφέρθηκε, ψευδώς αυξημένες τιμές μπορεί να παρατηρηθούν, ειδικά με τη χρήση οξαλιπλατίνας⁹⁶.

CA 19-9

Πρόκειται για ένα σιαλοποιημένο αντιγόνο ομάδας αίματος Lewis και η ανίχνευσή του γίνεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα NS 1116 19-9. Περίπου 5% του γενικού πληθυσμού με Le a-b γονότυπο δεν εκφράζουν το CA 19-9. Ανευρίσκεται στο λεπτό και παχύ έντερο του εμβρύου και σε 59-80% σε καρκίνους παχέος εντέρου, καθώς και σε μεγάλο ποσοστό πολυπόδων παχέος εντέρου και συσχετίζεται με το δυναμικό κακοήθους εξαλλαγής τους⁹⁷. Αυξημένες τιμές (>37 U/ml) παρατηρούνται περίπου στο 19-40% με καρκίνο παχέος εντέρου και 0,6% σε υγιή άτομα, ενώ σε σύγκριση με το CEA έχει λιγότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη ειδικότητα. Τιμές μέχρι και 120 U/ml έχουν παρατηρηθεί και σε καλοήθεις καταστάσεις (παγκρεατίτιδα, πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, αποφρακτικό ίκτερο, κίρρωση και κυστική ίνωση). Αν και συχνά χρησιμοποιείται στην καθ' ημέρα κλινική πρακτική σε συνδυασμό με το CEA, δεν υπάρχουν σαφείς κατευθυντήριες οδηγίες που να ενθαρρύνουν τον προσδιορισμό του για την διάγνωση, σταδιοποίηση ή την ανταπόκριση στην θεραπεία ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο.

8.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

RAS μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις των ογκογονιδίων της οικογένειας RAS, θεωρείται πως αποτελούν πρώιμα γεγονότα στη διαδικασία της καρκινογένεσης, έχουν συσχετιστεί με διάφορους καρκίνους και η επίπτωσή τους αφορά περίπου το ένα τρίτο των νεοπλασμάτων⁹⁸. RAS μεταλλάξεις ανευρίσκονται στο 50% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου καθώς και στο 50% αδενωμάτων > 1 cm⁹⁹.

Τα ογκογονίδια KRAS, NRAS και HRAS κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργία G-πρωτεϊνών, οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις των RAS

γονιδίων ευνοούν την ενεργοποιημένη GTP-δεσμευμένη (GTP-bound) μορφή των πρωτεϊνών αυτών, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταγωγή σήματος προς τον πυρήνα, μέσω του RAS-RAF-MAPK μονοπατιού⁹.

Η κλινική σημασία της ανεύρεσης αυτών των μεταλλάξεων είναι σημαντική στο σχεδιασμό της θεραπευτικής στρατηγικής. Ασθενείς των οποίων οι όγκοι φέρουν κάποια ενεργοποιητική μετάλλαξη των RAS ογκογονιδίων δεν έχουν όφελος από τη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του επιδερμικού παράγοντα (anti-EGFR αντισώματα: cetuximab, panitumumab). Συνεπώς, ο έλεγχος ύπαρξης μεταλλάξεων RAS [(εξόνια 2,3,4 του *KRAS* (κωδικόνιο 12,13,59,61,117,146) και τα εξόνια 2,3,4 του *NRAS* (κωδικόνιο 12,13,59,61,117)] πρέπει να γίνεται σε κάθε ασθενή με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο κατά τη διάγνωση και πριν από την έναρξη της θεραπείας και οι στοχευτικοί anti-EGFR παράγοντες θα πρέπει να χορηγούνται μόνο σε περιπτώσεις μη μεταλλαγμένων RAS ογκογονιδίων (*RAS* wild type)⁷⁷. Μέχρι τώρα δεν έχουν εγκριθεί στοχευμένες θεραπείες για μεταλλαγμένους *KRAS* όγκους. Ωστόσο, ένας νέος παράγοντας, το AMG 510 (sotorasib) για *KRAS* G12C μεταλλαγμένους καρκίνους σε συνδυασμό με ΧΜΘ βρίσκεται υπό διερεύνηση¹⁰⁰.

BRAF μεταλλάξεις

Τα ογκογονίδια RAF εμπλέκονται στην παραγωγή τριών ισομορφών της πρωτεΐνης RAF που αποτελούν στόχους της πρωτεΐνης RAS στον καταρράκτη των MAPK κινασών¹⁰¹. Η συχνότερη από αυτές τις μεταλλάξεις (V600E) εντοπίζεται στην ισομορφή BRAF, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του RAS-RAF-MEK-ERK σηματοδοτικού μονοπατιού και ανευρίσκεται στο 8-12% των ορθοκολικών καρκίνων. Συνήθως δε, απαντώνται σε επίπεδα οδοντωτά αδενώματα και καρκίνους με εντόπιση στο δεξιό κόλον, με βλενώδη διαφοροποίηση και αυξημένη πιθανότητα περιτοναϊκών μεταστάσεων^{83,102}.

Η ύπαρξη BRAF μεταλλάξεων αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα και η μέση επιβίωση ασθενών που τις φέρουν ανέρχεται στους 10,4 μήνες έναντι >30 μηνών σε περιπτώσεις μη μεταλλαγμένων BRAF όγκων¹⁰². Επίσης, BRAF μεταλλαγμένοι όγκοι είναι μικροδορυφορικά ασταθείς (MSI-H)¹⁰³.

Μια μεταανάλυση που δημοσιεύτηκε το 2015 από τον Rowland και συνεργάτες, εκτίμησε το όφελος από την χορήγηση anti-EGFR θεραπείας σε BRAF μεταλλαγμένους και BRAF-άγριου τύπου (BRAF-wt) όγκους. Αν και αρχικά φάνηκε όφελος για τους BRAF-wt όγκους, περαιτέρω ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές¹⁰⁴. Επίσης μια άλλη μεταανάλυση που δημοσιεύτηκε την ίδια χρονιά από τον Pietrantonio και συνεργάτες, δεν έδειξε διαφορά στο όφελος από τη χορήγηση panitimumab ή cetuximab σε ασθενείς με RAS wt/BRAFV600E μεταλλαγμένους σε σχέση με RAS wt/BRAF-wt όγκους¹⁰⁵. Αντίθετα μια φάσης II τυχαιοποιημένη μελέτη έδειξε όφελος (RR 71% έναντι 22%) από την προσθήκη panitimumab σε FOLFOXIRI, σε σύγκριση με FOLFOXIRI μόνο, σε ασθενείς με BRAF μεταλλαγμένους όγκους. Ωστόσο, δε φάνηκε στατιστικά σημαντικό όφελος ως προς το PFS¹⁰⁶. Προσφάτως, δημοσιεύτηκαν θετικά αποτελέσματα τις μελέτες BEACON και SWOG, όπου ο συνδυασμός anti-EGFR και BRAF αναστολέα κατέληξε σε υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης των BRAF μεταλλαγμένων όγκων^{107,108}. Συμπερασματικά, αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικές ενδείξεις, δεν υπάρχει σαφής οδηγία για την προσθήκη anti-EGFR αντισωμάτων στη θεραπεία ασθενών που φέρουν μεταλλάξεις BRAF.

Μικροδορυφορική αστάθεια-MSI

Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια χαρακτηρίζονται από μονήρεις μεταλλάξεις του τύπου επαναλαμβανόμενων μικροδορυφορικών αλληλουχιών νουκλεοτιδίων (microsatellites) και απαντώνται στο 4%-8% των κολοορθικών καρκίνων. Οι όγκοι αυτοί έχουν ειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (βλενώδεις ή πτωχή διαφοροποίηση), τάση να εντοπίζονται στο δεξί κόλον και συχνά είναι de novo μεταστατικοί. Επίσης η ύπαρξη MSI έχει συσχετιστεί με

την ανεύρεση BRAF μεταλλάξεων⁹¹. Ασθενείς πρώιμου σταδίου με όγκους που χαρακτηρίζονται από MSI έχουν καλύτερη πρόγνωση, ενώ σε ασθενείς σταδίου IV ύπαρξη MSI αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα, μάλλον μέσω μηχανισμών ανοσοδιαφυγής και λόγω μεγαλύτερης πιθανότητας συνύπαρξης BRAF μεταλλάξεων^{91,109}.

Η εμφάνιση νεοαντιγόνων στο μικροπεριβάλλον του όγκου ασθενών με MSI-H καρκίνους έχει εισάγει στην φαρέτρα των θεραπευτικών επιλογών τη χορήγηση ανοσοθεραπείας σε τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο⁷⁷. Έλεγχος της ύπαρξης MSI χρήζει εξέτασης σε όλους τους ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο, τόσο για τον προβλεπτικό όσο και για τον προγνωστικό της ρόλο.

HER-2

Περίπου 3% των ορθοκολικών καρκίνων υπερεκφράζουν το γονίδιο του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα Τύπου 2 (HER-2), αλλά η επίπτωση αυξάνεται σε ασθενείς με RAS/BRAF-wt όγκους (5-14%)^{87,110}. Παρά το γεγονός ότι ο προσδιορισμός του status του HER-2 στο μεταστατικό CRC δεν αποτελεί συνήθη κλινική πρακτική, οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες NCCN προτείνουν τον έλεγχο γονιδιακής ενίσχυσης HER-2 για ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο, αλλά όχι για όσους φέρουν γνωστές RAS/RAF μεταλλάξεις⁷⁷.

8.3 ΛΟΙΠΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Εκτός από τους προαναφερθέντες στην τρέχουσα βιβλιογραφία υπάρχει μια πληθώρα βιοδεικτών που φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη διάγνωση, πρόγνωση και πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο. Ενδεικτικά κάποιοι επιπλέον δείκτες οι οποίοι θα μπορούσαν να ελεγχθούν, αλλά ο έλεγχός τους δεν αποτελεί καθημερινή κλινική πρακτική, είναι η ανίχνευση της μετάλλαξης PIK3CA στο εξόνιο 20, απώλεια του PTEN, εκτίμηση των επιπέδων της πρωτεΐνης EGFR, κ.α.

9. ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η αντίσταση στη θεραπεία αποτελεί ένα σύνθετο φαινόμενο και έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που σχετίζονται με κλινική και απεικονιστική επιδείνωση, ήτοι πρόοδο νόσου. Διάφοροι μηχανισμοί που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Επιγραμματικά, ορισμένοι από αυτούς αφορούν:

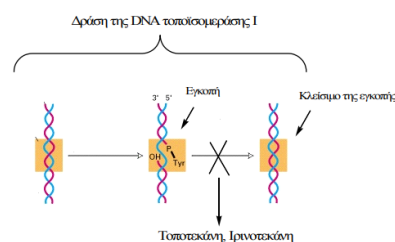
- Μεταβολές στη διαμεμβρανική μεταφορά των φαρμάκων-Πολλαπλή αντίσταση σε φάρμακα (Multi Drug Resistance-MDR)
- Μεταβολές στην ενεργότητα ενζύμων μεταβολισμού των φαρμάκων
- Μεταβολές στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA
- Μεταβολές στο μικροπεριβάλλον του όγκου
- Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και αρχέγονα καρκινικά κύτταρα (CSCs)

Η p-γλυκοπρωτεΐνη (γνωστή και ως MDR1-Multidrug Resistance Protein 1 ή ABCB1 -ATP-binding cassette sub-family B member 1) λειτουργεί ως αντλία ενεργητικής μεταφοράς μορίων στο εξωκυττάριο περιβάλλον και ευθύνεται για το φαινόμενο της πολλαπλής αντίστασης σε φάρμακα. Εντοπίζεται σε ηπατικά, νεφρικά, κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και στην κυτταρική μεμβράνη επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και δρα κυτταροπροστατευτικά απομακρύνοντας τοξίνες στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Ωστόσο, η προαναφερθείσα φυσιολογική λειτουργία μειώνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των φαρμάκων και ως εκ τούτου την φαρμακολογική τους δράση. Τα καρκινικά κύτταρα, υπερεκφράζουν το γονίδιο ABCB1, ενισχύοντας την αντίσταση του όγκου στη θεραπεία¹¹¹.

Επίσης, η αντίσταση στη θεραπεία του ορθοκολικού καρκίνου έχει συσχετιστεί με το μικροπεριβάλλον του όγκου¹¹². Η έκκριση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων από τα κύτταρα στρώματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου επάγει την EMT, η οποία εντοπίζεται

ειδικότερα σε νεοπλασίες ανθεκτικές σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα και ευθύνεται για τη δημιουργία καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστικά stem κυττάρων¹¹³. Τα τελευταία έχουν την τάση να εισβάλουν στον περιβάλλοντα χώρο και ταυτόχρονα να αντιστέκονται σε συγκεκριμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Πιο συγκεκριμένα τα προκαρκινικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες, όπως τον TGF- β , που ενεργοποιούν τους ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες αφού ενεργοποιηθούν, αποκτούν διαφορετικό φαινότυπο και μεταπίπτουν σε ινοβλάστες που σχετίζονται με καρκίνο (carcinoma-associated fibroblast) - (CAF). Οι τελευταίοι παράγουν αυξημένα επίπεδα μορίων που επάγουν την καρκινική ανάπτυξη και την αναστολή της απόπτωσης, ενώ ταυτόχρονα αντιτίθενται στην δράση των χημειοθεραπευτικών^{114,115}. Στις επόμενες παραγράφους θα αναφερθούμε πιο συγκεκριμένα στην αντίσταση στα σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη και αποτέλεσαν τη θεραπεία των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας.

Η ιρινοτεκάνη είναι ένα ημισυνθετικό ανάλογο της καμπτοθεκίνης και δρα αναστέλλοντας την DNA τοποϊσομεράση I. Πιο συγκεκριμένα, συνδέεται και σταθεροποιεί το υπό άλλες συνθήκες πρόσκαιρο σύμπλοκο τοποϊσομεράσης I/DNA, παρεμποδίζοντας έτσι την επανασύνδεση του κλώνου από την τοποϊσομεράση I και οδηγώντας σε διάσπαση του δίκλωνου DNA και σε απόπτωση. Η ιρινοτεκάνη αποτελεί προφάρμακο το οποίο εκδηλώνει τη δράση του κατόπιν βιομετρατοπής από ηπατικές καρβοξυλεστεράσες, στον ενεργό μεταβολίτη SN-38 (Εικόνα 14). Ο ηπατικός μεταβολισμός του τελευταίου μεσολαβείται από το ένζυμο UDP-γλυκουρονική τρανσφεράση (UGT).



Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης ιρινοτεκάνης

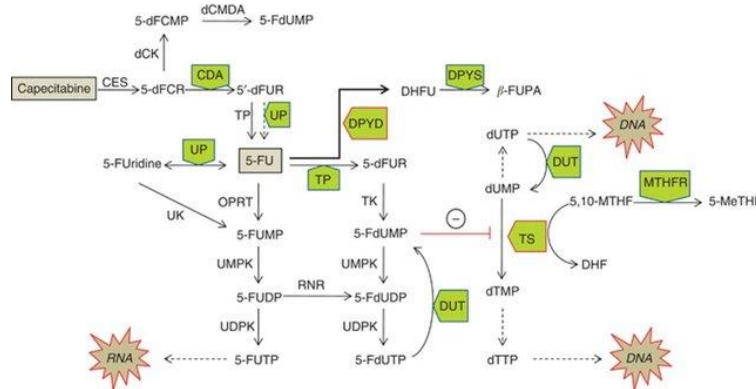
Η αντίσταση στην ιρινοτεκάνη στον κολοορθικό καρκίνο έχει συσχετιστεί με διάφορους μηχανισμούς. Η χαμηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ιρινοτεκάνης και του ενεργού μεταβολίτη SN-38 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να προκληθεί μέσω της αυξημένης απομάκρυνσής του από την MDR πρωτεΐνη¹¹⁶. Αρκετές *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει διάφορους πολυμορφισμούς πρωτεϊνών μεταφοράς (π.χ. ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2 και ABCG2/BCRP) που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης ή τοξικότητας στην ιρινοτεκάνη¹¹⁷. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι αυξημένη, UGT- επαγόμενη, κάθαρση του μεταβολίτη SN-38 μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη αντίστασης στην ιρινοτεκάνη¹¹⁸. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο UGT1A1 έχουν σαν αποτέλεσμα εμφάνιση τοξικότητας. Η ιρινοτεκάνη μεταβολίζεται από τα κυτοχρώματα CYP3A4 και CYP3A5 σε APC (7-ethyl-10-(4-N-aminopentanoic acid)-1-piperidino) carbonyloxycamptothecin) και NPC (7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino)carbonyloxycamptothecin), αντίστοιχα. Το NPC είναι ανενεργός μεταβολίτης αλλά υπόκειται σε ηπατικό μεταβολισμό από καρβοξυλεστερασες και μετατρέπεται σε SN-38. Ως εκ τούτου, η ενεργότητα του CYP3A4 έχει διερευνηθεί σε σχέση με την εκδήλωση αντίστασης στη θεραπεία, αλλά δεν υπάρχουν σαφείς συσχετίσεις των πολυάριθμων πολυμορφισμών που έχουν περιγραφεί για το γονίδιο του CYP3A4 και την αντίσταση στην ιρινοτεκάνη¹¹⁹.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η δράση της ιρινοτεκάνης εξαρτάται από τη φυσιολογική λειτουργία της τοποϊσομεράσης I, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο TOP 1. Τα επίπεδα έκφρασης του τελευταίου και ο αριθμός των αντιγράφων του έχουν συσχετιστεί με εγγενή αντίσταση στην ιρινοτεκάνη¹²⁰⁻¹²². Επιπλέον, μεταβολές στο σημείο πρόσδεσης της τοποϊσομεράσης I, λόγω σημειακών μεταλλάξεων του TOP 1 γονιδίου, αποτρέπουν τη δημιουργία σταθερού συμπλέγματος με το SN-38¹²³.

Ένας κύριος εγγενής μηχανισμός αντίστασης στις φθοριοπυριμιδίνες σχετίζεται με την ύπαρξη MSI. Σποραδικές μεταλλάξεις MMR γονιδίων, όπως στο hMSH2,

hMLH1 και hMSH6, και η απώλεια των αντίστοιχων MMR πρωτεϊνών οδηγούν σε ανθεκτικότητα των κυττάρων σε βλάβη του DNA και απόπτωση που προκαλούν κυτταροτοξικά όπως οι φθοριοπυριμιδίνες¹²⁴.

Ο μεταβολισμός της 5-FU και του από του στόματος χορηγούμενου προφαρμάκου της, capecitabine είναι πολύπλοκος και απεικονίζεται στην εικόνα 15.



Εικόνα 15¹²⁵: Μεταβολισμός 5-FU και καπεσιταμπίνης. Ένζυμα: Carboxyl esterase (CES), deoxycytidine kinase (dCK), deoxycytidine monophosphate deaminase (dCMDA), cytidine deaminase (CDA), thymidine phosphorylase (TP), uridine phosphorylase (UP), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD), dihydropyrimidinase (DPYS), orotate phosphoribosyltransferase (OPRT), uridine kinase (UK), uridine monophosphate kinase (UMPK), uridine diphosphate kinase (UDPK), ribonucleotide reductase (RNR), thymidine kinase (TK), thymidine synthase (TS), deoxyuridine triphosphatase (DUT), methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). Metabolites: deoxyfluorocytidine riboside (5'-dFCR), deoxyfluorocytidine monophosphate (5'-dFCMP), deoxyfluorouridine monophosphate (5-FdUMP), deoxyfluorouracil (5'-dFUR), fluorouracil (5-FU), fluorouridine (5-FUridine), fluorouracil monophosphate (5-FUMP), fluorouracil di, tri-phosphate (5-FUDP, 5-FUTP), deoxyfluorouracil di, tri-phosphate (5-FdUDP, 5-FdUTP), deoxyuridine mono, tri-phosphate (dUMP, dUTP), deoxycytidine mono, tri-phosphate (dTMP, dTTP), 5,10-

methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF), 5-methyltetrahydrofolate (5-MeTHF), dihydrofolate (DHF), dihydrofluorouracil (DHFU), beta-fluoroureido propionic acid (β -FUPA).

Το επίπεδο έκφρασης της θυμιδικής συνθετάσης (TS) αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα της δραστηριότητας της 5-FU. Δύο μετα-αναλύσεις ανέφεραν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του TYMS γονιδίου (γονίδιο που κωδικοποιεί την TS) και της ανταπόκρισης σε θεραπεία με φθοριοπυριμιδίνες^{126,127}. Διάφοροι πολυμορφισμοί του MTHFR γονιδίου (κυρίως οι 677C>T και 1298A>C), έχει αναφερθεί ότι οδηγούν σε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία αναφορικά με την συσχέτιση της δραστηριότητας του MTHFR με την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι αντικρουόμενα¹²⁸⁻¹³⁰. Ομοίως, αν και θεωρητικά υψηλότερα επίπεδα του TP ενζύμου συνεπάγονται μεγαλύτερη ευαισθησία σε 5-FU (λόγω αυξημένων επιπέδων του 5-FUDR και κατ' επέκταση του δραστικού μεταβολίτη 5-FdUMP), έχουν αναφερθεί και αντίθετα αποτελέσματα^{131,132}. Οι περισσότερες μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της έκφρασης του UPMS γονιδίου (κωδικοποιεί το OPRT ένζυμο το οποίο καταλύει τη βιομετατροπή της 5-FU σε 5-FUMP) κατέληξαν στο ότι υπερέκφρασή του συσχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία σε 5-FU^{133,134} και μειωμένη έκφρασή του σε αντίσταση σε 5-FU¹³⁵. Ένα ακόμα σημαντικό ένζυμο που εμπλέκεται στον καταβολισμό των φθοριοπυριμιδινών είναι η δεϋδρογονάση της διυδροπυριμιδίνης (DPD). Εγγενής υπερέκφραση του DPD έχουν συσχετιστεί με αντίσταση στη θεραπεία^{116,131}. Αρκετοί πολυμορφισμοί του DPYD γονιδίου έχουν περιγραφεί και ορισμένοι (π.χ. IVS14+1 G>A, DPYD*2A) κυρίως στα ομόζυγα άτομα, έχουν συσχετιστεί με εκδήλωση θανατηφόρας τοξικότητας οφειλόμενη στη μειωμένη απομάκρυνση των φθοριοπυριμιδινών.

Διάφοροι μηχανισμοί αντίστασης έχουν επίσης αναφερθεί για τους anti-EGFR και anti-VEGF παράγοντες. Η ύπαρξη επίκτητων σημειακών μεταλλάξεων και συγκεκριμένα η

S492R δεν προϋπάρχει αλλά παρουσιάζεται κατόπιν της έναρξης θεραπείας με anti-EGFR μόρια και έχει συσχετιστεί με αντίσταση στο cetuximab, αλλά όχι στο panitumumab¹³⁶. Ομοίως, KRAS μεταλλάξεις οι οποίες δεν προϋπήρχαν μπορεί να ανευρεθούν κατά τη διάρκεια της θεραπείας με anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα. Βέβαια έχει αναφερθεί ότι οι μεταλλάξεις αυτές πιθανώς προϋπάρχουν, αλλά είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με τις διαθέσιμες τεχνικές¹³⁷. Σημειακές KRAS μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με αντίσταση τόσο στο cetuximab όσο και στο panitumumab¹³⁸. Επίσης, όγκοι που έφεραν μεταλλάξεις του PIK3CA και απώλεια λειτουργικότητας του PTEN έχουν συσχετισθεί με αντίσταση στο cetuximab¹³⁹. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ύπαρξη BRAF μεταλλάξεων μπορεί να συμβάλλει στη ανάπτυξη αντίστασης σε anti-EGFR παράγοντες¹⁴⁰. Τέλος, είναι γνωστό ότι ο EGFR έχει πολλαπλούς προσδέτες, εκτός του EGF, όπως τον TGF- α , οι οποίοι μπορούν να προσδεθούν στον υποδοχέα και να ενεργοποιήσουν το σηματοδοτικό μονοπάτι. Ένας τέτοιος παρακρινικός μηχανισμός αντίστασης έχει επίσης αναφερθεί, σύμφωνα με τον οποίο παρατηρείται αύξηση της έκκρισης τέτοιων προσδετών με στόχο την «προστασία» των καρκινικών κυττάρων από τον EGFR αποκλεισμό¹⁴¹. Αντίστοιχα, στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί κυρίως μηχανισμοί επίκτητης αντίστασης στους anti-VEGF παράγοντες. Θα μπορούσαμε να διακρίνουμε κυρίως 3 γενικές κατηγορίες μηχανισμών: την επαναγγειογένεση μέσω εναλλακτικών αγγειογενετικών μονοπατιών^{142,143}, την ανάπτυξη προστατευτικών μηχανισμών^{144,145} και την ενίσχυση του διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού των όγκων^{146,147}.

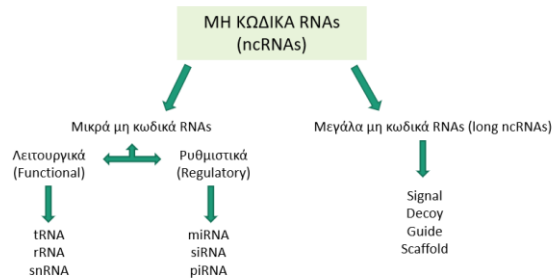
Η ετερογένεια των όγκων και δη των μεταστατικών είναι επίσης ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψιν και σχετίζεται άμεσα με την αντίσταση στις χορηγούμενες θεραπείες. Σε κάθε καρκινική εστία υπάρχουν χιλιάδες κύτταρα τα οποία μπορεί να είναι ήδη ανθεκτικά στη θεραπεία που θα χορηγηθεί. Επίσης, η μοριακή υπογραφή του όγκου είναι ετερογενής όχι μόνο μεταξύ των διαφορετικών σημείων της πρωτοπαθούς εστίας αλλά και μεταξύ των

πρωτοπαθών όγκων και των μεταστατικών εστιών. Ως εκ τούτου, η βιοψία του ιστού δίνει πληροφορίες για το γονιδιακό προφίλ του όγκου στο συγκεκριμένο σημείο, χωρίς να υπάρχει δυνατότητα πληροφορίας για διαφορετικά σημεία της πρωτοπαθούς εστίας ή των μεταστατικών εστιών.

Συμπερασματικά, το πεδίο της αντίστασης στη θεραπεία του ορθοκολικού καρκίνου είναι εξαιρετικά πολύπλοκο και σχετίζεται τόσο με την ύπαρξη συγκεκριμένων μεταλλάξεων στον όγκο (εγγενών ή επίκτητων) όσο και με την ετερογένεια του όγκου. Η εξατομικευμένη αντιμετώπιση των ογκολογικών ασθενών αποτελεί ήδη λαμπρό πεδίο έρευνας και ο ρόλος της μοριακής υπογραφής του όγκου σε διάφορα σημεία εξέλιξης της νόσου, θα καθορίζει τη θεραπευτική προσέγγιση έτσι ώστε να αποφεύγονται αποτυχίες των εφαρμοζόμενων στρατηγικών.

10. ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAs (ncRNAs)

Παρόλο που περίπου το 90% του ανθρώπινου γονιδιώματος μπορεί να μεταγραφεί σε RNA, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των μεταγράφων αυτών μεταφράζεται σε πρωτεΐνες¹⁴⁸. Ως εκ τούτου, για δεκαετίες επικρατούσε η άποψη ότι το μεγαλύτερο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελεί, μη λειτουργικό, «άχρηστο» («junk») DNA. Αργότερα, από τις αρχές του 1980, ανακαλύφθηκε μια νέα κατηγορία RNAs με χαμηλό ή καθόλου δυναμικό μετάφρασης, γνωστά ως «μη κωδικά RNAs» (non-coding RNAs, ncRNAs), τα οποία διαθέτουν πληθώρα λειτουργιών, αλλάζοντας έτσι την επιστημονική άποψη για το «άχρηστο» γενετικό υλικό. Τα ncRNAs ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθός τους, σε δύο μεγάλες κατηγορίες τα μικρά [όπως transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), small nuclear RNA (snRNA), microRNAs (miRNA), piwi interacting RNA(piRNA), small inhibitory (siRNA)] και τα μεγάλα ncRNAs (long non-coding RNAs), αποτελούμενα από > 200 νουκλεοτίδια (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Είδη μη κωδικών RNAs

Τα τελευταία χρόνια τα ncRNAs έχουν προσελκύσει τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον και έχουν μελετηθεί εκτενώς ως πιθανοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες στη ογκογένεση, την εξέλιξη του καρκίνου και την αντίσταση στη θεραπεία. Πολυάριθμες μελέτες έχουν εστιάσει στην απορρύθμιση της έκφρασης και το ρόλο τους στον καρκίνο καθώς φαίνεται ότι οι μοριακές “υπογραφές” τους διαφέρουν μεταξύ των καρκινοπαθών και υγιών ατόμων.

10.1 MicroRNAs ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Τα microRNAs (miRNAs) εκπροσωπούν μια κατηγορία ρυθμιστικών μονόκλωνων RNAs (αποτελούμενα από 18–26 νουκλεοτίδια) τα οποία όπως αναφέρθηκε δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά εμπλέκονται στη ρύθμιση πρωτεϊνών μέσω αναστολής μετάφρασης του mRNA γονιδίων στόχων. Τα miRNAs συμμετέχουν σε πλειάδα φυσιολογικών και αναπτυξιακών διαδικασιών και η έκφρασή τους στον καρκινογένεση διαφοροποιείται με αποτέλεσμα να λειτουργούν τόσο ως ογκογονίδια όσο και ως ογκοκατασταλτικά. Μάλιστα, η έκφρασή τους μπορεί να είναι διαφορετική ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου αλλά και στον ίδιο όγκο, παρουσιάζοντας διακυμάνσεις έκφρασης στα βλαστικά κύτταρα και τα υπόλοιπα κύτταρα του ίδιου όγκου.

Η βιογένεση των miRNA αποτελεί μια διαδικασία 2 βημάτων με τη συμμετοχή δύο ριβονουκλεασών (Drosha και Dicer). Κατά το κανονικό μονοπάτι σχηματισμού miRNAs, τα

γονίδια των miRNAs μεταγράφονται και προκύπτει το πρωταρχικό miRNA (primary miRNA, pri-miRNA). Στη συνέχεια, το τελευταίο υφίσταται διάσπαση από το ένζυμο RNάση Drosha σχηματίζοντας το πρόδρομο pre-miRNA. Ακολούθως, το pre-miRNA μεταφέρεται με τη βοήθεια ενός πυρηνοκυτταροπλασματικού μεταφορέα (ο οποίος αποτελείται από την εξπορτίνη 5 (exportin-5) και Ran-GTP) από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, το ώριμο διπλής έλικας miRNA προκύπτει μέσω της RNάση Dicer. Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί ότι η διαδικασία της βιογένεσης των miRNAs είναι πολύ εξειδικευμένη και εξαρτάται από το κάθε microRNA που εκφράζεται. Ως εκ τούτου, στη μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs μπορεί να συμμετέχει η RNA πολυμεράση II ή η RNA πολυμεράση III δεδομένου ότι κάθε μια αναγνωρίζει ειδικούς υποκινητές και περιοχές λήξης και υφίσταται ειδική ρύθμιση.

Σημαντικό ρόλο στην καταστολή της έκφρασης των target mRNAs στο RNA-επαγόμενο σύμπλοκο σίγασης (RNA interference silencing complex), διαδραματίζει η περιοχή εκβλάστησης (seed region) των miRNAs, επιτρέποντας τη σύζευξη με την 3-μη μεταφραζόμενη περιοχή του mRNA-στόχου. Σε περίπτωση πλήρους συμπληρωματικότητας του mRNA-στόχου με το αντίστοιχο miRNA, προκαλείται αποδόμηση του mRNA-στόχου. Αντίθετα σε περίπτωση ατελούς συμπληρωματικότητας, εμφανίζεται αποαδενυλίωση και αποσταθεροποίηση. Σε αυτή τη διαδικασία, ιδιαίτερο ρόλο παίζει το RISC, το οποίο αποτελείται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών Argonaute (Ago 1-Ago 4) και GW182. Οι πρωτεΐνες Argonaute συμμετέχουν στην αναγνώριση του mRNA-στόχου, ενώ οι GW182 εμπλέκονται στην καταστολή ή/και αποδόμηση mRNA-στόχων¹⁴⁹.

Πολυάριθμα miRNAs έχουν μελετηθεί και φαίνεται να εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες καρκινογένεσης όπως στον πολλαπλασιασμό, απόπτωση, διήθηση και μεταστατική ικανότητα του κολοορθικού καρκίνου, ενώ συνεχώς ανακαλύπτονται νέα. Υπερέκφραση του miR-31 έχει συσχετιστεί με μεταστατικό CRC¹⁵⁰⁻¹⁵¹, ενώ επίσης αυξημένη έκφραση διάφορων miRNAs, όπως miR-31, miR-17-5p, miR18a, miR-20a και miR-92 βρέθηκε σε καρκινικά

κύτταρα σε σχέση με κύτταρα φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου¹⁵². Αντίστοιχα τα miR-143/145 ανευρέθηκαν υποεκφρασμένα σε προκαρκινικά αδενώματα και φαίνεται να εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης του ΚΠΕ-Ο¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται ενδεικτικά η απορρύθμιση και ο ρόλος ορισμένων microRNAs στον ΚΠΕ-Ο.

microRNAs	Έκφραση	Γονίδιο-Στόχος	Χαρακτηριστικά
miR-17	↑	PTEN	Διήθηση, μετανάστευση
miR-18a	↑	ATM	Επιδιόρθωση DNA
miR-19a	↑	TIA1	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση
miR-19-b	↑	ITGB8	Αύξηση όγκου και Μετάσταση
miR-20a	↑	GABBR1, SMAD4, SENP1	Πολλαπλασιασμός, Απόπτωση, Διήθηση, Μετανάστευση, Χημειο-αντίσταση
miR-21	↑	PDCD4	Διήθηση, μετανάστευση
miR-27b	↓	VEGF, Rab3D	Πολλαπλασιασμός, Αγγειογένεση, EMT
miR-30a	↓	Metadherin	Διήθηση, μετανάστευση
miR-31	↑	RASA1	Αύξηση όγκου, Πολλαπλασιασμός
miR-34a	↓	Sirt1, E2F3	Χημειο-αντίσταση
miR-92a	↑	PTEN	Διήθηση, μετανάστευση
miR-96	↑	FOXO3A, UBE2N, XIAP, REV1, RAD51	Αύξηση όγκου, Πολλαπλασιασμός, Χημειο-ευαισθησία, Απόπτωση
miR-99a	↓	KRAS	Αντίσταση στη θεραπεία
miR-101	↓	COX-2, ZEB1	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση
MiR-126	↓	PI3K, VCAM-1, CXCR4, VEGFA, IRS1, RhoA	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση, Κυτταρικός Κύκλος, Αγγειογένεση
miR-128	↓	Sirt1	Απόπτωση
miR-135a/b	↑	APC, hMLH1, hMSH2	Πολλαπλασιασμός
miR-143/145	↓	IGF1R, CD44, KLF5, KRAS, BRAF	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση, Απόπτωση, Αγγειογένεση, Χημειοαντίσταση
miR-149	↓	FOXO1	Διήθηση και μετανάστευση
miR-155	↑	MSH6, MLH1, FOXO3a, HuR	Αγγειογένεση, Αντίσταση στη θεραπεία, Γενωμική αστάθεια, EMT
miR-198	↓	ADAM28	Πολλαπλασιασμός
miR-200c	↑	ZEB1, ETS1, FLT1, PTEN	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση, Μετάσταση, EMT
miR-210	↑	RBM3	Αγγειογένεση, Επιδιόρθωση DNA
miR-214	↑	PTEN, PDLIM2	Φλεγμονή

miR-224	↑	SMAD4, p21, PHLPP1, PHLPP2, GSK-3β	Πολλαπλασιασμός, Μετάσταση, ογκογένεση, Χημειο-Ακτινο-ευαισθησία
miR-296	↓	ARRB1	Αύξηση όγκου, Απόπτωση
miR-301a	↑	TGFBR2	Διήθηση, μετανάστευση, Λεμφαδενική μετάσταση
miR-383	↓	PAX6	Πολλαπλασιασμός και Διήθηση
miR-410	↑	DKK-1	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση, Διήθηση
miR-452	↑	GSK3β	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση
miR-598	↑	INPP5E	Πολλαπλασιασμός, Κυτταρικός κύκλος
miR-769	↓	CDK1	Πολλαπλασιασμός, Απόπτωση, Διήθηση, Μετανάστευση
miR-3666	↓	SATB2	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση, Διήθηση
miR-7702	↓	TADA1	Διήθηση, μετανάστευση
Let-7	↓	KRAS	Πολλαπλασιασμός

Πίνακας 1: Ο ρόλος ενδεικτικών microRNAs στον κολοροθικό καρκίνο^{156,157}.

Όπως φαίνεται παραπάνω πολλά miRNAs παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του μεταστατικού δυναμικού του όγκου, είτε θετικά, λειτουργώντας ως ογκογονίδια είτε αρνητικά λειτουργώντας ως ογκοκατασταλτικά. Αυτά δρουν ως τροποποιητές μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. c-MYC (avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog), STAT (signal transducer and activator of transcription), E2F1 (E2F transcription factor 1), ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1), ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2) κ.α.) καθώς και γονιδίων ρύθμισης μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ύλης (MMPs). Επίσης αρκετά miRNAs, όπως η οικογένεια των miR-200, έχουν συσχετιστεί με την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT)^{156,157}.

Εκτός όμως από την εκτενή έρευνα σχετικά με την διαφορική έκφραση των miRNAs, αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν εστιάσει και στην συσχέτιση πολυμορφισμών που μπορεί να επιδρούν στη βιογένεση των miRNAs και την αναγνώριση των γονιδίων-στόχων τους, συνεισφέροντας έτσι στις διαδικασίες καρκινογένεσης, διήθησης και μετάστασης. Η ποικιλομορφία του ανθρώπινου DNA σχετίζεται με την ύπαρξη μονονουκλεοτιδικών

πολυμορφισμών (Single nucleotide polymorphisms-SNPs), σε ποσοστό >90%. Αυτοί διακρίνονται σε κωδικούς (cSNPs) και μη κωδικούς (ncSNPs) ανάλογα με το αν εντοπίζονται σε κωδικές περιοχές ή όχι. Απαντώνται σε συχνότητα ~1/1000 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνουν μια σημειακή μεταλλαγή σε μια θέση του γονιδιώματος. Οι ncSNPs είναι πολύ πιο συχνοί σε σχέση με τους cSNPs και επιδρούν σημαντικά στη δομή της χρωματίνης και τη γονιδιακή ρύθμιση εν γένει. Οι ncSNPs μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφή γειτονικών γονιδίων μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως μεταβάλλοντας τη συνάφεια σύνδεσης για τη μεταγραφή, τη μεθυλίωση του προαγωγέα καθώς και τις λειτουργίες άλλων ρυθμιστικών στοιχείων¹⁵⁸.

Το 2008, ο Glinsky ανέδειξε το σημαντικό ρόλο μεταξύ των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε miRNAs και την ανάπτυξη νόσων¹⁵⁹. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σχετιζόμενοι με miRNAs μπορεί να εντοπιστούν σε γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs, σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν στοιχεία του μηχανισμού επεξεργασίας των miRNAs (pri-, pre-miRNA), καθώς και σε επίπεδο αλληλεπίδρασης miRNA-mRNA (σε θέσεις πρόσδεσης των miRNAs στα αγγελιοφόρα RNA-στόχους)¹⁶⁰.

Σε αυτό το πλαίσιο, τα τελευταία χρόνια πολυάριθμες μελέτες έχουν μελετήσει την ύπαρξη πολυμορφισμών σε miRNAs ως παράγοντες κινδύνου εμφάνισης, πρόγνωσης και αντίστασης στη θεραπεία του κολορθικού καρκίνου^{161,162}. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται ορισμένοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε σχετιζόμενα με κολορθικό καρκίνο επιλεγμένα miRNAs και διάφορες συσχετίσεις με τον κίνδυνο εμφάνισης και την πρόγνωση ΚΠΕ-Ο.

miRNA	Πολυμορφισμός	Συσχέτιση	Reference
let-7	rs10877887	Ο γονότυπος CT/CC vs. TT συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση	[163]

	rs712	Ομόζυγα άτομα TT vs GG διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης CRC	[164]
miR-608	rs4919510	rs4919510 C > G συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση και συνολική επιβίωση	[163]
miR-378	rs1076064	Ο γονότυπος AG vs. AA συσχετίζεται με καλύτερη συνολική επιβίωση	[163]
miR-423	rs6505162	Οι γονότυποι AC και AC/AA συσχετίζονται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής νόσου-RFS	[163]
miR-146	rs2910164	Οι γονότυποι GG vs. GC+CC συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου-DFS	[163]
		Οι γονότυποι CC/CG έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερη πιθανότητα σύγχρονων ηπατικών μεταστάσεων	[165]
		Ομόζυγα άτομα GG vs CC διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης CRC	[164]
mir-149	rs2292832	Ο γονότυπος TT vs CC/CT έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης CRC	[166]
		Οι γονότυποι CT vs. TT, CC vs. TT CT+CC vs. TT και CC vs. CT+TT έχουν συσχετιστεί με καλύτερη συνολική επιβίωση-OS	[165]
miRNA-34b/c	rs4938723	Ετερόζυγα άτομα TC vs CC διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης CRC	[164]

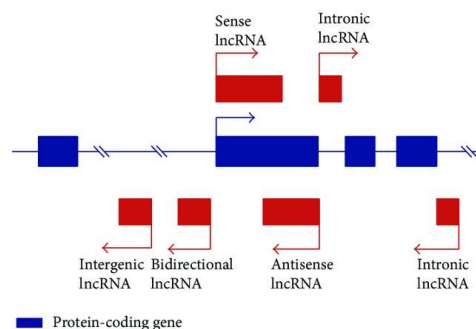
Πίνακας 2: Συσχετισμοί ανάμεσα σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια που κωδικοποιούν σχετιζόμενα με CRC miRNAs βάσει πρόσφατων μετααναλύσεων

10.2 LncRNAs ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Σε αντίθεση με τα μικρά μη κωδικά RNAs, (miRNAs, siRNAs, piRNAs), στα ncRNA ανήκουν και τα long non coding RNAs (lncRNAs) τα οποία παρουσιάζουν μικρότερο βαθμό συντήρησης και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετά-

μεταγραφικό επίπεδο. Τα long non coding RNAs είναι μεγαλύτερα από 200 νουκλεοτίδια και αποτελούν >80% των ncRNAs των θηλαστικών.

Ανάλογα με τον γενετικό τόπο από τον οποίο προέρχονται, τα lncRNAs διακρίνονται σε α) νοηματικά (sense) και αντινοηματικά (antisense) τα οποία προέρχονται από περιοχές που επικαλύπτονται με ένα ή και περισσότερα εξώνια ενός άλλου μεταγράφου, στο νοηματικό και αντινοηματικό κλώνο αντίστοιχα β) αμφίδρομα (bidirectional) όταν βρίσκεται σε γενωμική εγγύτητα με κάποιο γειτονικό κωδικό μετάγραφο του αντίθετου κλώνου DNA γ) ιντρονικά (intronic) όταν προκύπτουν από το ιντρόνιο ενός άλλου γονιδίου δ) διαγονιδιακά (intergenic) όταν προκύπτουν από μία περιοχή του γονιδιώματος η οποία βρίσκεται εντός του διαστήματος μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες^{163,164} (Εικόνα 17). Τα γονίδια των lncRNAs ομοιάζουν με αυτά των mRNAs και στη μεταγραφή τους εμπλέκεται η RNA πολυμεράση II¹⁶⁵.



Εικόνα 17¹⁶⁶: Κατηγοριοποίηση των lncRNAs αναλογα με τον γενετικό τόπο προέλευσής τους

Επιπρόσθετα, τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει των λειτουργιών τους στην γονιδιακή έκφραση και κυτταρική ομοίωση, στις τέσσερις βασικές παρακάτω κατηγορίες¹⁶⁷ (Εικόνα 18):

α) Μοριακά σήματα (Signals): Ορισμένα lncRNAs παρουσιάζουν κυτταροειδικότητα και ενεργοποιούνται ως απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, υποδηλώνοντας ότι η έκφρασή τους υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο. Έτσι, θεωρούνται ως ρυθμιστές έκφρασης άλλων

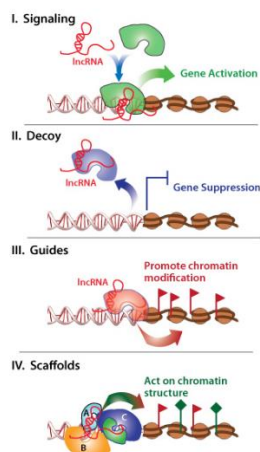
γονιδίων δεδομένου ότι η μεταγραφή τους εξαρτάται από συγκεκριμένα σήματα και σε συγκεκριμένους χρόνους.

β) Μοριακά δολώματα (Decoys): Δρουν ελέγχοντας τη δράση παραγόντων μεταγραφής και έτσι εμποδίζουν ή ευνοούν την αλληλεπίδραση θέσεων ελέγχου του DNA με πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Ως μοριακά δολώματα, προσδέονται πρωτεΐνες-καταλύτες του κυτταρικού κύκλου, απομακρύνοντάς τες από τους υποκινητές γονιδίων-στόχων, ρυθμίζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση.

γ) Καθοδηγητές (Guides): Ορισμένα lncRNAs προσδέονται σε πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση όπως οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες, σχηματίζοντας σύμπλοκα (RNA-πρωτεΐνης), κατευθύνοντάς τες σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους. Έτσι ρυθμίζουν τη μεταγραφή ή τη δομή της χρωματίνης. Ανάλογα με την εγγύτητά τους στα γονίδια τα οποία μπορούν να δράσουν διακρίνονται σε cis (τοπική δράση σε κοντινά γονίδια από την περιοχή που εκφράζονται και τα ίδια) και trans (δράση σε απομακρυσμένα γονίδια ή χρωμοσώματα).

δ) Ικρίωματα (Scaffolds): Ορισμένα lncRNAs δρουν ως «ικρίωματα» προσδέοντας διάφορα μόρια και έτσι ρυθμίζοντας έμμεσα μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών. Το lncRNA-ικρίωμα μπορεί να επιδράσει στη δομή της χρωματίνης επηρεάζοντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων ή να σταθεροποιήσει σύμπλοκα που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια.

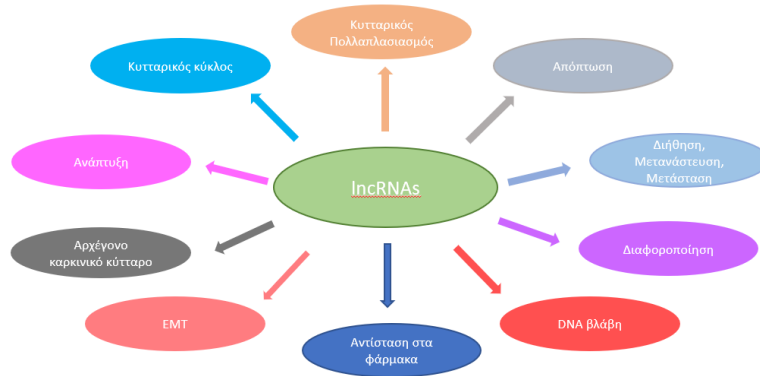
Αξίζει να αναφερθεί βέβαια πώς ένα lncRNA μπορεί να ανήκει σε παραπάνω από μία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες κατέχοντας πλειοτροπικές δράσεις στη γονιδιακή ρύθμιση.



Εικόνα 18¹⁶⁷: Κατηγορίες λειτουργικών lncRNAs

Ο ρόλος των lncRNAs στον ορθοκολικό καρκίνο έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια. Αρκετά lncRNAs φαίνεται ότι εμπλέκονται στην καρκινογένεση του ΚΠΕ-Ο, δρώντας ως ογκοκατασταλτικά ή ως ογκογονίδια αλλά και αλληλοεπιδρώντας με το DNA, RNA και πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, το CCAT1 βρέθηκε υπερεκφρασμένο στον καρκινικό ιστό, το αίμα και τα κόπρανα ασθενών με κολοορθικό καρκίνο και έχει προταθεί ως πιθανός διαγνωστικός βιοδείκτης¹⁶⁸. Επιπλέον, ο Zhao και συνεργάτες, το πρότειναν ως προβλεπτικό βιοδείκτη για το screening ΚΠΕ-Ο, λόγω της υψηλής έκφρασής του στο πλάσμα ασθενών¹⁶⁸. Δεδομένα από αρκετές έρευνες καταδεικνύουν τη συμμετοχή τους σε ένα ανταγωνιστικό ενδογενές δίκτυο RNA, για miRNAs που εμπλέκονται στην ογκογένεση και εξέλιξη του ορθοκολικού καρκίνου¹⁶⁹. Τα αποτελέσματα μιας μελέτης της ομάδας του Zheng και συνεργατών, έδειξαν ότι η υπερέκφραση του MALAT1 σε CRC ιστούς παρουσιάζει θετική συσχέτιση με δυσμενή πρόγνωση ασθενών σταδίου II και III¹⁷⁰. Ομοίως, ένα άλλο ευρέως γνωστό lncRNA, το HOTAIR, έχει συσχετιστεί με αυξημένο δυναμικό μετάστασης και κακή πρόγνωση. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφρασή του σχετίζεται με σταδίου IV κολοορθικό καρκίνο και αυξημένα επίπεδα έχουν συσχετιστεί με την ύπαρξη ηπατικών μεταστάσεων¹⁷¹. Επιπλέον, καταστολή της έκφρασης του HOTAIR φαίνεται να αναχαιτίζει το μεταστατικό δυναμικό, μέσω της αναστολής των CRC CD133⁺ καρκινικών βλαστικών κυττάρων¹⁷².

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που πραγματεύονται την απορρύθμιση lncRNAs στον ορθοκολικό καρκίνο και την επίδρασή τους στη νόσο. Στην εικόνα 19 συνοψίζονται οι λειτουργίες και οι ρόλοι τους στον ΚΠΕ-Ο και τα σημαντικότερα από αυτά αναφέρονται στον Πίνακα 3.



Εικόνα 19: Ο ρόλος των lncRNAs στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών. EMT: Epithelial to mesenchymal transition

lncRNA	Έκφραση	Χαρακτηριστικά	Στόχοι
ATB	↑	Διήθηση, προαγωγή EMT	E-cadherin, ZO-1, ZEB1, N-cadherin
BC200	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, προαγωγή EMT, αναστολή Απόπτωσης	STAT3, β-catenin
B3GALT5-AS1	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού, Διήθησης, προαγωγή EMT, αναστολή Απόπτωσης	miR-203, ZEB2, Snail
CASC15	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-4310, LGR5, Wnt/β-catenin
CASC19	↑	Μετανάστευση	N/A
CCAT1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Αντίσταση στα φάρμακα	c-Myc
CCAT2	↑	Μετάσταση	miR-145, WNT
CYTOR	↑	Διήθηση, Μετανάστευση, προαγωγή EMT	β-catenin/TCF
DACOR1	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού, επαγωγή DNA μεθυλίωσης	Cystathionine β-synthase

DMTF1v4	↑	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση, αναστολή Απόπτωσης	p-ERK, p-JNK, p-p38
ENST00000455974	↑	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση	JAG2
FAL1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, αναστολή Απόπτωσης	STAT3, TGF-β1, Bcl-2, p65, PCNA
FAM83H-AS1	↑	Προαγωγή Ογκογένεσης	TGF-β μονοπάτι
FER1L4	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού, Διήθησης, Μετανάστευσης	miR-106a-5p
GSEC	↑	Μετανάστευση	DHX36
HNF1A-AS1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, αναστολή Απόπτωσης	miR-34a/p53
HOTAIR	↑	Διήθηση, Μετανάστευση	E-cadherin, vimentin, MMP-9
HULC	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-613, RTKN, vimentin, N-cadherin, E-cadherin
H19	↑	Διήθηση, Μετανάστευση, Αντίσταση στα φάρμακα	miR138, HMGA1, miR-675-5p
Linc00973	/	Αντίσταση στα φάρμακα	N/A
Linc01106	↑	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση	miR-449b-5p, Gli
Linc01234	↑	Πολλαπλασιασμός	miR-642a-5p, SHMT2
Linc01567	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-93
Linc00261	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού, Διήθησης, επαγωγή Απόπτωσης, Αντίσταση στα φάρμακα	β-catenin, Wnt μονοπάτι
Linc00657	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού, Διήθησης, επαγωγή Απόπτωσης	CAPN7, PI3K/Akt
Linc01082	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού, Διήθησης, Μετανάστευσης	/
Linc01578	↑	Επαγωγή Μετάστασης	NF-κB, YY1
Linc02418	↑	Διήθηση, αναστολή Απόπτωσης	miR-34b-5p, Bcl-2
Lnc34a	↑	Πολλαπλασιασμός	Dnmt3a, PHB2,HDAC1
Loc285194	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού	miR-211
Loc441461	↑	αναστολή Απόπτωσης	PhoA, ROCK
LincDUSP	↑	Πολλαπλασιασμός, ρύθμιση απόκρισης σε βλάβη DNA, αναστολή απόπτωσης	ATR, p53, E2F, c- Myc

MALAT1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-129-5p, HMGB1, miR-663a
MYU	↑	Πολλαπλασιασμός, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	hnRNP-K, CDK6
PCAT6	↑	Πολλαπλασιασμός, αναστολή Απόπτωσης	EZH2, H3K4me3
Pint	↓	αναστολή Πολλαπλασιασμού	PRC2
PVT1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-26b, miR-30d-5p/RUNX2
RBM5-AS1	/		WNT, β-catenin
ROR	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-145
RP11-619 L19.2	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση, προαγωγή EMT	miR-1271-5p, CD164
SBDSP1	↑		p21, cyclin D1, Akt, ERK1/2, STAT3
SNHG1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση, αναστολή Απόπτωσης	Wnt/β-catenin, c-Myc, cyclin D
SNHG7	↑	Πολλαπλασιασμός, αναστολή Απόπτωσης	miR-193b, K-ras/ERK/cyclinD1
SNHG15	↑	Πολλαπλασιασμός, Μετανάστευση	Slug
SNHG17	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-375, CBX3
TUG1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, προαγωγή EMT, αναστολή Απόπτωσης	miR-26a-5p, MMP-14, VEGF, MAPK, Hsp27
XIST	↑	Πολλαπλασιασμός	miR-34a, Wnt, β-catenin cyclin D1, c-Myc, MMP-7
ZEB1-AS1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, Μετανάστευση	miR-455-3p, PAK2
ZFAS1	↑	Πολλαπλασιασμός, Διήθηση, προαγωγή EMT, αναστολή Απόπτωσης	ZEB1, E-cadherin, ZO-1, vimentin, N-cadherin

Πίνακας 3: Ο ρόλος ενδεικτικών lncRNAs στον κολοορθικό καρκίνο¹⁷³.

Επίσης, αρκετά lncRNAs έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη χημειοαντίστασης μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως επιγενετική ρύθμιση, αλληλεπίδραση με άλλα miRNAs και δρώντας ως ικριώματα ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση γονιδίων-στόχων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την αύξηση της διηθητικής ικανότητας και τη μετάσταση¹⁷⁴. Για παράδειγμα, το lncMEG3 έχει προταθεί ως πιθανός δείκτης ανταπόκρισης στην οξαλιπλατίνα, καθώς η έκφρασή του βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς ανθεκτικούς στη θεραπεία με οξαλιπλατίνα. Επίσης, μειωμένη έκφραση του lncRNA MEG3 στον ορό ασθενών με CRC βρέθηκε ότι αυξάνει τη χημειοαντίσταση και συσχετίστηκε με πτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, ο κύριος μηχανισμός σχετίζεται με το γεγονός ότι το MEG3 ενισχύει την επαγόμενη από οξαλιπλατίνα απόπτωση, συμβάλλοντας στην χημειοευαισθησία¹⁷⁵. Ένα ακόμα lncRNA, το UCA1 μειώνει τη χημειοευαισθησία στην 5-FU, λόγω αναστολής του miR-204-5p και μείωσης της 5-FU-επαγόμενης απόπτωσης. Σε αυτή την περίπτωση το UCA1 λειτουργεί ως ceRNA (competing endogenous RNA), δρώντας στον άξονα UCA1-miR-204-5p-CREB1/BCL2/RAB22A, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και χημειοαντίσταση του ΚΠΕ-Ο¹⁷⁶. Ομοίως, ο Lee και συνεργάτες, βρήκαν ότι αύξηση των επιπέδων του lncRNA snaR ενισχύει τον 5-FU- επαγόμενο κυτταρικό θάνατο¹⁷⁷, ενώ σε μια άλλη μελέτη το lncRNA TUG1 συσχετίστηκε με αντίσταση στη μεθοτρεξάτη μέσω του miR-186/CPEB2 άξονα¹⁷⁸.

Επιπλέον, η ύπαρξη πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου-SNPs σε lncRNA γονίδια έχει φανεί ότι μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην έκφραση και τη λειτουργία των lncRNAs με επακόλουθη επίδραση στην εμφάνιση, πρόγνωση και αντίσταση στη θεραπεία του καρκίνου¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Για παράδειγμα ο rs2839698 H19 πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ-Ο σε έναν Κινέζικο πληθυσμό¹⁸² και ο lncRNA GAS5 rs145204276 πολυμορφισμός έχει συνδεθεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ-Ο μέσω ρύθμισης

της έκφρασης του GAS5¹⁸³. Ομοίως, η ύπαρξη του GAS5 rs55829688 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο κολορθικού καρκίνου, μέσω υποέκφρασης του GAS5¹⁸⁴. Ο lncRNA PCAT1 rs2632159 φαίνεται ότι επίσης παίζει ρόλο στην εμφάνιση ΚΠΕ-Ο μέσω ρύθμισης παραγόντων μεταγραφής όπως ο EBF, LUN-1 και TCF12¹⁸⁵. Διάφοροι άλλοι SNPs που εντοπίζονται σε lncRNAs έχουν επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο όπως οι rs3807598, rs2067087, και rs17427960 του lncRNA HOTTIP, ο lnc-LAMC2-1:1 rs2147578, ενώ οι rs13252298 και rs1456315 στο lncRNA PRNCR1 φαίνεται να συνδέονται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠΕ-Ο¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

Οι παρατηρήσεις αυτές θέτουν τις βάσεις για νέους θεραπευτικούς χειρισμούς με εργαλεία νέους, μη παρεμβατικούς βιοδείκτες στη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της θεραπείας ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου-ορθού. Επιπλέον, η επιτυχής εφαρμογή των αρχικών ευρημάτων της βασικής έρευνας στην κλινική πράξη, θα μπορούσε να αναδείξει την ύπαρξη νέων μορίων-στόχων που δύνανται να δράσουν επικουρικά στην διατήρηση της χημειοευαισθησίας και την παράταση της ανταπόκρισης ασθενών με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο.

10.3 ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ MicroRNAs ΚΑΙ lncRNAs ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο μέρος της έρευνας έχει στραφεί στον προσδιορισμό κυκλοφορούντων ncRNAs, ως διαγνωστικούς, προγνωστικούς και δείκτες παρακολούθησης της θεραπείας. Τα ncRNAs εκκρίνονται από τόσο από φυσιολογικά όσο και από καρκινικά κύτταρα, σε διάφορα βιολογικά υγρά, όπως αίμα, αμνιακό υγρό, ούρα και σίελος, μέσω μεμβρανικών νανοκυστιδίων, γνωστά ως εξωσώματα. Τα εξωσώματα θεωρούνται βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής επικοινωνίας και αξίζει να σημειωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες εξωσωμάτων από ότι τα υγιή κύτταρα. Αν και η

σύνθεση και το περιεχόμενο των εξωσωμάτων εξαρτάται από το κύτταρο προέλευσης, συνήθως αποτελούνται από πρωτεΐνες, λιπίδια καθώς και από λειτουργικά μόρια RNA (π.χ. mRNA) αλλά και μη κωδικά RNAs, όπως miRNAs και τα lncRNAs.

Τα εξωσωμικά microRNAs δρουν κατόπιν πρόσδεσης σε υποδοχείς που ομοιάζουν με Toll (Toll-like receptors-TLR) και μεταφέρουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά από το προγονικό κύτταρο (parental cell) στο κύτταρο δέκτη. Έχει φανεί επίσης ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη χημειοαντίστασης και αντίσταση στην ακτινοβολία¹⁸⁹. Υπερέκφραση του miR-21 σε εξωσώματα απομονωθέντα από CRC κυτταρικές σειρές αλλά πλάσμα ασθενών, συσχετίστηκε με το στάδιο νόσου, την ύπαρξη ηπατικών μεταστάσεων, αλλά και την πρόγνωση^{190,191}. Εκτός από το miR-21, τα miR-17, -18a, -19a, -19b-1, -20a, 92a-1 και miR-1246, miR-27a, miR-130a έχουν προταθεί ως διαγνωστικοί βιοδείκτες^{192,193}. Αντίστοιχα, αρκετά εξωσωμικά RNAs (miR-96, miR-149, miR-486-5p, miR-8073, miR-193a) έχει φανεί ότι παίζουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στον ΚΠΕ-Ο¹⁹⁴⁻¹⁹⁸.

Συμπερασματικά, τα εξωσώματα αποτελούν ένα νέο, πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας, καθώς διαθέτουν μοναδικές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα τους στην κυκλοφορία και το επιλεκτικό «πακετάρισμα» με φορτίο που αντικατοπτρίζει ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Η μοριακή εξέλιξη του καρκίνου καθιστά απαραίτητη την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για την παρακολούθησή του και την ανάπτυξη ευαίσθητων στρατηγικών για έγκαιρη και μη παρεμβατική διάγνωση και παρακολούθηση της θεραπείας. Η υγρή βιοψία, μέσω της ανάλυσης των εξωσωμάτων, αποτελεί μια σχετικά καινούρια πρόταση και δίνει λύση στο πρόβλημα της ετερογένειας μιας νεοπλασίας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης ανάμεσα σε non coding RNA μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς και στην ανταπόκριση στη θεραπεία ασθενών που λαμβάνουν χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν την ιρινοτεκάνη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε τους τους microRNA πολυμορφισμούς rs11134527 miR-218 και rs1834306 miR-100 και τους long non-coding RNA πολυμορφισμούς rs4759314 HOTAIR και rs3200401 MALAT1 καθώς και την ύπαρξη K-RAS μετάλλαξης. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος ασθενών με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο καθώς και δείγματα αρχειακού νεοπλασματικού ιστού για ανάλυση της μοριακής τους υπογραφής. Επίσης, συγκεντρώθηκαν και συσχετίστηκαν δημογραφικά στοιχεία των ασθενών με τα αποτελέσματα αλλά και με υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε μετά την έγκριση από τα Επιστημονικά Συμβούλια του Αρεταιείου Νοσοκομείου και του ΓΟΝΚ «Οι Άγιοι Ανάργυροι». Οι ασθενείς σταχυολογήθηκαν βάσει των κριτηρίων επιλογής, ενημερώθηκαν και συμμετείχαν εθελοντικά μετά από ενυπόγραφη έντυπη συγκατάθεσή τους, σε εναρμόνιση με τον κώδικα ηθικής και Δεοντολογίας σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Οι συμμετέχοντες συναίνεσαν στη διάθεση βιολογικού τους υλικού (3ml περιφερικού αίματος ή/και καρκινικού ιστού εγκλεισμένου σε παραφίνη), την ακόλουθη επεξεργασία των βιολογικών τους δειγμάτων για την ταυτοποίηση ύπαρξης συγκεκριμένων πολυμορφισμών και μεταλλάξεων καθώς και τη συλλογή και χρήση κλινικών δεδομένων από τον ιατρικό τους φάκελο.

2. ΜΕΘΟΔΟΣ-ΥΛΙΚΑ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς πάσχοντες από ιστολογικά τεκμηριωμένο μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (mCRC). Η συλλογή των δειγμάτων ολικού περιφερικού αίματος έγινε κατά τα έτη 2005-2018. Όλοι οι ασθενείς έπρεπε να έχουν συμπληρώσει το δέκατο όγδοο έτος της ηλικίας τους και να έχουν λάβει χημειοθεραπευτικά σχήματα που συμπεριλάμβαναν φθοριοπυριμιδίνη και ιρινοτεκάνη με ή χωρίς της προσθήκη στοχευμένης θεραπείας (μονοκλωνικού αντισώματος: panitumumab, cetuximab ή bevacizumab ή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σύντηξης: aflibercept), ανεξάρτητα από τον προσδόκιμο χρόνο επιβίωσης. Η τεκμηρίωση του σταδίου βασίστηκε σε ιστολογικά (βιοψία μέσω κολονοσκόπησης ή χειρουργικής επέμβασης) και απεικονιστικά κριτήρια (αξονικές τομογραφίες θώρακα, άνω και κάτω κοιλίας και σε ορισμένες περιπτώσεις με μαγνητική τομογραφία άνω και κάτω κοιλίας). Επίσης, οι ασθενείς έπρεπε να έχουν επαρκή αιμοποιητική, ηπατική και νεφρική λειτουργία (Πίνακας 1).

Κριτήρια εισαγωγής

▶ Ηλικία > 18 ετών

▶ Ιστολογικά επιβεβαιωμένος μεταστατικός ορθοκολικός καρκίνος

▶ Επαρκής λειτουργία μυελού των οστών

WBC \geq 2.500/ μ L

ANC \geq 1.500/ μ L

PLTs \geq 100.000/ μ L

Hb \geq 10 g/dl

▶ Επαρκής νεφρική λειτουργία

Cr \leq 1.5x ULN

Πρωτεΐνη ούρων \leq 2g/24h

▶ Επαρκής ηπατική λειτουργία

Ολική χολερυθρίνη \leq 3mg/dl
AST (SGOT) και ALT(SGPT) \leq
2xULN

► Σχήματα με φθοριοπυριμιδίνη και ιρινοτεκάνη ± βιολογικό παράγοντα (panitumumab, cetuximab, bevacizumab ή aflibercept)

► Μετρήσιμη νόσος κατά την έναρξη της θεραπείας βάσει RECIST 1.1 κριτηρίων

Πίνακας 1: Κριτήρια εισαγωγής. WBC: αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, ANC: αριθμός ουδετερόφιλων, PLTs: αριθμός αιμοπεταλίων, Hb: αιμοσφαιρίνη, Cr: κρεατινίνη ορού, AST(SGOT): ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, ALT(SGPT): αμινοτρανσφεράση της αλανίνης ULN: ανώτερο επιτρεπτό όριο.

2.2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χορηγήθηκαν στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης ήταν τα εξής: XELIRI-BEVACIZUMAB (ιρινοτεκάνη, capecitabine και bevacizumab), XELIRI-PANITUMUMAB (ιρινοτεκάνη, capecitabine και panitumumab), FOLFIRI-BEVACIZUMAB (5-FU/λευκοβορίνη, ιρινοτεκάνη και bevacizumab), FOLFIRI-PANITUMUMAB (5-FU/λευκοβορίνη, ιρινοτεκάνη και panitumumab), FOLFIRI-AFLIBERCEPT (5-FU/λευκοβορίνη, ιρινοτεκάνη και aflibercept), FOLFIRI-CETUXIMAB (5-FU/λευκοβορίνη, ιρινοτεκάνη και cetuximab) και XELIRI-CETUXIMAB (ιρινοτεκάνη, capecitabine και cetuximab). Από το σύνολο των συμμετεχόντων 41 ασθενείς (39.1%) έλαβαν XELIRI-BEVACIZUMAB, 12 ασθενείς (11.4%) XELIRI-PANITUMUMAB, 23 ασθενείς (21,9%) έλαβαν FOLFIRI-BEVACIZUMAB, 16 ασθενείς (15.2%) έλαβαν FOLFIRI-PANITUMUMAB, 6 ασθενείς (5,7%) έλαβαν FOLFIRI-AFLIBERCEPT, 5 ασθενείς (4.8%) έλαβαν FOLFIRI-CETUXIMAB και 2 ασθενείς (1.9%) έλαβαν XELIRI-CETUXIMAB.

Τα θεραπευτικά πρωτόκολλα χορήγησης βασίστηκαν στις κατευθυντήριες οδηγίες της Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος⁷⁰. Πιο συγκεκριμένα το σχήμα XELIRI-BEVACIZUMAB χορηγούνταν ανά 21 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 210 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1,5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Bevacizumab 7.5 mg/kg, ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 0.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Capecitabine 850 mg/m² από του στόματος, BID, τις ημέρες 1-14 του κύκλου θεραπείας

Το σχήμα XELIRI-PANITUMUMAB χορηγούνται ανά 21 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 210 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1,5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Panitumumab 9 mg/kg, ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 0.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Capecitabine 850 mg/m² από του στόματος, BID, τις ημέρες 1-14 του κύκλου θεραπείας

Το σχήμα FOLFIRI-BEVACIZUMAB χορηγούνται ανά 15 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 180 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1,5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Λευκοβορίνη 400 mg/ m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 400 mg/ m², bolus ενδοφλεβίως την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Bevacizumab 5 mg/kg, ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 0.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 2400 mg/ m², συνεχής ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 46 h, την ημέρα 1 και 2 του κύκλου θεραπείας

Το σχήμα FOLFIRI-PANITUMUMAB χορηγούνταν ανά 15 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 180 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1,5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Λευκοβορίνη 400 mg/ m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 400 mg/ m², bolus ενδοφλεβίως την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Panitumumab 6 mg/kg, ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 0.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 2400 mg/ m², συνεχής ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 46 h, την ημέρα 1 και 2 του κύκλου θεραπείας

Το σχήμα FOLFIRI-AFLIBERCEPT χορηγούνταν ανά 15 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 180 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Λευκοβορίνη 400 mg/ m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 400 mg/ m², bolus ενδοφλεβίως την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Aflibercept 4 mg/kg, ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1-2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 2400 mg/ m², συνεχής ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 46 h, την ημέρα 1 και 2 του κύκλου θεραπείας

Το σχήμα FOLFIRI-CETUXIMAB χορηγούνταν ανά 15 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 180 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1,5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας

- Λευκοβορίνη 400 mg/ m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 2 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- 5-FU 400 mg/ m², bolus ενδοφλεβίως την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Cetuximab 250 mg/m² ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας, εβδομαδιαίως
- 5-FU 2400 mg/ m², συνεχής ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 48 h, την ημέρα 1 και 2 του κύκλου θεραπείας

Το σχήμα XELIRI-CETUXIMAB χορηγούνταν ανά 21 ημέρες ως εξής:

- Ιρινοτεκάνη 210 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1.5 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας
- Cetuximab 250 mg/m², ενδοφλέβια έγχυση (σε 250 ml N/S 0.9%), διάρκειας 1 h, την ημέρα 1 του κύκλου θεραπείας, εβδομαδιαίως
- Capecitabine 850 mg/m² από του στόματος, BID, τις ημέρες 1-14 του κύκλου θεραπείας

Η πρώτη χορήγηση του bevacizumab και panitumumab διαρκούσε 90 min και αν ήταν καλώς ανεκτή από τον ασθενή οι επακόλουθες εγχύσεις είχαν διάρκεια 60 ή 30 min. Σε καμία περίπτωση η έγχυση δεν ήταν μικρότερη από 30 min. Η πρώτη δόση (loading dose) του cetuximab ήταν 400 mg/m² με διάρκεια έγχυσης κατά προσέγγιση 2 ώρες ενώ κάθε επόμενη δόση ήταν 250mg/m² με διάρκεια έγχυσης 1 ώρα. Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού σχήματος συνεχιζόταν μέχρι την εξέλιξη της νόσου ή την εμφάνιση μη αποδεκτής τοξικότητας, με μέγιστη διάρκεια τους 12 κύκλους. Στη συνέχεια, η χορήγηση του βιολογικού παράγοντα μπορεί να συνεχιζόταν ως θεραπεία συντήρησης. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται τα θεραπευτικά σχήματα που χορηγήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Σχήμα	Αριθμός ασθενών	Irinotecan	Capecitabine	Bevacizumab	Panitumumab	5-FU	Leucovorin	Cetuximab	Aflibercept
XELIRI-BEVACIZUMAB	41	✓	✓	✓					
XELIRI-PANITUMUMAB	12	✓	✓		✓				
FOLFIRI-BEVACIZUMAB	23	✓		✓		✓	✓		
FOLFIRI-PANITUMUMAB	16	✓			✓	✓	✓		
FOLFIRI-AFLIBERCEPT	6	✓				✓	✓		✓
FOLFIRI-CETUXIMAB	5	✓				✓	✓	✓	
XELIRI-CETUXIMAB	2	✓	✓					✓	

Πίνακας 2: Θεραπευτικά σχήματα που έλαβαν οι ασθενείς

2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ

Τα δείγματα αίματος για τη μελέτη συσχέτισης των πολυμορφισμών miR-100 rs1834306, miR-218 rs11134527, rs3200401 MALAT1 και rs4759314 HOTAIR με την ανταπόκριση των ασθενών στους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με ιρινοτεκάνη, συλλέχθηκαν 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).

Η συλλογή των δειγμάτων νεοπλασματικού ιστού ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της χειρουργικής εξαίρεσης ή κατά τη διάρκεια βιοψίας μέσω κολονοσκόπησης. Οι βιοψίες ή τμήματα των εξαιρεθέντων ιστών απεστάλησαν για παθολογοανατομική εξέταση. Ακολούθως τα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και εγκλείστηκαν σε παραφίνη ή καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την απομόνωση του DNA.

2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση του συστήματος NucleoSpin Blood Kit (Macherey-Nagel, Germany), βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή¹⁹⁹.

Με την εν λόγω μέθοδο επιτυγχάνεται απομόνωση υψηλής καθαρότητας DNA από ολικό αίμα, ορό πλάσμα και άλλα βιολογικά υγρά. Συνοπτικά, η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω επώασης του ολικού περιφερικού αίματος σε διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε χαοτροπικά άλατα, παρουσία πρωτεΐνάσης K. Η πρόσδεση του DNA στη στήλη πυριτίου επιτυγχάνεται μέσω προσθήκης αιθανόλης και αποτελεί αντιστρεπτή και ειδική διαδικασία ως προς τα νουκλεϊκά οξέα. Η διαδοχική έκπλυση της στήλης με δυο ρυθμιστικά διαλύματα εξασφαλίζει την απομάκρυνση επιμολύνσεων. Το καθαρό γενωμικό

DNA προκύπτει τελικά υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος σε ένα ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα έκλυσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1¹⁹⁹: Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA (Macherey-Nagel, Germany)

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα αίματος απαιτούνται έως 200 μL αίματος. Τα διαλύματα B3, BW, B5 και BE που αναφέρονται παρακάτω, παρέχονται από την εταιρία Macherey-Nagel, χωρίς να αναλύεται η σύνθεσή τους. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθούμε σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι τα εξής:

- Προσθήκη 25 μL πρωτεΐνάσης K σε 200 μL ολικού περιφερικού αίματος σε σωληνάρια φυγοκέντρησης 1.5 mL τύπου eppendorf.
- Προσθήκη 200 μL διαλύματος B3 στο δείγμα και έντονη ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) για 10-20 sec.
- Επώαση δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου και τακτική ανάδευση.
- Επώαση δειγμάτων στους 70 °C για 10–15 min.
- Προσθήκη 210 μL αιθανόλης (96-100%) στα δείγματα και έντονη ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).

- Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη πυριτίου η οποία είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο φυγοκέντρησης 1.5 mL τύπου Eppendorf και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.
- Αφαίρεση της στήλης και απομάκρυνση του διηθήματος. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο φυγοκέντρησης.
- Προσθήκη 500 μL διαλύματος BW στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.
- Αφαίρεση της στήλης και απομάκρυνση του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο φυγοκέντρησης.
- Προσθήκη 600 μL διαλύματος B5 στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.
- Αφαίρεση της στήλης και απομάκρυνση του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο φυγοκέντρησης.
- Φυγοκέντρηση της στήλης στις 11.000 στροφές για 1 min με στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας διαλυμάτων.
- Αφαίρεση της στήλης και απομάκρυνση του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο φυγοκέντρησης 1.5 mL τύπου eppendorf.
- Προσθήκη 100 μL θερμού διαλύματος BE (70 °C) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.
- Συλλογή του υποκείμενου διαλύματος το οποίο περιέχει το καθαρό απομονωμένο DNA, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για έλεγχο ποιότητας, φωτομέτρηση για προσδιορισμό της ποσότητας και καθαρότητας του DNA και αποθήκευση στους -20 °C.

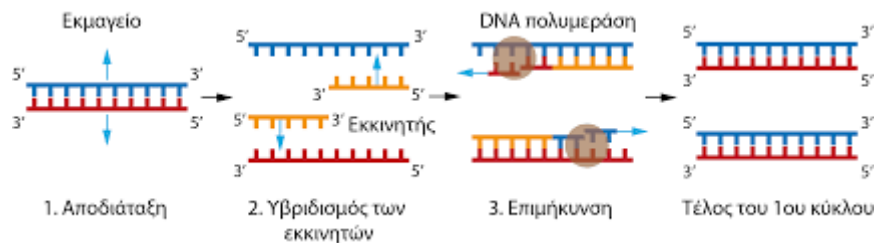
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Αφού ολοκληρωθεί η απομόνωση του DNA, ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός μιας μικρής ακολουθίας DNA (θραύσματος) σε πολλά αντίγραφα χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-Polymerase chain Reaction). Πρόκειται για μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο η οποία επιτρέπει *in vitro* τη γρήγορη ανάλυση ειδικών περιοχών DNA που περιέχονται σε ένα μικρό δείγμα²⁰⁰.

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μια μονόκλωνη αλυσίδα DNA ως καλούπι για τη σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', έχοντας ως αφετηρία ένα δίκλωνο τμήμα DNA. Το DNA αποδιατάσσεται (denaturation) σε θερμοκρασία ~95 °C. Η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην περιοχή-στόχο για ενίσχυση είναι σημαντική για την κατασκευή δύο συνθετικών, διαφορετικής αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμεύουν ως εκκινητές (primers) και είναι συμπληρωματικοί ως προς μια δεδομένη αλληλουχία του αντιγραφόμενου κλώνου. Οι εκκινητές υβριδίζονται υπό κατάλληλες συνθήκες στο σημείο έναρξης της αντιγραφής. Έτσι, η κατάλληλη επιλογή των εκκινητών [μήκος (συνήθως 18-22 βάσεις) και αλληλουχία] είναι σημαντική ώστε αποφεύγεται η πιθανότητα υβριδισμού με άλλες περιοχές του DNA, πέραν των επιθυμητών πέριξ του επιλεγμένου τμήματος-στόχου. Το DNA- στόχος πολλαπλασιάζεται με γεωμετρική πρόοδο σε κάθε κύκλο και έπειτα από πολλούς θερμικούς κύκλους είναι ανιχνεύσιμο. Στη μέθοδο PCR χρησιμοποιείται η Taq, μια θερμοφιλή DNA πολυμεράση που προέρχεται από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus Aquaticus*. Το πλεονέκτημα που προσδίδει το ένζυμο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι ανθεκτικό στις παρατεταμένες και συνεχείς συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (95°C) και έτσι δεν χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο.

Τα στάδια PCR απεικονίζονται στην εικόνα 2 και περιγράφονται παρακάτω:

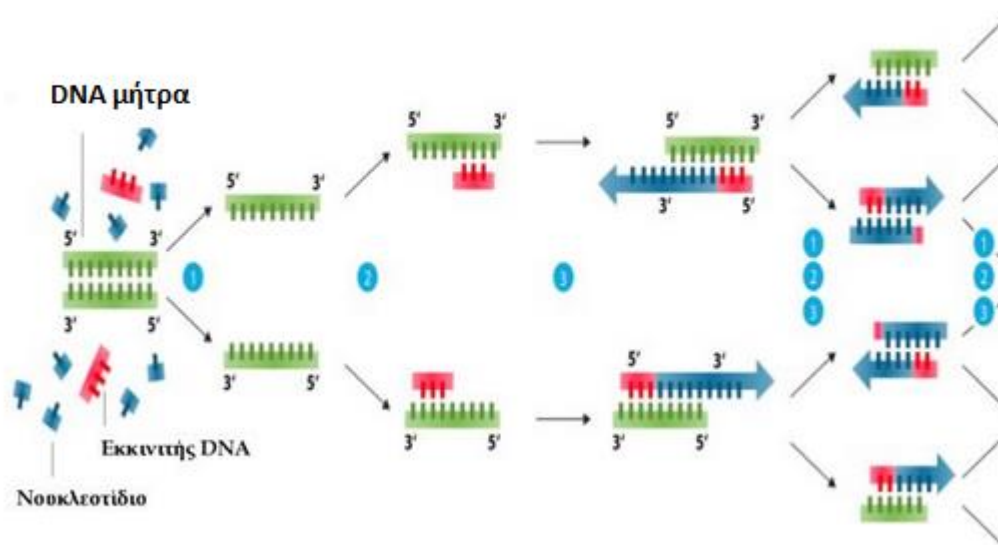
1. Αποδιάταξη (Denaturation) DNA-στόχου στους $\sim 95^{\circ}\text{C}$. Στο πρώτο στάδιο διάρκειας 20-30 sec, τα δίκλινα μόρια DNA αποχωρίζονται (σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις συμπληρωματικές αζωτούχες βάσεις) και προκύπτουν οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμοποιηθούν ως DNA μήτρες.
2. Υβριδισμός (Annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται σε βαθμό που εξαρτάται από τις ιδιότητες των εκκινητών, ώστε να προσδεθούν στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η σχέση που καθορίζει την θερμοκρασία εξειδίκευσης προσδιορίζεται από τη σχέση $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$. Ο υβριδισμός κάθε εκκινητή με τον συμπληρωματικό κλώνο πραγματοποιείται έτσι ώστε το 3'-OH άκρο του να είναι στραμμένο το ένα προς το άλλο. Το στάδιο αυτό διαρκεί 20-45 sec.
3. Επιμήκυνση (Elongation) των υβριδισμένων εκκινητών: Η θερμοκρασία προσαρμόζεται στους 72°C , η οποία θεωρείται βέλτιστη για τη δράση της Taq πολυμεράσης ώστε να σχηματιστούν οι νέοι θυγατρικοί κλώνοι DNA. Το στάδιο αυτό διαρκεί 0,5-3 min.



Εικόνα 2: Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-Polymerase chain Reaction).

Τα μόρια DNA που προκύπτουν από κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται ως μήτρες για τον επόμενο κύκλο και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για 25-40 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση των αντιγράφων (Εικόνα 3).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)



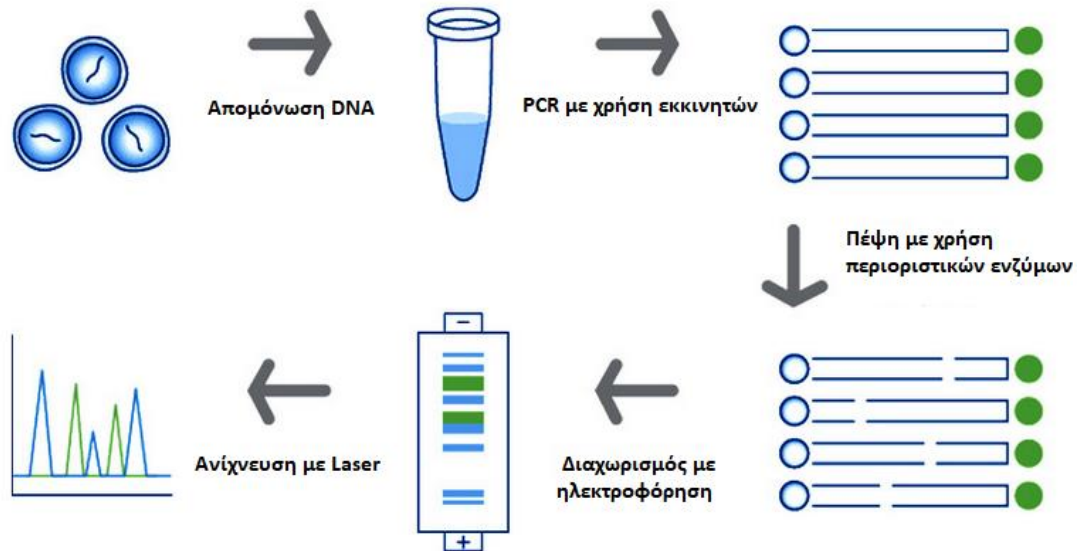
Εικόνα 3: Τεχνητή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase chain Reaction).

2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ (RFLP)

Για τη γονοτύπηση των πολυμορφισμών rs11134527 miR-218 και rs1834306 miR-100 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP. Σε αυτό το υποκεφάλαιο θα αναφερθούμε στη μέθοδο RFLP καθώς η PCR αναλύθηκε στις προηγούμενες παραγράφους.

Η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism) βασίζεται στην ικανότητα περιοριστικών ενδονουκλεασών (restriction enzymes) να αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες DNA των PCR προϊόντων, γνωστές ως θέσεις περιορισμού (restriction sites) και να πέττουν το μόριο μέσα ή πλησίον της αλληλουχία αναγνώρισης²⁰¹ (Εικόνα 4). Ουσιαστικά πρόκειται για την ενζυμική κατάτμηση δίκλωνων μορίων DNA με στόχο την ανίχνευση γονοτύπων ως προς έναν πολυμορφισμό. Οι θέσεις περιορισμού αποτελούνται συνήθως από 4-8 νουκλεοτίδια και είναι συνήθως παλίνδρομες, δηλαδή είναι θέσεις όπου η αλληλουχία στον κάθε κλώνο είναι η ίδια όταν διαβιβάζεται με κατεύθυνση 5'-3'. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες υδρολύουν τους

φωσφοδιεστερικούς δεσμούς δημιουργώντας περιοριστικά θραύσματα (restriction fragments) και η δραστηρότητά τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες (π.χ. pH, θερμοκρασία αντίδρασης πέψης κλπ).



Εικόνα 4²⁰¹: PCR και RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism

Οι γονοτυπικές αναλύσεις που γίνονται με τη μέθοδο PCR-RFLP περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

1. Ενίσχυση με PCR του υπό μελέτη τμήματος DNA (τμήμα που φέρει έναν σημειακό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό- SNP-single nucleotide polymorphism)
2. Επώαση του προϊόντος της αντίδρασης σε κατάλληλη θερμοκρασία και κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση.
3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης και διαχωρισμός θραυσμάτων.

Στην παρούσα μελέτη η γονοτύπηση των rs11134527 miR-218 G/A και rs1834306 miR-100 C/T πολυμορφισμών έγινε με την περιγραφόμενη μέθοδο, χρησιμοποιώντας σετ εκκινητών (primers) που αναφέρονται στον Πίνακα 3. Σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης PCR

0.20 ml, προστέθηκαν 1 μ L γενωμικού DNA (~100 ng/ml), 1 μ L κάθε εκκινητή (10 μ M), 10 μ L 2X Prime Taq Premix (Genet Bio, Korea) και 7 μ L απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Κατόπιν της αποδιάταξης στους 95 °C για 5 min, ακολούθησαν 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, υβριδισμός σε κατάλληλη θερμοκρασία για 30 sec επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών στους 72 °C για 30 sec, ενώ ο τελικός κύκλος έγινε στους 72 °C για 5 min. Πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι PCR στους 95 °C για 5 min, στους 95 °C για 40 sec, στους 60 °C για 40 sec και στους 72 °C για 40 sec, ενώ ο τελικός κύκλος έγινε στους 72 °C για 5 min. Στη συνέχεια ακολούθησε πέψη του τελικού προϊόντος (10 μ L) με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων που αναφέρονται στον Πίνακα 5. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή αγαρόζης η οποία περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο ως UV ετικέτα φθορισμού. Για τον ποιοτικό έλεγχο της διαδικασίας, επαναλήφθηκε η διαδικασία της γονοτύπησης στο 20% περίπου των δειγμάτων και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) ανήλθε στο 100%.

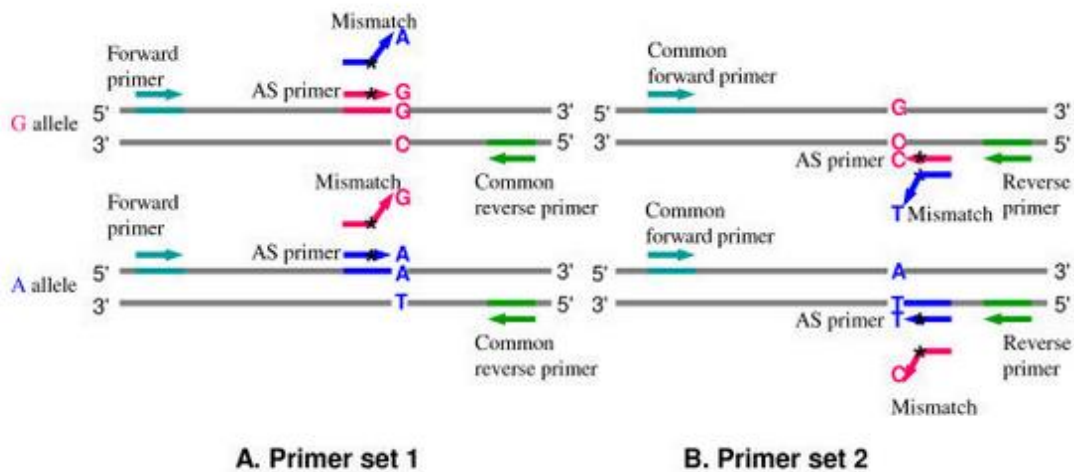
Για τον πολυμορφισμό rs11134527 miR-218 τα θραύσματα των 252 bp ήταν ενδεικτικά ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο G, ενώ τα θραύσματα 144 bp και 108 bp ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο A. Αντίστοιχα, για τον πολυμορφισμό rs1834306 miR-100 τα θραύσματα των 473 bp ήταν ενδεικτικά ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο C, ενώ τα θραύσματα 268 bp και 205 bp ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T (Πίνακας 3).

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	Στήλη1	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ	ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ENZYMO	ΘΡΑΥΣΜΑ
MiR-218 rs11134527	Εμπρόσθιος (Forward)	5'- AGCGACTGGTCAGAGTCAAGG -3'	67 °C	HinIII	G allele:252
	Ανάστροφος (Reverse)	5'- CCTGAAGCTCCCGAGTATGGG-3			A allele: 144+108
MiR-100 rs1834306	Εμπρόσθιος (Forward)	5'- GCATTTGGGCTCTCATGTGTTC-3'	61 °C	TaII	C allele: 473
	Ανάστροφος (Reverse)	5'- CAGGTCCGTGAGATTGCCT-3'			T allele: 268+205

Πίνακας 3: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση miRNA πολυμορφισμών

2.7 ΑΛΛΗΛΟΕΙΔΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Allele Specific PCR, AS-PCR)

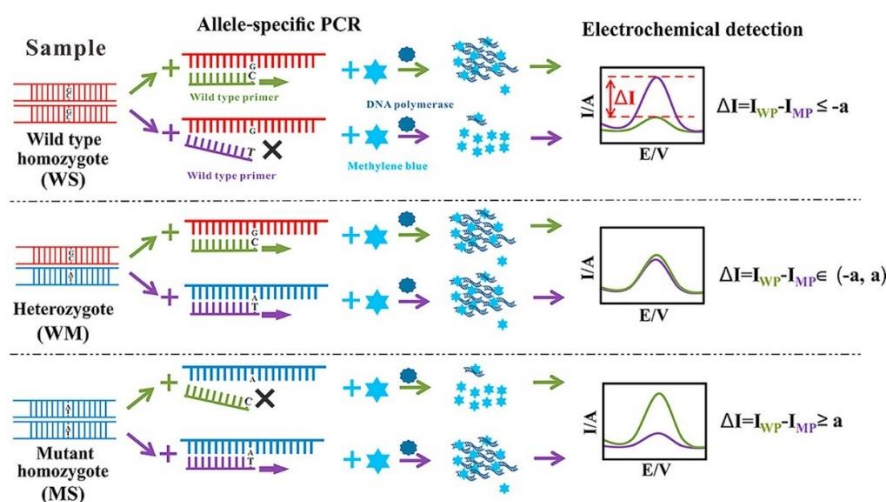
Για τον προσδιορισμό των γονοτύπων για τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς HOTAIR rs4759314 και MALAT1 rs3200401 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλληλοειδικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Πρόκειται για μια τεχνική που βασίζεται στην PCR και η βασική της σχετίζεται με την αδυναμία επιμήκυνσης της αλληλουχίας στόχου από την πολυμεράση, λόγω αδυναμίας ζευγαρώματος του τελευταίου νουκλεοτιδίου στο 3' άκρο του ευθέως ή του αντίστροφου εκκινητή με την αλληλουχία – στόχο. Για τη συγκεκριμένη μέθοδο σχεδιάζονται ειδικοί εκκινητές που επιτρέπουν την επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων από την DNA πολυμεράση μόνο όταν το 3' νουκλεοτίδιο του εκκινητή είναι απόλυτα συμπληρωματικό με τη βάση αλληλουχίας άγριου τύπου (wild type) ή με την αλληλουχία που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη (Εικόνα 5). Οι βασικές αρχές της μεθόδου απεικονίζονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 5²⁰²: Σχεδιασμός εκκινητών για allele specific PCR.

Έτσι, για την πραγματοποίηση μιας Allele Specific PCR αντίδρασης χρειάζονται τρεις εκκινητές. Δύο προς τη μία κατεύθυνση, ο καθένας με το 3' τελευταίο νουκλεοτίδιο να

αντιστοιχεί σε ένα αλληλόμορφο της πολυμορφικής θέσης, και ένας εκκινητής αντίστροφης φοράς. Συνεπώς, για κάθε δείγμα, πραγματοποιούνται ταυτόχρονα δύο αντιδράσεις PCR και ο γονότυπος ταυτοποιείται ανάλογα σε ποια από τις δύο αντιδράσεις θα παραχθεί προϊόν. Το αποτέλεσμα προκύπτει έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, με απεικόνιση UV²⁰³.



Εικόνα 6²⁰⁴: Αρχές της allele specific PCR.

Στην παρούσα διατριβή η γονοτύπηση του HOTAIR rs4759314 πραγματοποιήθηκε με την αναφερόμενη τεχνική, με τη βοήθεια του KAPA Taq PCR kit, [(KAPA Biosystems Pty (Ltd)] και ένα σετ εκκινητών για G και A αλληλόμορφα. Ομοίως η γονοτύπηση του MALAT1 rs3200401 πραγματοποιήθηκε με AS-PCR και σετ εκκινητών για C και T αλληλόμορφα. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα περιεκτικότητας 2% αγαρόζη-98% TAE (1% TAE gel) και τέλος, αναλύθηκαν σε σύστημα απεικόνισης UV (Πίνακας 4).

Πολυμορφισμός	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή
MALAT1	Εμπρόσθιος	5'-AGTGAGTGTATGAGACCTTGC-3'
rs3200401	Ανάστροφος C	5'-CTTGCCAACAGAACAGACAG-3'
	Ανάστροφος T	5'-GCCAACAGAACAGACAAA-3'

HOTAIR	Εμπρόσθιος	5'-GAGAGAAGCCAAATACACACA-3'
rs4759314	Ανάστροφος A	5'-TTTATTAACCTTGCATCCGCT-3'
	Ανάστροφος G	5'-TTTATTAACCTTGCATCCGCC-3'

Πίνακας 4: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τους lncRNA πολυμορφισμούς και οι αλληλουχίες τους

2.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, της AS-PCR και της RFLP πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Πρόκειται για μια μέθοδο διαχωρισμού, απομόνωσης και ταυτοποίησης τμημάτων DNA, RNA και πρωτεϊνών. Η αγαρόζη αποτελεί έναν φυτικό πολυσακχαρίτη που σχηματίζει ένα πορώδες πήκτωμα μέσω του οποίου μετακινούνται ηλεκτρικά φορτισμένα μόρια ανάλογα το μοριακό βάρος τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα του πηκτώματος. Το DNA (αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH) κινείται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα η οποία εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τη συγκέντρωση του πηκτώματος το διάλυμα που χρησιμοποιείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα μόρια του DNA στο πήκτωμα σχηματίζουν ζώνες ταυτόσημης κινητικότητας, οι οποίες γίνονται ορατές σε υπεριώδες φως με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική ουσία) κατόπιν δέσμευσης στη διπλή έλικα του DNA. Για την παρούσα μελέτη το πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης ολικού DNA που ακολουθήθηκε είναι:

- Προσθήκη 2 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος Tris-Borate-EDTA (0.09M TrisHCl, 0.09M Boric Acid, 2.5mM EDTA, pH:8.3) συγκέντρωσης 1x
- Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως.
- Προσθήκη 10 μ L χρωστικής GelRed (10 mg/ml stock διάλυμα) ή EtBr (0.25 μ g/ml) και καλή ανάδευση
- Ψύξη του διαλύματος σε τρεχούμενο νερό βρύσης μέχρι 50-60°C

- Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο ηλεκτροφόρησης και αναμονή μέχρι να ψυχθεί και να δημιουργηθεί στερεό πήκτωμα
- Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Ανάμειξη 15 mL ολικού DNA με 2 μ L διαλύματος φόρτωσης (bromophenol blue) και τοποθέτηση του μείγματος στην κατάλληλη θέση του πηκτώματος
- Ρύθμιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης σε τάση 80 mV και χρόνο 1h
- Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους φωτός και φωτογράφιση του πηκτώματος με ψηφιακή κάμερα

2.9 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΤΑ ΚΩΔΙΚΟΝΙΑ 12 ΚΑΙ 13 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ KRAS

Τα βήματα που περιεγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.4 είναι κοινά για την απομόνωση γενωμικού DNA από ιστό και αίμα. Ωστόσο, για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12,13 του KRAS προηγήθηκε αποπαραφινοποίηση των δειγμάτων ιστών σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο (NucleospinTissue, Macherey-Nagel, Germany):

- Ζύγιση ~25 mg από τον ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη.
- Τοποθέτηση του ιστού σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 1 ml n-octane ή ξυλένιο
- Δυνατή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με παράλληλη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα
- Φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές για 3 min
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος
- Προσθήκη 1 ml αιθανόλης (96-100%) σε κάθε Eppendorf και ανάδευση αρκετές φορές
- Φυγοκέντρηση σε 11.000 στροφές για 3 min
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος

- Επανάληψη του βήματος με την πλύση με αιθανόλη (96-100%) και τη φυγοκέντρωση
- Επώαση των δειγμάτων στους 37 °C με ανοικτά καπάκια έως ότου εξατμιστεί η αιθανόλη από τα σωληνάρια (~ 15 min)

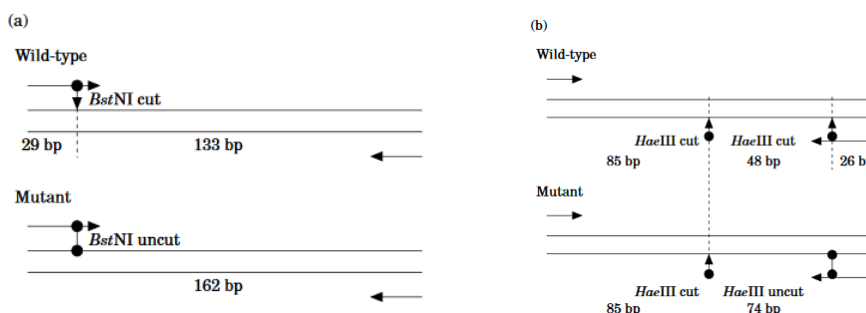
Με την έως τώρα διαδικασία ολοκληρώθηκε η απομόνωση του ιστού από την παραφίνη. Ακολουθούν τα βήματα απομόνωσης γενωμικού DNA από ιστό και αίμα, όπως περιεγράφηκαν αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο (2.3). Για την ανίχνευση των KRAS μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP, η οποία αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες. Πιο συγκεκριμένα, για την ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 και 13 του KRAS εισήχθη μια μη ομόλογη βάση στους εκκινητές που ανιχνεύουν το κάθε κωδικόνιο. Έτσι δημιουργήθηκε μια θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstN I για το κωδικόνιο 12 και HaeIII για το κωδικόνιο 13 αντίστοιχα. Η εισαγωγή αυτή πραγματοποιήθηκε διότι δεν υπάρχουν ενδογενώς θέσεις αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες που να περιλαμβάνουν τα εν λόγω κωδικόνια, και ως εκ τούτου πρέπει να δημιουργηθούν τεχνητά.

Ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12

Εκκινητής που βρίσκεται στο 5' άκρο έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο C αντί για G, στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11 παρέχοντας μια θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση BstN I (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Η θέση αναγνώρισης του BstN I καταστρέφεται από σημειακή μετάλλαξη σε μια από τις δύο αυτές θέσεις, ενώ σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο νουκλεοτίδιο θεωρείται «παρανοηματική» (non sense) μετάλλαξη, καθώς δεν ελέγχεται με το συγκεκριμένο ένζυμο. Τούτο συμβαίνει διότι όλα τα κωδικόνια GGA, GGC, GGT και GGG κωδικοποιούν για το αμινοξύ γλυκίνη (Gly). (Εικόνα 7a)

Ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13

Η ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 13 έγινε με την εισαγωγή μιας μη ομόλογης βάσης στον «αντινοσηματικό» (antisense) εκκινητή. Έτσι, δημιουργήθηκε μια θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII (GGCC) στο αλληλόμορφο άγριου τύπου (wild type). (Εικόνα 7b)



Εικόνα 7²⁰⁵: (a) Χάρτης περιορισμού για το κωδικόνιο 12 κατόπιν πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση BstN I (b) Χάρτης περιορισμού για το κωδικόνιο 13 κατόπιν πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII.

Ακολουθεί πέψη μέρους των προϊόντων PCR (10-40 μ L) με 30 U BstN I στους 60°C ή 30 U HaeIII στους 37°C για 16 h, αντίστοιχα. Έτσι προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα DNA για το άγριου τύπου (φυσιολογικό-wild type, wt) και το μεταλλαγμένο γονίδιο (mutant, mut) (Πίνακας 5). Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

	Εξώνιο	Κωδικόνιο	Εκκινητές	Υβριδισμός	Προϊόν PCR (bp)	Προϊόν RFLP (bp)
KRAS	2	12	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' (S) 5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA-3' (A)	60 °C	162	29/133 (wt) 162 (mut)
		13	5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTA-3' (S) 5'-GTATCGTCAAGGCACTCTTGCTTAGG-3' (A)	37 °C	159	85/48/26 (wt) 85/74 (mut)

Πίνακας 5: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους, μέγεθος του PCR προϊόντος και των προϊόντων πέψης. (wt: wild type, mut: mutant, S: sense, A: antisense).

2.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Graph Pad version 3.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας πραγματοποιήθηκε κατόπιν εξακρίβωσης ότι οι υπό μελέτη πληθυσμοί μας για τον κάθε υπό έρευνα γενετικό τόπο βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Οι συχνότητες των γονοτύπων συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία χ^2 με διόρθωση κατά Yates (Yate's correction). Ο σχετικός κίνδυνος (Odds ratios -OR) και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% (Confidence Intervals -95% CI) υπολογίστηκαν με την αντίστοιχη δοκιμασία κατανομής χ^2 . Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε κάθε αποτέλεσμα για την τιμή $p < 0.05$. Η ισορροπία Hardy-Weinberg αξιολογήθηκε εκ του υπολογισμού των αναμενόμενων συχνοτήτων και των απόλυτων χωριστά για τους ασθενείς και την ομάδα ελέγχου με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 καλής προσαρμογής (goodness of fit χ^2 test). Η ανάλυση απλοτύπων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας <https://www.snpstats.net/preproc.php>. Οι καμπύλες επιβίωσης δημιουργήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου Kaplan-Meier και η σύγκρισή τους έγινε με το log-rank test. Η μελέτη της επίδρασης των διαφόρων μεταβλητών στη συνολική επιβίωση των ασθενών έγινε με τη χρήση του πολυπαραγοντικού μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox (multivariate analysis of Cox proportional hazard model).

2.10.1 Δοκιμασία χ^2

Το κριτήριο χ^2 αποτελεί μια μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία που χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ποιοτικών δεδομένων και όταν η κλίμακα μέτρησης είναι κατηγορική. Χρησιμοποιείται για την ερμηνεία συχνοτήτων που προέρχονται μόνο από ένα δείγμα ως δείκτης προσαρμογής. Στην παρούσα εργασία το κριτήριο χ^2 μας επέτρεψε να εξετάσουμε την απόκλιση μεταξύ των δεδομένων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της έρευνας

(παρατηρούμενες συχνότητες) και των θεωρητικά αναμενόμενων συχνοτήτων, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\Pi - A)^2}{A}$$

όπου Π : παρατηρούμενες τιμές και A : θεωρητικά αναμενόμενες τιμές

Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η απόκλιση τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να προκύψει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Επίσης, μια δεύτερη χρήση του είναι ως στατιστικό κριτήριο για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας μεταξύ δύο μεταβλητών. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση δύο ή περισσότερων δειγμάτων, για να διαπιστωθεί αν οι συχνότητες των διαφόρων κατηγοριών μπορούν να προκύψουν τυχαία ή είναι συστηματικές.

Η τιμή χ^2 προσδιορίζει, για συγκεκριμένους βαθμούς ελευθερίας, την πιθανότητα (p) ταύτισης των θεωρητικά αναμενόμενων με τις παρατηρούμενες τιμές. Οι βαθμοί ελευθερίας εκφράζουν τους παράγοντες οι οποίοι μπορεί να μεταβάλουν ένα σύστημα. Στην παρούσα μελέτη ορίστηκε ως επίπεδο σημαντικότητας το 5 %, δηλαδή όρια εμπιστοσύνης 95%. Πιθανότητα μεγαλύτερη του επιπέδου σημαντικότητας συνεπάγεται συμφωνία, δηλαδή τα αποτελέσματά μας δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ως εκ τούτου, γίνεται αποδεκτή η μηδενική υπόθεση (Null Hypothesis) και ο πληθυσμός για τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Αντίστοιχα, στην περίπτωση που η τιμή p είναι μικρότερη του επιπέδου σημαντικότητας, ήτοι $p < 0.05$, η μηδενική υπόθεση δεν είναι αποδεκτή καθώς υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ θεωρητικά αναμενόμενων και παρατηρούμενων τιμών.

Ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας προσδιορίζεται από την εξίσωση:

Βαθμοί Ελευθερίας= [Αριθμός διαφορετικών γονοτύπων-1]- [Αριθμός αλληλόμορφων-1]

Σε περίπτωση που οι βαθμοί ελευθερίας είναι 1 αυξάνονται οι πιθανότητες σφάλματος. Στην παρούσα εργασία, έχουμε 1 βαθμό ελευθερίας (δεδομένου ότι για ένα σύστημα δύο αλληλόμορφων υπάρχουν τρεις τάξεις και μια ανεξάρτητη μεταβλητή). Έτσι, προχωρήσαμε σε τροποποίηση στον υπολογισμό του χ^2 (διόρθωση κατά Yates), η οποία περιλαμβάνεται στο στατιστικό εγχειρίδιο InStat, και το χ^2 υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\chi^2 = \sum \frac{(|\Pi - A| - 0.5)^2}{A}$$

όπου $|\Pi - A|$: η απόλυτη τιμή της διαφοράς της πραγματικής συχνότητας Π από την αναμενόμενη συχνότητα A για κάθε μία από τις κατηγορίες της μεταβλητής.

2.10.2 ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ HARDY-WEINBERG (Hardy-Weinberg Equilibrium-HWE)

Ο νόμος της ισορροπίας των Hardy-Weinberg αποτελεί κεντρικό θεώρημα της πληθυσμιακής γενετικής και διατυπώθηκε από τον μαθηματικό Godfrey Hardy στις αρχές του 19^{ου} αιώνα. Δεδομένου ότι και ο ιατρός Wilhelm Weinberg είχε επίσης καταλήξει ανεξάρτητα στα ίδια συμπεράσματα, ο γενετιστής Curt Stern πρότεινε η βασική αυτή αρχή να ονομαστεί «νόμος των Hardy-Weinberg», ώστε να αναγνωριστεί η συνεισφορά και των δύο επιστημόνων.

Σύμφωνα με το νόμο αυτό, σε έναν σχετικά μεγάλο πληθυσμό του οποίου τα άτομα διασταυρώνονται τυχαία, απουσία παρεμβαλόμενων παραγόντων μπορούμε να προσδιορίσουμε τις συχνότητες των γονοτύπων στην επόμενη γενιά, βασιζόμενοι στις συχνότητες των αλληλόμορφων. Με άλλα λόγια, οι γονοτυπικές συχνότητες κατανέμονται σύμφωνα με τις συχνότητες των αλληλόμορφων στον πληθυσμό και παραμένουν ίδιες κατά τη διάρκεια των γενεών. Πιο συγκεκριμένα, αν δύο αλληλόμορφα γονίδια A και B σε ένα

πληθυσμό έχουν γονιδιακή συχνότητα p και q αντίστοιχα, τότε οι συχνότητες των γονότυπων AA είναι p^2 , BB είναι q^2 και AB είναι $2pq$ και το άθροισμά τους θα είναι 1. Αυτό είναι το ανάπτυγμα της ταυτότητας $(p+q)^2$, το οποίο προκύπτει από τη διωνυμική κατανομή.

$$(p+q)^2 = p^2 + q^2 + 2pq = 1$$

Με αυτόν τον τρόπο οι αναλογίες των Hardy-Weinberg συνδέουν τις αλληλικές με τις γονοτυπικές συχνότητες. Στην παρούσα μελέτη η ισχύς του νόμου πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες με τις αναμενόμενες με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 καλής προσαρμογής (goodness of fit χ^2 test).

3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ

Η αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία έγινε με βάσει τα κριτήρια RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), τα οποία δημιουργήθηκαν έτσι ώστε να υπάρχουν συγκεκριμένα, κοινώς αποδεκτά και ακριβή μέτρα «ποσοτικοποίησης» και αξιολόγησης με στόχο τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα και εύκολα κατανοητά. Το 2009 δημοσιεύτηκε η αναθεωρημένη έκδοση (RECIST 1.1)²⁰⁶ που ισχύει και σήμερα αποτελούν τα μόνα αποδεκτά κριτήρια από τον FDA για σκοπούς ερευνητικών πρωτοκόλλων.

Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά, το φορτίο νόσου αντιπροσωπεύεται από επιλεγμένες βλάβες-στόχους. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη ασθενείς έπρεπε να έχουν μετρήσιμη νόσο, δηλαδή 1 τουλάχιστον βλάβη που να πληροί τα κριτήρια RECIST με τη βοήθεια αξονικής (CT) ή μαγνητικής τομογραφίας (MRI). Μετρήσιμες θεωρούνται οι βλάβες που μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια σε μία τουλάχιστον διάσταση με μεγαλύτερη διάμετρο ≥ 10 χιλ. σε μέτρηση με ελικοειδή CT. Σχετικά με τους λεμφαδένες, για να θεωρηθεί ένας λεμφαδένας σαν βλάβη-στόχος, πρέπει η βραχεία διάμετρος (short axis) να είναι τουλάχιστον 15χιλ. Μη μετρήσιμες θεωρούνται οι βλάβες με μεγαλύτερη διάμετρο < 10 χιλ. καθώς και άλλες

νεοπλασματικές εκδηλώσεις όπως ασκίτικη συλλογή, περικαρδιακή και υπεζωκοτική συλλογή, λεπτομηνιγγική νόσος κλπ. Η έκδοση 1.1 προβλέπει έως 5 βλάβες-στόχους συνολικά και έως 2 βλάβες-στόχους ανά όργανο.

Ως πλήρης ανταπόκριση (Complete Response-CR) ορίζεται η πλήρης εξαφάνιση όλων των βλαβών στόχων. Μείωση κατά $\geq 30\%$ του αθροίσματος των μεγαλύτερων διαστάσεων θεωρείται σαν μερική ανταπόκριση (Partial Response-PR). Ως πρόοδος νόσου (Progressive Disease-PD) ορίζεται η αύξηση κατά $\geq 20\%$ του αθροίσματος των μεγαλύτερων διαστάσεων των βλαβών στόχων ή η εμφάνιση μιας ή περισσότερων νέων βλαβών. Τέλος, σαν σταθερή νόσος ορίζεται είτε η μη επαρκής μείωση ($< 30\%$) για να υπάρχει PR ή μη επαρκής αύξηση ($< 20\%$) για να υπάρχει PD. Επίσης, για να θεωρηθεί μια περίπτωση σαν PD κατά RECIST 1.1, θα πρέπει, επιπλέον της αύξησης κατά $\geq 20\%$ του αθροίσματος των μεγαλύτερων διαστάσεων των βλαβών στόχων, να υπάρχει και αύξηση στο απόλυτο μέγεθος των βλαβών στόχων κατά 5 χιλ. τουλάχιστον. Η επαναξιολόγηση των ασθενών της παρούσας μελέτης με απεικονιστικές εξετάσεις έγινε βάσει της συνήθους κλινικής πρακτικής, ήτοι περίπου κάθε 12 εβδομάδες. Αναφορικά με την περίπτωση σταθερής νόσου (SD), οι μετρήσεις θα πρέπει να ικανοποιούν τα SD κριτήρια, τουλάχιστον μια φορά μετά την έναρξη της μελέτης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης. Οι συμμετέχοντες ασθενείς κατανεμήθηκαν σε 3 κατηγορίες ανάλογα με την ανταπόκρισή τους, α) σε CR και PR, β) σε SD και γ) σε PD. Ο χρόνος επιβίωσης και η πρόοδος νόσου υπολογίστηκε από την 1^η μέρα θεραπείας.

4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Στην παρούσα μελέτη η εκτίμηση της τοξικότητας έγινε με βάση την κλίμακα διαβάθμισης βαρύτητας ανεπιθύμητων συμβάντων για τα CTCAE του NCI (Κοινά κριτήρια Τοξικότητας για Ανεπιθύμητες Ενέργειες, έκδοση 4.0)²⁰⁷. Ο παρακάτω πίνακας χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της βαρύτητας ΑΕ που δεν αναφέρονται ρητά στο CTCAE του NCI.

ΒΑΘΜΟΣ	ΒΑΡΥΤΗΤΑ
1	Ήπιου βαθμού: ασυμπτωματική ή ήπια συμπτώματα
2	Μέτριου βαθμού
3	Βαριές ή ιατρικά σημαντικές συνέπειες
4	Απειλητικές για τη ζωή συνέπειες
5	Θάνατος που σχετίζεται με ΑΣ

Πίνακας 6: Κλίμακα διαβάθμισης βαρύτητας Ανεπιθύμητου Συμβάντος (ΑΣ)

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ rs11134527 miR-218 ΚΑΙ rs1834306 miR-100

Η διερεύνηση των microRNA πολυμορφισμών έγινε σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από περιφερικό αίμα 105 ασθενών με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο όπως φαίνεται στον Πίνακα 7. Ο μέσος όρος της ηλικίας των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση ήταν 69.42 έτη ενώ η κατά φύλο κατανομή ήταν άνδρες vs γυναίκες, 58 vs 47 αντίστοιχα. 92 από τους 105 ασθενείς υπεβλήθησαν σε χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και η ανατομική εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας ήταν πιο συχνή για το κόλον (31 ασθενείς) και το σιγμοειδές (29 ασθενείς) ακολουθούμενη από το ορθό (25 ασθενείς) και το ορθοσιγμοειδές (20 ασθενείς). Η πλειοψηφία των μεταστάσεων στον πληθυσμό της μελέτης εντοπιζόταν στο ήπαρ (40 ασθενείς) και τους πνεύμονες (24 ασθενείς). Η κατανομή της ανταπόκρισης βάσει κριτηρίων RECIST 1.1 ήταν παρόμοια μεταξύ (πλήρους και μερικής) ανταπόκρισης, σταθερής νόσου και προόδου νόσου. Η πλειοψηφία (80 από τους 105) των ασθενών εμφάνισε τοξικότητα στη θεραπεία.

Χαρακτηριστικά		Αριθμός ασθενών
Ηλικία (έτη)	Μέσος όρος	69.42
	Εύρος	43-90
Φύλο	Άνδρες	58
	Γυναίκες	47
Χειρουργική εξαίρεση πρωτοπαθούς όγκου	Ναι	92
	Όχι	13
Εντόπιση πρωτοπαθούς εστίας	Κόλον	31
	Σιγμοειδές	29
	Ορθό	25
	Ορθοσιγμοειδές	20
Σημείο μετάστασης	Ήπαρ	40
	Πνεύμονας	24
	Περιτόναιο	6
	Επινεφρίδια	1
	Πολλαπλά σημεία	34
Θεραπευτικό Σχήμα	Bevacizumab, ιρινοτεκάνη και καπεσιταμπίνη	41
	Panitumumab, ιρινοτεκάνη και καπεσιταμπίνη	12
	Bevacizumab, ιρινοτεκάνη και 5FU	23
	Panitumumab, ιρινοτεκάνη και 5FU	16
	Aflibercept, ιρινοτεκάνη και 5FU	6
	Cetuximab, ιρινοτεκάνη και 5FU	5
	Cetuximab, ιρινοτεκάνη και καπεσιταμπίνη	2
Ανταπόκριση βάσει RECIST 1.1	Πλήρης Ανταπόκριση (CR) και Μερική Ανταπόκριση (PR)	34
	Σταθερή Νόσος (SD)	36
	Πρόοδος Νόσου (PD)	35
Τοξικότητα	Ναι	80
	Όχι	25

Πίνακας 7: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη των rs11134527 miR-218 και rs1834306 miR-100.

Μέχρι τον Αύγουστο του 2018, παρατηρήθηκε αντικειμενική ανταπόκριση (CR + PR) σε 34 (32.38%) ασθενείς, ενώ σε 36 (34.29%) και σε 35 (33.33%) ασθενείς παρατηρήθηκε σταθερή νόσος και πρόοδος νόσου αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην αντικειμενική ανταπόκριση και τους rs11134527 και rs1834306 γονότυπους. Οι γονότυποι GA και AA του πολυμορφισμού miR-218 rs11134527 συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την υποομάδα ασθενών που εμφάνισε πρόοδο νόσου ($p = 0.036$ και $p = 0.033$, αντίστοιχα). Με βάση αυτή την παρατήρηση, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 9, φορείς του A αλληλόμορφου φαίνεται να έχουν στατιστικά μεγαλύτερη πιθανότητα να μην ανταποκριθούν σε χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη ($p = 0.002$).

Αντίστοιχα, οι γονότυποι CT και TT του πολυμορφισμού miR-100 rs1834306 συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την υποομάδα ασθενών που εμφάνισε πρόοδο νόσου ($p = 0.038$ και 0.032 αντίστοιχα) και η ύπαρξη του T αλληλόμορφου φαίνεται ότι δεν αποτελεί ευνοϊκό παράγοντα αναφορικά με την ανταπόκριση σε σχήματα με ιρινοτεκάνη ($p = 0.002$) (Πίνακας 8).

rs11134527	CR+PR	SD	p; OR (95% CI)	PD	p; OR (95% CI)
GG	25	23	1.00	14	1.00
GA	8	11	0.59; 1.49(0.51-4.37)	15	0.036; 3.35(1.14-9.85)
AA	1.00	2	0.61; 2.17(1.18-25.62)	6	0.033; 10.71(1.17-98.29)
Αλληλόμορφο G	58	57	1,00	43	1.00
Αλληλόμορφο A	10	15	0.38; 1.53(0.63-3.68)	27	0.002; 3.64(1.59-8.32)
rs1834306					
CC	24	31	1,00	13	1.00
CT	9	4	0.13; 0.34(0.09-1.25)	16	0.038; 3.28(1.13-9.47)
TT	1.00	1.00	1.00; 0.77(0.05-13.03)	6	0.032; 11.07(1.20-102.25)
Αλληλόμορφο C	57	66	1.00	42	1.00
Αλληλόμορφο T	11	6	0.19; 0.47(0.16-1.36)	28	0.002; 3.45(1.56-7.71)

Πίνακας 8: Κατανομές γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς miR-218 (rs11134527) και miR-100 (rs1834306) σε σχέση με την ανταπόκριση (SD vs CR + PR, και PD vs CR + PR)

Η πλειοψηφία των ασθενών (76,19%) που περιλήφθηκαν στη μελέτη μας εμφάνισαν τις πλέον συχνές τοξικότητες που σχετίζονται με τη θεραπεία (Πίνακας 9). Δεν

παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα τους υπό μελέτη γονότυπους και τον κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας. Ωστόσο, όπως φαίνεται και τον πίνακα 9, μια συσχέτιση που πλησιάζει το όριο στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0.07$) βρέθηκε ανάμεσα σε φορείς του miR-100 rs1834306 T αλληλόμορφου και την εμφάνιση τοξικότητας.

rs11134527	Τοξικότητα/n	Όχι Τοξικότητα/n	p; OR (95% CI)
GG	45	17	1.00
GA	27	7	0.62; 1.46(0.53-3.97)
AA	8	1.00	0.43; 3.02(0.35-26.02)
Αλληλόμορφο G	117	41	1.00
Αλληλόμορφο A	43	9	0.26; 1.67(0.75-3.73)
rs1834306			
CC	49	19	1.00
CT	23	6	0.61; 1.49(0.52-4.22)
TT	8	0	0.19; 6.69(0.37-121.8)
Αλληλόμορφο C	121	44	1.00
Αλληλόμορφο T	39	6	0.07; 2.36(0.93-5.97)

Πίνακας 9: Κατανομές γονοτύπων και εμφάνιση τοξικότητας

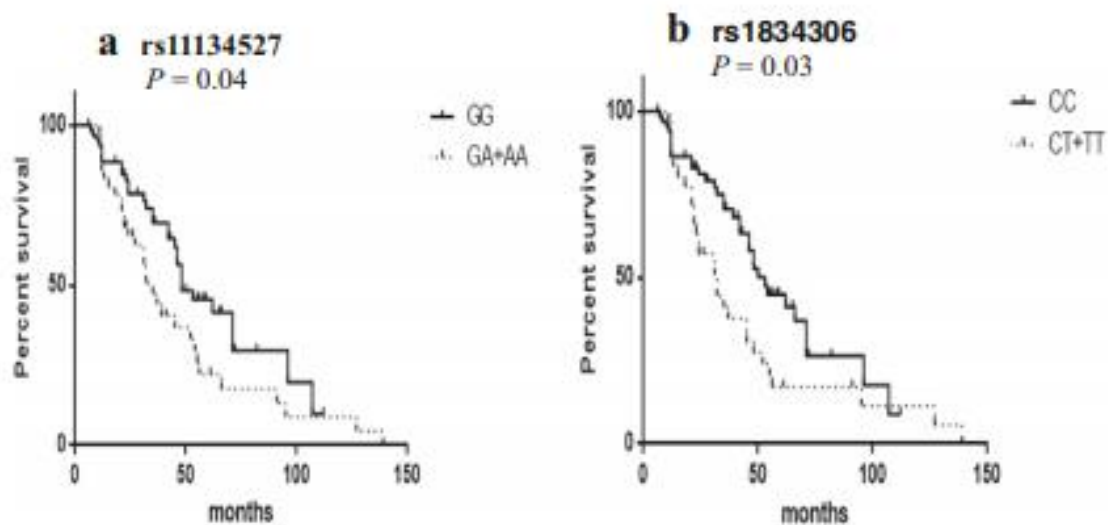
Αναφορικά με τη συνολική επιβίωση, οι γονότυποι GA και AA rs11134527 συνδέθηκαν στατιστικά περισσότερο με χειρότερη πρόγνωση ($p = 0.04$). Ομοίως, οι γονότυποι rs1834306 CT και TT συσχετίστηκαν με στατιστικά μικρότερη συνολική επιβίωση ($p = 0.03$) (Πίνακας 10, Εικόνα 8). Η επιβίωση υπολογίστηκε από την ημερομηνία του πρώτου κύκλου θεραπείας έως το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία. Από πολυπαραγοντική ανάλυση αναφορικά με την επίδραση στην επιβίωση, προκύπτει ότι η παρουσία των rs1834306 CT και TT γονοτύπων μπορεί να θεωρηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας συνολικής επιβίωσης (HR 0.49, 95% CI 0.31–0.76, $p = 0.002$).

Γονότυπος	Συνολική Επιβίωση (Overall Survival)			p
	Θάνατοι	13-ετής επιβίωση (%)^a	Hazard Ratio (95% CI)	

rs11134527				
GG	30	60.62	1.00[REFERENCE]	0.04
GA+AA	32	50.74	1.37 (0.83-2.26)	
rs1834306				
CC	29	60.74	1.00[REFERENCE]	0.03
CT+TT	33	49.62	1.66(1.01-2.73)	

^a Ανάλυση Kaplan–Meier

Πίνακας 10: rs11134527 και rs1834306 γονότυποι σε σχέση με τη συνολική επιβίωση



Εικόνα 8: Συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης με τους γονοτύπους των miR218 rs11134527 (a) και miR-100 rs1834306 (b) πολυμορφισμών. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier αντανακλούν το ποσοστό επιβίωσης σε μήνες μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων των ασθενών.

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ HOTAIR rs4759314 ΚΑΙ MALAT1 rs3200401

Η διερεύνηση των lncRNA πολυμορφισμών έγινε σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από περιφερικό αίμα 98 ασθενών με μεταστατικό ΚΠΕΟ όπως φαίνεται στον Πίνακα 11. Ο μέσος όρος της ηλικίας των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν 70.24 έτη ενώ η κατά φύλο κατανομή ήταν άνδρες vs γυναίκες, 54 vs 44 αντίστοιχα. Το 88.8% των ασθενών υπεβλήθησαν σε χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και η

ανατομική εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας ήταν πιο συχνή για το κόλον (29.6%) και το σιγμοειδές (27.5%) ακολουθούμενη από το ορθό (23.5%) και το ορθοσιγμοειδές (19.4%). Επίσης όπως φαίνεται στον Πίνακα 11, η πλειοψηφία των μεταστάσεων στον πληθυσμό της μελέτης εντοπιζόνταν στο ήπαρ (38.8%) και τους πνεύμονες (22.4%) και το 77.6% των ασθενών εμφάνισε τοξικότητα στη θεραπεία.

Χαρακτηριστικά		Αριθμός ασθενών	Ποσοστό %
Ηλικία (έτη)	Μέσος όρος	70.24	
	Εύρος	43-90	
Φύλο	Άνδρες	54	55.1
	Γυναίκες	44	44.9
Χειρουργική εξαίρεση πρωτοπαθούς όγκου	Ναι	87	88.8
	Όχι	11	11.2
Εντόπιση πρωτοπαθούς εστίας	Κόλον	29	29.6
	Σιγμοειδές	27	27.5
	Ορθό	23	23.5
	Ορθοσιγμοειδές	19	19.4
Σημείο μετάστασης	Ήπαρ	38	38.8
	Πνεύμονας	22	22.4
	Περιτόναιο	5	5.1
	Επινεφρίδια	1	1
	Πολλαπλά σημεία	32	32.7
Τοξικότητα	Ναι	76	77.6
	Όχι	22	22.4

Πίνακας 11: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη των lncRNA πολυμορφισμών rs4759314 HOTAIR και rs3200401 MALAT1

Για την ανίχνευση των KRAS μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε νεοπλασματικός ιστός, ο οποίος απομονώθηκε από τους ασθενείς μέσω βιοψίας ή χειρουργείου. Οι ιστοί αυτοί μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 4% και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε παραφίνη από τους παθολογοανατόμους. Ελήφθησαν τομές πάχους 5 μm, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες και ακολούθησε εντόπιση του νεοπλασματικού ιστού δια μικροσκοπικής παρατήρησης, κατόπιν χρώσης των παρασκευασμάτων με ειδικές χρωστικές (αιματοξυλίνη- ηωσίνη). Μετά την εντόπιση περιοχών πλούσιων σε καρκινικά κύτταρα (>30%), ακολούθησε απομόνωση του DNA από τον κύβο παραφίνης που αντιστοιχούσε σε κάθε ασθενή.

Μέχρι τον Αύγουστο του 2018, παρατηρήθηκε πλήρης ανταπόκριση (CR) σε 4 (4.08%) ασθενείς, μερική ανταπόκριση (PR) σε 30 (30.6%) ασθενείς, ενώ σε 32 (32.6%) και 32 (32.6%) ασθενείς παρατηρήθηκε σταθερή νόσος (SD) και πρόοδος νόσου (PD) αντίστοιχα. Αναφορικά με το status μεταλλάξεων του KRAS, 40 από τους ασθενείς που ελέγχθηκαν έφεραν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 και 5 ασθενείς στο κωδικόνιο 13. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στους φορείς KRAS μεταλλάξεων και στις υποομάδες ασθενών με CR, PR, SD και PD. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που μελετήθηκαν και τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς. Ομοίως, όπως φαίνεται και στους πίνακες 12 και 13, δεν ανευρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ανταπόκρισης και τους rs4759314 και rs3200401 γονότυπους και απλότυπους.

Γονότυπος	CR + PR	SD	PD
HOTAIR rs4759314			
AA	28	24	22
AG	5	7	8
GG	1	1	2
MALAT1 rs3200401			
CC	21	10	14
CT	9	16	11
TT	4	6	7

Πίνακας 12: Οι κατανομές των γονοτύπων rs4759314 και rs3200410 σε σχέση με την ανταπόκριση των ασθενών. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις.

rs4759314	rs3200401	Συχνότητα	Difference (95% CI)	p
A	C	0.5361	1 [REFERENCE]	
A	T	0.3211	0.17 (-0.08-0.41)	0.18
G	C	0.1068	0.17 (-0.23-0.57)	0.41
G	T	0.0361	0.55 (-0.18-1.28)	0.14

Πίνακας 13: Η ανάλυση απλοτύπων rs4759314 και rs3200410 σε σχέση με την ανταπόκριση των ασθενών. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις.

Φορείς των AG και GG γονοτύπων του rs4759314 φαίνεται ότι είναι στατιστικά πιθανότερο να φέρουν KRAS μεταλλάξεις (Πίνακας 14).

Γονότυπος	KRAS wild type	KRAS μεταλλαγμένο	p-value; OR (CI 95%)
HOTAIR rs4759314			
AA	40	34	1 [REFERENCE]
AG + GG	5	19	0.005; 4.47 (1.51- 13.25)
MALAT1 rs3200401			
CC	25	20	1 [REFERENCE]

CT + TT	26	27	0.55; 1.29 (0.58–2.88)
---------	----	----	------------------------

Πίνακας 14: Οι πολυμορφισμοί rs4759314 και rs3200401 σε σχέση με το KRAS status

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιήθηκαν και στο προφίλ τοξικότητας ούτε μεταξύ της εμφάνισης τοξικότητας και των rs4759314 γονότυπων. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στον πίνακα 15 ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p = 0.015$) μεταξύ φορέων των rs3200401 CT/TT αλληλόμορφων και ανάπτυξης τοξικότητας. Ως εκ τούτου φαίνεται ότι φορείς του μεταλλαγμένου T αλληλόμορφου, είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν τοξικότητα σε σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη ($p = 0.0006$).

Γονότυπος	Τοξικότητα/n	Όχι Τοξικότητα/n	p-value; OR (CI95%)
HOTAIR rs4759314			
AA	49	25	1 [REFERENCE]
AG + GG	16	8	1; 1.02 (0.38–2.71)
MALAT1 rs3200401			
CC	26	19	1 [REFERENCE]
CT + TT	43	10	0.015; 3.14 (1.27–7.79)

Πίνακας 15: Οι πολυμορφισμοί rs4759314 και rs3200401 σε σχέση με την εμφάνιση τοξικότητας

Η απλοτυπική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων απλότυπων και εμφάνισης τοξικότητας (Πίνακας 16).

rs4759314	rs3200410	Συχνότητα	Difference (95% CI)	p
A	C	0.5377	1 [REFERENCE]	
A	T	0.3195	1.59 (0.82–3.09)	0.17
G	C	0.1052	0.51 (0.18–1.43)	0.2
G	T	0.0377	0.15 (0.02–1.35)	0.094

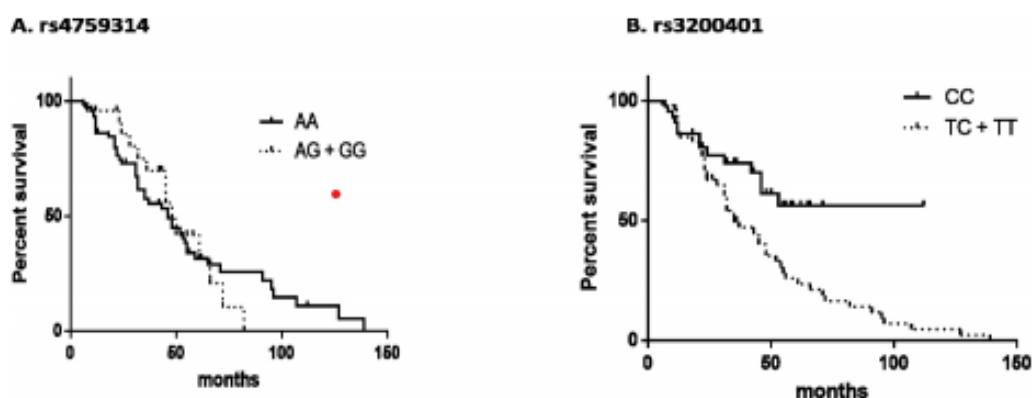
Πίνακας 16: Η σχέση μεταξύ των απλότυπων rs4759314 και rs3200401 και την εμφάνιση τοξικότητας

Στον Πίνακα 17 φαίνονται οι συσχετίσεις των rs4759314 και rs3200401 γονότυπων με τη συνολική επιβίωση. Κατά τη διάρκεια της μελέτης σημειώθηκαν 60 θάνατοι μεταξύ των συμμετεχόντων. Η επιβίωση υπολογίστηκε από την ημερομηνία του πρώτου κύκλου θεραπείας έως το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του πολυμορφισμού rs4759314 και της συνολικής επιβίωσης. Ωστόσο, οι CT και TT γονότυποι του rs3200401 συνδέθηκαν σημαντικά με μικρότερη συνολική επιβίωση ($p = 0.01$) (Εικόνα 9).

Γονότυπος	Συνολική επιβίωση			
	Θάνατοι (n)	13-ετής επιβίωση (%)*	Hazard Ratio (95% CI)	p
rs4759314				
AA	46	52.22	1.00 (Reference)	0.95
AG + GG	14	61.05	0.96 (0.53–1.74)	
rs3200401				
CC	14	71.41	1.00 (Reference)	0.01
CC + TT	46	45.94	2.02 (1.17–3.47)	

* Ανάλυση Kaplan–Meier

Πίνακας 17: Rs4759314 και rs3200401 γονότυποι σε σχέση με τη συνολική επιβίωση



Εικόνα 9: Συσχέτιση συνολικής επιβίωσης και γονοτύπων των πολυμορφισμών rs4759314 HOTAIR (A) και rs3200401 MALAT1 (B). Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier

αντανακλούν το ποσοστό επιβίωσης σε μήνες μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων των rs4759314 και rs3200401 πολυμορφισμών.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Διάφοροι θεραπευτικοί συνδυασμοί που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη, άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και στοχεύουσες θεραπείες, έχουν συμβάλει στη σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο^{79,81,82,91}. Παρόλα αυτά, η χορήγηση ιρινοτεκάνης έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη δοσοεξαρτώμενων τοξικοτήτων κυρίως εξαιτίας της ευρείας διατομικής μεταβλητότητας μεταξύ διαφόρων ασθενών^{208,209}. Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανακάλυψη νέων, σχετιζόμενων με την ιρινοτεκάνη, γενετικών παραμέτρων, με στόχο την εξατομίκευση της θεραπείας²¹⁰⁻²¹².

Το miR-100 αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά microRNAs στην έρευνα του καρκίνου και λειτουργεί τόσο ως ογκοκατασταλτικό όσο και ως ογκογονίδιο²¹³⁻²¹⁵. Ο Chen και συνεργάτες ανέφεραν ότι μειωμένη έκφραση του miR-100 συσχετίζεται με πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με ΚΠΕ-Ο²¹³, ενώ πρόσφατα προτάθηκε ως πιθανός βιοδείκτης λεμφαδενικής μετάστασης στον κολοορθικό καρκίνο²¹⁶. Επιπροσθέτως, ο Boni και συνεργάτες ανέφεραν μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του SNP rs1834306 και αυξημένου συνολικού χρόνου μέχρι την επιδείνωση (Time to Progression-TTP) σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο που λαμβάνουν θεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν 5-FU και ιρινοτεκάνη²¹⁷. Η υπερέκφραση του miR-100 έχει επίσης συνδεθεί με εγγενή και επίκτητη αντίσταση σε cetuximab σε κυτταρικές σειρές κολοορθικού καρκίνου²¹⁸ και φαίνεται να παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση της ακτινοευαισθησίας σε ΚΠΕ-Ο²¹⁹.

Το miR-218 αποτελεί ένα microRNA με ογκοκατασταλτική δράση και φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και στην αντίσταση στη θεραπεία²²⁰.

Επιπλέον, ο πολυμορφισμός rs11134527 έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη διάφορων τύπων καρκίνου²²¹⁻²²⁴. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μεταανάλυσης δεν έδειξαν σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον εν λόγω πολυμορφισμό και τον κίνδυνο καρκίνου σε Ασιατικούς πληθυσμούς²²⁵. Πιθανή σύνδεση της έκφρασης του miR-218 με την ενίσχυση της επαγόμενης από cisplatin νεφροτοξικότητας αλλά και με την αντίσταση σε 5-FU έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιογραφία^{226,227}. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί η σύνδεση της μειωμένης έκφρασης του miR-218 με α) την αντίσταση στη 5-FU, β) τη μείωση της συνολικής επιβίωσης (OS) και γ) του χρονικού διαστήματος ελεύθερου υποτροπής της νόσου (Relapse Free Survival-RFS) σε ασθενείς πάσχοντες από ΚΠΕ-Ο²²⁷. Ομοίως, ο Hu και συνεργάτες ανέφεραν ότι η έκφραση του miR-218 ήταν μειωμένη σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού ανθεκτικών σε δοξουβικίνη και πακλιταξέλη²²⁸. Αντίθετα, ο Zhuang και συνεργάτες υποστήριξαν ότι το miR-218 υπερεκφράζεται σε κύτταρα στοματικού καρκίνου ανθεκτικά σε cisplatin²²⁹. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης πιθανής συσχέτισης της έκφρασης της έκφρασης του miR-218 και του miR-218 rs11134527 και της αντίστασης στην ιρινοτεκάνη.

Η παρουσία του αλληλόμορφου A (AA και AG γονότυποι) φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του ώριμου miR-218²³⁰. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μειωμένη έκφραση του miR-218 έχει συσχετιστεί με αντίσταση και πτωχή ανταπόκριση σε σχήματα φθοριοπυριμιδινών σε ΚΠΕ-Ο, μέσω τη ενεργοποίησης του NF-κB/TS σηματοδοτικού μονοπατιού²²⁷. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, δεδομένου ότι βρήκαμε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία των miR-218 rs11134527 GA και AA γονοτύπων και στην ομάδα ασθενών που εμφάνισε πρόοδο νόσου. Αυτή η παρατήρηση, υποδηλώνει ότι η ύπαρξη του αλληλόμορφου A στον πολυμορφισμό rs11134527 μπορεί να σχετίζεται με πτωχές ανταποκρίσεις σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο που λαμβάνουν σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη. Επίσης,

αξίζει να σημειωθεί ότι, όπως έχει ήδη προταθεί από τον Scartozzi και συνεργάτες, ένας πιθανός μηχανισμός που εμπλέκεται στην αντίσταση σε ιρινοτεκάνη σχετίζεται με την ενεργοποίηση του NF-κB²³¹. Βάσει των ανωτέρω, προτείναμε την υπόθεση ότι ο υποκείμενος μηχανισμός στην miR-218-επαγόμενη αντίσταση στην ιρινοτεκάνη στον πληθυσμό της μελέτης μας, μπορεί να οφείλεται σε ενεργοποίηση του NF-κB σηματοδοτικού μονοπατιού. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης.

Επίσης, δείξαμε ότι οι γονότυποι GA/AA miR-218 rs11134527, σχετίζονται με μικρότερη συνολική επιβίωση. Συνεπώς, συμπερασματικά μπορούμε να προτείνουμε ότι η ύπαρξη του A αλληλόμορφου ενδέχεται να αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα πρόγνωσης (PFS και OS) σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο που λαμβάνουν σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η παρουσία του G αλληλόμορφου στο rs11134527 pri-miR-218, σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του ώριμου miR-218²³⁰. Η παρατήρησή μας είναι σύμφωνη με αυτή του Jiang και συνεργατών που υποστήριξαν ότι οι GG γονότυποι σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τους AA/AG γονότυπους ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου²²¹.

Όσον αφορά το miR-100, υπάρχουν όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα συσχέτισης της έκφρασης και των πολυμορφισμών του με την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου και την πρόγνωση²¹³⁻²¹⁶. Βέβαια αξίζει να σημειωθεί ότι τα βιβλιογραφικά δεδομένα που σχετίζονται με το ρόλο του πολυμορφισμού rs1834306 στην ανάπτυξη και πρόγνωση αρκετών νόσων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, είναι αντιφατικά. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1834306 (T>C) με σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης πλακώδους καρκινώματος οισοφάγου²³², ενώ μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι ο TC γονότυπος και η παρουσία του T αλληλόμορφου σχετίζονται με υπερέκφραση του miR-100 και αυξημένο ιικό φορτίο σε ασθενείς με HBV λοίμωξη²³³. Επιπλέον, ο SNP rs1834306 C>T, φαίνεται να συνδέεται με αυξημένο συνολικό

χρόνο μέχρι την επιδείνωση (Time to Progression-TTP) σε πάσχοντες από μεταστατικό ΚΠΕ-Ο που έλαβαν σχήματα με 5-FU και ιρινοτεκάνη²¹⁰.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν σημαντική συσχέτιση των γονοτύπων CT/TT του miR-100 rs1834306 πολυμορφισμού και πτωχής ανταπόκρισης. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση των Boni και συνεργατών, σύμφωνα με την οποία η παρουσία του C αλληλόμορφου (CC/CT γονότυποι) συνδέεται με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΠΕ-Ο που έλαβαν σχήματα με 5-FU και ιρινοτεκάνη²¹⁰. Συνεπώς, η παρουσία του αλληλόμορφου T του rs1834306 ενδέχεται να αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα σε αυτό τον πληθυσμό ασθενών.

Επίσης, στην παρούσα εργασία φάνηκε ότι οι γονότυποι CT/TT του miR-100 rs1834306 σχετίζονται και με μικρότερη συνολική επιβίωση (OS). Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα της έρευνας του Wu και συνεργατών, οι οποίοι δεν βρήκαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στον rs1834306 και τη συνολική επιβίωση ασθενών με προχωρημένο καρκίνο οισοφάγου που έλαβαν θεραπεία βασιζόμενη σε πλατίνα²³⁴. Επιπλέον, η αναλογία miR-182/miR-100 φαίνεται να παίζει ρόλο ως προβλεπτικός παράγοντας επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης²³⁵, ενώ τα αποτελέσματα μια μεγάλης κλίμακας μεταφραστικής έρευνας δεν έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του rs1834306 και της συνολικής επιβίωσης ασθενών με προχωρημένο καρκίνο στομάχου²³⁶. Οι παρατηρούμενες αντιπαραθέσεις στη βιβλιογραφία μπορεί να οφείλονται στο ότι το miR-100 μπορεί να δράσει τόσο ως ογκοκατασταλτικό όσο και ως ογκογονίδιο, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι παρά το γεγονός ότι το miR-100 αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα microRNAs, η πλειοψηφία των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων περιλαμβάνουν δεδομένα σχετιζόμενα με TTP και PFS αλλά όχι δεδομένα OS.

Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι σε συμφωνία με αυτά που απαντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία σύμφωνα με τα οποία δεν επιβεβαιώνεται συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς miR-218 rs11134527 και miR-100 rs1834306 και στην ανάπτυξη τοξικότητας²³⁴.

Τα τελευταία χρόνια, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν διερευνήσει εκτενώς και το ρόλο των μεγάλων μη- κωδικών RNAs (lncRNAs) στον καρκίνο. Το HOTAIR αποτελεί ένα από πλέον ενδιαφέροντα lncRNAs με σημαντικούς ρόλους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη γενωμική σταθερότητα και την αντίσταση στη θεραπεία. Η έκφρασή του έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του ΚΠΕ-Ο²³⁷. Στον κολοορθικό καρκίνο, το HOTAIR φαίνεται ότι δρα ως ογκογονίδιο, προάγοντας την ογκογένεση και το μεταστατικό δυναμικό²³⁸. Πρόσφατα δε, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μεταανάλυσης, ανεδείχθη συσχέτιση μεταξύ HOTAIR SNPs και κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου²³⁹. Ο Luo και συνεργάτες, παρατήρησαν επίσης ότι όγκοι οι οποίοι υπερεκφράζουν το HOTAIR τείνουν να εμφανίζουν μεγαλύτερη αντίσταση στη θεραπεία και μάλιστα αυξημένη έκφρασή του συσχετίζεται με πτωχή πρόγνωση²⁴⁰. Επιπλέον, η έκφρασή του έχει συνδεθεί με την αντίσταση στο cisplatin και τους αναστολείς τυροσινικής κινάσης crizotinib και imatinib, σε αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και χρόνια μυελογενή λευχαιμία αντίστοιχα²⁴¹⁻²⁴³. Επίσης, ο Li και συνεργάτες κατέδειξαν ότι το lncRNA HOTAIR συμβάλει στην ανάπτυξη αντίστασης σε 5-FU και μάλιστα υπερέκφρασή του συσχετίζεται με μικρότερο OS και RFS σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία που βασίζεται σε 5-FU²²⁷. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ο SNP rs4759314 HOTAIR, δε φαίνεται να συσχετίζεται με την επαγόμενη από ιρινοτεκάνη τοξικότητα, ένα εύρημα που είναι σε συμφωνία με την παρατήρηση του Gonk και συνεργατών, οι οποίοι επίσης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του εν λόγω πολυμορφισμού και της ανάπτυξης τοξικότητας σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα που λαμβάνουν θεραπείες βασισμένες στην πλατίνα²⁴⁴.

Το MALAT1 (γνωστό και ως NEAT2) αποτελεί ένα lncRNA που έχει αναδειχθεί ως πιθανός βιοδείκτης μετάστασης σε καρκίνο του πνεύμονα²⁴⁵, ενώ σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του έχουν επίσης συσχετιστεί με ΚΠΕ-Ο²⁴⁶. Πρόσφατα, η ύπαρξη του SNP rs1194338 φάνηκε ότι μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας προστασίας έναντι της ανάπτυξης ΚΠΕ-Ο²⁴⁷. Αντίθετα, ο MALAT1 rs664589 πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κολοορθικού καρκίνου²⁴⁸. Επίσης, διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει την έκφρασή του με αντίσταση σε σισπλατίνη, αδριαμυκίνη και τεμοξολομίδη σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) και γλοιοβλάστωμα αντίστοιχα²⁴⁹⁻²⁵¹. Τέλος, υπερέκφραση του MALAT1 έχει συνδεθεί με μειωμένη ανταπόκριση σε οξαλιπλατίνη σε ασθενείς πάσχοντες από ΚΠΕ-Ο²⁵².

Όσον αφορά τον rs3200401 MALAT1, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι οι CT και CT/TT γονότυποι σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση ασθενών με καρκίνο πνεύμονα σε σχέση με τους CC γονότυπους²⁵³. Από την άλλη πλευρά, έχει προταθεί ότι φορείς του ετερόζυγου rs3200401 CT γονότυπου έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο δηλητηρίασης από μόλυβδο²⁵⁴. Στην παρούσα μελέτη υποθέσαμε ότι η αντίσταση στην ιρινοτεκάνη μπορεί να οφείλεται στο ότι α) η έκφραση του MALAT1 έχει ανευρεθεί αυξημένη κατά τις φάσεις G1/S και M του κυτταρικού κύκλου αναχαιτίζοντας την απόπτωση και ενισχύοντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και β) η ιρινοτεκάνη δρα μέσω της αναστολής της DNA τοποϊσομεράσης I. Ωστόσο, κανένας από τους πολυμορφισμούς (rs3200401 MALAT1 και rs4759314 HOTAIR) δε φαίνεται να σχετίζεται με την ανταπόκριση στη θεραπεία με σχήματα περιέχοντα ιρινοτεκάνη. Αξίζει να αναφερθεί ότι στη βιβλιογραφία η έκφραση του MALAT1 έχει συνδεθεί με πτωχή ανταπόκριση σε σχήματα με οξαλιπλατίνη και χημειοαντίσταση σε πάσχοντες από ΚΠΕ-Ο²⁵².

Βάσει των αποτελεσμάτων μας φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους CT/TT γονότυπους του rs3200401 MALAT1 και στην εμφάνιση τοξικότητας στον πληθυσμό της μελέτης μας. Ωστόσο, αυτό το εύρημα δε συσχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ανεξάρτητος βιοδείκτης τοξικότητας σε ασθενείς που λαμβάνουν σχήματα με ιρινοτεκάνη. Ομοίως, ο Qian και συνεργάτες είχαν παρατηρήσει ότι ο rs3200401 CT γονότυπος σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας²⁵⁴. Αξίζει επίσης να αναφέρουμε ότι βάσει της ερευνάς μας, οι rs3200401 CT + TT γονότυποι συσχετίστηκαν όχι μόνο με αυξημένη τοξικότητα αλλά και με σημαντικά μικρότερη συνολική επιβίωση. Ως εκ τούτου, φορείς του μεταλλαγμένου T αλληλόμορφου ενδέχεται μην ανέχονται καλά τη θεραπεία βασιζόμενη σε ιρινοτεκάνη και μάλιστα η μειωμένη συνολική επιβίωση μπορεί να είναι απότοκος της αυξημένης τοξικότητας. Αντίθετα, ο Wang και συνεργάτες, ανέδειξαν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του rs3200401 T αλληλόμορφου και της συνολικής επιβίωσης ασθενών με προχωρημένο αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα²⁵³. Αυτή η ασυνέπεια βέβαια μπορεί να οφείλεται στο ότι τα σχήματα που χρησιμοποιούνται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι αρκετά διαφορετικά από αυτά που χρησιμοποιούνται σε ΚΠΕ-Ο. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματά μας χρήζουν επιβεβαίωσης από επιπλέον μελέτες σε μεγαλύτερες πληθυσμιακές ομάδες.

Οι μεταλλάξεις των RAS γονιδίων έχουν επίσης συνδεθεί με το δυναμικό μετάστασης του ΚΠΕ-Ο αλλά και με αυξημένο κίνδυνο μεταστάσεων σε πάσχοντες από καρκίνο πνεύμονα και ωοθηκών που λαμβάνουν σχήματα βασιζόμενα σε ιρινοτεκάνη²⁵⁵. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δεν ανέδειξαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του status των KRAS μεταλλάξεων και της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι KRAS μεταλλάξεις δε θεωρούνται ως ανεξάρτητοι προβλεπτικοί παράγοντες επιβίωσης και μόνο ένας υποπληθυσμός ασθενών ευνοείται από

του βιολογικούς παράγοντες που στοχεύουν τον EGFR (λόγω της πολύπλοκης αιτιοπαθογένειας του ΚΠΕ-Ο και της αντίστασης σε αυτές τις στοχεύουσες θεραπείες)^{256,257}. Παρόλα αυτά, στη μελέτη μας βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των AG/GG γονοτύπων του rs4759314 HOTAIR και των KRAS μεταλλάξεων, υποδηλώνοντας για πρώτη φορά ότι φορείς του μεταλλαγμένου G αλληλόμορφου ενδέχεται να φέρουν επίσης KRAS μεταλλάξεις.

7. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Παρά τα αποτελέσματα και τις πιθανές συσχετίσεις που διαπιστώθηκαν και δημοσιεύτηκαν για πρώτη φορά, η παρούσα μελέτη έχει διάφορους περιορισμούς. Οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης των πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) μη κωδικών RNAs στην παθογένεση και την πρόγνωση του καρκίνου, καθώς και στην εμφάνιση τοξικότητας σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα παραμένουν ακόμα άγνωστοι και χρήζουν περαιτέρω έρευνας. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί των μη κωδικών RNAs, όπως τα microRNAs και τα lncRNAs, μπορούν να αλληλεπιδράσουν σε πολλά επίπεδα με σύνθετες αντικαρκινικές θεραπείες όπως αυτές που χορηγήθηκαν στον πληθυσμό της μελέτης μας. Ακόμα, πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι η τοξικότητα επαγόμενη από ιρινοτεκάνη μπορεί να οφείλεται σε πλειάδα γενετικών παραγόντων, πέραν των υπό μελέτη πολυμορφισμών. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα της μελέτης μας πρέπει να ενισχυθούν από μεγαλύτερης κλίμακας έρευνες με μεγαλύτερα πληθυσμιακά δείγματα, ώστε οι εν λόγω πολυμορφισμοί να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς και προγνωστικούς σκοπούς στο μέλλον.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε για πρώτη φορά πιθανή συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών miR-218 rs11134527 και miR-100 rs1834306 και ανταπόκρισης σε θεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη. Επίσης, κατόπιν ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης, φάνηκε ότι φορείς του μεταλλαγμένου A αλληλόμορφου του miR-218

rs11134527 και του μεταλλαγμένου T αλληλόμορφου του miR-100 rs1834306 είναι πιθανό να μην ανταποκριθούν σε σχήματα με ιρινοτεκάνη. Επιπλέον, οι GA/AA γονότυποι του rs11134527 και οι CT/TT γονότυποι του rs1834306 CT/TT συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με μικρότερη συνολική επιβίωση.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs3200401 MALAT1, φάνηκε για πρώτη φορά πιθανή συσχέτιση με την ανάπτυξη τοξικότητας και τη συνολική επιβίωση ασθενών που πάσχουν από μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο και λαμβάνουν σχήματα που περιλαμβάνουν ιρινοτεκάνη. Τέλος, η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης έδειξε ότι φορείς του μεταλλαγμένου G αλληλόμορφου του rs4759314 HOTAIR είναι πιθανό να φέρουν επίσης KRAS μεταλλάξεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Available from: <https://gco.iarc.fr>
2. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010 [published correction appears in *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):133-4]. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300 doi:10.3322/caac.20073.
4. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2020-2022.pdf>
5. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*. 2012;118(14):3636-3644.
6. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(18):1353-1362.
7. Bailey CE, Hu CY, You YN, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010 [published correction appears in *JAMA Surg*. 2015 Mar 1;150(3):277]. *JAMA Surg*. 2015;150(1):17-22. doi:10.1001/jamasurg.2014.1756.
8. Ait Ouakrim D, Pizot C, Boniol M, et al. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*. 2015;351:h4970.
9. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, et al. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(4):1016-1022.
10. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 2007;21:2525–2538. doi: 10.1101/gad.1593107.
11. Kolligs FT. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc Med*. 2016 Jun;32(3):158–64.
12. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. COLORECTAL CANCER. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Nov 5;1:15065.
13. Bowel cancer risk [Internet]. Cancer Research UK. 2015 [cited 2018 Sep 30]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer/risk-factors>

14. Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*. 2006 Feb;55(2):285–91.
15. Stephen J. D. O'Keefe, Dan Chung, Nevine Mahmoud, Antonia R. Sepulveda, Mashudu Manafe, Judith Arch, Haytham Adada, Tian van der Merwe, Why Do African Americans Get More Colon Cancer than Native Africans?, *The Journal of Nutrition*, Volume 137, Issue 1, January 2007, Pages 175S–182S.
16. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. USA, World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 2007.
17. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 2010; 70:2406.
18. Chan DS, Lau R, Aune D, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 2011; 6:e20456.
19. Aune D, Chan DSM, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, et al. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control*. 2013 Apr;24(4):611–27.
20. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*. 2011 Sep;22(9):1958–72.
21. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;300(23):2765-2778. doi:10.1001/jama.2008.839.
22. Chao A, Thun MJ, Jacobs EJ, Henley SJ, Rodriguez C, Calle EE. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the Cancer Prevention Study II. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1888- 1896.
23. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ [Internet]*. 2011 Nov 10 [cited 2018 Sep 30];343. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3213242/>.
24. McCullough ML, Zoltick ES, Weinstein SJ, et al.. Circulating vitamin D and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2018.
25. Ngo SN, Williams DB, Cobiac L, Head RJ. Does garlic reduce risk of colorectal cancer? A systematic review. *J Nutr* 2007; 137:2264.

26. Wu S, Feng B, Li K, et al. Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2012; 125:551.
27. Zhang X, Keum N, Wu K, et al. Calcium intake and colorectal cancer risk: Results from the nurses' health study and health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 2016; 139:2232.
28. Passarelli MN, Barry EL, Rees JR, et al. Folic acid supplementation and risk of colorectal neoplasia during long-term follow-up of a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2019; 110:903.
29. Aune D, Lau R, Chan DS, et al. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol* 2012; 23:37.
30. Kim M, Park K. Dietary Fat Intake and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrients*. 2018;10(12):1963. Published 2018 Dec 12.
31. Yuan Zhong, Yan Zhu, Quanpeng Li, Fei Wang, Xianxiu Ge, Guangxin Zhou, Lin Miao, Association between Mediterranean diet adherence and colorectal cancer: a dose-response meta-analysis, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 111, Issue 6, June 2020, Pages 1214–1225.
32. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Oct 17;104(20):1548–61.
33. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2011; 377:31.
34. Loomans-Kropp HA, Pinsky P, Cao Y, et al. Association of Aspirin Use With Mortality Risk Among Older Adult Participants in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *JAMA Netw Open* 2019; 2:e1916729.
35. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 378:2081.
36. Amitay EL, Carr PR, Jansen L, et al. Association of Aspirin and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs With Colorectal Cancer Risk by Molecular Subtypes. *J Natl Cancer Inst* 2019; 111:475.

37. Samadder NJ, Neklason DW, Boucher KM, et al. Effect of Sulindac and Erlotinib vs Placebo on Duodenal Neoplasia in Familial Adenomatous Polyposis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016; 315:1266.
38. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:1701.
39. Simon MS, Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer incidence and mortality. *J Clin Oncol* 2012; 30:3983.
40. Pedersen TR, Berg K, Cook TJ, et al. Safety and tolerability of cholesterol lowering with simvastatin during 5 years in the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Arch Intern Med* 1996; 156:2085.
41. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:2184.
42. Coogan PF, Smith J, Rosenberg L. Statin use and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:32.
43. Singh H, Mahmud SM, Turner D, et al. Long-term use of statins and risk of colorectal cancer: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:3015.
44. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990;98(2):371-379.
45. Hennink SD, van der Meulen-de Jong AE, Wolterbeek R, et al. Randomized Comparison of Surveillance Intervals in Familial Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4188-4193.
46. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):199-209.
47. Knudson AG, Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971, 68(4):820-823.
48. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2059–2072.
49. Rusan NM, Peifer M. Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J Cell Biol*. 2008;181(5):719-726. doi:10.1083/jcb.200802107.
50. Gonzalez, R.S., Washington, K. & Shi, C. Current applications of molecular pathology in colorectal carcinoma. *Appl Cancer Res* **37**, 13 (2017). <https://doi.org/10.1186/s41241-017-0020-1>

51. Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer.
52. Hemminki K, Chen B. Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Jul [cited 2019 May 17];13(7):1253–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247139>.
53. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med.* 1994;331:1694–1702.
54. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 1991;66(3):589-600.
55. Sant V, Reich E, Khanna L, Cao W, Kornacki S, Grucela A. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) in a patient associated with a novel mutation in APC. *BMJ Case Rep.* 2019;12(11):e231232. Published 2019 Nov 10.
56. Paraf F, Jothy S, Van Meir EG. Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J. Clin. Oncol.* 1997 Jul;15(7):2744-58.
57. Patel R, McGinty P, Cuthill V, et al. MUTYH-associated polyposis - colorectal phenotype and management [published online ahead of print, 2020 Apr 19]. *Colorectal Dis.* 2020;10.1111/codi.15078.
58. Yamaguchi K, Shimizu E, Yamaguchi R, et al. Development of an MSI-positive colon tumor with aberrant DNA methylation in a PPAP patient. *J Hum Genet.* 2019;64(8):729-740.
59. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma. *Arch Intern Med* 1913;12:546-55.
60. Tse JY, Wu S, Shinagare SA, Lauwers GY, Yilmaz O, Wu CL, Deshpande V. Peutz-Jeghers syndrome: a critical look at colonic Peutz-Jeghers polyps. *Mod Pathol.* 2013 Sep;26(9):1235-40.
61. Cichy W, Klincewicz B, Plawski A. Juvenile polyposis syndrome. *Arch Med Sci.* 2014 Jun ;10(3):570-7.
62. Orloff MS, He X, Peterson C, Chen F, Chen JL, Mester JL, Eng C. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2013 Jan 10;92(1):76-80.
63. Burt RW. Familial risk and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996;25:793–803.
64. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology.* 1993;105:1716–23.

65. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer*. 1986;57(9):1866-1870. doi:10.1002/1097-0142(19860501)57:9<1866::aid-cnrcr2820570928>3.0.co;2-t.
66. Sleisenger and Fordtran's: Gastrointestinal and Liver Disease. 2002; 2240.
67. The classification of cancer of the rectum - Dukes - 1932 - The Journal of Pathology and Bacteriology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2018 May 12]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.1700350303>
68. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
69. Available from: <https://oncohemakey.com/colectomy-approaches-for-colorectal-cancer/>
70. Hellenic Society of Medical Oncologists, url: <https://www.hesmo.gr>.
71. Wurster EF, Tenckhoff S, Probst P, Jensen K, Dölger E, Knebel P, et al. A systematic review and meta-analysis of the utility of repeated versus single hepatic resection for colorectal cancer liver metastases. *HPB*. 2017 Jun [cited 2019 May 17];19(6):491–7.
72. Park J, Chen Y-J, Lu W-P, Fong Y. The evolution of liver-directed treatments for hepatic colorectal metastases. *Oncology (Williston Park)* . 2014 Nov [cited 2019 May 17];28(11):991–1003.
73. Lee GH, Malietzis G, Askari A, Bernardo D, Al-Hassi HO, Clark SK. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2015;41(3):300-8.
74. Shen H, Yang J, Huang Q, Jiang MJ, Tan YN, Fu JF, Zhu ZL et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *WJG*. 2015;21(21):6470-8.
75. Tournigand C, André T, Achille E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229–237.
76. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1209–1214.
77. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx

78. van Helden EJ, Menke-van der Houven van Oordt CV, Heymans MW, Ket JCF, van den Oord R, Verheul HMW. Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Metastasis Rev* (2017) 36:395–406
79. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013–2019
80. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2011–2019.
81. Ciardiello F, Lenz H-J, Köhne C-H et al. Effect of KRAS and NRAS mutational status on first-line treatment with FOLFIRI plus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): new results from the CRYSTAL trial. *J Clin Oncol* 2014; 32 (suppl 3; abstr LBA443)
82. Seymour MT, Brown SR, Middleton G et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 749–759.].
83. Molina-Cerrillo J, San Román M, Pozas J, et al. BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1571. Published 2020 Jun 14.
84. KOPETZ S, GROTHEY A, YAEGER R, VAN CUTSEM et al; Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Oct 24;381(17):1632- 1643.
85. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, . Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol* 2019;32:147–153.
86. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, Hurwitz H, Spigel DR, Sweeney C, et al. Targeted therapy for advanced solid tumors on the basis of molecular profiles: Results from mypathway, an open-label, phase IIA multiple basket study. *J Clin Oncol*. 2018;36(6):536–42.
87. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, Depetris I, Martinelli E. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:738-746.

88. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul;25(13):3753–8
89. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study [published correction appears in *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):e510]. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1182-1191.
90. Thierry Andre, Kai-Keen Shiu, Tae Won Kim, Benny Vittrup Jensen, Lars Henrik Jensen, Cornelis J. A. Punt, Denis Michel Smith, Rocio Garcia-Carbonero, Manuel Benavides, Peter Gibbs, Christelle De La Fouchardiere, Fernando Rivera, Elena Elez, Johanna C. Bendell, Dung T. Le, Takayuki Yoshino, Ping Yang, Mohammed Zulfiqar Husain Farooqui, Patricia Marinello, and Luis A. Diaz. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: The phase 3 KEYNOTE-177 Study. *Journal of Clinical Oncology* 2020 38:18_suppl, LBA4-LBA4.
91. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer special articles *Annals of Oncology*. *Ann Oncol* . 2016 [cited 2018 Oct 21];27:1386–422.
92. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* . 2011 Mar 1 [cited 2019 May 17];104(6):1020–6.
93. Gangopadhyay A, Lazure D, Thomas P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clinical & Experimental Metastasis*. 1998. 16:8,pp 703-712.
94. Wiggers T, Arends JW, Volovics A. Regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum*. 1988 Jan;31(1):33- 41.
95. ASCO. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Onc* 1996;14:2843-2877.
96. Sørbye H, Dahl O. Carcinoembryonic antigen surge in metastatic colorectal cancer patients responding to oxaliplatin combination chemotherapy: implications for tumor marker monitoring and guidelines. *J Clin Oncol*. 2003;21(23):4466-4467.

97. Gong E, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Expression of carbohydrate antigen 19-9 and stage-specific embryonic antigen 1 in nontumorous and tumorous epithelia of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst.* 1985;75(3):447-454.
98. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* . 2003 Jun [cited 2019 May 17];3(6):459–65.
99. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Satoh T, Takimoto R, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 2001 Sep;121(3):599-611.
100. Fakih M, O’Neil B, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo J, et al. Phase 1 study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and efficacy of AMG 510, a novel small molecule KRASG12C inhibitor, in advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2019 May20;37(15_suppl):3003.
101. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1196-212.
102. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJA. *BRAF* Mutation in Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2009 Jul 2 [cited 2019 May 17];361(1):98–9.
103. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* . 2011 Oct 15 [cited 2019 May 17];117(20):4623–32.
104. Rowland, A.; Dias, M.M.; Wiese, M.D.; Kichenadasse, G.; McKinnon, R.A.; Karapetis, C.S.; Soric, M.J. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2015, 112, 1888–1894.
105. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: A meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015 Mar [cited 2019 May 17];51(5):587–94.
106. Geissler, M.; Riera-Knorrenschild, J.; Tannapfel, A.; Greeve, J.; Florschütz, A.; Wessendorf, S.; Ettrich, T.; Kanzler, S.; Nörenberg, D.; Ricke, J.; et al. mFOLFOXIRI + panitumumab versus FOLFOXIRI as first-line treatment in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer m(CRC): A randomized phase II VOLFI trial of the AIO (AIO-KRK0109). *J. Clin. Oncol.* **2019**, 37, 3401–3411.

107. Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle P-J, Elez E, et al. Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With *BRAF* V600E–Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. *J Clin Oncol* . 2019 Mar 20 [cited 2019 May 17];JCO.18.02459.
108. Kopetz S, McDonough SL, Morris VK, Lenz H-J, Magliocco AM, Atreya CE, et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in *BRAF* -mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *J Clin Oncol* . 2017 Feb 21 [cited 2019 May 17];35(4_suppl):520–520.
109. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol* . 2014 May [cited 2019 May 17];25(5):1032–8.
110. Sartore-Bianchi A, Amatu A, Porcu L, . HER2 positivity predicts unresponsiveness to EGFR-targeted treatment in metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2019;24:1395–1402.
111. Luqmani, Y. A. (2005). "Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy." *Medical Principles and Practice* 14(suppl 1)(Suppl. 1): 35-48.
112. Pin AL, Houle F, Huot J. Recent advances in colorectal cancer research: the microenvironment impact. *Cancer Microenviron*. 2011;4(2):127-131.
113. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-715.
114. Radisky DC. Fibroblasts act as co-conspiracy for chemotherapy resistance. *Cancer Biology & Therapy* 2008;7:1348-1349.
115. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-890.
116. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):275-92.
117. Zhao J, Li W, Zhu D, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Med Oncol*. 2014;31(1):802.
118. Cummings J, Boyd G, Ethell BT, et al. Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(4):607-613.
119. Fujiwara Y, Minami H. An overview of the recent progress in irinotecan pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2010;11(3):391-406.

120. McLeod HL, Keith WN. Variation in topoisomerase I gene copy number as a mechanism for intrinsic drug sensitivity. *Br J Cancer*. 1996;74(4):508-512.
121. Smith DH, Christensen IJ, Jensen NF, et al. Mechanisms of topoisomerase I (TOP1) gene copy number increase in a stage III colorectal cancer patient cohort. *PLoS One*. 2013;8(4):e60613. doi:10.1371/journal.pone.0060613
122. Nygård SB, Christensen IJ, Nielsen SL, Nielsen HJ, Brønner N, Spindler KL. Assessment of the topoisomerase I gene copy number as a predictive biomarker of objective response to irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(1):84-91.
123. Gongora C, Vezio-Vie N, Tuduri S, et al. New Topoisomerase I mutations are associated with resistance to camptothecin. *Mol Cancer*. 2011;10:64. Published 2011 May 27.
124. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004;126(2):394-401. doi:10.1053/j.gastro.2003.12.023.
125. Loganayagam A, Arenas Hernandez M, Corrigan A, et al. Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br J Cancer*. 2013;108(12):2505-2515.
126. Qiu LX, Tang QY, Bai JL, et al. Predictive value of thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer patients receiving fluoropyrimidine-based chemotherapy: evidence from 24 studies. *Int J Cancer*. 2008;123(10):2384-2389.
127. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2004;22(3):529-536.
128. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy?. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(6):835-840.
129. Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(2):134-144.
130. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;69(1):58-66.

131. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res*. 2000;6(4):1322-1327
132. Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann Oncol*. 2008;19(5):915-919.
133. Koopman M, Venderbosch S, van Tinteren H, et al. Predictive and prognostic markers for the outcome of chemotherapy in advanced colorectal cancer, a retrospective analysis of the phase III randomised CAIRO study. *Eur J Cancer*. 2009;45(11):1999-2006.
134. Isshi K, Sakuyama T, Gen T, et al. Predicting 5-FU sensitivity using human colorectal cancer specimens: comparison of tumor dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activities with in vitro chemosensitivity to 5-FU. *Int J Clin Oncol*. 2002;7(6):335-342.
135. Muhale FA, Wetmore BA, Thomas RS, McLeod HL. Systems pharmacology assessment of the 5-fluorouracil pathway. *Pharmacogenomics*. 2011;12(3):341-350.
136. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Siena S, Bardelli A. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2014;8(6):1084-1094.
137. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, et al. Increased Detection Sensitivity for KRAS Mutations Enhances the Prediction of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Resistance in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 15 [cited 2019 May 18];17(14):4901-14.
138. Misale S., Yaeger R., Hobor S., Scala E., Janakiraman M., Liska D., et al. (2012) Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486: 532-536.
139. Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in ≥ 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One*. 2011;6(1):e15980. Published 2011 Jan 20. doi:10.1371/journal.pone.0015980.
140. Hirschi B., Gallmeier E., Ziesch A., Marschall M., Kolligs F. (2014) Genetic targeting of B-RafV600E affects survival and proliferation and identifies selective agents against BRAF-mutant colorectal cancer cells. *Mol Cancer* 13: 122.

141. Hobor S., Van Emburgh B., Crowley E., Misale S., Di Nicolantonio F., Bardelli A. (2014) TGF- α and amphiregulin paracrine network promotes resistance to EGFR blockade in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 20: 6429–6438.
142. Lieu C., Tran H., Jiang Z., Mao M., Overman M., Lin E., et al. (2013) The association of alternate VEGF ligands with resistance to anti-VEGF therapy in metastatic colorectal cancer. *PloS One* 8: e77117
143. Mizukami Y., Jo W., Duerr E., Gala M., Li J., Zhang X., et al. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nature Med* 11: 992–997
144. Mitchell E. (2013) Targeted therapy for metastatic colorectal cancer: role of aflibercept. *Clin Colorectal Cancer* 12: 73–85.
145. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. Ribatti D *Angiogenesis*. 2008; 11(3):215-21.
146. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, Zhang M, Westphal M, Deen DF, Shuman MA *Neoplasia*. 2000 Jul-Aug; 2(4):306-14.
147. Du R., Lu K., Petritsch C., Liu P., Ganss R., Passegue E., et al. (2008) HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13: 206–220.
148. Berretta J, Morillon A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Rep*. 2009;10(9):973-982. doi:10.1038/embor.2009.181.
149. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-561.
150. Yang MH, Yu J, Chen N, et al. Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2. *PLoS One*. 2013;8(12):e85353. Published 2013 Dec 30.
151. Kent OA, Mendell JT, Rottapel R. Transcriptional Regulation of miR-31 by Oncogenic KRAS Mediates Metastatic Phenotypes by Repressing RASA1. *Mol Cancer Res*. 2016;14(3):267-277.
152. Bovell, L.C.; Shanmugam, C.; Putcha, B.D.; Katkoori, V.R.; Zhang, B.; Bae, S.; Singh, K.P.; Grizzle, W.E.; Manne, U. The prognostic value of microRNAs varies with patient race/ethnicity and stage of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res*. 2013, 19, 3955–3965.

153. Cummins, J.M.; He, Y.; Leary, R.J.; Pagliarini, R.; Diaz, L.A., Jr.; Sjoblom, T.; Barad, O.; Bentwich, Z.; Szafranska, A.E.; Labourier, E.; et al. The colorectal microRNAome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 3687–3692
154. Michael, M.Z.; SM, O.C.; van Holst Pellekaan, N.G.; Young, G.P.; James, R.J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 2003, 1, 882–891.
155. Motoyama, K.; Inoue, H.; Takatsuno, Y.; Tanaka, F.; Mimori, K.; Uetake, H.; Sugihara, K.; Mori, M. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 2009, 34, 1069–1075.
156. Xiao Z, Chen S, Feng S, et al. Function and mechanisms of microRNA-20a in colorectal cancer. *Exp Ther Med.* 2020;19(3):1605-1616.
157. Ding L, Lan Z, Xiong X, et al. The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2791. Published 2018 Sep 17.
158. Gong J, Liu W, Zhang J, Miao X, Guo A-Y. lncRNASNP: a database of SNPs in lncRNAs and their potential functions in human and mouse. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D181-6.
159. Glinsky GV. SNP-guided microRNA maps (MirMaps) of 16 common human disorders identify a clinically accessible therapy reversig trnascriptional aberrations of nuclear import and inflammasome pathways. *Cell Cycle* 2008;7:3564-3576.
160. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med.* 2012;16(1):8-21.
161. Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J et al. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*2012;18:2827-2831
162. Min KT, Kim JW, Jeon YJ et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol Carcinog*2011;51:E65-73.
163. Mercer, T. R., Dinger, M. E., and Mattick, J. S. (2009) Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat. Rev. Genet.*10, 155–159
164. Gutschner, T., and Diederichs, S. (2012) The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.*9, 703–709.
165. Rao, A. K. D. M., Rajkumar, T., and Mani, S. (2017) Perspectives of long non-coding RNAs in cancer. *Mol. Biol. Rep.*44, 203–218.

166. Losko M, Kotlinowski J, Jura J. Long Noncoding RNAs in Metabolic Syndrome Related Disorders. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:5365209.
167. Wang, K. C., and Chang, H. Y. (2011) Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell*43, 904–914.
168. Zhao B, Lu M, Wang D, Li H, He X. Genome-Wide Identification of Long Noncoding RNAs in Human Intervertebral Disc Degeneration by RNA Sequencing. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3684875.
169. Xu MD, Qi P, Du X. Long non-coding RNAs in colorectal cancer: implications for pathogenesis and clinical application. *Mod Pathol.* 2014 Oct;27(10):1310-20.
170. Zheng HT, Shi DB, Wang YW, Li XX, Xu Y, Tripathi P, Gu WL, Cai GX, Cai SJ. High expression of lncRNA MALAT1 suggests a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 May 15;7(6):3174-81.
171. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S, Miyano S, Mori M. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res.* 2011 Oct 15;71(20):6320-6.
172. Dou J, Ni Y, He X, Wu D, Li M, Wu S, Zhang R, Guo M, Zhao F. Decreasing lncRNA HOTAIR expression inhibits human colorectal cancer stem cells. *Am J Transl Res.* 2016 Jan 15;8(1):98-108.
173. Chen, S., Shen, X. Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer. *Mol Cancer* 19, 167 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01287-2>. Ding HX, Lv Z, Yuan Y, Xu Q. MiRNA Polymorphisms and Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2018;8:596. Published 2018 Dec 13.
174. Lizarbe MA, Calle-Espinosa J, Fernández-Lizarbe E, Fernández-Lizarbe S, Robles MÁ, Olmo N, Turnay J. Colorectal Cancer: From the Genetic Model to Posttranscriptional Regulation by Noncoding RNAs. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7354260.
175. Li L, Shang J, Zhang Y, et al. MEG3 is a prognostic factor for CRC and promotes chemosensitivity by enhancing oxaliplatin-induced cell apoptosis. *Oncol Rep* 2017;38:1383-92.
176. Bian Z, Jin L, Zhang J, et al. LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p. *Sci Rep* 2016;6:23892.
177. Lee H, Kim C, Ku JL, et al. A long non-coding RNA snaR contributes to 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Mol Cells* 2014;37:540-6.

178. Li Q, Lohr CV, Dashwood RH. Activator protein 2alpha suppresses intestinal tumorigenesis in the Apc(min) mouse. *Cancer Lett* 2009;283:36-42.
179. Cheetham S, Gruhl F, Mattick J, Dinger M. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *Br J Cancer*. 2013;108:2419.
180. Ling H, Vincent K, Pichler M, *et al.* Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene*. 2015;34:5003.
181. Pan W, Liu L, Wei J, *et al.* A functional lncRNA HOTAIR genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility. *Mol Carcinog*. 2016;55:90-96.
182. Wang R, Du L, Yang X, *et al.* Identification of long noncoding RNAs as potential novel diagnosis and prognosis biomarkers in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142:2291-2301.
183. Kong H, Wu Y, Zhu M, *et al.* Long non-coding RNAs: novel prognostic biomarkers for liver metastases in patients with early stage colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7:50428.
184. Wang Y, Wu S, Yang X, Li X, Chen R. Association between polymorphism in the promoter region of lncRNA GAS5 and the risk of colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2019;39.
185. M-l Yang, Z Huang. Wu L-n, Wu R, Ding H-x and Wang B-g. lncRNA-PCAT1 rs2632159 polymorphism could be a biomarker for colorectal cancer susceptibility. *Biosci Rep*. 2019;39.
186. Lv Z, Xu Q, Sun L, *et al.* Four novel polymorphisms in long non-coding RNA HOTTIP are associated with the risk and prognosis of colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2019;39.
187. Gong J, Tian J, Lou J, *et al.* A functional polymorphism in lnc-LAMC2-1: 1 confers risk of colorectal cancer by affecting miRNA binding. *Carcinogenesis*. 2016;37:443-451.
188. Li L, Sun R, Liang Y, *et al.* Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32:104.
189. Ragusa M, Statello L, Maugeri M, Barbagallo C, Passanisi R, Alhamdani MS, Li Destri G, Cappellani A, Barbagallo D, Scalia M, Valadi H, Hoheisel JD, Di Pietro C, Purrello M. Highly skewed distribution of miRNAs and proteins between colorectal cancer cells and their exosomes following Cetuximab treatment: biomolecular, genetic and translational implications. *Oncoscience*. 2014 Mar 16;1(2):132-157.
190. Chiba M., Kimura M., Asari S. Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncology Reports*. 2012;28(5):1551–1558.

191. Zhu M., Huang Z., Zhu D., et al. A panel of microRNA signature in serum for colorectal cancer diagnosis. *Oncotarget*. 2017;8:17081–17091.
192. Vautrot V, Chanteloup G, Elmallah M, et al. Exosomal miRNA: Small Molecules, Big Impact in Colorectal Cancer. *J Oncol*. 2019;2019:8585276. Published 2019 Oct 13.
193. Xiangxiang Liu BP, Li Sun, Xiaoxiang Chen, Kaixuan Zeng, Xiuxiu Hu, Tao Xu, Mu Xu and Shukui Wang. 2018. Circulating Exosomal miR-27a and miR-130a Act as Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 27(7):746-754.
194. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for colorectal cancer. Yan S, Han B, Gao S, Wang X, Wang Z, Wang F, Zhang J, Xu D, Sun B *Oncotarget*. 2017 Sep 1; 8(36):60149-60158.
195. Li J., Li B., Ren C., et al. The clinical significance of circulating GPC1 positive exosomes and its regulative miRNAs in colon cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8:101189–101202.
196. Li J., Chen Y., Guo X., et al. GPC1 exosome and its regulatory miRNAs are specific markers for the detection and target therapy of colorectal cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(5):838–847.
197. Mizoguchi A., Takayama A., Arai T., Kawauchi J., Sudo H. MicroRNA-8073: tumor suppressor and potential therapeutic treatment. *PLoS One*. 2018;13(12).
198. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, Deng Z, Kumar A, Zhang L, Merchant ML, Yan J, Miller DM, Zhang HG *Nat Commun*. 2017 Feb 17; 8():14448.
199. NucleoSpin Tissue in Genomic DNA from Tissue (ed. Macherey-Nagel). (2017).
200. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
201. Aryal S. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (2018). Available from: <https://microbenotes.com/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp/>.
202. You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, Lazo GR, Dvorak J, Anderson OD. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*. 2008 May 29;9:253.
203. C. R. Newton et al., “Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS),” *Nucleic Acids Res.*, vol. 106 17, no. 7, pp. 2503–2516, Apr. 1989.

204. He Q, Chen M, Lin X, Chen Z. Allele-specific PCR with a novel data processing method based on difference value for single nucleotide polymorphism genotyping of ALDH2 gene. *Talanta*. 2020 Dec 1;220:121432.
205. 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.
206. E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford et al., New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1), *European Journal of Cancer* 45(2) (2009), 228–247.
207. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0 Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010).
208. Ratain MJ (2002) Irinotecan dosing: does the CPT in CPT-11 stand for Can't predict toxicity? *J Clin Oncol* 20:7–8
209. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, Pasetto LM, Pessa S, Errante D, De Pangher V, Giusto M, Medici M, Gaion F, Sandri P, Galligioni E, Bonura S, Boccalon M, Biason P, Frustaci S (2006) The role of UGT1A1*28 polymorphism Rong GQ, Zhang XM, Chen B, Yang XD, Wu HR, Gong W. MicroRNA gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3617-3623.
210. Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandrés E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda E (2011) Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5- fluorouracil and irinotecan. *Pharm J* 11:429–436.
211. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, Pasetto LM, Pessa S, Errante D, De Pangher V, Giusto M, Medici M, Gaion F, Sandri P, Galligioni E, Bonura S, Boccalon M, Biason P, Frustaci S (2006) The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 24:3061–3068
212. Isaakidiou A, Gazouli M, Aravantinos G, Pectasides D, Theodoropoulos GE (2016) Prediction of response to combination chemotherapy with irinotecan in Greek patients with metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 12:193–197.
213. Chen P, Zhao X, Ma L (2013) Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 383:49–58

214. Henson BJ, Bhattacharjee S, O'Dee DM, Feingold E, Gollin SM (2009) Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Genes Chromosom Cancer* 48:569–582
215. Wang G, Chen L, Meng J, Chen M, Zhuang L, Zhang L (2013) Overexpression of microRNA-100 predicts an unfavorable prognosis in renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol* 45:373–379.
216. Fujino Y, Takeishi S, Nishida K, Okamoto K, Muguruma N, Kimura T, Kitamura S, Miyamoto H, Fujimoto A, Higashijima J, Shimada M, Rokutan K, Takayama T (2017) Downregulation of microRNA-100/microRNA-125b is associated with lymph node metastasis in early colorectal cancer with submucosal invasion. *Cancer Sci* 108:390–397.
217. Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandrés E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda E (2011) Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5- fluorouracil and irinotecan. *Pharm J* 11:429–436.
218. Lu Y, Zhao X, Liu Q, Li C, Graves-Deal R, Cao Z, Singh B, Franklin JL, Wang J, Hu H, Wei T, Yang M, Yeatman TJ, Lee E, Saito-Diaz K, Hinger S, Patton JG, Chung CH, Emmrich S, Klusmann JH, Fan D, Coffey RJ (2017) lncRNA MIR100HG derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/ β -catenin signaling. *Nat Med* 23:1331–1341.
219. Yang XD, Xu X, Zhang SY, Wu Y, Xing CG, Ru G, Xu HT, Cao JP (2015) Role of miR-100 in the radioresistance of colorectal cancer cells. *Am J Cancer Res* 5:545–559.
220. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N (2013) Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 42:1523–1532
16. Zhu Z, Xu Y, Du J, Tan J, Jiao H (2014) Expression of MicroRNA-218 in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its correlation with tumor progression and patient survival. *J Surg Oncol* 109:89–94.
221. Jiang L, Wang C, Sun C, Xu Y, Ding Z, Zhang X, Huang J, Yu H (2014) The impact of pri-miR-218 rs11134527 on the risk and prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7:6206–6212
222. Shi TY, Chen XJ, Zhu ML, Wang MY, He J, Yu KD, Shao ZM, Sun MH, Zhou XY, Cheng X, Wu X, Wei Q (2013) A pri-miR-218 variant and risk of cervical carcinoma in Chinese women. *BMC Cancer* 13:19

223. Li C, Zhang Y, Li Y, Ma Q, Liu S, Yao Y, Tan F, Shi L, Yao Y (2018) The association of polymorphisms in miRNAs with nonsmall cell lung cancer in a Han Chinese population. *Cancer Manag Res* 10:697–704.
224. Danesh H, Hashemi M, Bizhani F, Hashemi SM, Bahari G (2018) Association study of miR-100, miR-124-1, miR-218-2, miR-301b, miR-605, and miR-4293 polymorphisms and the risk of breast cancer in a sample of Iranian population. *Gene*. 647:73–78.
225. Moazeni-Roodi A, Bahari G, Taheri M, Ansari H, Hashemi M (2018) Association between miR-218 rs11134527 polymorphism and risk of selected types of cancer in Asian population: an updated metaanalysis of case-control studies. *Gene*. 678:370–376.
226. Pavkovic M, Vaidya VS (2016) MicroRNAs and drug-induced kidney injury. *Pharmacol Ther* 163:48–57.
227. Li P, Zhang X, Wang L, Du L, Yang Y, Liu T, Li C, Wang C (2017) lncRNA HOTAIR contributes to 5FU resistance through suppressing miR-218 and activating NF- κ B/TS signaling in colorectal cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 8:356–369.
228. Hu Y, Xu K, Yagüe E (2015) miR-218 targets survivin and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 151:269–280.
229. Zhuang Z, Hu F, Hu J, Wang C, Hou J, Yu Z, Wang TT, Liu X, Huang H (2017) MicroRNA-218 promotes cisplatin resistance in oral cancer via the PPP2R5A/Wnt signaling pathway. *Oncol Rep* 38:2051–2061.
230. Gao X, Yang L, Ma Y, Yang J, Zhang G, Huang G, Huang Q, Chen L, Fu F, Chen Y, Su D, Dong Y, Ma X, Lu C, Peng X (2013) No association of functional variant in pri-miR-218 and risk of congenital heart disease in a Chinese population. *Gene*. 523:173–177.
231. Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, Mandolesi A, Loupakis F, Zaniboni A, Catalano V, Quadri A, Zorzi F, Berardi R, Biscotti T, Labianca R, Falcone A, Cascinu S (2007) Nuclear factor- κ B tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 25:3930–3935.
232. Zhu J, Yang L, You W, Cui X, Chen Y, Hu J, Liu W, Li S, Song X, Wei Y, Zhang W, Li F (2015) Genetic variation in miR-100 rs1834306 is associated with decreased risk for esophageal squamous cell carcinoma in Kazakh patients in northwest China. *Int J Clin Exp Pathol* 8:7332–7340.
233. Motawi TK, Mady AE, Shaheen S, Elshenawy SZ, Talaat RM, Rizk SM (2019) Genetic variation in microRNA-100 (miR-100) rs1834306 T/C associated with hepatitis B virus (HBV) infection: correlation with expression level. *Infect Genet Evol* 73:444–449.

234. Wu C, Li M, Hu C, Duan H (2014) Prognostic role of microRNA polymorphisms in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 73:335–341.
235. Chen Z, Wu L, Lin Q, Shi J, Lin X, Shi L (2016) Evaluation of miR182/miR-100 ratio for diagnosis and survival prediction in bladder cancer. *Arch Iran Med* 19:645–651.
236. Stenholm L, Stoehlmacher-Williams J, Al-Batran SE, Heussen N, Akin S, Pauligk C, Lehmann S, Senff T, Hofheinz RD, Ehninger G, Kramer M, Goekkurt E (2013) Prognostic role of microRNA polymorphisms in advanced gastric cancer: a translational study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Ann Oncol* 24:2581–2588.
237. Q. Tang and S.S. Hann, HOTAIR: An oncogenic long noncoding RNA in human cancer, *Cellular Physiology and Biochemistry* 47(3) (2018), 893–913.
238. M. Hajjari and A. Salavaty, HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers, *Cancer Biology and Medicine* 12(1) (2015), 1–9.
239. L. Min, X. Mu, A. Tong, Y. Qian, C. Ling, T. Yi et al., The association between HOTAIR polymorphisms and cancer susceptibility: An updated systemic review and meta-analysis, *OncoTargets and Therapy* 14(11) (2018), 791–800.
240. Z.F. Luo, D. Zhao, X.Q. Li, Y.X. Cui, N. Ma, C.X. Lu et al., Clinical significance of HOTAIR expression in color cancer, *World of Journal Gastroenterology* 22(22) (2016), 5252–5259.
241. Liu Z, Sun M, Lu K, Liu J, Zhang M, Wu W, De W, Wang Z, Wang R. The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregulation of p21(WAF1/CIP1) expression. *PLoS One*. 2013 Oct 14;8(10):e77293.
242. Y. Yang, C. Jiang, Y. Yang, L. Guo, J. Huang, X. Liu et al., Silencing of lncRNA-HOTAIR decreases drug resistance of non-small cell lung cancer cells by inactivating autophagy via suppressing the phosphorylation of ULK1, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 497(4) (2018), 1003–1010.
243. H. Wang, Q. Li, S. Tang, M. Li, A. Feng, L. Qin et al., The role of long noncoding RNA HOTAIR in the acquired multidrug resistance of imatinib in chronic myeloid leukemia cells, *Hematology* 22(4) (2017), 208–216.
244. W.J. Gong, J.B. Peng, J.Y. Yin, X.P. Li, W. Zhen, L. Xiao et al., Association between well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms and platinum-based chemotherapy toxicity in Chinese patients with lung cancer, *Acta Pharmacologica Sinica* 38(4) (2017), 581–590.

245. K.W. Hon, N. Abu, N.S. Ab Mutalib and R. Jamal, miRNAs and lncRNAs as predictive biomarkers of response to FOLFOX therapy in colorectal cancer, *Frontiers in Pharmacology* 9 (2018), 1–10.
246. Y. Li, C. Bao, S. Gu, D. Ye, F. Jing, C. Fan et al., Associations between novel genetic variants in the promoter region of MALAT1 and risk of colorectal cancer, *Oncotarget* 8(54) (2017), 92604–92614.
247. Fardet A, Druesne-Pecollo N, Touvier M, Latino-Martel P. Do alcoholic beverages, obesity and other nutritional factors modify the risk of familial colorectal cancer? A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;119:94-112.
248. Wu S, Sun H, Wang Y, *et al.* MALAT1 rs664589 Polymorphism Inhibits Binding to miR-194-5p, Contributing to Colorectal Cancer Risk, Growth, and Metastasis. *Cancer Res.* 2019;79:5432-5441.
249. Z. Fang, W. Chen, Z. Yuan, X. Liu and H. Jiang, LncRNAMALAT1 contributes to the cisplatin-resistance of lung cancer by upregulation MRP1 and MDR1 via STAT3 activation, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 101 (2018), 536–542.
250. M. Long, M. Zhuan, S. Xu, R. Yang, W. Chen and S. Zhang, miR-92b-3p acts as a tumor suppressor by targeting Gabra3 in pancreatic cancer, *Molecular Cancer* 16(1) (2017), 167.
251. Y. Lu, G. Wei, L. Liu, Y. Mo, Q. Chen, L. Xu et al., Direct targeting of MAPK8IP1 by miR-10a-5p is a major mechanism for gastric cancer metastasis, *Oncology Letters* 13(3) (2017), 1131–1136.
252. P. Li, X. Zhang, H. Wang, L. Wang, T. Liu, L. Du et al., MALAT1 is associated with poor response to oxaliplatin based chemotherapy in colorectal cancer patients and promotes chemoresistance through EZH2, *Molecular Cancer Therapeutics* 16(4) (2017), 739–751.
253. J.Z. Wang, J.J. Xiang, L.G. Wu, Y.S. Bai, Z.W. Chen, X.Q. Yin et al., A genetic variant in long non-coding RNA MALAT1 associated with survival outcome among patients with advanced lung adenocarcinoma: A survival cohort analysis, *BMC Cancer* 17 (2017), 167.
254. X.R. Qian, L. Chen, J.T. Liu, B.L. Zhu, Q. N Zhao, E.M. Ding et al., Association between polymorphisms of MALAT1 and blood lead levels in lead-exposed workers, *Biomedical and Environmental Sciences* 7 (2018), 525–530.
255. J. Liu, W.X. Peng, Y.Y. Mo and D. Luo, MALAT-1 mediated tumorigenesis, *Frontiers in Bioscience* 22 (2017), 66–80.
256. D. Mouradov, E. Domingo, P. Gibbs, R.N. Jorissen, S. Li, P.Y. Soo, L. Lipton, Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and

microsatellite instability, but not by specific driver mutations, *American Journal of Gastroenterology* 108(11) (2013), 1785–1793.

257. B.O. Van Emburgh, S. Arena, G. Siravegna, L. Lazzari, G. Crisafulli, G. Corti et al., Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer, *Nature Communications* 7 (2016), 13665.