



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**<<Ανοσολογικοί και Προβλεπτικοί Βιοδείκτες του
Καρκίνου του Παχέος Εντέρου>>**

**<<Immunological and Predictive Biomarkers of
Colorectal Cancer>>**

Εφραιμίδα Κλεονίκη Παυλίνα του Νέστορα Εφραιμίδα

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωτσάκης Αθανάσιος

Λάρισα 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κωτσάκης Αθανάσιος

Διευθυντής ογκολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τηλ: 2413502009

Email: thankotsakis@uth.gr

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματική του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τηλ: 30-2410-565206

Email: agiakountis@uth.gr

Ξαγαρά Αναστασία

Συμβασιούχος μεταδιδακτορική ερευνήτρια

Τηλ: 30-2410-685720

Email: xagaraa@hotmail.com

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες και ειλικρινέστερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, κ. Κωτσάκη, για την πολύτιμη καθοδήγησή του στην επιλογή του θέματος και για τη συνεχή στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης.

Επίσης, εκφράζω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον συνεπιβλέποντα της εργασίας μου, για τη διαθεσιμότητά του σε κάθε απορία και για τις ουσιαστικές συμβουλές του που συνέβαλαν καθοριστικά στην πορεία της μελέτης.

Ιδιαίτερη και βαθύτατη ευγνωμοσύνη οφείλω στην κ. Ξαγαρά Αναστασία, η οποία στάθηκε δίπλα μου σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής. Την ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές της, την επεξήγηση των δεδομένων, τις απαντήσεις σε κάθε ερώτημά μου, τις γνώσεις που μου προσέφερε απλόχερα και κυρίως για την υπομονή και τη στήριξή της. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική, καθώς χωρίς εκείνη η παρούσα μελέτη δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κωνσταντίνα Βασίλιεβα, μέλος του Εργαστηρίου Ογκολογίας, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε σε διάφορα στάδια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των ετησίως νεοδιαγνωσμένων κακοηθειών, καταλαμβάνοντας την τρίτη θέση σε συχνότητα εμφάνισης και τη δεύτερη ως αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με διττό στόχο. Ο πρωταρχικός στόχος ήταν ο ποσοτικός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυρίαρχων πληθυσμών ανοσοκαταστολής συγκεκριμένα των Tregs (CD4+CD25+FOXP3+), των προγονικών εξαντλημένων και των τελικά εξαντλημένων CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με CRC. Δευτερεύων, αλλά εξίσου σημαντικός στόχος, ήταν η διερεύνηση της αξίας αυτών των πληθυσμών ως προβλεπτικών βιοδεικτών σε σχέση με την ανταπόκριση στη θεραπεία, τον χρόνο μέχρι την υποτροπή, την επιβίωση και άλλες κλινικές παραμέτρους. Για τον σκοπό αυτό, αναλύθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου τα οποία χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά με τη χρήση πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας ροής. Οι ασθενείς με μεταστατική νόσο εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα ποσοστά Tregs, ενώ παρουσίασαν μείωση των εξαντλημένων CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων συγκριτικά με τους υγιείς δότες. Επιπλέον, καταγράφηκε ισχυρή θετική συσχέτιση ανάμεσα στην αφθονία των Tregs και στα επίπεδα των εξαντλημένων T-λεμφοκυττάρων. Αξιοσημείωτο εύρημα αποτέλεσε η συσχέτιση ασθενών με υψηλή συχνότητα Tregs και παράλληλα χαμηλή συχνότητα πρώιμων εξαντλημένων CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων με δυσμενέστερη επιβίωση και στις δύο ομάδες ασθενών. Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ότι ο μεταστατικός CRC συνοδεύεται από μια έντονη συστημική ανοσοκαταστολή, ανιχνεύσιμη στο περιφερικό αίμα, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία Tregs.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) accounts for approximately 10% of all newly diagnosed malignancies annually, ranking third in incidence and second in cancer-related mortality worldwide. The present study was designed with a dual objective. The primary aim was the quantitative and phenotypic characterization of key immunosuppressive populations, specifically Tregs (CD4+CD25+FOXP3+), progenitor exhausted, and terminally exhausted CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the peripheral blood of CRC patients. A secondary but equally important objective was to investigate the predictive value of these populations in relation to treatment response, time to relapse, survival, and other clinical parameters. To this end, peripheral blood samples from patients with colorectal cancer were analyzed and phenotypically characterized using multiparametric flow cytometry. Patients with metastatic disease showed significantly increased proportions of Tregs, while both CD4+ and CD8+ exhausted T lymphocytes were reduced compared with healthy donors. Furthermore, a strong positive correlation was observed between the abundance of Tregs and the levels of exhausted T lymphocytes. A notable finding was that patients with a high frequency of Tregs combined with a low frequency of progenitor exhausted CD4+ and CD8+ T cells had worse survival outcomes in both patient groups. Overall, the findings of this study indicate that metastatic CRC is accompanied by profound systemic immunosuppression detectable in peripheral blood, characterized by elevated levels of Tregs.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Ανατομία και φυσιολογία του παχέος εντέρου/ορθού	9
1.2 Επιδημιολογία του Καρκίνου του παχέος εντέρου	10
1.2.1Αιτιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου	12
1.2.3.Κλινική Εικόνα και Συμπτώματα	13
1.3. Διάγνωση και σταδιοποίηση	14
1.3.1. Διάγνωση του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου	14
1.3.2.Σταδιοποίηση του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου	15
1.4. Μορφές θεραπείας.....	15
1.6. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στον καρκίνο	18
1.7 Προβλεπτικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες	18
1.7.1 Μικροδορυφορική Αστάθεια	19
1.7.2 Μεταλλάξεις.....	21
1.8. Περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος (PBMCs) ως δείκτες	24
1.8.1. T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs)	24
1.8.2. Υποπληθυσμοί διαφοροποίησης/ωρίμανσης T-λεμφοκυττάρων.....	25
1.9.TCF1	27
1.10. PD-1	28
1.11. Συσχέτιση του TCF1 και PD1 με τον καρκίνο του παχέος εντερου	28
1.12. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση και κυτταρομετρία ροής	31
1.13. Σκοπός της παρούσας μελέτης	31
2.Υλικά και Μέθοδοι.....	33
2.1.Επιλογή δειγμάτων ασθενών	33

2.2 Απομόνωση PBMCs από το αίμα των ασθενών με την χρήση φυκόλης	33
2.3 Staining των κυττάρων: Προετοιμασία για Κυτταρόμετρο	34
2.4.Κυτταρόμετρο ροής	37
2.5 Στρατηγική ανάλυση(Gating strategy)	37
2.5.1.Gating strategy για τα T-ρυθμιστικά κύτταρά	41
2.5.2.Gating strategy για τους υποπληθυσμούς ωρίμανσης των T- λεμφοκυττάρων	38
2.6 Στατιστική Ανάλυση	40
3. Αποτελέσματα.....	42
3.1. Περιγραφή Κλινικών Δεδομένων Ασθενών	42
3.2 Ανάλυση του ποσοστού των T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον PD1 και τον TCF1	45
3.3. Ανάλυση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων	50
3.4.Συσχετιση μεταξύ των T- ρυθμιστικών και των CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων	52
3.5.Συσχέτιση του συνδυαστικού πληθυσμού των χαμηλής συχνότητας CD8 ⁺ PD-1 ⁺ TCF1 ⁺ κυττάρων και των υψηλής συχνότητας των FOXP3 ⁺ Tregs με το χρονικό περιθώριο χωρίς υποτροπής της νόσου και την επιβίωση των ασθενών	53
4.Συμπεράσματα.....	56
4.1. Εξήγηση αποτελεσμάτων	56
4.1.1 Ποσοστά των CD4/CD8 T-λεμφοκυττάρων κυττάρων που εκφράζουν PD1 και TCF1 στους ασθενείς και στους υγιείς δότες	56
4.1.2. Συσχέτιση των υποπληθυσμών αυτών των κυττάρων με την επιβίωση των ασθενών	58
4.1.3. Ποσοστά T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στους ασθενείς και στους υγιείς δότες	58
4.1.4. Συσχέτιση των Tregs κυττάρων με το χρονικό περιθώριο χωρίς υποτροπής της νόσου και την επιβίωση των ασθενών	59
4.1.5. Συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών T- ρυθμιστικών και των CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων	60

4.1.6.Συσχέτιση του συνδυαστικού πληθυσμού των χαμηλής συχνότητας CD8 ⁺ PD-1 ⁺ TCF1 ⁺ κυττάρων και των υψηλής συχνότητας των FOXP3 ⁺ Tregs με το χρονικό περιθώριο χωρίς υποτροπής της νόσου και την επιβίωση των ασθενών	61
4.2. Περιορισμοί της μελέτης	61
4.3. Μελλοντικοί στόχοι	62
5.Βιβλιογραφία.....	64

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ανατομία και φυσιολογία του παχέος εντέρου/ορθού

Το παχύ έντερο εκτείνεται από το ειλεοτυφλικό στόμιο έως τον πρωκτικό δακτύλιο και έχει συνολικό μήκος περίπου 1,5 μέτρο. Χωρίζεται σε τρία κύρια τμήματα: τυφλό, κόλον και ορθό με τον πρωκτό. Η κύρια του αποστολή είναι η απορρόφηση νερού και ηλεκτρολυτών και η αποθήκευση/απέκκριση κοπράνων. Το τυφλό είναι το αρχικό τμήμα, σε σχήμα θύλακα, το οποίο επικοινωνεί με το λεπτό έντερο μέσω της βαλβίδας του Bauhin (ειλεοτυφλικό βαλβίδα). Από το τυφλό εκφύεται η σκωληκοειδής απόφυση. Το κόλον αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του παχέος εντέρου και διαιρείται σε τέσσερις μοίρες, το Ανιόν κόλον το οποίο εκτείνεται από το τυφλό έως την ηπατική καμπή, το Εγκάρσιο κόλον το οποίο περνά εγκάρσια την κοιλιά, από την ηπατική έως τη σπληνική καμπή, το κατιόν κόλον το οποίο συνεχίζει προς τα κάτω στην αριστερή πλάγια κοιλιακή χώρα και τέλος το σιγμοειδές κόλον το οποίο καμπυλώνεται σε σχήμα "S". Μετά από το κόλον συναντάται το τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου το ορθό το οποίο έχει μήκος περίπου 12cm και λειτουργεί ως αποθήκη κοπράνων πριν την αφόδευση. Το ορθό αποτελεί το τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου το οποίο καταλήγει στο πρωκτικό δακτύλιο(1).

Η φυσιολογία του παχέος εντέρου επικεντρώνεται κυρίως στην τελική επεξεργασία των άπεπτων υπολειμμάτων της τροφής, με κύριους στόχους την απορρόφηση νερού και ηλεκτρολυτών, καθώς και τη διαμόρφωση και προσωρινή αποθήκευση των κοπράνων(2). Αφού ο χυλός (το μερικώς χωνεμένο φαγητό) περάσει από το λεπτό έντερο, εισέρχεται στο παχύ έντερο σε υδαρή μορφή. Μέσω αργών, τμηματικών συσπάσεων που ονομάζονται μυκηλιακές συστολές (haustral churning), το περιεχόμενο αναδεύεται, επιτρέποντας τη μέγιστη επαφή με τον βλεννογόνο για την απορρόφηση του νερού και των αλάτων. Παράλληλα, ένας κρίσιμος ρόλος επιτελείται από την πλούσια εντερική μικροχλωρίδα, τρισεκατομμύρια βακτήρια που ζυμώνουν τις άπεπτες φυτικές ίνες, παράγοντας λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) που τρέφουν τα κύτταρα του εντέρου και συνθέτουν απαραίτητες βιταμίνες, όπως η βιταμίνη K και ορισμένες βιταμίνες του συμπλέγματος B. Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) απορροφώνται από τα κολονοκύτταρα, προσφέροντας πηγή

ενέργειας και συμβάλλοντας στη ρύθμιση τόσο του pH όσο και της ανοσολογικής ομοιόστασης. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, έντονες περισταλτικές συσπάσεις, γνωστές ως μαζικές κινήσεις, προωθούν το εντερικό περιεχόμενο προς το ορθό. Με την προοδευτική απορρόφηση νερού, το περιεχόμενο καθίσταται πιο συμπαγές και μετατρέπεται σε σχηματισμένα κόπρανα, τα οποία παραμένουν αποθηκευμένα στο σιγμοειδές κόλον και το ορθό μέχρι την ενεργοποίηση του αντανακλαστικού της αφόδευσης(3).

Η ρύθμιση της κινητικότητας γίνεται από το εντερικό νευρικό σύστημα (ENS), με το μυεντερικό πλέγμα και το υποβλεννογόνιο πλέγμα να συντονίζουν την τοπική δραστηριότητα. Νευροδιαβιβαστές όπως η ακετυλοχολίνη και η σεροτονίνη, αλλά και ορμόνες όπως η γαστρίνη και το πεπτίδιο ΥΥ, συμμετέχουν στον έλεγχο της κινητικότητας(3).

1.2 Επιδημιολογία του Καρκίνου του παχέος εντέρου

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του GLOBOCAN που παρέχονται από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού αποτελεί το 10% των ετησίως νεοδιαγνωσμένων κακοηθειών καθιστώντας τον το τρίτο πιο συχνό είδος καρκίνου. Παράλληλα ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) ήταν η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (μετά τον καρκίνο του πνεύμονα), με εκτιμώμενο αριθμό 935.173 θανάτων και ηλικιακά προσαρμοσμένο δείκτη θνησιμότητας (ASMR) 9,0 ανά 100.000 άτομα ανά έτος το 2020(4).

Η επίπτωση της νόσου παρουσιάζει σημαντική γεωγραφική ποικιλομορφία, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται σε χώρες υψηλού εισοδήματος όπως η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, η Ευρώπη και η Βόρεια Αμερική, και τα χαμηλότερα στην Αφρική και τη Νότια-Κεντρική Ασία. Αυτή η κατανομή αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στις διαφορές στον τρόπο ζωής και τη διατροφή. Ωστόσο, αυτή η εικόνα αλλάζει, καθώς χώρες με μεσαίο HDI (human development index-δείκτης ανθρώπινης ανάπτυξης), ιδίως στην Ανατολική Ασία, βιώνουν μια ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων(5). Οι προβλέψεις για το μέλλον είναι δυσοίωνες, εκτιμώντας ότι τα νέα

περιστατικά θα φτάσουν τα 3,2 εκατομμύρια και οι θάνατοι τα 1,6 εκατομμύρια έως το 2040(4).

Μια από τις πιο ανησυχητικές τάσεις των τελευταίων δεκαετιών είναι η σταθερή αύξηση της επίπτωσης του ΚΠΕ σε άτομα ηλικίας κάτω των 50 ετών, μια κατάσταση γνωστή ως καρκίνος του παχέος εντέρου πρώιμης έναρξης (EOCRC) . Αυτή η αύξηση, που παρατηρείται σε πολλές χώρες υψηλού εισοδήματος, έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τη σταθεροποίηση ή μείωση των ποσοστών στους ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας(6). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, για παράδειγμα το ποσοστό των περιστατικών σε άτομα κάτω των 55 ετών αυξήθηκε από 11% το 1995 σε 20% το 2019 ενώ η επίπτωση σε νεότερους ενήλικες αυξάνεται κατά 1%-2% ετησίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1990(7). Σε παγκόσμιο επίπεδο, η επίπτωση και ο επιπολασμός (συνολικός αριθμός ασθενών) του EOCRC αυξήθηκαν σημαντικά μεταξύ 1990 και 2021, αν και τα ποσοστά θνησιμότητας μειώθηκαν, πιθανώς λόγω καλύτερων θεραπειών(6).

Παράλληλα με την αύξηση στους νέους, παρατηρείται και μια αλλαγή στον τρόπο που εκδηλώνεται η νόσος. Υπάρχει μια ανησυχητική μετατόπιση προς τη διάγνωση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σε πιο προχωρημένα στάδια. Στις ΗΠΑ, το 60% των νέων περιστατικών το 2019 ήταν προχωρημένου σταδίου (τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό), σε σύγκριση με 52% στα μέσα της δεκαετίας του 2000 .Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τους νεότερους ασθενείς, οι οποίοι είναι πιο πιθανό να διαγνωστούν με μεταστατική νόσο (Στάδιο IV). Επίσης παρατηρείται μια αύξηση των όγκων που εντοπίζονται στην αριστερή πλευρά του παχέος εντέρου και στο ορθό. Το ποσοστό του καρκίνου του ορθού αυξήθηκε από 27% το 1995 σε 31% το 2019(8).

Ενώ η συνολική θνησιμότητα από ΚΠΕ έχει μειωθεί σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες χάρη στα προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου και τις βελτιωμένες θεραπείες, οι τάσεις αυτές δεν είναι ομοιόμορφες(9). Η θνησιμότητα σε άτομα κάτω των 50 ετών στις ΗΠΑ αυξάνεται κατά 0,5%-3% ετησίως(7). Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές φυλετικές και εθνικές ανισότητες, με τους Αφροαμερικανούς να αντιμετωπίζουν δυσανάλογα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας σε σύγκριση με άλλες πληθυσμιακές ομάδες(10)

1.2.1 Αιτιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου

Η ανάπτυξή του είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία καθοδηγείται από μια περίπλοκη αλληλεπίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών και σχετιζόμενων με τον τρόπο ζωής παραγόντων. Η κατανόηση αυτών των παραγόντων, καθώς και των συμπτωμάτων που προκαλεί η νόσος, είναι κρίσιμη για την πρόληψη, την έγκαιρη διάγνωση και τη βελτίωση της πρόγνωσης των ασθενών(11).

Η πλειονότητα των περιπτώσεων ΚΠΕ είναι σποραδικές, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 70% του συνόλου, και συνδέονται με επίκτητες γενετικές μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλοιώσεις . Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό (20-30%) εμφανίζει οικογενή συσσωμάτωση, ενώ περίπου το 5% οφείλεται σε συγκεκριμένα κληρονομικά σύνδρομα υψηλού κινδύνου(11).

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι οφείλονται στην ανάπτυξη της νόσου. Αυτοί χωρίζονται σε μη τροποποιήσιμοι παράγοντες και αντίστοιχα σε τροποποιήσιμους(4). Από τους σημαντικότερους μη τροποποιήσιμους παράγοντες είναι τα κληρονομικά σύνδρομα που σχετίζονται με την νόσο. Δύο κύρια σύνδρομα ευθύνονται για τις περισσότερες κληρονομικές περιπτώσεις. Το Σύνδρομο Lynch, γνωστό και ως Κληρονομικός Μη-Πολυποδιακός Καρκίνος του Παχέος Εντέρου (HNPCC), είναι το συχνότερο και οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (Mismatch Repair - MMR) . Η Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση (FAP) είναι ένα σπανιότερο σύνδρομο που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο APC και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη εκατοντάδων πολυπόδων(12). Εκτός από κληρονομικά σύνδρομα στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες συμπεριλαμβάνονται και οι σποραδικές μεταλλάξεις. Σε αυτές περιπτώσεις, η συσσώρευση μεταλλάξεων σε βασικά γονίδια όπως τα APC, KRAS, BRAF και PIK3CA οδηγεί στη διαταραχή κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ., Wnt/β-catenin, RAS/RAF/MEK/ERK), προωθώντας την ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη(13). Κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου επίσης διαδραματίζουν και προϋπάρχουσες παθήσεις και άλλοι παράγοντες. Ανάμεσα τους οι πιο αξιοσημείωτοι είναι η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) η οποία προκαλεί χρόνια φλεγμονή που χαρακτηρίζει παθήσεις όπως η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου(14). Επιπρόσθετα

το μικροβίωμα του Εντέρου, και συγκεκριμένα, βακτήρια όπως το *Fusobacterium nucleatum*, το εντεροτοξινογόνο *Bacteroides fragilis* και το γονοτοξικό *Escherichia coli* (*rks+* *E. coli*), έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην καρκινογένεση μέσω της πρόκλησης χρόνιας φλεγμονής, της παραγωγής γονοτοξινών και της διαμόρφωσης του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου(15). Τέλος πρέπει να αναφερθεί η ηλικία και το φύλλο. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται σημαντικά στις ηλικίες άνω των 50 ετών. Βέβαια τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μία ανησυχητική αύξηση της επίπτωσης σε άτομα κάτω των 50 ετών (Early-Onset CRC)(16). Όσον αφορά το φύλλο η νόσος είναι ελαφρώς συχνότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες (12).

Προχωρώντας στους τροποποιήσιμους παράγοντες οι κυριότεροι είναι ο τρόπος Ζωής και το περιβάλλον. Η διατροφή παίζει καθοριστικό ρόλο. Μια δίαιτα υψηλή σε κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας, ζωικά λίπη και σάκχαρα αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο. Αντίθετα, η κατανάλωση φυτικών ινών, δημητριακών ολικής άλεσης, φρούτων, λαχανικών, ασβεστίου και γαλακτοκομικών προϊόντων έχει προστατευτική δράση. Επίσης η παχυσαρκία και ο καθιστικός τρόπος ζωής αποτελούν ισχυρούς και ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου. Η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας και η υιοθέτηση ενός «δυτικού» τρόπου ζωής έχουν συνδεθεί άμεσα με την αυξανόμενη επίπτωση της νόσου. Τέλος τόσο το κάπνισμα όσο και η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ έχουν τεκμηριωθεί ως σημαντικοί παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης ΚΠΕ(14).

1.2.3.Κλινική Εικόνα και Συμπτώματα

Ένα από τα πιο επικίνδυνα χαρακτηριστικά του ΚΠΕ είναι ότι στα αρχικά του στάδια είναι συχνά ασυμπτωματικός ή προκαλεί μόνο μη ειδικά σημεία (17). Τα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται όταν ο όγκος μεγαλώσει αρκετά ώστε να προκαλέσει αιμορραγία ή απόφραξη του εντερικού αυλού. Η συμπτωματολογία μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική θέση του όγκου(18). Οι αλλαγές στις συνήθειες του εντέρου αποτελεί ένα από τα πιο κοινά συμπτώματα και μπορεί να περιλαμβάνει πρόσφατη εμφάνιση δυσκοιλιότητας, διάρροιας, αλλαγή στη σύσταση των κοπράνων ή εναλλαγές μεταξύ δυσκοιλιότητας και διάρροιας(19). Ένα άλλο σύμπτωμα ίσως

από τα πιο συχνά είναι η αιμορραγία από το ορθό (Αιματοχεσία). Η παρουσία ορατού, ζωηρού κόκκινου αίματος στα κόπρανα είναι ένα σημαντικό προειδοποιητικό σημάδι, ιδιαίτερα για όγκους που εντοπίζονται στο ορθό ή το σιγμοειδές (17). Η νόσος επίσης μπορεί να εκδηλωθεί και ως κοιλιακός πόνος και δυσφορία συγκεκριμένα ως κράμπες ή αίσθημα φουσκώματος που δεν υποχωρεί. Σε όγκους που εντοπίζονται στο δεξιό (ανιόν) κόλον, η χρόνια, μη ορατή απώλεια αίματος είναι συχνή και οδηγεί σε σιδηροπενική αναιμία. Αυτή μπορεί να είναι η μοναδική εκδήλωση της νόσου, προκαλώντας συμπτώματα όπως ανεξήγητη κόπωση, αδυναμία και ωχρότητα. Αποτελεί επίσης ένα κοινό σύμπτωμά το αίσθημα ατελούς κένωσης. Ιδιαίτερα σε όγκους του ορθού, ο ασθενής μπορεί να νιώθει ότι το έντερο δεν αδειάζει πλήρως μετά την κένωση (20). Τέλος η ανεξήγητη απώλεια βάρους είναι ένα σύμπτωμα που μπορεί να προκληθεί σε αρκετά είδη καρκίνων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η απώλεια βάρους χωρίς προφανή αιτία είναι ένα γενικό σύμπτωμα που μπορεί να υποδηλώνει προχωρημένη νόσο (18).

Δυστυχώς, τα συμπτώματα αυτά συχνά παραβλέπονται, ειδικά σε νεότερους ασθενείς, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη διάγνωση και χειρότερη πρόγνωση 14. Η σιωπηλή φύση της νόσου στα αρχικά της στάδια καθιστά τον προληπτικό έλεγχο, όπως η κολonosκόπηση, θεμελιώδη στρατηγική για την έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία (18).

1.3. Διάγνωση και σταδιοποίηση

1.3.1. Διάγνωση του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου

Η διαγνωστική διαδικασία για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) ξεκινά συνήθως είτε μέσω προληπτικού ελέγχου (screening) σε ασυμπτωματικά άτομα είτε κατόπιν διερεύνησης κλινικών συμπτωμάτων (19). Η κολonosκόπηση αναγνωρίζεται ως η εξέταση εκλογής (gold standard), καθώς παρέχει τη δυνατότητα άμεσης οπτικής επιθεώρησης ολόκληρου του παχέος εντέρου και ταυτόχρονα επιτρέπει τη λήψη βιοψιών από ύποπτες βλάβες (20). Η χρήση προηγμένων ενδοσκοπικών τεχνικών, όπως η απεικόνιση στενής ζώνης (Narrow-band imaging - NBI), ενισχύει την αντίθεση των αγγειακών δομών και αναδεικνύει με μεγαλύτερη σαφήνεια τις λεπτές αλλοιώσεις της επιφάνειας του βλεννογόνου, βελτιώνοντας έτσι την ακρίβεια της ενδοσκοπικής

αξιολόγησης(21). Σε περιπτώσεις όπου η πλήρης κολονοσκόπηση είναι ανέφικτη, για παράδειγμα λόγω στένωσης που δεν επιτρέπει τη διόδο του ενδοσκοπίου, η αξονική κολονογραφία (CTC) αποτελεί μια αξιόπιστη εναλλακτική δεύτερης γραμμής(22). Η οριστική και αδιαμφισβήτητη διάγνωση του αδενοκαρκινώματος τίθεται πάντοτε μέσω της ιστοπαθολογικής εξέτασης του ιστού που λαμβάνεται κατά τη βιοψία, η οποία επιβεβαιώνει την παρουσία κακοήθειας και παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για τον ιστολογικό τύπο και τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου(20).

1.3.2.Σταδιοποίηση του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου

Μετά την ιστολογική επιβεβαίωση της διάγνωσης, η ακριβής σταδιοποίηση της νόσου είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς καθοδηγεί τις θεραπευτικές αποφάσεις και αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα .Το διεθνώς αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης είναι το σύστημα TNM, το οποίο αναπτύχθηκε και ενημερώνεται περιοδικά από την American Joint Committee on Cancer (AJCC)(23). Το σύστημα αυτό αξιολογεί τρεις παραμέτρους: την τοπική επέκταση του πρωτοπαθούς όγκου (T), την παρουσία μεταστάσεων στους περιοχικούς λεμφαδένες (N) και την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων (M) . Η κατηγορία **T** (Tumor) περιγράφει το βάθος διήθησης του όγκου στο εντερικό τοίχωμα, ξεκινώντας από τον βλεννογόνο (Tis) και φτάνοντας έως τη διήθηση γειτονικών οργάνων (T4b) 8. Η κατηγορία **N** (Nodes) ποσοτικοποιεί την έκταση της λεμφαδενικής προσβολής, από την απουσία μεταστάσεων (N0) έως την παρουσία μεταστάσεων σε επτά ή περισσότερους λεμφαδένες (N2b) . Η κατηγορία **M** (Metastasis) καταγράφει την απουσία (M0) ή την παρουσία (M1) μεταστάσεων σε απομακρυσμένα όργανα όπως το ήπαρ ή οι πνεύμονες{Citation}. Για τον καθορισμό του σταδίου χρησιμοποιούνται οι απεικονιστικές μέθοδοι που προαναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα· η αξονική τομογραφία (CT) χρησιμοποιείται ευρέως για τη συνολική σταδιοποίηση, ενώ ειδικά για τον καρκίνο του ορθού, η μαγνητική τομογραφία (MRI) και το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS) αποτελούν τις μεθόδους εκλογής για την ακριβή εκτίμηση της τοπικής επέκτασης (στάδια T και N)(22).

1.4. Μορφές Θεραπείας

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) έχει εξελιχθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες, μεταβαίνοντας από τις παραδοσιακές μεθόδους σε μια

πολυδιάστατη και ολοένα και πιο εξατομικευμένη προσέγγιση . Η σύγχρονη θεραπευτική στρατηγική συνδυάζει πολλαπλές μεθόδους, όπως η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, οι στοχευμένες θεραπείες και η ανοσοθεραπεία, με τις αποφάσεις να καθοδηγούνται από το στάδιο της νόσου, τη μοριακή υπογραφή του όγκου και τα ατομικά χαρακτηριστικά του ασθενούς (24).

Από όλες τις παραδοσιακές θεραπευτικές μεθόδους η χειρουργική επέμβαση αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για τον εντοπισμένο ΚΠΕ και παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας με στόχο την ίαση. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες θεραπείες, είτε προεγχειρητικά (neoadjuvant) για τη συρρίκνωση του όγκου, είτε μετεγχειρητικά (adjuvant) για την εξάλειψη πιθανών υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων (24). Πέρα από το χειρουργείο για δεκαετίες, η χημειοθεραπεία αποτελούσε τη βάση της συστηματικής θεραπείας για τον μεταστατικό ΚΠΕ (mCRC) . Συνδυαστικά σχήματα που περιλαμβάνουν φάρμακα όπως η φθοριοουρακίλη (5-FU), η οξαλιπλατίνη και η ιρινοτεκάνη, έχουν βελτιώσει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών, επεκτείνοντάς την σε πάνω από 20 μήνες . Η χημειοθεραπεία παραμένει ένα κεντρικό συστατικό της θεραπείας, συχνά σε συνδυασμό με νεότερες, στοχευμένες θεραπείες(24) Μια θεραπεία που προτιμάται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις είναι η ακτινοθεραπεία η οποία είναι μια βασική θεραπευτική επιλογή, ιδιαίτερα για τον καρκίνο του ορθού, όπου χρησιμοποιείται συχνά πριν από τη χειρουργική επέμβαση (προεγχειρητική θεραπεία) για τη μείωση του μεγέθους του όγκου και του κινδύνου τοπικής υποτροπής (24). Πλέον έχουν έρθει στο επίκεντρο και οι στοχευμένες θεραπείες. Η κατανόηση των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν στην καρκινογένεση επέτρεψε την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών, οι οποίες δρουν σε συγκεκριμένους μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων. Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται άμεσα από το μοριακό προφίλ του όγκου του κάθε ασθενούς (25). Οι κύριες κατηγορίες στοχευμένων θεραπειών περιλαμβάνουν τους αρχικά τους αναστολείς της αγγειογένεσης (Anti-VEGF/VEGFR). Η αγγειογένεση, δηλαδή η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων, είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τη μετάσταση των όγκων . Φάρμακα όπως το bevacizumab, το ramucirumab και το aflibercept στοχεύουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) ή τους υποδοχείς του (VEGFR), εμποδίζοντας την τροφοδοσία του

όγκου με αίμα(26).Επίσης χρησιμοποιούνται και οι αναστολείς του Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Anti-EGFR): Ο EGFR είναι ένας υποδοχέας που παίζει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό . Μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τον EGFR έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά, αλλά μόνο σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι δεν φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS* (*K-ras*, *N-ras*) και *BRAF*. Η έρευνα έχει αναδείξει και άλλους μοριακούς στόχους, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* και η ενίσχυση του γονιδίου *HER2*, για τους οποίους αναπτύσσονται εξειδικευμένες στοχευμένες θεραπείες (26).

Μια πρόσφατη μορφή θεραπείας είναι η ανοσοθεραπεία. Η ανοσοθεραπεία αντιπροσωπεύει μια επανάσταση στη θεραπεία του καρκίνου, καθώς δεν στοχεύει άμεσα τον όγκο, αλλά ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του ασθενούς ώστε να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα(27) . Οι αναστολείς σημείων ελέγχου του Ανοσοποιητικού (Immune Checkpoint Inhibitors - ICIs) είναι η πιο καθιερωμένη μορφή ανοσοθεραπείας για τον ΚΠΕ(28). Έχει αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματική, αλλά σε μια συγκεκριμένη υποομάδα ασθενών: εκείνους των οποίων οι όγκοι παρουσιάζουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) ή ανεπάρκεια στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (dMMR) . Αυτοί οι όγκοι φέρουν υψηλό μεταλλακτικό φορτίο, γεγονός που τους καθιστά πιο «ορατούς» στο ανοσοποιητικό σύστημα . Αντίθετα, η πλειονότητα των όγκων που είναι μικροδορυφορικά σταθεροί (MSS) δεν ανταποκρίνονται εξίσου καλά στη μονοθεραπεία με ICIs .Η έρευνα εστιάζει σε νέες στρατηγικές για να επεκτείνει τα οφέλη της ανοσοθεραπείας σε περισσότερους ασθενείς. Αυτές περιλαμβάνουν τις υιοθετημένες κυτταρικές θεραπείες (όπως τα CAR-T κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο- TILs), τους ογκολυτικούς ιούς και τα θεραπευτικά εμβόλια, τα οποία βρίσκονται υπό κλινική διερεύνηση (29).

Η σύγχρονη διαχείριση του καρκίνου του παχέος εντέρου έχει απομακρυνθεί από μια ενιαία προσέγγιση . Η επιλογή της θεραπείας είναι πλέον μια εξατομικευμένη διαδικασία που βασίζεται σε μια βαθιά κατανόηση της βιολογίας του όγκου . Ο προσδιορισμός βιοδεικτών όπως η κατάσταση των γονιδίων *RAS* και *BRAF*, το καθεστώς MSI/dMMR και η έκφραση του *HER2* είναι απαραίτητος για την καθοδήγηση

των θεραπευτικών αποφάσεων . Οι συνδυαστικές θεραπείες και οι προ εγχειρητικές (neoadjuvant) στρατηγικές αποτελούν πεδία έντονης έρευνας, με απώτερο στόχο τη βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών (25).

1.6. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στον καρκίνο

Το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει διττό ρόλο στην ογκογένεση. Αφενός, μέσω της διαδικασίας της ανοσοεπιτήρησης, μπορεί να αναγνωρίσει και να εξαλείψει τα μετασχηματισμένα κύτταρα προτού εξελιχθούν σε κλινικά εμφανείς όγκους . Τα Τ-λεμφοκύτταρα, και ειδικότερα τα κυτταροτοξικά CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα, αποτελούν τους κύριους εκτελεστές αυτής της αντικαρκινικής δράσης. Αφετέρου, η χρόνια φλεγμονή, η οποία συνδέεται με ορισμένους τύπους καρκίνου μπορεί να προάγει την ογκογένεση μέσω της παραγωγής αυξητικών παραγόντων και της δημιουργίας ενός περιβάλλοντος που ευνοεί την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό (30).

Κατά τη διαδικασία της ανοσοτροποποίησης (immunoediting), η συνεχής πίεση που ασκεί το ανοσοποιητικό σύστημα οδηγεί στην επιλογή καρκινικών κλώνων που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς διαφυγής. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την απώλεια της έκφρασης αντιγόνων (π.χ., μόρια MHC), την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών (π.χ., TGF-β, IL-10) και την ενεργοποίηση ανοσολογικών σημείων ελέγχου (immune checkpoints) . Τα σημεία ελέγχου, όπως το PD-1 (Programmed cell death protein 1) και το CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), είναι μόρια που φυσιολογικά ρυθμίζουν την ένταση της ανοσολογικής απόκρισης για να αποτρέψουν την αυτοανοσία. Οι όγκοι μπορούν να εκμεταλλευτούν αυτούς τους μηχανισμούς εκφράζοντας τους συνδέτες τους (π.χ., PD-L1), οδηγώντας έτσι στην εξάντληση και απενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο . Η κατανόηση αυτών των μονοπατιών οδήγησε στην ανάπτυξη αναστολέων σημείων ελέγχου (checkpoint inhibitors), φαρμάκων που μπλοκάρουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις και "απελευθερώνουν" τα Τ-κύτταρα για να επιτεθούν στον όγκο(31).

1.7 Προβλεπτικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες

Στην ογκολογία, οι βιοδείκτες είναι κρίσιμης σημασίας για την καθοδήγηση των κλινικών αποφάσεων και διακρίνονται σε προγνωστικούς και προβλεπτικούς. Οι προγνωστικοί βιοδείκτες παρέχουν πληροφορίες για την πιθανή πορεία και εξέλιξη της νόσου, ανεξάρτητα από τη θεραπεία που θα λάβει ο ασθενής (π.χ., το στάδιο TNM). Αντίθετα, οι προβλεπτικοί βιοδείκτες υποδεικνύουν την πιθανότητα απόκρισης ή αντίστασης σε μια συγκεκριμένη θεραπεία. Η ταυτοποίηση αξιόπιστων βιοδεικτών είναι θεμελιώδης για την εφαρμογή της εξατομικευμένης θεραπείας, επιτρέποντας τη χορήγηση της σωστής θεραπείας στον σωστό ασθενή τη σωστή στιγμή(32).

Στον ΚΠΕ, αρκετοί μοριακοί βιοδείκτες χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πράξη. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS* (όπως *KRAS*, *NRAS*) και *BRAF* είναι σημαντικοί προβλεπτικοί δείκτες για την απόκριση στη θεραπεία με αναστολείς του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (anti-EGFR). Ασθενείς με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια δεν ωφελούνται από τη συγκεκριμένη θεραπεία(33). Ένας άλλος κρίσιμος βιοδείκτης είναι η κατάσταση της μικροδορυφορικής αστάθειας (Microsatellite Instability - MSI), η οποία προκύπτει από δυσλειτουργία του συστήματος επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων του DNA (Mismatch Repair - MMR). Όγκοι με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) ή ανεπάρκεια στο σύστημα MMR (dMMR) έχουν καλύτερη πρόγνωση αλλά, κυρίως, παρουσιάζουν εξαιρετική απόκριση στην ανοσοθεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου(24).

1.7.1 Μικροδορυφορική Αστάθεια

Η μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability - MSI) είναι ένα μοναδικό μοριακό χαρακτηριστικό που παρατηρείται περίπου στο 15% όλων των καρκίνων του παχέος εντέρου (ΚΠΕ). Αντιπροσωπεύει έναν ξεχωριστό μηχανισμό καρκινογένεσης και αποτελεί έναν κρίσιμο βιοδείκτη για την πρόγνωση, την πρόβλεψη της θεραπευτικής απόκρισης και την αναγνώριση κληρονομικών συνδρόμων. Η κατανόηση της MSI απαιτεί την εξήγηση των μικροδορυφόρων, του μηχανισμού που τους διατηρεί σταθερούς και των συνεπειών της δυσλειτουργίας αυτού του μηχανισμού(34). Οι μικροδορυφόροι, γνωστοί και ως βραχείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Short Tandem Repeats - STRs), είναι μικρά τμήματα του DNA που

αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 1 έως 6 νουκλεοτιδίων . Αυτές οι αλληλουχίες είναι διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα, τόσο σε περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όσο και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές . Λόγω της επαναληπτικής φύσης τους, οι μικροδορυφόροι είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε σφάλματα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, όπου το ένζυμο DNA πολυμεράση μπορεί να «γλιστρήσει», οδηγώντας στην εισαγωγή ή διαγραφή επαναλαμβανόμενων μονάδων(35). Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI) είναι η κατάσταση κατά την οποία το μήκος αυτών των μικροδορυφόρων παρουσιάζει μεταβολές (αύξηση ή μείωση) στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα του ίδιου ατόμου . Αυτό αποτελεί ένδειξη ενός ελαττωματικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA(36).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα σφάλματα που συμβαίνουν στους μικροδορυφόρους κατά την αντιγραφή του DNA διορθώνονται από ένα εξειδικευμένο σύστημα επιδιόρθωσης που ονομάζεται Mismatch Repair (MMR). Αυτό το σύστημα αναγνωρίζει και επιδιορθώνει τις αταίριαστες βάσεις. Το σύστημα MMR αποτελείται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών, με τις πιο σημαντικές να είναι οι MLH1, MSH2, MSH6, και PMS2, οι οποίες σχηματίζουν λειτουργικά ετεροδιμερή (MLH1/PMS2 και MSH2/MSH6) . Η μικροδορυφορική αστάθεια είναι το φαινοτυπικό αποτέλεσμα της ανεπάρκειας αυτού του συστήματος (deficient Mismatch Repair - dMMR) 2. Όταν το σύστημα MMR είναι ελαττωματικό, τα σφάλματα συσσωρεύονται, οδηγώντας σε έναν φαινότυπο όπου η μικροδορυφόροι παρουσιάζουν μεταβολές στα μήκη τους(36).

Η ανεπάρκεια του συστήματος MMR μπορεί να προκύψει μέσω δύο διακριτών μηχανισμών. Ο πρώτος είναι λόγω κληρονομικότητας όπου περίπου το 3% των περιπτώσεων ΚΠΕ με MSI οφείλεται στο Σύνδρομο Lynch, το πιο συχνό κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου του παχέος έντερου. Σε αυτούς τους ασθενείς, υπάρχει μια κληρονομούμενη μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια του MMR (συνηθέστερα στα *MLH1* ή *MSH2*). Όμως η πλειονότητα των περιπτώσεων MSI (περίπου 12% του συνόλου των ΚΠΕ) δεν είναι κληρονομική. Ο συνηθέστερος μηχανισμός σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η επιγενετική σίγαση του γονιδίου *MLH1* μέσω της

υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι η δυσλειτουργία του συστήματος MMR(37).

Όταν το σύστημα MMR είναι ανενεργό, οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται με υψηλό ρυθμό, ιδιαίτερα σε γονίδια που περιέχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες στις κωδικοποιούσες περιοχές τους. Ορισμένα από τα γονίδια που πλήττονται συχνά σε όγκους με MSI περιλαμβάνουν τον TGFβ-R2 (Transforming growth factor-beta receptor 2) ο οποίος είναι ένας βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης, την BAX (Bcl-2-associated X protein), μια πρωτεΐνη που προάγει την απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) , τον IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) , τον E2F4 (E2F transcription factor 4) κ.α. Η αδρανοποίηση αυτών των γονιδίων, που κανονικά ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση και τον θάνατο, συμβάλλει άμεσα στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου(35).

Οι όγκοι με MSI ταξινομούνται συνήθως σε τρεις κατηγορίες: MSI-High (MSI-H) δηλαδή υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. MSI-Low (MSI-L), χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και MSS (Microsatellite Stable) δηλαδή μικροδορυφορικά σταθεροί. Κλινικά, η πιο σημαντική διάκριση είναι μεταξύ των όγκων MSI-H και MSS, καθώς οι όγκοι MSI-L συχνά ομαδοποιούνται με τους MSS(38). Οι όγκοι MSI-H παρουσιάζουν διακριτά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όπως καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους όγκους MSS. Εντοπίζονται κυρίως στο δεξιό (ανιόν) κόλον , και επίσης εμφανίζουν έντονη διήθηση από λεμφοκύτταρα και μια φλεγμονώδη αντίδραση που μοιάζει με τη νόσο του Crohn, κάτι που υποδηλώνει ισχυρή ανοσολογική απόκριση . Αυτή η έντονη ανοσολογική αντίδραση εξηγεί γιατί οι όγκοι MSI-H ανταποκρίνονται εξαιρετικά στην ανοσοθεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου(39).

1.7.2 Μεταλλάξεις

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) δεν είναι μια ενιαία νόσος, αλλά ένα ετερογενές σύνολο κακοηθειών που προκύπτουν από τη συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων. Αυτές οι αλλοιώσεις διαταράσσουν κρίσιμα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, επιβίωση και

μετάσταση των κυττάρων(40) . Η κατανόηση του μοριακού προφίλ κάθε όγκου είναι πλέον θεμελιώδης, καθώς καθοδηγεί τις προγνωστικές εκτιμήσεις και τις θεραπευτικές αποφάσεις, ιδίως όσον αφορά τις στοχευμένες θεραπείες(41). Οι πιο συχνά μεταλλαγμένες ογκογόνες και ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες στον ΚΠΕ περιλαμβάνουν τις TP53, KRAS, BRAF και PIK3CA(42).

1.7.2.1. TP53

Το TP53είναι ένα από τα πιο σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μεταλλάξεις στο TP53 είναι εξαιρετικά συχνές, ανιχνεύονται σε πάνω από το 50% των περιπτώσεων ΚΠΕ . Η πρωτεΐνη p53 παίζει κρίσιμο ρόλο στην απόκριση του κυττάρου στο στρες, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επιδιόρθωση του DNA ή απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Οι μεταλλάξεις του TP53 είναι συνήθως ένα **όψιμο γεγονός** στην καρκινογένεση, επιτρέποντας στα κύτταρα με γενετική αστάθεια να επιβιώσουν και να εξελιχθούν σε κακοήγη(43).

1.7.2.2. KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Virus)

Το KRAS είναι το **συχνότερα μεταλλαγμένο ογκογονίδιο** στον άνθρωπο και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον ΚΠΕ. Η συχνότητα των μεταλλάξεων KRAS κυμαίνεται ευρέως σε διαφορετικούς πληθυσμούς, από 30% έως πάνω από 50%.. Η συχνότητα είναι υψηλότερη σε μεταστατικούς όγκους (44). Το KRAS είναι μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/RAF/MAPK, το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Οι μεταλλάξεις, που συμβαίνουν κυρίως στα κωδικόνια 12 και 13 του εξονίου 2 **10, 12**, «κλειδώνουν» την πρωτεΐνη σε μια μόνιμα ενεργή κατάσταση, οδηγώντας σε συνεχή σηματοδότηση για πολλαπλασιασμό(45). Η κατάσταση του KRAS είναι ένας από τους πιο κρίσιμους προγνωστικούς και προβλεπτικούς βιοδείκτες. Οι μεταλλάξεις KRAS συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση κυρίως, με **αντίσταση σε στοχευμένες θεραπείες κατά του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα** (anti-EGFR), όπως η cetuximab και η panitumumab(45).

1.7.2.3 BRAF (B-Raf Proto-Oncogene)

Το BRAF είναι ένα γονίδιο που δρα αμέσως μετά το KRAS στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι (RAS/RAF/MAPK). Οι μεταλλάξεις BRAF απαντώνται στο 5-10% του συνόλου των ΚΠΕ. Η συχνότητά τους είναι σημαντικά υψηλότερη (30-45%) σε όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Η συνηθέστερη μετάλλαξη είναι η V600, η οποία οδηγεί σε συνταγματική ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK. Οι μεταλλάξεις BRAF συνδέονται συχνά με την εναλλακτική οδό καρκινογένεσης μέσω των οδοντωτών πολυπόδων και σχετίζονται με τον φαινότυπο CIMP (CpG Island Methylator Phenotype). Οι μεταλλάξεις BRAF αποτελούν ισχυρό αρνητικό προγνωστικό δείκτη, υποδηλώνοντας πιο επιθετική νόσο. Επίσης, προβλέπουν αντίσταση σε θεραπείες anti-EGFR. Οι μεταλλάξεις BRAF και KRAS είναι συνήθως αμοιβαία αποκλειόμενες, πράγμα που σημαίνει ότι ένας όγκος σπάνια φέρει και τις δύο(46).

1.7.2.4 PIK3CA

Το γονίδιο PIK3CA κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α του ενζύμου PI3K, το οποίο ρυθμίζει το κρίσιμο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR, που εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και μεταβολισμό. Οι μεταλλάξεις PIK3CA ανιχνεύονται στο 15-20% των ασθενών με ΚΠΕ, αν και άλλες μελέτες αναφέρουν χαμηλότερα ποσοστά, από 4% έως 6,4%. Οι μεταλλάξεις οδηγούν σε μόνιμη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, προάγοντας την ογκογένεση. Ο ρόλος τους ως προβλεπτικός δείκτης για την αντίσταση σε θεραπείες anti-EGFR παραμένει υπό διερεύνηση και θεωρείται αμφιλεγόμενος (47).

1.7.2.5 Άλλες Σημαντικές Μεταλλάξεις

Το γονίδιο NRAS είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας γονιδίων RAS το οποίο μεταλλάσσεται με χαμηλότερη συχνότητα (περίπου 4%). Ωστόσο, οι μεταλλάξεις του έχουν την ίδια κλινική σημασία με τις μεταλλάξεις KRAS, καθώς επίσης προκαλούν αντίσταση στις θεραπείες anti-EGFR. Για τον λόγο αυτό, οι κλινικές οδηγίες συνιστούν τον έλεγχο όλων των γονιδίων RAS (KRAS και NRAS). Τέλος ένα άλλο ογκοκατασταλτικό

γονίδιο που μεταλλάσσεται σε περίπου 10-15% των ΚΠΕ και αποτελεί μέρος του μονοπατιού του TGF-β(46)

1.8. Περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος (PBMCs) ως δείκτες

Τα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs) περιλαμβάνουν κυρίως λεμφοκύτταρα (T-κύτταρα, B-κύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα, NK) καθώς και μονοκύτταρα, και αποτελούν ένα αξιόπιστο και άμεσα προσβάσιμο βιολογικό υλικό, το οποίο λειτουργεί ως αντιπροσωπευτικό "παράθυρο" για την εκτίμηση της κατάστασης και της λειτουργικής δραστηριότητας του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανάλυσή τους μέσω της "υγρής βιοψίας" προσφέρει μια δυναμική και ελάχιστα επεμβατική μέθοδο για την παρακολούθηση της ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς έναντι του καρκίνου. Αλλαγές στη συχνότητα, τον φαινότυπο και τη λειτουργική κατάσταση των υποπληθυσμών των PBMCs μπορούν να συσχετιστούν με το φορτίο του όγκου, την πρόγνωση και την απόκριση στη θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοθεραπείας(48).

1.8.1. T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs)

Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs), που χαρακτηρίζονται κυρίως από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, είναι ένας υποπληθυσμός CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων με ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και η πρόληψη αυτοάνοσων νοσημάτων. Ωστόσο, στο πλαίσιο του καρκίνου, τα Tregs συσσωρεύονται τόσο μέσα στον όγκο όσο και στην περιφέρεια, όπου καταστέλλουν την αντικαρκινική δράση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και άλλων ανοσοκυττάρων. Οι όγκοι τα εκμεταλλεύονται για να προστατευθούν από την επίθεση των δραστικών T-λεμφοκυττάρων. Η αυξημένη διήθηση Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) συνδέεται στενά με κακή πρόγνωση σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, του πνεύμονα, του παγκρέατος και του μελανώματος ,καθιστώντας τα έναν σημαντικό προγνωστικό βιοδείκτη και θεραπευτικό στόχο(49). Καταστέλλουν τα δραστικά T-λεμφοκύτταρα μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Παράγουν ανασταλτικές κυτταροκίνες, όπως η IL-10 και ο TGF-β και καταναλώνουν την IL-2, μια κυτταροκίνη απαραίτητη για τον

πολλαπλασιασμό των δραστικών T-κυττάρων(50). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε ορισμένους καρκίνους, όπως του παχέος εντέρου και της ουροδόχου κύστης, η υψηλή διήθηση από Tregs έχει συσχετιστεί παραδόξως με καλύτερη πρόγνωση, υποδηλώνοντας έναν πολύπλοκο και εξαρτώμενο από τον ιστό ρόλο(51).

1.8.2. Υποπληθυσμοί διαφοροποίησης/ωρίμανσης T-λεμφοκυττάρων

Τα T-λεμφοκύτταρα υφίστανται μια διαδικασία διαφοροποίησης μετά την ενεργοποίησή τους από ένα αντιγόνο. Με βάση την έκφραση επιφανειακών δεικτών όπως οι CD45RA και CCR7, μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορα στάδια ωρίμανσης: ανώριμα (naïve, TN), κεντρικής μνήμης (central memory, TCM), εκτελεστικής μνήμης (effector memory, TEM) και τελικώς διαφοροποιημένα (terminally differentiated effector memory, TEMRA) . Η παρουσία ενός ισχυρού και μακράς διάρκειας πληθυσμού T-κυττάρων μνήμης (TCM και TEM) είναι απαραίτητη για μια διαρκή αντικαρκινική ανοσία και για την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας. Η ανάλυση αυτών των υποπληθυσμών στα PBMCs μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την "ποιότητα" της ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς(52).

1.8.2.1.Τα Ανώριμα T-λεμφοκύτταρα (Naïve T cells - T_N)

Τα ανώριμα T-λεμφοκύτταρα είναι λεμφοκύτταρα που δεν έχουν ακόμη συναντήσει το ειδικό τους αντιγόνο. Εδρεύουν κυρίως στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπως οι λεμφαδένες, όπου περιμένουν να ενεργοποιηθούν από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs).Εκφράζουν δείκτες όπως οι CD45RA, CCR7 και CD62L. Συγκεκριμένα τα naïve T-Κύτταρα αναγνωρίζονται από το προφίλ των εξής δεικτών: CD45RA+ / CD45RO- / CCR7+(52). Αποτελούν τη δεξαμενή από την οποία προέρχονται όλοι οι άλλοι τύποι δραστικών και μνημονικών T-λεμφοκυττάρων. Σε ασθενείς με καρκίνο, η μετατόπιση του πληθυσμού από ανώριμα σε κύτταρα μνήμης μπορεί να υποδηλώνει μια συνεχιζόμενη ανοσολογική απόκριση κατά του όγκου. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα ανώριμα T-λεμφοκύτταρα μπορεί να είναι ιδανικοί υποψήφιοι για θεραπείες υιοθετικής μεταφοράς κυττάρων (adoptive cell therapy), καθώς έχουν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και χαμηλά επίπεδα «εξάντλησης», προσφέροντας έτσι μια πιο διαρκή αντικαρκινική απόκριση(53).

1.8.2.2 Τα Δραστικά Τ-λεμφοκύτταρα (Effector T cells - T_{eff})

Όταν τα ανώριμα Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιηθούν, διαφοροποιούνται σε δραστικά Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία αποτελούν κύτταρα της πρώτης γραμμής της αντικαρκινικής ανοσίας. Η κυριότερη υποομάδα είναι τα κυτταροτοξικά CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα (CTLs). Εκφράζουν υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικών μορίων, όπως η περφορίνη και οι γρανζύμες, καθώς και κυτταροκίνες όπως η ιντερφερόνη-γάμμα (IFN-γ). Εκφράζουν δείκτες όπως οι CD45RA, CCR7 και συγκεκριμένα τα effector Τ-κύτταρα αναγνωρίζονται από το προφίλ των εξής δεικτών: CD45RA⁺ / CD45RO⁻ / CCR7⁻ (52). Είναι οι κύριοι εκτελεστές της αντικαρκινικής ανοσίας, ικανοί να αναγνωρίζουν και να σκοτώνουν απευθείας τα καρκινικά κύτταρα. Η διήθηση όγκων από αυτά τα κύτταρα (Tumor-Infiltrating Lymphocytes - TILs) συνδέεται σχεδόν καθολικά με καλύτερη πρόγνωση για τον ασθενή(54). Ωστόσο, το εχθρικό μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) μπορεί να καταστείλει τη λειτουργία τους, οδηγώντας σε μια κατάσταση δυσλειτουργίας γνωστή ως «εξάντληση» (exhaustion). Οι σύγχρονες ανοσοθεραπείες, όπως οι αναστολείς σημείων ελέγχου (π.χ., anti-PD-1), στοχεύουν στην αναζωογόνηση αυτών ακριβώς των κυττάρων (55).

1.8.2.3. Κεντρικά Τ-λεμφοκύτταρα Μνήμης (Central Memory T cells - T_{CM})

Μετά την κάθαρση ενός αντιγόνου, ένας μικρός αριθμός δραστικών κυττάρων επιβιώνει και μετατρέπεται σε μακρόβια κύτταρα μνήμης, τα οποία παρέχουν μακροπρόθεσμη προστασία. Αυτά χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι τα κεντρικά Τ-λεμφοκύτταρα μνήμης (Central Memory T cells - T_{CM})(56). Τα central memory Τ-κύτταρα εδρεύουν κυρίως στα λεμφικά όργανα, όπως και τα naïve Τ-Κύτταρα, και εκφράζουν τους δείκτες CCR7 και CD62L. Συγκεκριμένα Κύτταρα αναγνωρίζονται από το προφίλ των εξής δεικτών: CD45RA⁻ / CD45RO⁺ / CCR7⁺(52). Ο κύριος ρόλος τους δεν είναι η άμεση κυτταροτοξικότητα, αλλά η εξαιρετικά υψηλή τους ικανότητα πολλαπλασιασμού. Όταν συναντήσουν ξανά το αντιγόνο, μπορούν να δημιουργήσουν γρήγορα έναν νέο, μεγάλο στρατό από δραστικά Τ-λεμφοκύτταρα. Λόγω της μακροβιότητας και της ικανότητάς τους για αυτο-ανανέωση, θεωρούνται ιδανικά για θεραπείες υιοθετικής μεταφοράς κυττάρων, καθώς μπορούν να εγκαθιδρύσουν μια διαρκή αντικαρκινική ανοσία(56).

1.8.2.4. Δραστικά Τ-λεμφοκύτταρα Μνήμης (Effector Memory T cells - T_{EM})

Η άλλη κατηγορία των κυττάρων μνήμης είναι τα δραστικά Τ-λεμφοκύτταρα Μνήμης (53). Κυκλοφορούν στο αίμα και περιπολούν στους περιφερικούς ιστούς, έτοιμα για άμεση δράση(57) . Δεν εκφράζουν CCR7 ή CD62L, γεγονός που τους επιτρέπει να εισέρχονται εύκολα σε μη λεμφικούς ιστούς, όπως οι όγκοι. Το προφίλ των μοριακών δεικτών τους είναι :CD45RA⁺ / CD45RO⁺ / CCR7⁻(52). Όσον αναφορά τον ρόλο τους στον καρκίνο παρέχουν άμεση, επιτόπια προστασία(58). Η παρουσία τους μέσα ή γύρω από τον όγκο είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης επιτυχίας της ανοσοθεραπείας . Μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση του πληθυσμού των T_{EM}, τόσο στην περιφερική κυκλοφορία όσο και μέσα στον όγκο, σχετίζεται με θετική έκβαση για τους ασθενείς(59).

Πίνακας 1. Υποκατηγορίες Τ-Λεμφοκυττάρων και οι αντίστοιχοι μοριακοί δείκτες

ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ		
	CD45RA	CD45RO	CCR7
ΑΝΩΡΙΜΑ (NAIVE)Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	+	-	+
ΔΡΑΣΤΙΚΑ (EFFECTOR) Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	+	-	-
ΚΕΝΤΡΙΚΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΝΗΜΗΣ(CENTRAL MEMEORY)	-	+	+
ΔΡΑΣΤΙΚΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΝΗΜΗΣ (EFFECTOR MEMORY)	-	+	-

1.9.TCF1

Ο TCF1 (T-Cell Factor 1), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *TCF7*, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με κεντρικό ρόλο στη βιολογία των Τ-λεμφοκυττάρων. Ο TCF1 είναι ένας κεντρικός ρυθμιστής της ανάπτυξης και της λειτουργίας των Τ-λεμφοκυττάρων σε πολλαπλά στάδια και σειρές. Η δράση του είναι απαραίτητη ήδη από τα πρώιμα στάδια στον θύμο, όπου, ως άμεσος στόχος της σηματοδότησης Notch, ενεργοποιεί βασικά γονίδια-στόχους όπως τα *Gata3* και *Bcl11b* για να

δεσμεύσει τα προγονικά κύτταρα στη μοίρα της T-κυτταρικής σειράς. Πέρα από τον ρόλο του στην πρώιμη ανάπτυξη, ο TCF1 είναι κρίσιμος για την επιλογή μεταξύ των CD4+ και CD8+ σειρών, προάγοντας άμεσα τον παράγοντα Th-POK για την παραγωγή των CD4+ T-κυττάρων και συνεργαζόμενος με τον Runx3 για την καταστολή του γονιδίου *Cd4* στα CD8+T-κύτταρα, διασφαλίζοντας έτσι την ταυτότητά τους(60) . Στην περιφέρεια, ο TCF1 είναι εξίσου σημαντικός, καθώς ρυθμίζει τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των ώριμων CD8+ T-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής και διατήρησης των κεντρικών T-κυττάρων μνήμης. Αυτό το επιτυγχάνει προάγοντας καταστάσεις που μοιάζουν με βλαστικά κύτταρα ("stem-like states") και ρυθμίζοντας την έκφραση του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2 και του μεταγραφικού παράγοντα Eomesodermin, εξασφαλίζοντας έτσι τη μακροπρόθεσμη επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μνήμης. Είναι δηλαδή απαραίτητος για την ανάπτυξη των T-κυττάρων, αλλά και για τη διατήρηση της ομοιότητας τους (stemness) και την ικανότητα αυτοανανέωσης των T-κυττάρων μνήμης(61).

1.10. PD-1

Ο PD-1 (Programmed cell death protein 1) είναι ένας κεντρικός ανοσο-ανασταλτικός υποδοχέας που εκφράζεται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων, η ενεργοποίησή του οδηγεί στην αρνητική ρύθμιση της λειτουργίας των λεμφοκυττάρων. Η φυσιολογική του δράση ασκείται μέσω της αλληλεπίδρασής του με δύο γνωστούς συνδέτες (ligands) που ανήκουν στην οικογένεια μορίων B7: τον PD-L1 (επίσης γνωστό ως B7-H1) και τον PD-L2. Μέσω της σύνδεσης με τους προσδέτες του ο PD-1 έχει την ιδιότητα να αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Συνεπώς, η φυσιολογική λειτουργία του μονοπατιού PD-1 είναι να λειτουργεί ως ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου (checkpoint), το οποίο, όταν ενεργοποιείται από τους συνδέτες του σε περιφερικούς ιστούς, θέτει ένα "φρένο" στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και στην αποφυγή αυτοάνοσων αντιδράσεων(62).

1.11. Συσχέτιση του TCF1 και PD1 με τον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει και να καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός που ρυθμίζεται από ένα δίκτυο μοριακών σημάτων. Δύο από τα πιο σημαντικά σήματα είναι ο υποδοχέας PD-1(62), που λειτουργεί ως «φρένο» της ανοσολογικής απόκρισης, και ο μεταγραφικός παράγοντας TCF1, που δρα ως «κύριος ρυθμιστής» της μοίρας και της λειτουργίας των Τ-λεμφοκυττάρων. Η αλληλεπίδρασή τους είναι καθοριστική για την επιτυχία των σύγχρονων ανοσοθεραπειών(63).

Ο PD-1 (Programmed Cell Death 1) είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας που ανήκει στην κατηγορία των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (immune checkpoints). Εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων (ειδικά των CD8+ κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων), τα οποία είναι υπεύθυνα για την εξόντωση των καρκινικών κυττάρων(64). Τα καρκινικά κύτταρα, για να ξεφύγουν από την επίθεση του ανοσοποιητικού, συχνά εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον συνδέτη του PD-1, που ονομάζεται PD-L1. Όταν ο PD-1 πάνω στο Τ-λεμφοκύτταρο συνδεθεί με το PD-L1 πάνω στο καρκινικό κύτταρο, αποστέλλεται ένα ανασταλτικό σήμα στο εσωτερικό του Τ-λεμφοκυττάρου. Αυτό το σήμα λειτουργεί σαν «φρένο», εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και την κυτταροτοξική δράση του, οδηγώντας σε μια κατάσταση που ονομάζεται εξάντληση των Τ-λεμφοκυττάρων (T-cell exhaustion). Αυτός είναι ένας βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου ο όγκος αποφεύγει την ανοσολογική επιτήρηση και συνεχίζει να αναπτύσσεται(65). Οι σύγχρονες ανοσοθεραπείες, γνωστές ως αναστολείς σημείων ελέγχου (Immune Checkpoint Inhibitors - ICIs), είναι μονοκλωνικά αντισώματα που εμποδίζουν τη σύνδεση PD-1/PD-L1, «απελευθερώνοντας» έτσι τα Τ-λεμφοκύτταρα για να επιτεθούν στον όγκο (64).

Εκτός του PD1 υπάρχει και ο TCF1 ο οποίος χαρακτηρίζεται ως Ο «Κύριος Ρυθμιστής» της Μοίρας των Τ-λεμφοκυττάρων Ο TCF1 (T Cell Factor 1). Κωδικοποιείται από το γονίδιο *TCF7*, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας θεμελιώδους σημασίας για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων Ο TCF1 είναι επίσης ένας άμεσος εκτελεστής του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης, το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στην εμβρυογένεση, στην ανανέωση των βλαστοκυττάρων και συχνά

απορρυθμίζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου . Μία από τις πιο κρίσιμες λειτουργίες του TCF1 είναι η ικανότητά του να διατηρεί τα T-λεμφοκύτταρα σε μια λιγότερο διαφοροποιημένη, «βλαστοκυτταρική» κατάσταση (stem-like state)(66).

Η χρόνια έκθεση των T-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα του όγκου οδηγεί στην εξάντλησή τους, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση του PD-1 και μειωμένη λειτουργικότητα. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα εξαντλημένα T-λεμφοκύτταρα ίδια. Η έρευνα αποκάλυψε την ύπαρξη ενός υποπληθυσμού εξαντλημένων CD8+ T-λεμφοκυττάρων που, παρότι εκφράζουν PD-1, διατηρούν υψηλά επίπεδα έκφρασης του TCF1. Αυτός ο πληθυσμός TCF1+/PD-1+ είναι εξαιρετικά σημαντικός. Συγκεκριμένα λειτουργεί ως «δεξαμενή» βλαστοκυττάρων: Αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης. Μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να διατηρούν έναν συνεχή πληθυσμό αντικαρκινικών T-λεμφοκυττάρων μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επίσης γεννά τα τελικά εκτελεστικά κύτταρα: Τα TCF1+ κύτταρα διαφοροποιούνται σε έναν άλλο πληθυσμό, τα τελικά εξαντλημένα κύτταρα, τα οποία έχουν χάσει την έκφραση του TCF1, αλλά είναι αυτά που ασκούν την άμεση κυτταροτοξική δράση κατά του όγκου. Ουσιαστικά, ο TCF1 διατηρεί μια «προγονική» δεξαμενή εξαντλημένων T-λεμφοκυττάρων. Αυτή η δεξαμενή είναι απολύτως απαραίτητη για την επιτυχία της θεραπείας με αναστολείς PD-1. Η θεραπεία αυτή δρα «αναζωογονώντας» ακριβώς αυτά τα TCF1+ κύτταρα, προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό τους και την ενίσχυση της παραγωγής των τελικών εκτελεστικών κυττάρων. Χωρίς αυτόν τον πληθυσμό, η απόκριση στην ανοσοθεραπεία είναι περιορισμένη και βραχύβια(65).

Ο ρόλος του TCF1 στα CD8+ T-λεμφοκύτταρα είναι κυρίως αντικαρκινικός, η δράση του μπορεί να είναι διαφορετική σε άλλα είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού. Για παράδειγμα στα Ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Tregs): Ο TCF1 ελέγχει τη φλεγμονή. Σε μοντέλα καρκίνου του παχέος εντέρου, η έλλειψη TCF1 στα Tregs προήγαγε την ανάπτυξη όγκων(67). Παράλληλά στα Ενδοεπιθηλιακά Λεμφοκύτταρα (IELs) του παχέος εντέρου, υψηλά επίπεδα TCF1 σε αυτά τα κύτταρα καταστέλλουν τις αντικαρκινικές τους λειτουργίες, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ογκοπροαγωγικό ρόλο σε αυτό το συγκεκριμένο πλαίσιο(68).

1.12. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση και κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ισχυρή τεχνολογία που επιτρέπει την ταχεία και ποσοτική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων, καθώς αυτά διέρχονται σε μια υγρή ροή μέσα από μια δέσμη φωτός laser . Χρησιμοποιώντας φθορίζουσες ουσίες, συνήθως συζευγμένες με μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες (αντιγόνα) στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να αναγνωρίσει, να μετρήσει και να διαχωρίσει πολύπλοκους και σπάνιους κυτταρικούς πληθυσμούς μέσα σε ένα ετερογενές δείγμα, όπως τα PBMCs (69).

Η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής, που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση δεκάδων δεικτών σε κάθε κύτταρο, είναι ένα απαραίτητο εργαλείο για τη βαθιά ανοσοφαινοτυπική ανάλυση. Μέσω αυτής της τεχνικής, είναι δυνατός ο ακριβής χαρακτηρισμός των υποπληθυσμών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως η ταυτοποίηση των Tregs (π.χ., CD3+CD4+CD25+FoxP3+), η ανάλυση των σταδίων ωρίμανσης των T-κυττάρων (π.χ., CD45RA, CD45RO CCR7) και η μέτρηση της έκφρασης μορίων-κλειδιών όπως το TCF1 και το PD-1 σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς. Αυτή η λεπτομερής χαρτογράφηση του ανοσοποιητικού προφίλ των ασθενών με ΚΠΕ είναι θεμελιώδης για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών(70).

1.13. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Παρά τις σημαντικές προόδους στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, η νόσος παραμένει μια κύρια αιτία θνησιμότητας και υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανακάλυψη νέων, ελάχιστα επεμβατικών βιοδεικτών που θα μπορούν να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου και την απόκριση στη θεραπεία. Η ανάλυση των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMCs) προσφέρει μια ελπιδοφόρα προσέγγιση για την παρακολούθηση της συστημικής ανοσολογικής απόκρισης, η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του ΚΠΕ.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η λεπτομερής ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των υποπληθυσμών των Τ-λεμφοκυττάρων σε δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, χρησιμοποιώντας την τεχνική της \ κυτταρομετρίας ροής. Ειδικότερα, η μελέτη θα εστιάσει στην ποσοτικοποίηση των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων, των υποπληθυσμών μνήμης των Τ-λεμφοκυττάρων και στην έκφραση των μορίων TCF1 και PD-1. Ο απώτερος στόχος είναι να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση αυτών των ανοσολογικών παραμέτρων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών (όπως το στάδιο της νόσου) και να αξιολογηθεί η δυνατότητά τους να λειτουργήσουν ως νέοι προγνωστικοί ή/και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1.Επιλογή δειγμάτων ασθενών

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από ασθενείς των οποίων το αίμα πάρθηκε με σκοπό την έρευνα ανοσολογικών δεικτών από υγρή βιοψία από την Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλοι ασθενείς και οι υγιείς δότες από τους οποίους συλλέχθηκαν δείγματα αίματος υπέγραψαν ενημερωτικό έντυπο συγκατάθεσης. Στα πλαίσια της ερευνητικής μελέτης έχει παρθεί αίμα από ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, από τους οποίους επιλέχθηκαν εκείνοι που πληρούσαν τα εξής κριτήρια: διάγνωση με καρκίνο του παχέος εντέρου και ύπαρξη επαρκών κλινικών δεδομένων. Τα δείγματα αίματος πάρθηκαν από τον Νοέμβριο του 2023 έως τον Ιανουάριο του 2025. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν συνολικά 89 ασθενείς με 63 από αυτούς να πάσχουν από πρώιμα στάδια της νόσου ενώ οι υπόλοιποι 26 να πάσχουν από μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Όλα τα δείγματα πάρθηκαν πριν την έναρξη θεραπείας. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 11 υγιείς δότες.

2.2 Απομόνωση PBMCs από το αίμα των ασθενών με την χρήση φυκόλης

Μετά τη συλλογή του αίματος σε σωληνάρια EDTA το αίμα των ασθενών μεταφέρεται στο εργαστήριο όπου αρχικά φυγοκεντρείται στις 1000 στροφές (g) ώστε να αποχωριστεί το πλάσμα από τα διάφορα κύτταρα. Αφού αφαιρεθεί το πλάσμα προστίθεται ακριβώς η ίδια ποσότητα PBS(Phosphate-buffered saline) και αφού ανακινηθεί ο σωλήνας EDTA το αίμα μεταφέρεται σε falcon των 50ml όπου προστίθεται PBS ίσο με τον όγκο του αίματος για περεταίρω αραιώση. Σε άλλο falcon των 50ml προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα φυκόλης(Για 35 ml αίματος χρησιμοποιείται 15 ml φυκόλης, για 25ml αίματος 10ml κ.τ.λ). Στην συνέχεια μεταφέρεται το αίμα στο falcon που περιέχει την φυκόλη με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί το στρώμα της φυκόλης και μετέπειτα φυγοκεντρείται στις 350 στροφές (g) για 20 λεπτά χωρίς φρένα. Η φυκόλη παρόλο που είναι τοξική για τα κύτταρα , χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού για τα PBMCs από τα άλλα κύτταρα του αίματος λόγω της πυκνότητας της. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα γι'αυτό μετρά την φυγοκέντρωση φαίνονται στον πάτο του falcon , μετά

υπάρχει η φικόλη και πάνω να υπάρχει το PBS. Ανάμεσα στο PBS και την φυκόλη βρίσκονται τα PBMCs υπό την μορφή μεσοστοιβάδας. Τα κύτταρα αυτά συλλέγονται με πουαρ και στην συνέχεια ακολουθούν δύο πλύσεις των κυττάρων με PBS(φυγοκέντρηση στις 350 στροφές (g) για 8 λεπτά με φρένα και αφαίρεση του υπερκειμένου). Μετά τις πλύσεις προστίθενται στα κύτταρα 20ml από μέσο καλλιέργειας RPMI ώστε να καταμετρηθούν τα κύτταρα σε πλάκα NEWBAUER. Τοποθετούνται 10μl από το δείγμα (με RPMI) σε κάθε μεριά της newbauer και μετρούνται τα 16 τετράγωνα από κάθε μεριά και η τελική τιμή που χρησιμοποιείται είναι ο μέσος όρος των δύο. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται για να βρεθεί η τελική συγκέντρωση είναι η εξής:

$$y=x*10*4*20$$

όπου y είναι η τελική συγκέντρωση, x είναι η τιμή από την πλάκα newbauer και 20 είναι τα ml RPMI που προστέθηκε στο pellet των κυττάρων. Στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 350 στροφές(g) για 8 λεπτά με τα φρένα και αφαίρεση του υπερκειμένου ώστε να μείνει το pellet. Αν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα τα κύτταρα θα πρέπει να αποθηκευτούν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μελλοντική χρήση. Για να αποθηκευτούν τα κύτταρα στους (-80°C) θα πρέπει να προστεθεί freezing mix το οποίο περιέχει 10% DMSO, 20% FBS και 70% RPMI. Το freezing mix προστατεύει τα κύτταρα από τον θάνατο κατά το πάγωμα. Τα δείγματα αποθηκεύονται σε cryovials των 2ml.

2.3 Staining των κυττάρων: Προετοιμασία για Κυτταρόμετρο

Για να αναλυθούν οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων των κυττάρων των ασθενών στο κυτταρόμετρο θα πρέπει πρώτα να χρωματιστούν με μια διαδικασία που ονομάζεται staining. Το staining των κυττάρων είναι η διαδικασία σύνδεσης ειδικών πρωτεϊνών που βρίσκονται είτε στη μεμβράνη των κυττάρων (εξωκυττάρια) είτε στο εσωτερικό του κυττάρου (ενδοκυττάρια) με αντισώματα τα οποία είναι συνδεδεμένα με φθοριοχρώματα ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν με το κυτταρόμετρο (FACS).

Για να μπορέσουν να αναλυθούν οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων σχεδιάστηκαν τα πάνελ αντισωμάτων με τις πρωτεΐνες και τα αντίστοιχα αντισώματα

τα οποία είναι συνδεδεμένα με τα σωστά φθοριοχρώματα ώστε να υπάρχει όσο των δυνατόν λιγότερη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των χρωμάτων.

Πίνακας 2. Πάνελ αντισωμάτων για τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα και για τους υποπληθυσμούς ωρίμανσης/διαφοροποίησης T- λεμφοκυττάρων.

T-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ			ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ T-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ		
ΜΟΡΙΑ-ΣΤΟΧΟΙ	ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΜΟΡΙΑ - ΣΤΟΧΟΙ	ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
CD3	PE-Cy7	1/20	CD4	APC-Cy7	1/20
CD4	BV510	1/20	CD8	BV510	1/20
FOXP3	FITCH	1/10	CD45RA	PE-Cy7	1/140
CTLA4	APC	1/20	CD45RO	APC	1/20
CD25	PerCPy	1/20	CCR7	FITCH	1/20
CD127	BV421	1/20	TCF1	PerCPy5.5	1/10
TCF1	PE	1/40	PD1	PE	1/40
CD154	BV785	1/20	-	-	-

Εφόσον το πάνελ έχει σχεδιαστεί ξεκινά η διαδικασία staining. Αρχικά ξεπαγώνονται τα κύτταρα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν με την χρήση υδατόλουτρο ή incubator για 5'-7' στους 37°C. Μετά, τα τοποθετούνται σε 15ml falcon και τα διαλυτοποιούνται σε 7ml μέσο καλλιέργειας (RPMI) , φυγοκεντρώνται στις 350 στροφές (g) για 10 λεπτά και στην συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο. Έχοντας σχεδιαστεί πριν την πειραματική διαδικασία το πάνελ των αντισωμάτων σε επόμενο βήμα θα ετοιμαστεί το διάλυμα των αντισωμάτων των ασθενών και των control. Σε αυτό το βήμα δεν θα προστεθούν τα αντισώματα που βάφουν ενδοκυττάρια ουσίες διότι αυτά δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του κυττάρου άρα δεν θα υπάρξει σύνδεση με αυτές. Τα συγκεκριμένα προθέτονται μετά το staining των εξωκυττάρων μορίων και αφού προηγηθεί μία διαδικασία που ονομάζεται permeabilization, κατά την οποία αρχικά γίνεται η μονιμοποίηση των κυττάρων και μετά αφού ανοίξουν οι πόροι

της μεμβράνης, εισχωρεί το αντίσωμα μέσα στο κύτταρο. Όσον αφορά τους μάρτυρες ελέγχου ή αλλιώς control θα πρέπει αρχικά να υπάρχουν τα singles στα οποία κάθε δείγμα single βάφεται μόνο με το αντίστοιχο αντίσωμα του. Για τα singles θα πρέπει να υπάρχουν τόσα όσα τα αντισώματα που θα χρησιμοποιήσουμε. Ο σκοπός αυτών είναι να επιβεβαιωθεί ότι το κάθε αντίσωμα λειτουργεί. Εκτός των singles, είναι απαραίτητα ως control και τα FMOs(Fluorescent Minus One)τα οποία επίσης είναι τόσα όσα τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται. Όμως σε αντίθεση με τα singles το κάθε FMO περιέχει όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται εκτός από ένα. Το κάθε FMO δεν περιέχει διαφορετικό αντίσωμα. Τα FMOs είναι απαραίτητα διότι με αυτά μπορούν να εντοπιστούν οι διάφοροι υποπληθυσμοί των κυττάρων με βάση την ένταση των φθοριοχρωμάτων. Τέλος ως control θα χρειαστεί και ένα δείγμα αχρωμάτιστων κυττάρων (unstained) το οποίο λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας

Όσον αφορά το staining των κυττάρων των ασθενών χρησιμοποιείται ένα master mix το οποίο περιέχει το κατάλληλο buffer(FACs Buffer) [90% PBS(το οποίο πρέπει να μη είναι ταμπλέτας) και 10% BSA 10%] και την κατάλληλη συγκέντρωση των αντισωμάτων με βάση την βέλτιστη συγκέντρωσή τους. Στο κάθε δείγμα κυττάρων προστίθενται 20μl από το master mix. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση στον πάγο και στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Η επόμενη διαδικασία λέγεται permeabilization της μεμβράνης κατά την οποία ανοίγουν οι πόροι της μεμβράνης. Για την διαδικασία είναι απαραίτητα δύο αντιδραστήρια το fix/perm και το perm/wash. Το πρώτο μονιμοποιεί τα κύτταρα και ανοίγει τους πόρους στην μεμβράνη ώστε να μπορούν να διαπεράσουν τα αντισώματα και το δεύτερο είναι το perm/wash χρησιμοποιείται τις πλύσεις. Μετά την επώαση, τα κύτταρα πλένονται με FACs Buffer προτίθενται σε κάθε ένα 100 μl διαλύματος fix/perm το οποίο πρέπει να έχει συγκέντρωση 1x. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση 30 λεπτών στο πάγο και στο σκοτάδι. Μετά την επώαση τα κύτταρα πλένονται με το διάλυμα perm/wash(200μl) και είναι έτοιμα να δεχτούν τα αντισώματα που θα συζευχτούν με τις ενδοκυττάρειες ουσίες. Το επόμενο βήμα είναι η δημιουργία ενός master mix που θα περιέχει τα αντισώματα για τις ενδοκυτταρικές ουσίες στην κατάλληλη συγκέντρωση με βάση την βέλτιστη συγκέντρωσή τους και το perm/wash ως buffer. Στο κάθε δείγμα προστίθενται 20μl από το master mix και μετά ακολουθεί επώαση για 45 λεπτά στον

πάγο και στο σκοτάδι. Μετά την επώαση γίνονται δύο πλύσεις με FACs Buffer και ως τελευταίο βήμα προστίθενται 200μl FACs BUFFER και τα δείγματα είναι έτοιμα.

2.4.Κυτταρόμετρο ροής

Τα δεδομένα κυτταρομετρίας ροής συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο ροής BD FACS MELODY εξοπλισμένο με λέιζερ: 405nm, 488nm και 640nm το οποίο scatter)/SSC(side scatter). Το σύστημα λειτουργεί με το λογισμικό BD FACSCORUS τόσο για τη συλλογή όσο και για την ανάλυση των δεδομένων. Πριν από τη συλλογή, η απόδοση του οργάνου επαληθεύτηκε χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα beads για το calibration. Για τη διόρθωση της φασματικής αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των φθοριοχρωμάτων, ορίστηκε αντιστάθμιση (compensation) χρησιμοποιώντας τα single controls. Για κάθε δείγμα, συλλέχθηκε ένας ελάχιστος αριθμός 100.000 συνολικών γεγονότων (events) με flow rate:45 για να διασφαλιστεί η στατιστικά σημαντική ανάλυση των πληθυσμών-στόχων. Η στρατηγική επιλογής πυλών (gating) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας μια σειρά από μάρτυρες ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων των unstained (αχρωμάτιστων κυττάρων) για τον προσδιορισμό του αυτοφθορισμού. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες ελέγχου FMO για τον ακριβή καθορισμό των πυλών για τους θετικά φθορίζοντες πληθυσμούς.

2.5 Στρατηγική ανάλυση(Gating strategy)

Η στρατηγική ανάλυση ή αλλιώς gating strategy πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα FLOWJO.

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν οι πληθυσμοί των T-ρυθμιστικών κυττάρων και οι υποπληθυσμοί που έχουν να κάνουν με την ωρίμανση των T- λεμφοκυττάρων. Για κάθε ανάλυση το πάνελ περιείχε διαφορετικές πρωτεΐνες συνεπώς η στρατηγική των πυλών ήταν διαφορετική. Για το gating strategy είναι απαραίτητη η χρήση των FMOs, διότι σε ένα πάνελ με πολλά φθοριοχρώματα, το φως που εκπέμπεται από έναν φθοριόχρωμα μπορεί να «διαχυθεί» (spectral overlap or spillover) και να ανιχνευθεί σε έναν γειτονικό ανιχνευτή, αυξάνοντας τεχνητά το σήμα υποβάθρου (background) σε αυτό το κανάλι. Το κάθε FMO επωάζεται με όλα τα αντισώματα του πάνελ, εκτός από ένα – αυτό για το οποίο πρόκειται να τεθεί το όριο της πύλης. Έτσι το ιστόγραμμα που προκύπτει για το συγκεκριμένο κανάλι αποκαλύπτει το ακριβές επίπεδο της μη

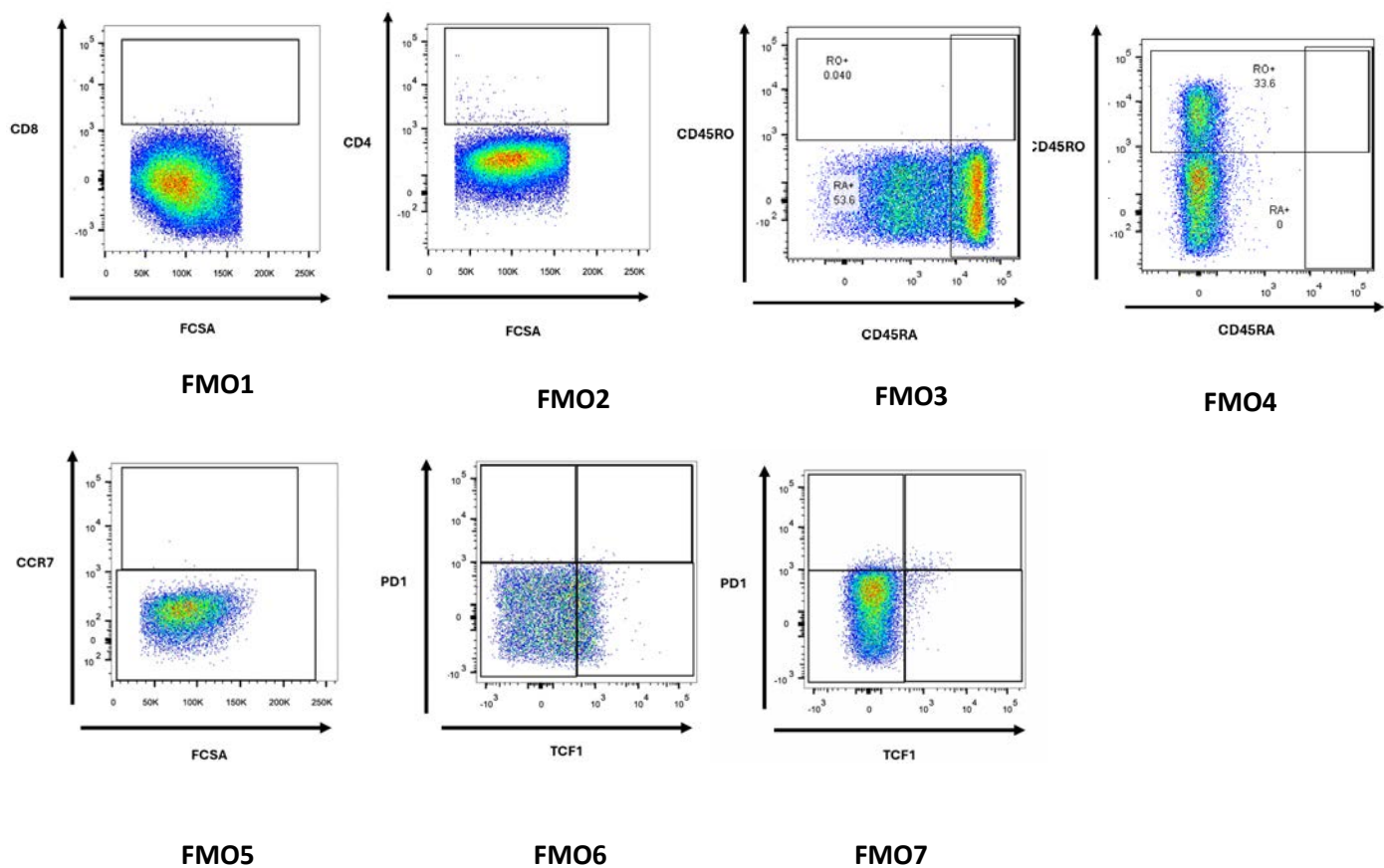
ειδικής φθορίζουσας σήμανσης που οφείλεται στη συνδυαστική επίδραση όλων των υπολοίπων φθοριοχρωμισμών. Επομένως θέτεται το gate διακρίνοντας τα πραγματικά θετικά κύτταρα από τα αρνητικά που εμφανίζουν αυξημένο υπόβαθρο λόγω της διάχυσης του σήματος. Η χρήση των FMO είναι ιδιαίτερα σημαντική για δείκτες που έχουν χαμηλή ή συνεχόμενη (όχι σαφώς θετική/αρνητική) έκφραση, όπως μόρια εξάντλησης (π.χ., PD-1), όπου η διάκριση μεταξύ θετικού και αρνητικού πληθυσμού είναι δύσκολη. Στους πίνακες 3,4 παραθέτονται τα FMOs του κάθε πανελ.

2.5.2. Gating strategy για τους υποπληθυσμούς ωρίμανσης των T- λεμφοκυττάρων

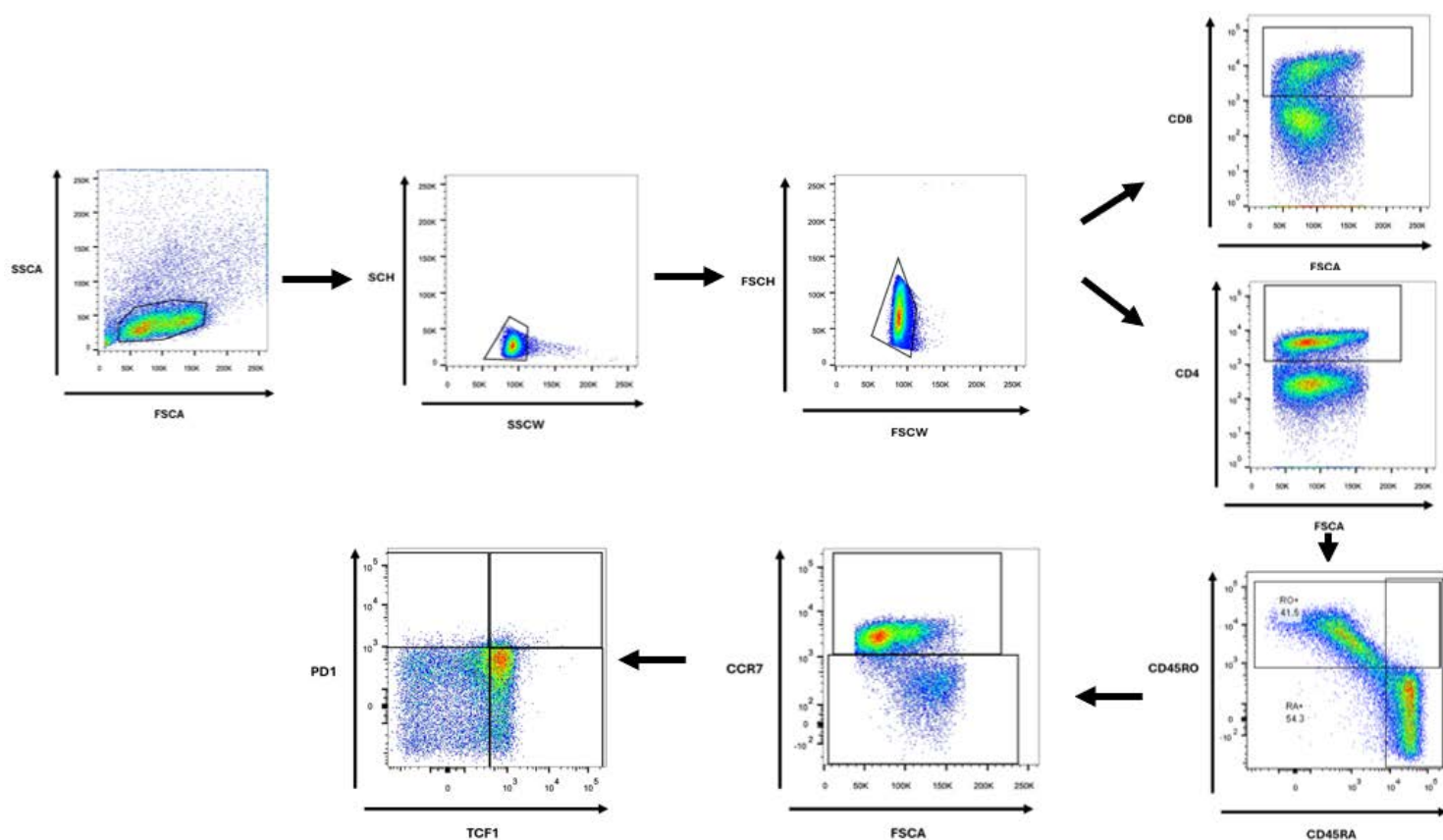
Πίνακας 3. FMOs του 2^{ου} Πάνελ.

ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ									
ΜΟΡΙΑ ΣΤΟΧΟΙ	ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	FMO1	FMO2	FM03	FM04	FMO5	FMO6	FMO7
CD4	APC-Cy7	1/20	-	+	+	+	+	+	+
CD8	BV510	1/20	+	-	+	+	+	+	+
CD45RA	PE-Cy7	1/140	+	+	-	+	+	+	+
CD45RO	APC	1/20	+	+	+	-	+	+	+
CCR7	FITCH	1/20	+	+	+	+	-	+	+
TCF1	PerCPy5.5	1/10	+	+	+	+	+	-	+
PD1	PE	1/40	+	+	+	+	+	+	-

FMOs



Εικόνα 1. FMOs του 2^{ου} Πάνελ



Εικόνα 2. Gates του 2^{ου} Πάνελ.

Η στρατηγική ανάλυσης (gating strategy) για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των T-λεμφοκυττάρων ξεκίνησε με τον εντοπισμό του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων στο γράφημα σκέδασης Forward Scatter (FSC) έναντι Side Scatter (SSC), με βάση τις χαρακτηριστικές φυσικές τους ιδιότητες (μέγεθος και κοκκίωση). Για τη διασφάλιση της ανάλυσης αποκλειστικά και μόνο μεμονωμένων κυττάρων, εφαρμόστηκε διαδοχικός αποκλεισμός των διπλών κυττάρων (doublets) χρησιμοποιώντας γραφήματα που συσχετίζουν την περιοχή του σήματος με το ύψος ή το πλάτος του (π.χ., FSC-Area vs FSC-Height). Από τον τελικό πληθυσμό των μονήρων λεμφοκυττάρων (singlets), απομονώθηκαν οι δύο κύριοι υποπληθυσμοί, τα CD4 βοηθητικά και τα CD8 κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Κάθε ένας από αυτούς τους πληθυσμούς αναλύθηκε ξεχωριστά για τον προσδιορισμό των υποπληθυσμών ωρίμανσης, βάσει της συνδυαστικής έκφρασης των δεικτών CD45RA και CCR7.

2.6 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism έκδοση 6.0 (GraphPad Institute Inc., San Diego, CA, USA). Οι πρώτες αναλύσεις που έγιναν ήταν T-test για κάθε υποπληθυσμό T-λεμφοκυττάρων ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών πρώιμου σταδίου και μεταστατικών αλλά και μεταξύ όλων των ασθενών και των υγιών δοτών. Οι πληθυσμοί με στατιστικά σημαντική διαφορά εξετάστηκαν για την προβλεπτική τους αξία με την ανάλυση Kaplan-Meier η οποία χρησιμοποιήθηκε για να συσχετίσει τους φαινοτύπους των ανοσοκυττάρων με τα κλινικά αποτελέσματα των ασθενών, με τις ομάδες να συγκρίνονται χρησιμοποιώντας τη δοκιμή log-rank. Η συνολική επιβίωση (OS) ορίστηκε ως ο χρόνος από της πρώτης αιμοληψίας μέχρι το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία ή μέχρι την τελευταία παρακολούθηση που ο ασθενής αναφέρθηκε ζωντανός. Η επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) ορίστηκε ως ο χρόνος μεταξύ της πρώτης αιμοληψίας και της υποτροπής της νόσου ή του θανάτου, ό,τι και αν συνέβη πρώτο. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U. Οι δοκιμές συσχέτισης

του Spearman χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ των επιπέδων των ελεγχμένων τύπων ανοσοκυττάρων. Για την ανάλυση PFS και OS, τα ποσοστά των ανοσοκυττάρων χωρίστηκαν σε χαμηλά και υψηλά χρησιμοποιώντας τα όρια που ορίστηκαν από τις καμπύλες χαρακτηριστικών λειτουργιών του δέκτη (ROC). Οι διαφορές και οι συσχετίσεις θεωρήθηκαν σημαντικές όταν $p < 0,05$. Όλες οι τιμές p ήταν διπλής όψης.

2.5.1. Gating strategy για τα T-ρυθμιστικά κύτταρα

Πίνακας 3. FMOs του 1^{ου} Πάνελ.

T-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΟΚΥΤΤΑΡΑ										
ΜΟΡΙΑ - ΣΤΟΧΟΙ	ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	FMO 1	FMO 2	FMO 3	FMO 4	FMO 5	FMO 6	FMO 7	FMO 8
CD3	PE-Cy7	1/20	-	+	+	+	+	+	+	+
CD4	BV510	1/20	+	-	+	+	+	+	+	+
FOXP3	FITCH	1/10	+	+	-	+	+	+	+	+
CTLA4	APC	1/20	+	+	+	-	+	+	+	+
CD25	PerCPy	1/20	+	+	+	+	-	+	+	+
CD127	BV421	1/20	+	+	+	+	+	-	+	+
TCF1	PE	1/40	+	+	+	+	-	+	-	+
CD154	BV785	1/20	+	+	+	+	+	-	+	-

Για την στρατηγική ανάλυσης των πυλών για τα T-ρυθμιστικά κύτταρα εφαρμόστηκε η ίδια μεθοδολογία με τους υπόλοιπους υποπληθυσμούς.

3. Αποτελέσματα

3.1. Περιγραφή Κλινικών Δεδομένων Ασθενών

Πίνακας 5. Κλινικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης

	% των ασθενών		
	Σύνολο (N=89)	Ομάδα 1 (N=63)	Ομάδα 2 (N=26)
Ηλικία			
Μ.Ο. (εύρος)	69.14606742 (45-88)	69.71428571(51-88)	67.76923077(45-83)
>60	79,77% (71/89)	80,95% (51/63)	76,92% (20/26)
≤60	20,22% (18/89)	19,04% (12/63)	23,08% (6/26)
>65	69,66% (62/89)	66,66% (42/63)	76,92% (20/26)
≤65	30,33% (27/89)	33,33% (21/63)	23,08% (6/26)
>70	47,19% (42/89)	42,85% (27/63)	57,69% (15/26)
≤70	52,80 (47/89)	57,4% (36/63)	42,30% (11/26)
Εντόπιση πρωτοπαθούς όγκου			
Σιγμοειδές	28,08% (25/89)	19,04% (12/63)	50% (13/26)
Αιόν	8,98% (8/89)	7,93% (5/63)	11,53% (3/26)
Κατίον	2,24% (2/89)	3,17% (2/63)	0% (0/26)
Τυφλό	6,74% (6/89)	9,53% (6/63)	0% (0/26)
Ορθό	21,34% (19/89)	23,80% (15/63)	15,38% (4/26)
Εγκάρσιο	13,48% (12/89)	17,46% (11/63)	3,84% (1/26)
2 σημεία	15,73% (14/89)	19,04% (12/63)	7,69% (2/26)
Φύλλο			
Γυναίκα	32,58% (29/89)	28,57% (18/63)	42,30% (11/26)
Άνδρας	67,41% (60/89)	71,42% (45/63)	57,69% (15/26)
Μικροδορυφορική Αστάθεια			

MSS(STABLE)	58,42% (52/89)	50,79% (32/63)	75,92% (20/26)
MMR DEFIECIENCY	12,35% (11/89)	11,11% (7/63)	15,38% (4/26)
N/A	29,21% (26/89)	38,09% (24/63)	7,69% (2/26)

Συνολικά εξετάστηκαν 89 ασθενείς με ΚΠΕ, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα (Group 1) εντάσσονται οι ασθενείς που πάσχουν από πρώιμα στάδια του ΚΠΕ ενώ στην δεύτερη ομάδα εντάσσονται ασθενείς που πάσχουν από μεταστατική νόσο.

Η μέση ηλικία από όλους τους ασθενείς που εξετάσθηκαν (N=89) είναι 69,14 με εύρος από 45 έως 88 χρονών. Στο group 1 με τους ασθενείς που πάσχουν από νόσο του πρώιμου σταδίου η μέση ηλικία ήταν 69,71 με εύρος από 51 έως 88 χρόνια ενώ στο group 2 με τους μεταστατικούς ασθενείς ο μέσος όρος ηλικίας είναι 69,76 με εύρος από 45 έως 83 χρόνια. . Το 20,22% (18/89) των ασθενών ήταν κάτω των 60 ετών ενώ το 79,77% (71/89) ήταν άνω των 60 ετών, το 30,33% (27/89) των ασθενών ήταν κάτω των 65 ετών ενώ το 69,66% (62/89) ήταν άνω των 65 ετών και τέλος το 47,19% (42/89) των ασθενών ήταν κάτω των 70 ετών ενώ το 47,19% (42/89) ήταν άνω των 70 ετών. Όσον αφορά την 1^η ομάδα τα ποσοστά διαφέρουν μερικώς. Συγκεκριμένα το 19,04% (12/63) ήταν κάτω των 60 ενώ το 80,95% (51/63) ήταν άνω των 60, το 33,33% (21/63) ήταν κάτω των 65 ενώ το 66,66% (42/63) ήταν άνω των 65 και τέλος το 57,4% (36/63) ήταν κάτω των 70 ενώ το 42,85% (27/63) ήταν άνω των 70. Στην ομάδα 2 το 23,08% (6/26) ήταν κάτω των 60 ενώ το 76,92% (20/26) ήταν άνω των 60, το 23,08% (6/26) ήταν κάτω των 65 ενώ το 76,92% (20/26) ήταν άνω των 65 και τέλος το 42,30% (11/26) ήταν κάτω των 70 ενώ το 57,69% (15/26) ήταν άνω των 70.

Όσον αφορά το φύλλο, το ποσοστό γυναικών που συμμετείχαν σε αυτή την έρευνα ήταν 32,58% (29/89) και των αντρών ήταν 67,41% (60/89). Στην ομάδα 1 το ποσοστό γυναικών ήταν 28,57% (18/63) ενώ των αντρών είναι 71,42% (45/63). Τέλος στην ομάδα 2 το 42,30% (11/26) ήταν γυναίκες ενώ το 57,69% (15/26) ήταν άντρες.

Από όλους τους ασθενείς (N=89) εμφάνισε πρωτοπαθής νόσο στο σιγμοειδές το 28,08% (25/89), στο ανιόν το 8,98% (8/89), στο κατίον το 2,24% (2/89), στο τυφλό το 6,74% (6/89) , στο ορθό 21,34% (19/89), στο εγκάρσιο το 13,48% (12/89) και τέλος σε δύο σημεία βρέθηκε να έχει πρωτοπαθή όγκο το 15,73% (14/89). Στην ομάδα 1(N=63) εμφάνισε πρωτοπαθής νόσο στο σιγμοειδές το 19,04% (12/63),στο ανιόν το 7,93% (5/63), στο κατίον το 3,17% (2/63), στο τυφλό το 9,53% (6/63), στο ορθό το 23,80% (15/63), στο εγκάρσιο το 17,46% (11/63), ενώ σε δύο σημεία βρέθηκε να έχει πρωτοπαθή όγκο το 19,04% (12/63). Στην ομάδα 2(N=26) εμφάνισε πρωτοπαθής νόσο στο σιγμοειδές το 50% (13/26), στο ανιόν το 11,53% (3/26), στο κατίον το 0% (0/26), στο τυφλό το 0% (0/26), στο ορθό 15,38% (4/26),στο εγκάρσιο το 3,84% (1/26) και τέλος σε δύο σημεία βρέθηκε να έχει πρωτοπαθή όγκο το 7,69% (2/26).

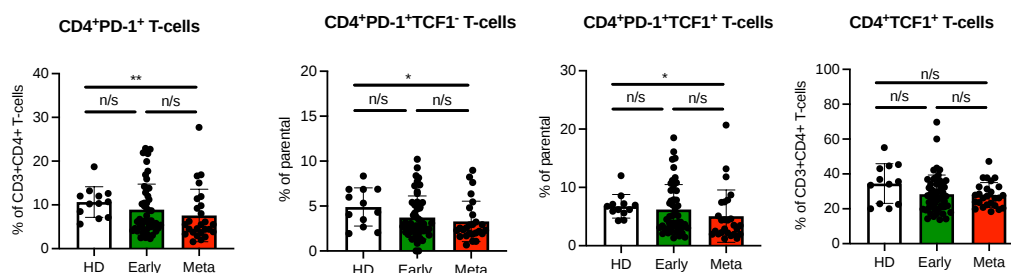
Τέλος εξετάστηκε και η μικροδορυφορική αστάθεια στους ασθενείς. Από όλους τους ασθενείς(N=89) το 58,42% (52/89) δεν παρουσίασε μικροδορυφορική αστάθεια δηλαδή ήταν MSS(stable) , το 12,35% (11/89) έχει μικροδορυφορική αστάθεια ενώ για το 29,21% (26/89) δεν υπάρχουν στοιχεία όσον αναφορά την μικροδορυφορική αστάθεια(N/A). Στην ομάδα 1(N=63), το 50,79% (32/63) δεν παρουσίασε μικροδορυφορική αστάθεια δηλαδή ήταν MSS(stable) , το 11,11% (7/63) έχει μικροδορυφορική αστάθεια ενώ το 38,09% (24/63) ήταν N/A. Τέλος στην ομάδα 2(N=26) το 75,92% (20/26) δεν παρουσίασε μικροδορυφορική αστάθεια, το 75,92% (20/26) έχει μικροδορυφορική αστάθεια ενώ το 7,69% (2/26) ήταν N/A.

Παρόλο που όλα τα δείγματα της μελέτης υποβλήθηκαν σε επιτυχή ανάλυση, τα δεδομένα που αφορούσαν ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του ορθού δεν συμπεριλήφθηκαν στην τελική στατιστική επεξεργασία διότι ο καρκίνος του ορθού παρουσιάζει διαφορετικά μοριακά και μορφολογικά χαρακτηριστικά, με συνέπεια τα αντίστοιχα αποτελέσματα να μην είναι συγκρίσιμα με εκείνα των όγκων του παχέος εντέρου.

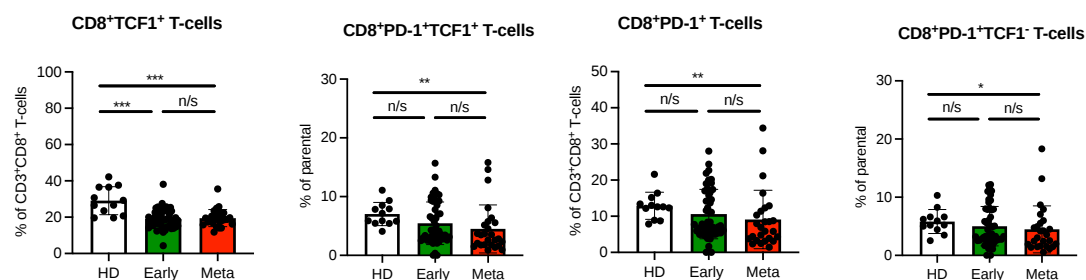
3.2 Ανάλυση του ποσοστού των Τ-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον PD1 και τον TCF1

Στην εικόνα 3 φαίνονται οι συχνότητες οκτώ διαφορετικών υποπληθυσμών Τ-λεμφοκυττάρων (CD4⁺ και CD8⁺) μεταξύ τριών ομάδων: 1. HD (Healthy Donors): Υγιείς δότες, που αποτελούν την ομάδα ελέγχου (control). 2. Early: Ασθενείς με καρκίνο σε πρώιμο στάδιο. 3. Meta (Metastatic): Ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο, δηλαδή σε προχωρημένο στάδιο. Αρχικά όσον αναφορά τον υποπληθυσμό CD4PD1⁺ παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική μείωση στους μεταστατικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες. Ο υποπληθυσμός CD4+PD1+TCF1⁺ υποδηλώνει τα πρώιμα(primary) εξαντλημένα CD4 Τ-λεμφοκύτταρα διότι αυτά είναι θετικά για τον TCF1 έναν μεταγραφικό παράγοντα κρίσιμο για τη "βλαστοκυτταρική" ιδιότητα (stemness) και τη μνήμη των Τ-κυττάρων, άρα αλλά έχουν ακόμα τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν και να αναζωογονηθούν ενώ ο πληθυσμός CD4+PD1+TCF1⁻ υποδηλώνει τα τελικά (terminally) εξαντλημένα. Οι υποπληθυσμοί αυτοί είναι επίσης μειωμένος στους μεταστατικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες ενώ ο πληθυσμός CD4TCF1⁺ δεν έχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά και στις 3 ομάδες. Όσον αναφορά τον πληθυσμό CD8PD1⁺ παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική μείωση των ασθενών των πρώιμων σταδίων και των προχωρημένων σταδίων. Ο υποπληθυσμοί CD8PD1+TCF1⁻ και CD8PD1+TCF1⁺ εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο με τους αντίστοιχους υποπληθυσμούς των CD4 λεμφοκυττάρων ενώ ο υποπληθυσμός CD8TCF1⁺ εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση στους μεταστατικούς ασθενείς έναντι των υγιών δοτών σε αντίθεση με τον- CD8TCF1⁺ αντίστοιχο CD4TCF1⁺ υποπληθυσμό .

A



B



Εικόνα 3. Α. Ποσοστά πληθυσμών CD4+PD1+, CD4+TCF1+, CD4+PD1+TCF1+, CD4+PD1+TCF1- και T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Β. Ποσοστά πληθυσμών CD8+PD1+, CD8+TCF1+, CD8+PD1+TCF1+, CD8+PD1+TCF1- T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. HD: healthy donors(N=11) EARLY: Ασθενείς σε πρώιμα στάδια της νόσου(N=63), META: Ασθενείς σε προχωρημένα στάδια της νόσου ή μεταστατικοί(N=26).

Ο πίνακας 6 παρουσιάζει συνοπτικά τα δεδομένα από τις αναλύσεις *Kaplan-Meier* οι οποίες γίνονται με το σκοπό να συσχετιστούν τα επίπεδα των διαφορετικών υποπληθυσμών των ασθενών με πρώιμα στάδια της νόσου με την επιβίωση χωρίς ασθένεια (DFS= Disease free survival) και την συνολική επιβίωση (OS= Overall survival). Median survival time (διάμεσος χρόνος επιβίωσης) είναι το χρονικό σημείο στο οποίο το 50% των ασθενών στην ομάδα μελέτης παραμένουν εν ζωή (ή δεν έχουν εμφανίσει το συμβάν που μελετάμε, π.χ., υποτροπή. Από τον πίνακα φαίνεται πως ο μόνος πληθυσμός με στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση(OS) των ασθενών είναι ο πληθυσμός CD4TCF1⁺. Αυτό σημαίνει πως οι ασθενείς με χαμηλές τιμές των κυττάρων CD4TCF1⁺ έχουν στατιστικά σημαντική καλύτερη πιθανότητα επιβίωσης από αυτούς με χαμηλές τιμές.(Εικόνα 4)

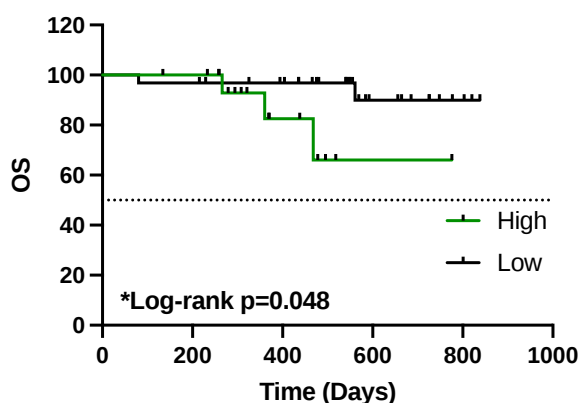
Πίνακας 6. Δεδομένα Ανάλυσης *Kaplan-Meier* του PFS και του OS με βάση τους υποπληθυσμούς CD4+PD1+, CD4+PD1+TCF1-, CD4+PD1+, CD4+TCF1+, CD8+PD1+, CD8+PD1+TCF1-, CD8+PD1+ και CD8+TCF1+ T-λεμφοκυττάρων του Group (EARLY)

EARLY	DFS		OS	
	Median(Days)	P-value	Median(Days)	P-value

CD4PD1 ⁺	HIGH	Undefined	0.5568	HIGH	Undefined	0.1154
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD4PD1 ⁺ TCF1 ⁻	HIGH	Undefined	0.4971	HIGH	Undefined	0.1059
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD4PD1 ⁺ TCF1 ⁺	HIGH	Undefined	0.7424	HIGH	Undefined	0.6302
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD4TCF1 ⁺	HIGH	Undefined	0.2689	HIGH	Undefined	0.0481
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD8PD1 ⁺	HIGH	561	0.5349	HIGH	561	0.1181
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD8PD1 ⁺ TCF1 ⁻	HIGH	561	0.8247	HIGH	561	0.2457
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD8PD1 ⁺ TCF1 ⁺	HIGH	561	0.7358	HIGH	561	0.1922
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD8TCF1 ⁺	HIGH	Undefined	0.1845	HIGH	Undefined	0.2848
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	

CD4⁺TCF1⁺ T-cells

Early CRC



Εικόνα 4. Ανάλυση Kaplan-Meier του OS με βάση τον υποπληθυσμό CD4TCF1⁺ των Τ-λεμφοκυττάρων των ασθενών σε αρχικά στάδια της νόσου (EARLY).

Ο πίνακας 7 παρουσιάζει συνοπτικά τα δεδομένα από τις αναλύσεις *Kaplan-Meier* οι οποίες γίνονται με το σκοπό να συσχετιστούν τα επίπεδα των διαφορετικών υποπληθυσμών των ασθενών με μεταστατική νόσο με την επιβίωση χωρίς υποτροπή(PFS= Progress free survival) και την συνολική επιβίωση (OS= Overall survival). Λόγω του γεγονότος ότι οι ασθενείς είναι σε προχωρημένα στάδια από τον πίνακα προκύπτουν περισσότερα ευρήματα. Συγκεκριμένα οι πληθυσμοί με στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση(OS) των ασθενών είναι ο πληθυσμός CD4PD1+TCF1+και ο πληθυσμός CD4PD1+TCF1+. . Αυτό σημαίνει πως οι ασθενείς με χαμηλές τιμές αυτών των πληθυσμών έχουν στατιστικά σημαντική καλύτερη επιβίωση από αυτούς με χαμηλές τιμές.

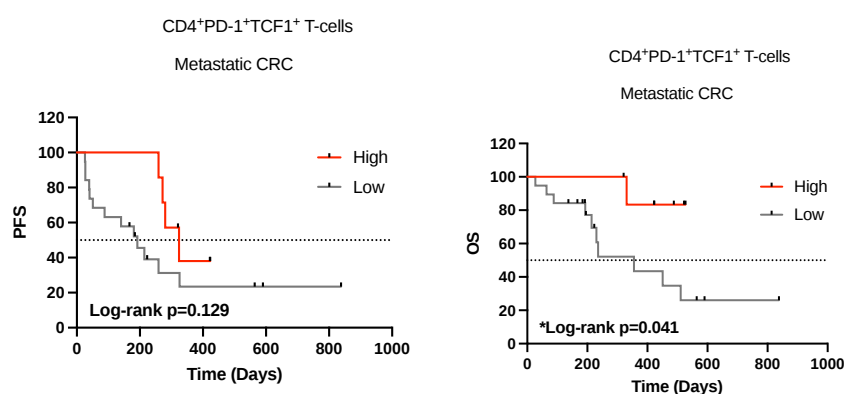
Πίνακας 7. Δεδομένα Ανάλυσης *Kaplan-Meier* του PFS και του OS με βάση τους υποπληθυσμούς CD4+PD1+, CD4+PD1+TCF1-, CD4+PD1+, CD4+TCF1+, CD8+PD1+, CD8+PD1+TCF1-, CD8+PD1+ και CD8+TCF1+ T- λεμφοκυττάρων των μεταστατικών ασθενών (META)

META	PFS			OS		
	Median(Days)		P-value	Median(Days)		P-value
CD4PD1 ⁺	HIGH	302	0.7448	HIGH	Undefined	0.4498
	LOW	Undefined		LOW	Undefined	
CD4PD1 ⁺ TCF1 ⁻	HIGH	302	0.1741	HIGH	Undefined	0.154
	LOW	192		LOW	451	
CD4PD1 ⁺ TCF1 ⁺	HIGH	324	0.1297	HIGH	Undefined	0.0411
	LOW	192		LOW	355	
CD4TCF1 ⁺	HIGH	259	0.2942	HIGH	331	0.9944
	LOW	259		LOW	451	
CD8PD1 ⁺	HIGH	280	0.2796	HIGH	Undefined	0.1012
	LOW	192		LOW	355	
CD8PD1 ⁺ TCF1 ⁻	HIGH	272	0.3483	HIGH	511	0.5069
	LOW	192		LOW	355	
CD8PD1 ⁺ TCF1 ⁺	HIGH	302	0.2891	HIGH	Undefined	0.0204
	LOW	192		LOW	355	

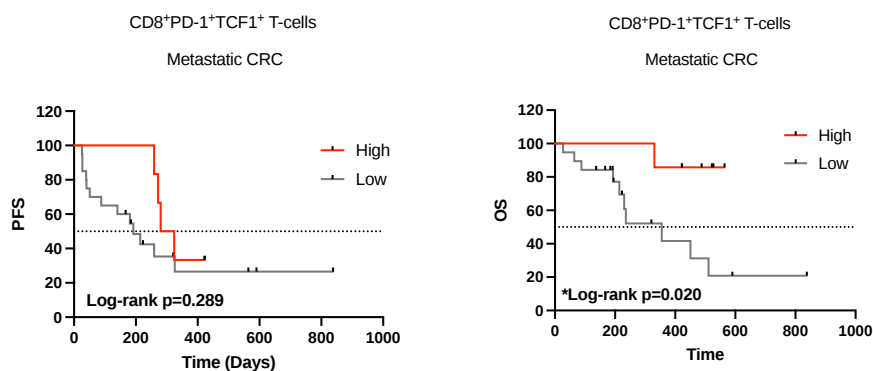
CD8TCF1⁺	HIGH	225.5	0.7924	HIGH	331	0.5568
	LOW	272		LOW	511	

Στην παρακάτω εικόνα παραθέτονται οι καμπύλες Kaplan-Meier για τους υποπληθυσμούς CD4PD1+TCF1+ και CD8PD1+TCF1+ αντίστοιχα. Ομοίως με τους πρώιμου σταδίου παρόλο που στις καμπύλες του PFS δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς παρατηρείται μία τάση για καλύτερη επιβίωση των ασθενών με χαμηλές συγκεντρώσεις των υποπληθυσμών αυτών από το μεγάλο άνοιγμα των δύο γραμμών. Αυτή η τάση επιβεβαιώνεται στις καμπύλες του OS και για τους δύο υποπληθυσμούς με βάση των οποίων οι ασθενείς με χαμηλά ποσοστά των υποπληθυσμών αυτών έχουν στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη πιθανότητα να αποβιώσουν πιο νωρίς.

A.



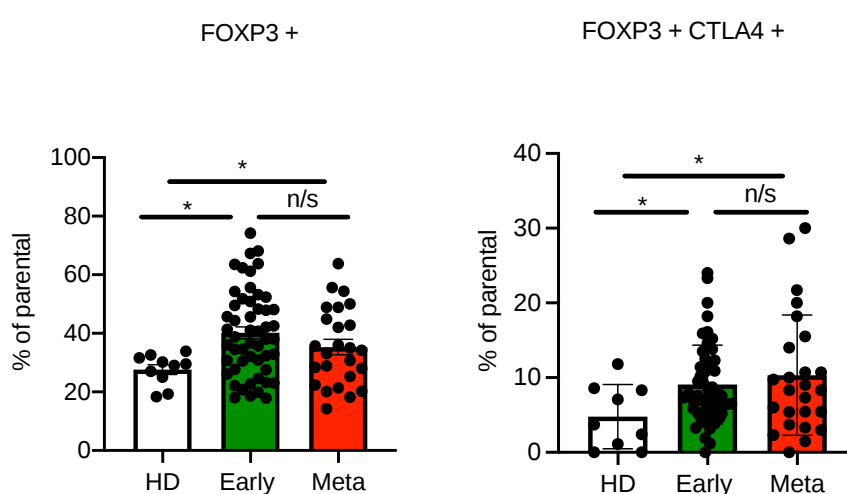
B.



Εικόνα 5. Α. Ανάλυση Kaplan-Meier του PFS και του OS με βάση τον υποπληθυσμό CD4PD1+TCF1+ των T-λεμφοκυττάρων των μεταστατικών ασθενών (META). Β. Ανάλυση Kaplan-Meier του PFS και του OS με βάση τον υποπληθυσμό CD8PD1+TCF1+ των T-λεμφοκυττάρων των μεταστατικών ασθενών (META)

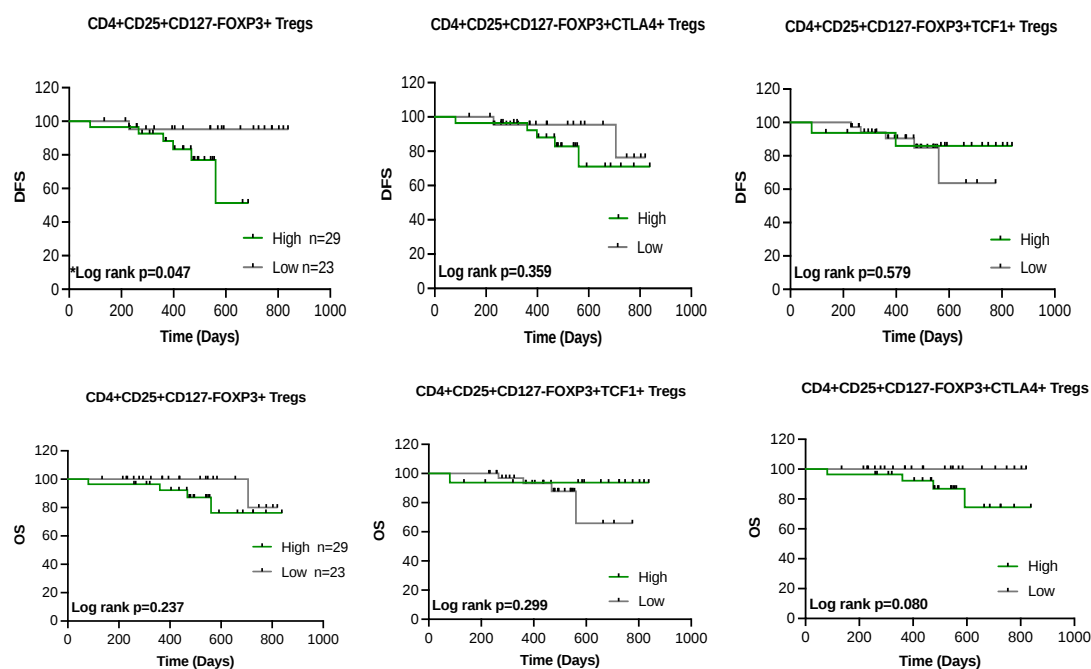
3.3. Ανάλυση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων

Από την εικόνα 4 παρατηρούμε πως το ποσοστό των κατασταλτικών CD4+FOXP3+ και CD4+FOXP3+CTLA4+ Tregs είναι αυξημένο στους ασθενείς και των δύο ομάδων σε σχέση με τους υγιείς δότες.



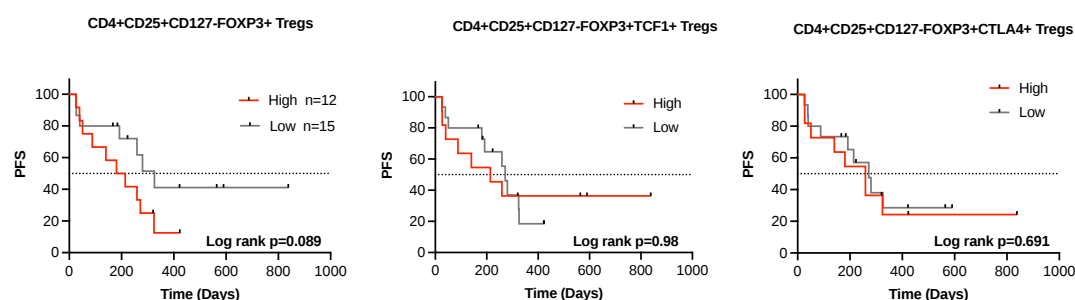
Εικόνα 6. Α. Ποσοστά πληθυσμών ρυθμιστικών FOXP3+ και FOXP3-CTLA4+ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. HD: healthy donors(N=11), EARLY: Ασθενείς σε πρώιμα στάδια της νόσου(N=63), META: Ασθενείς σε προχωρημένα στάδια της νόσου ή μεταστατικοί(N=26).

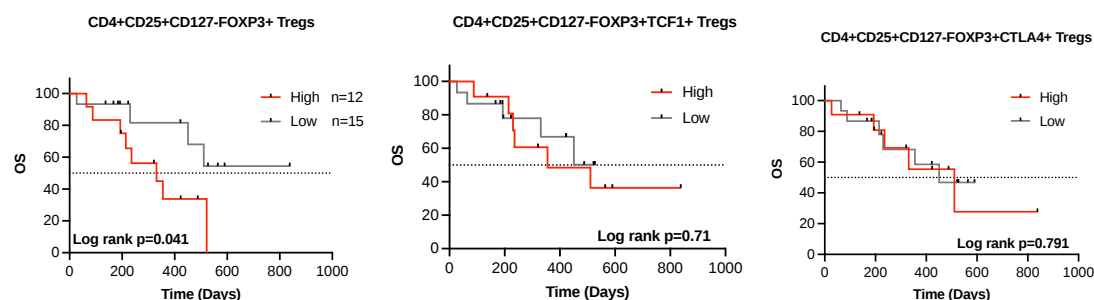
Από την καμπύλες Kaplan-Meier της εικόνας βγαίνει το συμπέρασμα πως ασθενείς με πρώιμη νόσο που έχει εξαιρεθεί χειρουργικά και υψηλά ποσοστά FOXP3+ Tregs παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά χειρότερο DFS σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν χαμηλά ποσοστά στην κυκλοφορία πριν τη χημειοθεραπεία.



Εικόνα 7. Ανάλυση Kaplan-Meier του PFS και του OS με βάση τους υποπληθυσμούς CD25+CD127-, CD25+CD127-FOXP3+, CD25+CD127-FOXP3-CTLA4+, CD25+CD127-FOXP3+TCF1+ και FOXP3+TCF1+ των Τ-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων του Group 1(EARLY)

Από τις αναλύσεις της εικόνας 8 φαίνεται πως ασθενείς με μεταστατική νόσο και υψηλά ποσοστά FOXP3+ Tregs παρουσιάζουν μια τάση για χειρότερο PFS και έχουν στατιστικά σημαντική χειρότερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν χαμηλά ποσοστά στην κυκλοφορία πριν τη θεραπεία.





Εικόνα 8. Ανάλυση Kaplan-Meier του PFS και του OS με βάση τους υποπληθυσμούς CD25+CD127-, CD25+CD127-FOXP3+, CD25+CD127-FOXP3-CTLA4+, CD25+CD127-FOXP3+TCF1+ και FOXP3+TCF1+ των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων του Group 2(META).

3.4.Συσχέτιση μεταξύ των T- ρυθμιστικών και των CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων

Ο Πίνακας 8 εξετάζει τη σχέση (συσχέτιση) μεταξύ των FOXP3 T- ρυθμιστικών κυττάρων και διάφορων υποπληθυσμών των CD4 T-λεμφοκυττάρων. Η μεταβλητή Spearman r δηλώνει παίρνει τιμές από -1 έως 1 και δηλώνει την θετική συσχέτιση(κοντά στο 1) , την αρνητική συσχέτιση (κοντά στο-1) και καθόλου συσχέτιση (κοντά στο 0). Στους EARLY ασθενείς η συσχέτιση που έχουμε είναι στους υποπληθυσμούς CD4PD1 και CD4TCF1+ και μάλιστα με τον πληθυσμό CD4TCF1+ η συσχέτιση είναι πολύ ισχυρή διότι το p-value είναι μικρότερη του 0,01. Στους META έχουμε συσχέτιση των FOXP3+Tregs με όλους σχεδόν τους υποπληθυσμούς με πιο στατιστικά σημαντικό τον CD4PD1+TCF1+ διότι το p-value είναι μικρότερο του 0,01.

Πίνακας 8. Συσχέτιση μεταξύ των FOXP3 T- ρυθμιστικών κυττάρων και των CD4+PD1+, CD4+PD1+TCF1, CD4+PD1+,CD4+TCF1 T-λεμφοκυττάρων του Group 1(EARLY) και του Group 2(META)

FOXP3+Tregs		CD4	CD4PD1	CD4PD1TCF1	CD4PD1TCF-	CD4TCF1
EARLY	Spearman r	-0,1799	0,327	0,5003	0,1287	0,4294
	p-value	0,2113	0,0204	0,5003	0,3729	0,0019
	95%CI	0,010 to 0,619	0,04512 to 0,5607	0,2500 to 0,6880	-0,1634 to 0,4001	0,1634 to 0,6373
META	Spearman r	-0,3642	0,4539	0,5152	0,3348	0,4675
	p-value	0,0735	0,0226	0,0084	0,1019	0,0185

	95%CI	-0,5309 to 0,2628	0,05935 to 0,7258	0,1387 to 0,7616	-0,0818 to 0,6518	0,07647 to 0,7339
--	-------	----------------------	----------------------	---------------------	----------------------	----------------------

Ο Πίνακας 9 εξετάζει τη σχέση (συσχέτιση) μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών συγκεκριμένα των *FOXP3* T- ρυθμιστικών κυττάρων και διάφορων υποπληθυσμών των *CD8* T-λεμφοκυττάρων.). Στους EARLY ασθενείς η συσχέτιση που έχουμε είναι σε όλους τους υποπληθυσμούς και μάλιστα με τον πληθυσμό *CD8*TCF1+ η συσχέτιση είναι πολύ ισχυρή διότι το p-value είναι μικρότερη του 0,01. Στους META έχουμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των *FOXP3*+Tregs μόνο με τον υποπληθυσμό *CD8*PD1+TCF1+.

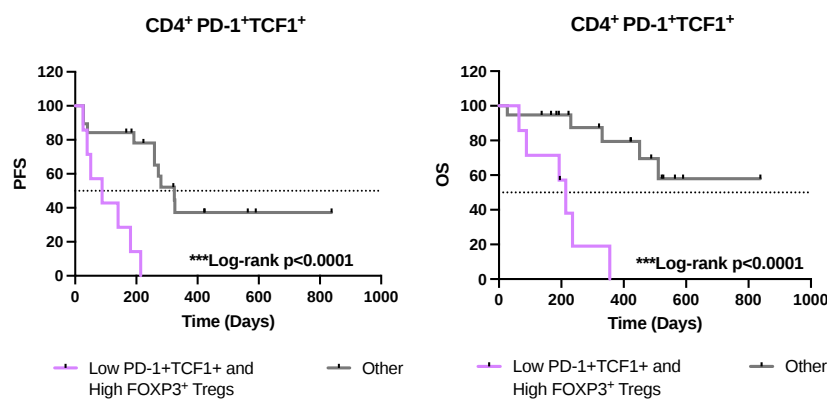
Πίνακας 9. Συσχέτιση μεταξύ των *FOXP3* T- ρυθμιστικών κυττάρων και των *CD8*+PD1+, *CD8*+PD1+TCF1-, *CD8*+PD1+,*CD8*+TCF1 T-λεμφοκυττάρων των EARLY και των META

FOXP3+Tregs		CD8	CD8PD1	CD8PD1TCF1	CD8D1TCF-	CD8TCF1
EARLY	Spewrman r	0,3173	0,3455	0,4392	0,2818	0,4181
	p-value	0,0248	0,014	0,014	0,0474	0,0025
	95%CI	0,03426 to 0,5532	0,06591 to 0,5748	0,1751 to 0,6444	-0,004664 to 0,5256	0,1500 to 0,6290
META	Spewrman r	-0,1439	0,3832	0,4078	0,3609	0,3911
	p-value	0,4926	0,0587	0,043	0,0763	0,0532
	95%CI	-0,5191 to 0,2778	-0,02647 to 0,6826	0,002715 to 0,6979	-0,05224 to 0,6686	-0,01715 to 0,6875

3.5.Συσχέτιση του συνδυαστικού πληθυσμού των χαμηλής συχνότητας *CD8*+PD-1+TCF1+ κυττάρων και των υψηλής συχνότητας των *FOXP3*+ Tregs με το χρονικό περιθώριο χωρίς υποτροπή της νόσου και την επιβίωση των ασθενών

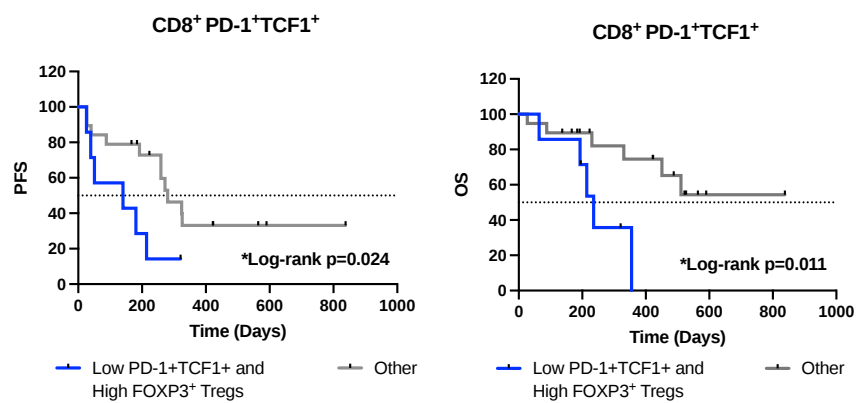
Αφού διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των *FOXP3* T- ρυθμιστικών κυττάρων και διάφορων υποπληθυσμών των *CD4* T-λεμφοκυττάρων το επόμενο βήμα ήταν να γίνει

η ανάλυση Kaplan-Meier ώστε να ανλήσουμε πληροφορίες για το αν κάποιος συνδυασμός των δύο επηρεάζει την επιβίωση του ασθενή. Από την ανάλυση όπως βλέπουμε οι ασθενείς με υψηλά ποσοστά των FOXP3⁺ Tregs και χαμηλά ποσοστά των CD4⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων έχουν στατιστικά σημαντική πιθανότητα να εμφανίσουν ξανά την νόσο πιο νωρίς καθώς και μεγαλύτερη πιθανότητά να αποβιώσουν ακόμα και μετά την θεραπεία.



Εικόνα 9. Ανάλυση Kaplan-Meier του PFS και του OS με βάση τη συνδυαστική συχνότητα των CD4⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων και των FOXP3⁺ Tregs.

Αφού διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των FOXP3 T- ρυθμιστικών κυττάρων και διάφορων υποπληθυσμών των CD8 T-λεμφοκυττάρων το επόμενο βήμα ήταν να γίνει η ανάλυση Kaplan-Meier ώστε να ανλήσουμε πληροφορίες για το αν κάποιος συνδυασμός των δύο επηρεάζει την πρόγνωση του ασθενή. Από την ανάλυση όπως βλέπουμε οι ασθενείς με υψηλά ποσοστά των FOXP3⁺ Tregs και χαμηλά ποσοστά των CD8⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων έχουν στατιστικά σημαντική πιθανότητα να εμφανίσουν ξανά την νόσο πιο νωρίς καθώς και μεγαλύτερη πιθανότητά να αποβιώσουν ακόμα και μετά την θεραπεία.



Εικόνα 10. Ανάλυση Kaplan-Meier του PFS και του OS με βάση τη συνδυαστική συχνότητα των CD8⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων και των FOXP3⁺ Tregs.

4.Συμπεράσματα

4.1. Εξήγηση αποτελεσμάτων

4.1.1 Ποσοστά των CD4/CD8 T-λεμφοκυττάρων κυττάρων που εκφράζουν PD1 και TCF1 στους ασθενείς και στους υγιείς δότες

Η βιβλιογραφία έχει δείξει πως χρόνια έκθεση των T-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα του όγκου οδηγεί στην εξάντλησή τους, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση του PD-1 και μειωμένη λειτουργικότητα. Σε συνδυασμό με τον δείκτη TCF1 έναν μεταγραφικό παράγοντα κρίσιμο για τη "βλαστοκυτταρική" ιδιότητα (stemness) και τη μνήμη των T-κυττάρων τα T-λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται σε πρώιμα εξαντλημένα (PD1+TCF1+) τα οποία έχουν την ικανότητα επανεργοποίησης και τα τελικά εξαντλημένα (PD1+TCF1-) τα οποία εφόσον δεν εκφράζουν TCF1+ δεν έχουν την ικανότητα να ενεργοποιηθούν.(71) Και οι δύο πληθυσμοί είτε είναι CD4 είτε CD8 είναι πολύ σημαντικοί τόσο για την ανάπτυξη θεραπειών που τα ενεργοποιεί όσο και για την χρήση τους ως βιοδείκτες για την πρόγνωση των ασθενών όσον αναφορά την ανταπόκριση στην θεραπεία και την επιβίωση τους.

Αν και η επικρατούσα άποψη είναι ότι ο καρκίνος αυξάνει την T-κυτταρική εξάντληση, τα αποτελέσματά μας έδειξαν μια μείωση στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες στο περιφερικό αίμα. Σε ορισμένους πληθυσμούς μεταστατικών ασθενών, η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Αν και φαινομενικά αυτό το εύρημα δεν μπορεί να εξηγηθεί μπορούν να προταθούν διάφορες ερμηνείες. Αρχικά είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η μελέτη των ασθενών αυτών έγινε με βάση το περιφερικό τους αίμα και όχι με ιστό του όγκου. Άρα είναι πιθανό τα εξαντλημένα κύτταρα που αναγνωρίζουν τον όγκο να έχουν συσσωρευτεί εκεί και τα επίπεδα τους στο αίμα να έχουν μειωθεί. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι πλειοψηφία των όγκων είναι MSS δηλαδή έχουν μικρό φορτίο άρα είναι "κρύοι" (cold) όγκοι με φτωχή διήθηση από T-λεμφοκύτταρα. Σε αυτούς τους ασθενείς, η ανοσολογική απόκριση είναι γενικά ασθενής. Είναι πιθανό να υπάρχουν συνολικά λιγότερα ενεργοποιημένα και εξαντλημένα κύτταρα, ακόμα και στην περιφέρεια, επειδή η αρχική ανοσολογική αντίδραση δεν ήταν ποτέ ισχυρή. Επίσης είναι λογικό οι ασθενείς με πολύ αρχικά στάδια της νόσου να μην εμφανίσουν ακόμα σημεία εξάντλησης και Γι'αυτό δεν

υπάρχει σχεδόν καθόλου διαφορά μεταξύ αυτών των ασθενών και των υγιών δοτών. Τέλος αν εστιάσουμε μεμονωμένα στον PD1 και στον TCF1 αντίστοιχα δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι στους υγιείς δότες δείχνουν την εξάντληση των Τ-λεμφοκυττάρων διότι η αυξημένη συγκέντρωση αυτών μπορεί να οφείλεται σε άλλες παραμέτρους.

Η βιβλιογραφία επικεντρώνεται στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου αντί στο περιφερικό αίμα οπότε δεν υπάρχει μία πλήρης εικόνα για να συγκριθούν τα αποτελέσματα(72). Οι μελέτες στο μικροπεριβάλλον δείχνουν μια δραματική αύξηση των εξαντλημένων (PD-1+TCF1-) Τ-κυττάρων μέσα στον όγκο σε σύγκριση τους υγιείς δότες(73). Παρά την εκτεταμένη έρευνα που εστιάζει στο μικροπεριβάλλον του όγκου, παρατηρείται ένα σημαντικό κενό στη βιβλιογραφία όσον αφορά τον συστηματικό χαρακτηρισμό και την προγνωστική αξία των ανοσολογικών βιοδεικτών στο περιφερικό αίμα, σε αντιπαράβολή με τον ιστό του όγκου. Ωστόσο, η αιμοληψία αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική και εύκολα επαναλαμβανόμενη διαδικασία, γεγονός που καθιστά το περιφερικό αίμα ένα ιδιαίτερα ελκυστικό πεδίο για την ανακάλυψη και παρακολούθηση βιοδεικτών. Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση των εν λόγω κυτταρικών πληθυσμών στην περιφερική κυκλοφορία.

Η παρατηρούμενη μείωση των συγκεκριμένων υποπληθυσμών στο αίμα, αν και φαινομενικά παράδοξη —δεδομένου ότι η εξάντληση των Τ-λεμφοκυττάρων αναμένεται να εντείνεται με την πρόοδο της νόσου— συνιστά ένα πρωτότυπο και δυνητικά σημαντικό εύρημα. Ασφαλώς, το εύρημα αυτό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης για την πλήρη αποσαφήνιση του υποκείμενου μηχανισμού και την επικύρωσή του σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ασθενών. Στο σημείο αυτό, είναι κρίσιμο να υπογραμμιστεί ότι η εξάντληση των Τ-λεμφοκυττάρων αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη και δυναμική διαδικασία, της οποίας οι υποκείμενοι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί παραμένουν πεδίο εντατικής επιστημονικής έρευνας.

4.1.2. Συσχέτιση των υποπληθυσμών αυτών των κυττάρων με την επιβίωση των ασθενών

Η συσχέτιση των διαφορετικών υποπληθυσμών CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων με το PFS (progression-free survival) και το OS (overall survival) αξιολογήθηκε μέσω αναλύσεων Kaplan-Meier. Στους ασθενείς με πρώιμα στάδια δεν προέκυψαν σημαντικά ευρήματα, σε αντίθεση με τους μεταστατικούς ασθενείς.. Σύμφωνα με τις αναλύσεις των μεταστατικών ασθενών παρόλο που δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς παρατηρείται μία τάση για καλύτερη επιβίωση χωρίς υποτροπή των ασθενών με υψηλές συγκεντρώσεις των υποπληθυσμών CD4PD1+TCF1+ και CD8PD1+TCF1+ από το μεγάλο άνοιγμα των δύο γραμμών. Αυτή η τάση επιβεβαιώνεται στις καμπύλες του OS και για τους δύο υποπληθυσμούς με βάση των οποίων οι ασθενείς με χαμηλά ποσοστά των υποπληθυσμών αυτών έχουν στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη πιθανότητα να αποβιώσουν πιο νωρίς. Τα ευρήματα αυτά συμβαδίζουν με την βιβλιογραφία διότι αυτοί οι πληθυσμοί και στα CD4 και στα CD8 αντιπροσωπεύουν τα πρώιμα εξαντλημένα κύτταρα τα οποία αντιπροσωπεύουν μια "δεξαμενή" (reservoir) T-κυττάρων που αρχικά έχουν αναγνωρίσει τον καρκίνο (γι' αυτό εκφράζουν PD-1) και επίσης διατηρούν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να ξανα-ενεργοποιούνται(γι' αυτό εκφράζουν TCF1).Τα κύτταρα αυτά είναι ο κύριος πληθυσμός που ανταποκρίνεται στην ανοσοθεραπεία (anti-PD-1)(74). Αυτό σημαίνει ότι το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς έχει στήσει μια ισχυρή, μακροπρόθεσμη άμυνα που, ακόμα κι αν δεν σταματά άμεσα την πρόοδο της νόσου (PFS $p=0.129$), τελικά οδηγεί σε μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης (OS).Επομένως οι ασθενείς με περισσότερα πρώιμα εξαντλημένα κύτταρα ανταποκρίνονται καλύτερα στις θεραπείες και εμφανίζουν καλύτερη επιβίωση σε σχέση με αυτούς που έχουν λιγότερο αριθμό αυτών των κυττάρων.

4.1.3. Ποσοστά T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στους ασθενείς και στους υγιείς δότες

Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs), που χαρακτηρίζονται κυρίως από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, είναι ένας υποπληθυσμός CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων με ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η διατήρηση

της ανοσολογικής ανοχής και η πρόληψη αυτονόμων νοσημάτων. Ωστόσο, στο πλαίσιο του καρκίνου, τα Tregs συσσωρεύονται τόσο μέσα στον όγκο όσο και στην περιφέρεια, όπου καταστέλλουν την αντικαρκινική δράση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και άλλων ανοσοκυττάρων. Γι'αυτό και στην βιβλιογραφία τα υψηλά ποσοστά των Tregs ισοδυναμούν με κακή πρόγνωση των ασθενών(75). Στην εικόνα 6 φαίνεται πως τα ποσοστά διάφορων υποπληθυσμών των Tregs είναι αυξημένα σε σχέση με αυτά των υγιών δοτών. Αυτό το εύρημα συμφωνεί και με ευρήματα άλλων ερευνητών και η πιθανότερη εξήγηση είναι πως ο όγκος στρατολογεί τα κύτταρα αυτά ώστε να εμποδίσουν τα υπόλοιπα T-λεμφοκύτταρα από το να του επιτεθούν εξίσου και ο αυξημένος αριθμός τους.

4.1.4. Συσχέτιση των Tregs κυττάρων με το χρονικό περιθώριο χωρίς υποτροπή της νόσου και την επιβίωση των ασθενών

Τα πορίσματα για την συσχέτιση του PFS και του OS με τους διάφορους πληθυσμούς των Tregs βγήκαν επίσης από τις αναλύσεις *Kaplan-Meier*. Από αυτές υπήρξαν ευρήματα και για τους ασθενείς πρώιμων σταδίων νόσου αλλά και για τους ασθενείς με μεταστατική νόσο. Ασθενείς με πρώιμη νόσο που έχει εξαιρεθεί χειρουργικά και υψηλά ποσοστά FOXP3+ Tregs παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά χειρότερο DFS σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν χαμηλά ποσοστά στην κυκλοφορία πριν τη χημειοθεραπεία ενώ ασθενείς με μεταστατική νόσο και υψηλά ποσοστά FOXP3+ Tregs παρουσιάζουν μια τάση για χειρότερο PFS και έχουν στατιστικά σημαντική χειρότερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν χαμηλά ποσοστά στην κυκλοφορία πριν τη θεραπεία. Αυτά τα ευρήματα συμβαδίζουν με τα προηγούμενα και επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα και άλλων μελετών. Όσον αφορά τους ασθενείς με πρώιμη νόσο είναι στατιστικά σημαντικά χειρότερο το DFS μόνο διότι σε αυτή την κατηγορία δεν έχουν συμβεί αρκετά events θανάτου. Στους μεταστατικούς ασθενείς βλέπουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα. Στο πλαίσιο του καρκίνου, τα Tregs συσσωρεύονται τόσο μέσα στον όγκο όσο και στην περιφέρεια, όπου καταστέλλουν την αντικαρκινική δράση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και άλλων ανοσοκυττάρων άρα ασθενείς με υψηλά ποσοστά αυτών των κυττάρων τείνουν να έχουν χειρότερη ανταπόκριση στην θεραπεία(ειδικά την (76)

ανοσοθεραπεία) . Γί'αυτό και στην βιβλιογραφία τα υψηλά ποσοστά των Tregs ισοδυναμούν με κακή πρόγνωση των ασθενών κάτι που αντικατοπτρίζεται και από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης .

4.1.5. Συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών T- ρυθμιστικών και των CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων

Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων είναι αυτά δηλαδή που σταματούν την ανοσολογική απόκριση ενώ τα CD4 βοηθητικά και τα CD8 κυτταροτοξικά είναι κύτταρα τα οποία προάγουν την ανοσολογική απόκριση. Αυτό σημαίνει ότι στην αντιμετώπιση του όγκου τα κύτταρα αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Γί'αυτό κρίθηκε σκόπιμο να γίνει μία ανάλυση συσχέτισης μεταξύ αυτών των πληθυσμών. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η παρουσία των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (Tregs) σχετίζεται σημαντικά με ένα υψηλό ποσοστό CD4+ T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν PD1 . Αυτό υποδηλώνει ότι στα πρώιμα στάδια της νόσου, αυτοί οι δύο πληθυσμοί κυττάρων μπορεί να έχουν αναλογική σχέση δηλαδή όταν αυξάνεται ο ένας πληθυσμός αυξάνεται και άλλος. Στους μεταστατικούς ασθενείς υπάρχει άλλου είδους συσχέτιση. Αρχικά υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση με τα CD4 κύτταρα που δεν εκφράζουν ούτε PD1 ούτε TCF1. Αυτό είναι λογικό διότι αυτοί οι πληθυσμοί έχουν διαφορετικές αποκρίσεις στον όγκο, τα ρυθμιστικά καταστέλλουν την ανοσολογική απόκριση ενώ τα CD4 την βοηθούν. Όμως από τον πίνακα φαίνεται ότι όλοι οι υπόλοιποι πληθυσμοί (εκτός του CDPD14TCF1) εμφανίζουν μια θετική συσχέτιση με τα Tregs. Μια εξήγηση γι'αυτό μπορεί να πως όλοι αυτοί οι πληθυσμοί σχετίζονται με την εξάντληση των T-λεμφοκυττάρων και είναι ένδειξη ότι τα T-λεμφοκύτταρα έχουν σταματήσει την δράση τους κάτι που οφείλεται εν μέρει στα Tregs. Όσον αφορά τα CD8 λεμφοκύτταρα παρατηρούμε ένα διαφορετικό μοτίβο. Στους EARLY ασθενείς υπάρχει θετική συσχέτιση των Tregs με όλες τις κατηγορίες των υποπληθυσμών ενώ στους META υπάρχει θετική συσχέτιση μόνο με τον υποπληθυσμό CD8PD1TCF1. Μία εξήγηση για τους ασθενείς του πρώιμου σταδίου είναι πως υπάρχει αυτή θετική συσχέτιση διότι τα CD8 κύτταρα ότι και να εκφράζουν όντας κυτταροτοξικά επάγουν την λειτουργία των Tregs σε αρχικά στάδια της νόσου. Στους μεταστατικούς ασθενείς βλέπουμε θετική συσχέτιση μόνο με τα πρώιμα εξαντλημένα CD8 T-λεμφοκύτταρα

των οποίων η εξάντληση μπορεί να οφείλεται στην δράση των Tregs στα προχωρημένα στάδια.

4.1.6.Συσχέτιση του συνδυαστικού πληθυσμού των χαμηλής συχνότητας CD8⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων και των υψηλής συχνότητας των FOXP3⁺ Tregs με το χρονικό περιθώριο χωρίς υποτροπής της νόσου και την επιβίωση των ασθενών

Από τις καμπύλες *Kaplan-Meier* προκύπτει ότι οι ασθενείς με υψηλά ποσοστά των FOXP3⁺ Tregs και χαμηλά ποσοστά των CD8⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων έχουν στατιστικά σημαντική πιθανότητα να εμφάνισουν ξανά την νόσο πιο νωρίς καθώς και μεγαλύτερη πιθανότητα να αποβιώσουν ακόμα και μετά την θεραπεία έναντι όλων των υπόλοιπων συνδιασμών των υποπληθυσμών αυτών. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και για τον υποπληθυσμό CD8⁺PD-1⁺TCF1⁺ δηλαδή ασθενείς με υψηλά ποσοστά των FOXP3⁺ Tregs και χαμηλά ποσοστά των CD8⁺PD-1⁺TCF1⁺ κυττάρων έχουν στατιστικά σημαντική πιθανότητα να εμφάνισουν ξανά την νόσο πιο νωρίς καθώς και μεγαλύτερη πιθανότητα να αποβιώσουν ακόμα και μετά την θεραπεία έναντι όλων των υπόλοιπων συνδιασμών των υποπληθυσμών αυτών. Πρέπει να σημειωθεί πως τα T-υθμιστικά καταστέλουν την ανοσολογική απόκριση άρα ο συνδυασμός των υψηλών ποσοστών αυτών των κυττάρων και των χαμηλών ποσοστών προγονικών εξαντλημένων κυττάρων τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν αποτελούν ένα κακό φαινότυπο για τους ασθενείς όσον αναφορά το χρονικό περιθώριο μέχρι να εμφανίσουν υποτροπή και για την επιβίωση τους.

4.2. Περιορισμοί της μελέτης

Η παρούσα μελέτη παρείχε μία σχετικά λεπτομερή εικόνα όσον αναφορά τους ανοσολογικούς δείκτες στο περιφερικό αίμα του καρκίνου του παχέος εντέρου. Είναι σημαντικό όμως να αναγνωριστούν ορισμένοι περιορισμοί της που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Πρωτίστως, το σχετικά μικρό μέγεθος του δείγματος ενδέχεται να περιορίζει τη στατιστική ισχύ των αναλύσεων και τη δυνατότητα γενίκευσης των ευρημάτων σε ευρύτερους πληθυσμούς. Ειδικά το Group 2 (META) δηλαδή οι μεταστατικοί ασθενείς ήταν αρκετά λιγότεροι (N=26) σε σχέση με το Group 1 (EARLY) (N=63). Εκτός από τους ασθενείς και το δείγμα των υγείων δοτών ήταν περιορισμένο. Επιπλέον, ένας σημαντικός

περιορισμός είναι η ανωριμότητα των δεδομένων, η οποία οφείλεται στον περιορισμένο χρόνο παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών. Αυτό σημαίνει ότι δεν έχει παρέλθει επαρκής χρόνος για την καταγραφή ενός ικανού αριθμού κλινικών συμβάντων (events), όπως η πρόοδος της νόσου ή η θνησιμότητα, γεγονός που καθιστά τις αναλύσεις επιβίωσης προκαταρκτικές και απαιτεί περαιτέρω ωρίμανση. Πρέπει να αναφερθεί επίσης πως η ανάλυση βασίστηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος, τα οποία ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον εντός του όγκου, όπου διαδραματίζεται η κρίσιμη αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών και των ανοσοποιητικών κυττάρων. Τέλος, αν και θα ήταν επιθυμητή η διεξαγωγή επιπρόσθετων διερευνητικών αναλύσεων για τη βαθύτερη κατανόηση των παρατηρούμενων συσχετίσεων, οι χρονικοί περιορισμοί δεν επέτρεψαν την ολοκλήρωσή τους στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα και μακρύτερη περίοδο παρακολούθησης είναι απαραίτητες για την επικύρωση των αποτελεσμάτων μας.

4.3. Μελλοντικοί στόχοι

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, αν και προκαταρκτικά, θέτουν τις βάσεις για σημαντικές μελλοντικές κατευθύνσεις της έρευνας, επισημαίνοντας την ανάγκη για βαθύτερη κατανόηση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρόλο που η ανοσοθεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου ανοσολογικής απόκρισης δεν αποτελεί εγκεκριμένη θεραπεία για την πλειοψηφία των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (συγκεκριμένα, για όγκους με μικροδορυφορική σταθερότητα - MSS), η αποκωδικοποίηση των μηχανισμών ανοσολογικής διαφυγής είναι ιδιαίτερα σημαντική. Αυτή η γνώση είναι θεμελιώδης για τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών που θα μπορούσαν να "μετατρέψουν" αυτούς τους "ανοσολογικά ψυχρούς" όγκους σε "θερμούς", καθιστώντας τους ευάλωτους στην ανοσοθεραπεία.

Ως εκ τούτου, οι μελλοντικές έρευνες πρέπει να επικεντρωθούν στην επικύρωση των ευρημάτων μας σε μεγαλύτερες, προοπτικές και πολυκεντρικές μελέτες με μακρύτερη περίοδο παρακολούθησης για την ωρίμανση των δεδομένων. Παράλληλα, είναι επιτακτική η μετάβαση από την παρατήρηση συσχετίσεων στη μηχανιστική διερεύνηση, χρησιμοποιώντας λειτουργικές αναλύσεις και τεχνολογίες αιχμής, όπως

η μονοκύτταρική αλληλούχηση RNA, για να αποκωδικοποιηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των Tregs και των εξαντλημένων T-κυττάρων. Κεντρικός στόχος παραμένει η διερεύνηση της δυνατότητας αυτών των κυτταρικών πληθυσμών να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες, συνδυάζοντας την ανάλυση του περιφερικού αίματος με την αντίστοιχη ανάλυση του ιστού του όγκου, ώστε να αποσαφηνιστεί εάν οι συστηματικές μεταβολές αντικατοπτρίζουν το τοπικό μικροπεριβάλλον.

Ο απώτερος σκοπός όλων αυτών των προσπαθειών είναι να καταστεί δυνατή η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση το ξεχωριστό ανοσολογικό τους προφίλ. Μια τέτοια προσέγγιση (immunological stratification) θα μας επιτρέψει να απομακρυνθούμε από τη λογική της ενιαίας θεραπείας για όλους και να εστιάσουμε στον σχεδιασμό και την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγιών, επιλέγοντας θεραπείες που είναι κατάλληλες για κάθε διακριτή υποομάδα ασθενών και ανοίγοντας, έτσι, τον δρόμο για μια νέα εποχή εξατομικευμένης ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη ανέδειξε σημαντικές ανοσολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με την πρόγνωση και την επιβίωση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, αναδεικνύοντας τον ρόλο των εξαντλημένων T-λεμφοκυττάρων και των T-ρυθμιστικών κυττάρων στη διαμόρφωση της αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης. Τα αποτελέσματα, αν και προκαταρκτικά, ενισχύουν την αντίληψη ότι το ανοσολογικό προφίλ των ασθενών μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο βιοδείκτη για την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η βαθύτερη κατανόηση αυτών των μηχανισμών είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγιών και τη βελτίωση των κλινικών εκβάσεων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η εργασία αυτή συμβάλλει στο συνεχώς διευρυνόμενο πεδίο της όγκο-ανοσολογίας, προσφέροντας πολύτιμα δεδομένα για μελλοντικές μελέτες και ανοίγοντας τον δρόμο για την εφαρμογή πιο στοχευμένων ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων.

5.Βιβλιογραφία

1. Azzouz LL, Sharma S. Physiology, Large Intestine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/>
2. Sulaiman S, Marciani L. MRI of the Colon in the Pharmaceutical Field: The Future before us. *Pharmaceutics*. 2019 Apr;11(4):146.
3. Lee R, Mezoff EA. 30 - Anatomy and Physiology of the Small and Large Intestines. In: Wyllie R, Hyams JS, Kay M, editors. *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: Elsevier; 2021 [cited 2025 Aug 28]. p. 308-320.e3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032367293100030X>
4. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers*. 2024 Jan;16(8):1530.
5. Pardamean CI, Sudigyo D, Budiarto A, Mahesworo B, Hidayat AA, Baurley JW, et al. Changing Colorectal Cancer Trends in Asians: Epidemiology and Risk Factors. *Oncol Rev*. 2023;17:10576.
6. Meng Y, Tan Z, Zhen J, Xiao D, Cai L, Dong W, et al. Global, regional, and national burden of early-onset colorectal cancer from 1990 to 2021: a systematic analysis based on the global burden of disease study 2021. *BMC Medicine*. 2025 Jan 21;23(1):34.
7. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2023;73(3):233–54.
8. Roberson J, Maguire L. Epidemiological trends in stage IV colorectal cancer. *Seminars in Colon and Rectal Surgery*. 2023 Sept 1;34(3):100967.
9. Kusnik A, Renjithlal SLM, Chodos A, Shanmukhappa SC, Eid MM, Renjith KM, et al. Trends in Colorectal Cancer Mortality in the United States, 1999 - 2020. *Gastroenterology Res*. 2023 Aug;16(4):217–25.
10. Primm KM, Malabay AJ, Curry T, Chang S. Who, where, when: Colorectal cancer disparities by race and ethnicity, subsite, and stage. *Cancer Med*. 2023 July;12(13):14767–80.
11. Neto Í, Rocha J, Gaspar MM, Reis CP. Experimental Murine Models for Colorectal Cancer Research. *Cancers*. 2023 Jan;15(9):2570.
12. Weledji E. Clinics in Oncology The Etiology and Pathogenesis of Colorectal Cancer OPEN ACCESS. 2024 Jan;9:2046.
13. Li Q, Geng S, Luo H, Wang W, Mo YQ, Luo Q, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Sig Transduct Target Ther*. 2024 Oct 7;9(1):266.

14. Balata GF, Azzam HN. Synopsis of colorectal cancer: prevalence, symptoms, screening, staging, risk factors, and treatment. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*. 2025 Jan 6;37(1):4.
15. Gong D, Adomako-Bonsu AG, Wang M, Li J. Three specific gut bacteria in the occurrence and development of colorectal cancer: a concerted effort. *PeerJ*. 2023;11:e15777.
16. Ullah F, Pillai AB, Omar N, Dima D, Harichand S. Early-Onset Colorectal Cancer: Current Insights. *Cancers*. 2023 Jan;15(12):3202.
17. Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, et al. Colorectal Cancer: An Overview. In: Morgado-Diaz JA, editor. *Gastrointestinal Cancers* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 [cited 2025 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586003/>
18. Briggs NL, Ton M, Malen RC, Reedy AM, Cohen SA, Phipps AI, et al. Colorectal cancer pre-diagnostic symptoms are associated with anatomic cancer site. *BMC Gastroenterology*. 2024 Feb 6;24(1):65.
19. Thota SSP, Senanayake J, Gill S, Craig S, Stear T, Thota SSP, et al. Rectosigmoid Adenocarcinoma Presenting As Nine Days of Constipation. *Cureus* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2025 Aug 28];15(5). Available from: <https://cureus.com/articles/146612-rectosigmoid-adenocarcinoma-presenting-as-nine-days-of-constipation>
20. Spadaccini M, Massimi D, Mori Y, Alfarone L, Fugazza A, Maselli R, et al. Artificial Intelligence-Aided Endoscopy and Colorectal Cancer Screening. *Diagnostics*. 2023 Jan;13(6):1102.
21. Ghuman SS, Kochhar R, Mahajan H, Buxi TBS, Gupta A, Arora A, et al. CT and MR Imaging in Colorectal Carcinoma: A Tool for Diagnosis, Staging, Response Evaluation, and Follow-Up. *South Asian J Cancer*. 2025 Jan 24;13(4):236–40.
22. Zheng LJ, Huang XX, Lu ZZ, Wu HF, Lv DD. A diagnostic test: diagnostic value of gastrointestinal endoscopy narrow-band imaging (NBI) for colorectal laterally spreading tumor (LST) and submucosal invasion. *Translational Cancer Research* [Internet]. 2022 Dec [cited 2025 Aug 28];11(12). Available from: <https://tcr.amegroups.org/article/view/70904>
23. Zhou Y, Han Z, Dou F, Yan T. Pre-colectomy location and TNM staging of colon cancer by the computed tomography colonography: a diagnostic performance study. *World Journal of Surgical Oncology*. 2021 Apr 15;19(1):120.
24. Adeleke A, Adebayo AS, Agbaje K, Olajubutu O, Adesina SK. Colorectal Cancer: Therapeutic Approaches and Their Complications. *Biomedicines*. 2025 July;13(7):1646.

25. Fadlallah H, Masri JE, Fakhereddine H, Youssef J, Chemaly C, Doughan S, et al. Colorectal cancer: Recent advances in management and treatment. *World Journal of Clinical Oncology*. 2024 Sept 24;15(9):1136–56.
26. Huang S, Ye J, Gao X, Huang X, Huang J, Lu L, et al. Progress of research on molecular targeted therapies for colorectal cancer. *Front Pharmacol* [Internet]. 2023 Aug 8 [cited 2025 Aug 28];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1160949/full>
27. Li F, Lin Y, Li R, Shen X, Xiang M, Xiong G, et al. Molecular targeted therapy for metastatic colorectal cancer: current and evolving approaches. *Front Pharmacol* [Internet]. 2023 Oct 20 [cited 2025 Aug 28];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1165666/full>
28. Yu B, Kang J, Lei H, Li Z, Yang H, Zhang M. Immunotherapy for colorectal cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2024 Aug 21 [cited 2025 Aug 28];15. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1433315/full>
29. Kamrani A, Nasiri H, Hassanzadeh A, Ahmadian Heris J, Mohammadinasab R, Sadeghvand S, et al. New immunotherapy approaches for colorectal cancer: focusing on CAR-T cell, BiTE, and oncolytic viruses. *Cell Communication and Signaling*. 2024 Jan 19;22(1):56.
30. Cornista AM, Giolito MV, Baker K, Hazime H, Dufait I, Datta J, et al. Colorectal Cancer Immunotherapy: State of the Art and Future Directions. *Gastro Hep Advances*. 2023 Jan 1;2(8):1103–19.
31. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565–70.
32. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018 Mar 23;359(6382):1350–5.
33. Kwan ASH, Uwishema O, Mshaymesh S, Choudhary K, Salem FK, Sengar AS, et al. Advances in the diagnosis of colorectal cancer: the application of molecular biomarkers and imaging techniques: a literature review. *Ann Med Surg (Lond)*. 2025 Jan;87(1):192–203.
34. Menon G, Cagir B. Colon Cancer. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>

35. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 June;138(6):2073-2087.e3.
36. Ulucutsoy B, Çini N, Erbaş O. Microsatellite Instability in Lynch Syndrome and Colorectal Cancers. *JEBMS*. 2021;2(3):375–9.
37. Chen W, Swanson BJ, Frankel WL. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagnostic Pathology*. 2017 Mar 4;12(1):24.
38. Purba AP, Warsinggih, Uwuratuw JA, Zainuddin AA, Arsyad A, Faruk M. The Relationship between Microsatellite Instability and KRAS Mutations in Liver-metastatic Colorectal Cancer: A Preliminary Cross-sectional Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*. 2025 May 10;10(2):315–22.
39. Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer*. 2005 May 9;92(9):1746–53.
40. Microsatellite instability in mismatch repair proficient colorectal cancer: clinical features and underlying molecular mechanisms - *eBioMedicine* [Internet]. [cited 2025 Sept 7]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(24\)00177-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(24)00177-4/fulltext)
41. Zhang J, Zheng J, Yang Y, Lu J, Gao J, Lu T, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Sci Rep*. 2015 Dec 22;5:18678.
42. Haefliger S, Marston K, Alborelli I, Stauffer EJ, Gugger M, Jermann PM, et al. Prevalence of Molecular Alterations in a Swiss Cohort of 512 Colorectal Carcinoma Patients by Targeted Next-Generation Sequencing Analysis in Routine Diagnostics. *Pathobiology*. 2023;90(3):166–75.
43. Tang Y, Fan Y. Combined KRAS and TP53 mutation in patients with colorectal cancer enhance chemoresistance to promote postoperative recurrence and metastasis. *BMC Cancer*. 2024 Sept 17;24(1):1155.
44. Ciepiela I, Szczepaniak M, Ciepiela P, Hińcza-Nowak K, Kopczyński J, Macek P, et al. Tumor location matters, next generation sequencing mutation profiling of left-sided, rectal, and right-sided colorectal tumors in 552 patients. *Sci Rep*. 2024 Feb 26;14(1):4619.
45. Pirvu EE, Severin E, Niță I, Toma ȘA. The impact of RAS mutation on the treatment strategy of colorectal cancer. *Med Pharm Rep*. 2023 Jan;96(1):5–15.
46. Wang J, Song J, Liu Z, Zhang T, Liu Y. High tumor mutation burden indicates better prognosis in colorectal cancer patients with KRAS mutations. *Front Oncol*

[Internet]. 2022 Nov 14 [cited 2025 Aug 28];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.1015308/full>

47. Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, Kuboki Y, Bando H, Okamoto W, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2015 Apr 11;15:258.
48. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015 [cited 2025 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500148/>
49. Frydrychowicz M, Boruckiowski M, Koleccka-Bednarczyk A, Dworacki G. The Dual Role of Treg in Cancer. [cited 2025 Aug 28]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.12615>
50. Ward-Hartstonge KA, Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clinical & Translational Immunology*. 2017;6(9):e154.
51. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*. 2019 July;110(7):2080–9.
52. T Cells in Colorectal Cancer: Unravelling the Function of Different T Cell Subsets in the Tumor Microenvironment [Internet]. [cited 2025 Sept 7]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/14/11673>
53. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*. 2004 Apr 23;22(Volume 22, 2004):745–63.
54. Takahashi H, Sakakura K, Ida S, Kawabata-Iwakawa R, Matsuyama T, Tada H, et al. Circulating naïve and effector memory T cells correlate with prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2022 Jan;113(1):53–64.
55. Gumber D, Wang LD. Improving CAR-T immunotherapy: Overcoming the challenges of T cell exhaustion. *eBioMedicine*. 2022 Mar 1;77:103941.
56. Choi H, Kim Y, Jung YW. The Function of Memory CD8+ T Cells in Immunotherapy for Human Diseases. *Immune Network* [Internet]. 2023 Feb 24 [cited 2025 Sept 7];23(1). Available from: <https://doi.org/10.4110/in.2023.23.e10>
57. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell*. 2020 Aug;11(8):549–64.
58. Principe N, Kidman J, Goh S, Tilsed CM, Fisher SA, Fear VS, et al. Tumor Infiltrating Effector Memory Antigen-Specific CD8+ T Cells Predict Response to Immune Checkpoint Therapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Nov 12 [cited 2025 Aug

- 28];11. Available from:
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.584423/full>
59. Knörck A, Schäfer G, Alansary D, Richter J, Thurner L, Hoth M, et al. Cytotoxic Efficiency of Human CD8+ T Cell Memory Subtypes. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Apr 13 [cited 2025 Aug 28];13. Available from:
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.838484/full>
60. Gounari F, Khazaie K. TCF-1: a maverick in T cell development and function. *Nat Immunol*. 2022 May;23(5):671–8.
61. Garcia-Perez L, Famili F, Cordes M, Brugman M, van Eggermond M, Wu H, et al. Functional definition of a transcription factor hierarchy regulating T cell lineage commitment. *Sci Adv*. 2020 July;6(31):eaaw7313.
62. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway | *Nature Reviews Immunology* [Internet]. [cited 2025 Aug 28]. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nri.2017.108>
63. Zhang J, Lyu T, Cao Y, Feng H. Role of TCF-1 in differentiation, exhaustion, and memory of CD8+ T cells: A review. *FASEB J*. 2021 May;35(5):e21549.
64. Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*. 2019 Mar;20(3):326–36.
65. Mohamed ASER, El-Rebey HS, AboElnasr LSA, Abdou AG. The role and relationship between programmed death ligand 1 and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 immunohistochemical expression in colorectal carcinoma patients; an impact on outcome [Internet]. 2021 [cited 2025 Aug 28]. Available from:
<http://ecancer.org/en/journal/article/1323-the-role-and-relationship-between-programmed-death-ligand-1-and-cytotoxic-t-lymphocyte-associated-antigen-4-immunohistochemical-expression-in-colorectal-carcinoma-patients-an-impact-on-outcome>
66. Benelli R, Zocchi MR, Poggi A. Immune Checkpoint Receptor/Ligand Expression and Chemotherapy in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 1;15(3):914.
67. Jung S, Baek JH. The Potential of T Cell Factor 1 in Sustaining CD8+ T Lymphocyte-Directed Anti-Tumor Immunity. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 29;13(3):515.
68. Kim C, Jin J, Weyand CM, Goronzy JJ. The Transcription Factor TCF1 in T Cell Differentiation and Aging. *Int J Mol Sci*. 2020 Sept 5;21(18):6497.

69. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology*. 2019;49(10):1457–973.
70. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar;12(3):191–200.
71. Brunell AE, Lahesmaa R, Autio A, Thotakura AK. Exhausted T cells hijacking the cancer-immunity cycle: Assets and liabilities. *Front Immunol* [Internet]. 2023 Apr 14 [cited 2025 Sept 7];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1151632/full>
72. Wu X, Zhang H, Xing Q, Cui J, Li J, Li Y, et al. PD-1(+) CD8(+) T cells are exhausted in tumours and functional in draining lymph nodes of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2014 Sept 23;111(7):1391–9.
73. Zhang L, Guo X, Sun X, Liao J, Liu Q, Ye Y, et al. Analysis of tumor-infiltrating exhausted T cells highlights IL-6 and PD1 blockade as a combined immunotherapy strategy for non-small cell lung cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2025 Feb 11 [cited 2025 Sept 7];16. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2025.1486329/full>
74. Zhou L, Velegraki M, Wang Y, Mandula JK, Chang Y, Liu W, et al. Spatial and functional targeting of intratumoral Tregs reverses CD8⁺ T cell exhaustion and promotes cancer immunotherapy. *J Clin Invest* [Internet]. 2024 July 15 [cited 2025 Sept 7];134(14). Available from: <https://www.jci.org/articles/view/180080>
75. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2015 Oct 1;5:15179.
76. Smolle MA, Herbsthofer L, Granegger B, Goda M, Brcic I, Bergovec M, et al. T-regulatory cells predict clinical outcome in soft tissue sarcoma patients: a clinico-pathological study. *Br J Cancer*. 2021 Aug;125(5):717–24.