



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του  
υποδοχέα του επιδερμидικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) σε ασθενείς  
με καρκίνο παχέος εντέρου**

Χρήστου Κωνσταντίνος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Κουκούλης Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Επιβλέπων
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Σαμαρά Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική

Λάρισα, Οκτώβριος, 2015



**UNIVERSITY OF  
THESSALY**

**SCHOOL OF HEALTH  
SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN  
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**Study of EGFR mRNA expression level in patients with colorectal  
carcinoma**

Christou Konstantinos

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Koukoulis Georgios, Professor of Pathology, Επιβλέπων
- Germenis Anastasios, Professor of Immunology
- Samara Maria, Assistant Professor of Pathology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine

Λάρισα , Οκτώβριος, 2015

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	5
2	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
3	ABSTRACT .....	7
4	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
5	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	10
5.1	ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	10
5.1.1	Ανατομία του παχέος εντέρου .....	10
5.1.2	Στάδια ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου .....	12
5.1.3	Τύποι καρκίνου του παχέος εντέρου.....	14
5.1.4	Βαθμός διαφοροποίησης (Grade) .....	16
5.1.5	Σταδιοποίηση των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου.....	17
5.2	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	21
5.2.1	Χημειοθεραπεία .....	21
5.2.2	Θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες .....	22
5.3	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	25
5.3.1	Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) .....	25
5.3.2	RAS/RAF/MAPK/ERK μονοπάτι .....	28
5.3.3	KRAS: Δομή και λειτουργία.....	31
5.3.4	Έκφραση του EGF-υποδοχέα στον καρκίνο του παχέος εντέρου .....	34
5.3.5	Έκφραση του KRAS στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	35
5.3.6	Επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων στον καρκίνο του παχέος εντέρου. ....	35
6	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	37
6.1	ΥΛΙΚΑ.....	37

6.2	ΜΕΘΟΔΟΙ .....	37
6.2.1	Εκτίμηση επιπέδων έκφρασης του EGF-υποδοχέα (mRNA μετάγραφα) .....	37
6.2.2	Προσδιορισμός KRAS μεταλλάξεων στα δείγματα .....	46
6.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	56
6.3.1	Κλινικοεργαστηριακές Παράμετροι .....	56
6.3.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων του KRAS ογκογονιδίου (KRAS status).....	58
6.3.3	Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης (mRNA μετάγραφα) του EGFR γονιδίου.....	59
7	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	65
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	69

## **1 ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ τον Καθηγητή και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Γερμενή Αναστάσιο για την επιλογή μου στο ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», που έκανε και δυνατή την παρούσα εργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεώργιο Κουκούλη και την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Μαρία Σαμαρά για την πολύτιμη βοήθεια τους, καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τέλος, η εκπόνηση αυτής της διπλωματική εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν η σύζυγος μου Ιουλία Παπουτσή και οι γονείς μου.

Χρήστου Κωνσταντίνος

## 2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η τέταρτη πιο συχνή αιτία θανάτου. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα με σύνθετες μορφολογικές, γενετικές και επιγενετικές διαταραχές. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGF-υποδοχέα παίζει καθοριστικό ρόλο. Έχουν αναπτυχθεί EGFR-στοχεύουσες θεραπείες με μονοκλωνικά αντισώματα και αναστολείς τυροσινικής κινάσης. Το EGFR γονίδιο υπερεκφράζεται σε νεοπλάσματα παχέος εντέρου σε ποσοστά 60-80%, ενώ οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις είναι σπάνιες. Η υπερέκφραση του EGFR γονιδίου σχετίζεται με χαμηλή πρόγνωση και χαμηλή επιβίωση των ασθενών, καθώς και με ανθεκτικότητα στη θεραπεία με τους βιολογικούς παράγοντες σετουξιμάμπη και πανιτουμουμάμπη. Ωστόσο, η χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών έχει οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Επιπλέον χρειάζεται να ξεκαθαριστούν οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την υπερέκφραση του EGFR γονιδίου. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του EGFR γονιδίου σε επίπεδο mRNA μεταγράφων σε φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. 80% των ασθενών είχε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση του EGFR γονιδίου στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό ( $p < 0,05$ ). Μελετήθηκαν κλινικοεργαστηριακές παράμετροι, όπως το φύλο, το μέγεθος του όγκου, η αγγειακή και περινευρική διήθηση, ο υπότυπος του όγκου, το στάδιο κατά Dukes και ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου και της παρουσίας ή απουσίας μεταλλάξεων του KRAS ογκογονιδίου δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ωστόσο, 5/30 ασθενείς είχαν μειωμένη έκφραση του EGFR γονιδίου στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό. Οι ασθενείς αυτοί είχαν περισσότερους από τέσσερις θετικούς λεμφαδένες. Τέλος, συσχέτιση των αποτελεσμάτων ποσοτικής έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων των δειγμάτων μας με αντίστοιχες τιμές από νωπό κατεψυγμένο ιστό των ίδιων ασθενών έδειξε ανάλογα αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0,05$ ). Χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να διερευνηθεί εάν η έκφραση του EGF-υποδοχέα μπορεί να αποτελέσει πιθανό βιοδείκτη για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας συγκεκριμένων αντι-EGFR στοχευουσών θεραπειών.

### 3 ABSTRACT

Colorectal cancer is the fourth most common death cause from neoplasia. It is a heterogenous group with complex morphological, genetic and epigenetic disorders. The EGFR signaling pathway has a major role. EGFR-targeted therapies have been developed including monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. EGFR gene is overexpressed in about 60-80% of all colorectal cancer cases. EGFR overexpression is associated with many types of cancer and it is usually related to poor prognosis, low survival and to tumor's resistance to therapy with biology agents, such as the monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab. However, usage of different methods has led to contradictory results. Moreover, EGFR overexpression mechanisms have to be further analyzed. The purpose of the current study was to evaluate EGFR mRNA expression in normal and cancer tissue of patients with colorectal cancer. 80% of the patients had stastically significant raise of EGFR expression in cancer tissue ( $p<0,05$ ). Several clinical parameters, such as gender, tumour size, vascular and perineural invasion, tumour type, Dukes stage and differentiation were studied, but none was correlated to the mRNA increase. The EGFR overexpression was also not correlated to KRAS mutational status. However, 5/30 patients had low mRNA expression in cancer compared to normal tissues. Those, 5 patients had more than 4 lymph nodes invaded. Also, comparison of the expression between fresh and paraffin-embedded tissue showed similar results ( $p<0,05$ ). Further study of EGFR expression in a wider population is required in order to determine the EGFR mRNA expression levels as a potential biomarker in the prediction of EGFR targeted therapies outcome.

## 4 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (colorectal cancer) αποτελεί την 4<sup>η</sup> πιο συχνή αιτία θανάτου και καταλαμβάνει περίπου το 9,2% του συνόλου των νεοπλασιών και κατέχει τη δεύτερη θέση στις γυναίκες (614.000 περιστατικά) και την 3<sup>η</sup> θέση στους άντρες (746.000 περιστατικά) παγκοσμίως. Ευθύνεται για 694.000 θανάτους ετησίως [1,2], εκ των οποίων το 52% παρατηρείται στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες λόγω χαμηλότερης επιβίωσης στις περιοχές αυτές.

Η συχνότητα εμφάνισης είναι σχεδόν ίδια και στα δύο φύλα (10.0% για τους άνδρες και 9.2% για τις γυναίκες) [1],[3], ενώ η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 40 ετών, με το 90% των ασθενών να ξεπερνάει τα 50 έτη [4]. Στην Ελλάδα η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι 9,5% (8,9% στους άνδρες και 10,3% στις γυναίκες) [1].

Αν και η συχνότητα εμφάνισης (incidence rate) είναι 50 φορές μεγαλύτερη σε άτομα ηλικίας μεταξύ 60-79 ετών, συγκριτικά με άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών [4,5], τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται συχνότερα σε νεαρά άτομα [6,7]. Επίσης, παρατηρείται ποικίλη γεωγραφική κατανομή, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται στην Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία (44,8% και 32,2% ανά 100.000 για άντρες και γυναίκες αντίστοιχα), ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά παρουσιάζονται στη Δυτική Αφρική (4,5% και 3,8% ανά 100.000 για άντρες και γυναίκες αντίστοιχα) [1].

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου θεωρείται νόσος των δυτικών χωρών, καθώς ποσοστό μεγαλύτερο από το 63% των καταγεγραμμένων περιστατικών προέρχεται από τις ανεπτυγμένες χώρες [8]. Η συγκεκριμένη νεοπλασία φαίνεται να είναι κατα κύριο λόγο απόρροια του τρόπου ζωής, καθώς μόλις το 5-10% των καρκίνων του παχέος εντέρου οφείλεται σε κληρονομικά αίτια, όπως στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, το σύνδρομο Lynch και την οικογενή νεανική πολυποδίαση. Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου είναι η δίαιτα πλούσια σε ζωϊκά λιπαρά και φτωχή σε φρούτα και λαχανικά, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η έλλειψη φυσικής άσκησης και η καθιστική ζωή [2,8]. Η παρουσία ορισμένων ασθενειών που προκαλούν φλεγμονή στο βλεννογόνο του εντέρου, όπως η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn, που χαρακτηρίζεται ως αυτοάνοσο νόσημα, φαίνεται να συνηγορεί υπέρ της εμφάνισης της συγκεκριμένης κακοήθειας [2,8].

Το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου εξαρτάται από το στάδιο της νόσου τη στιγμή της διάγνωσης. Η έγκαιρη διάγνωση αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης του ατόμου. Το 90% των ασθενών με νεοπλασία που περιορίζεται τοπικά στο παχύ έντερο ξεπερνά την



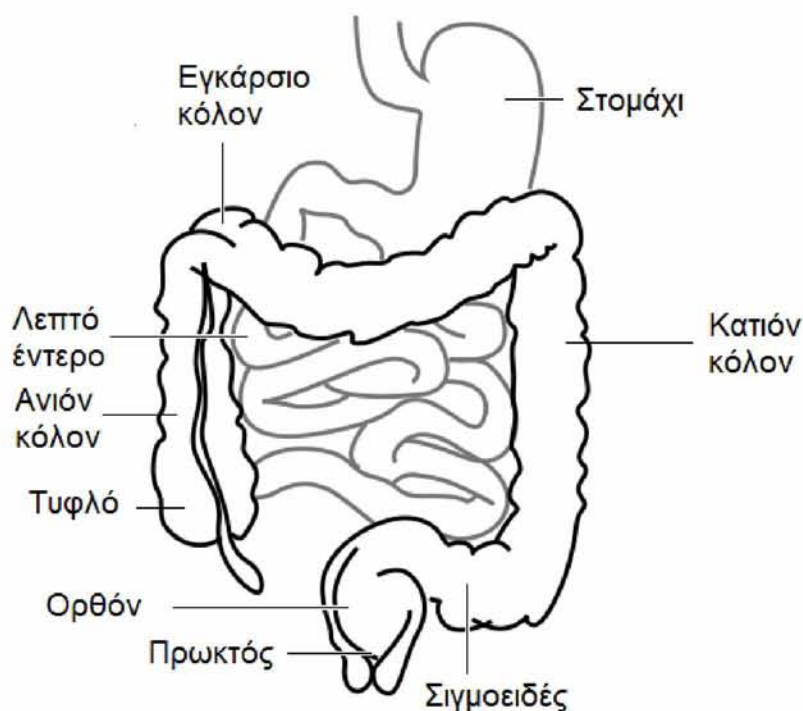
πενταετή επιβίωση, ενώ το ποσοστό αυτό περιορίζεται στο 10% σε ασθενείς που έχουν εμφανίσει μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα [4,9].

## 5 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5.1 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

#### 5.1.1 Ανατομία του παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο και το ορθό αποτελούν το τελικό τμήμα του πεπτικού σωλήνα. Το μήκος του παχέος εντέρου είναι κατά προσέγγιση 130cm και το εύρος του αυλού του 7,5cm, ενώ το μήκος του ορθού κυμαίνεται μεταξύ 15-20cm. Τα επιμέρους τμήματα του παχέος εντέρου είναι το τυφλό και το κόλον (ανιόν, εγκάρσιο, κατιόν και σιγμοειδές) (Εικ. 1). Η κύρια λειτουργία του είναι να απορροφά νερό και θρεπτικές ουσίες από το περιεχόμενο που διέρχεται δια μέσου αυτού.



Εικόνα 1 Ανατομία του παχέος εντέρου

Η απορρόφηση γίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τον αυλό του εντέρου. Σε όλη την έκτασή του το επιθήλιο σχηματίζει πτυχές με σκοπό την αύξηση της απορροφητικής επιφάνειας του εντέρου.

Ιστολογικά, το παχύ έντερο αποτελείται από τέσσερις κυκλοτερείς στιβάδες ή χιτώνες, οι οποίοι είναι από έξω προς τα μέσα: ο ορογόνος, ο κυρίως μυϊκός χιτώνας, ο υποβλεννογόνιος χιτώνας και ο βλεννογόνος. Ο τελευταίος απαρτίζεται από τη βασική μεμβράνη όπου επικάθονται τα επιθηλιακά κύτταρα (μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο), τα οποία καταδύονται στο χόριο και σχηματίζουν αδένες ή εντερικές κρύπτες (Εικ. 2).

Οι κρύπτες επενδύονται από μία στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων, ενώ στη βάση κάθε κρύπτης υπάρχουν 4-6 βλαστοκύτταρα (stem cells), τα οποία παράγουν 3 κύριους τύπους επιθηλιακών κυττάρων (απορροφητικά, καλυκοειδή και νευροεπιθηλιακά κύτταρα). Τα κύτταρα διαιρούνται στο κάτω μέρος της κρύπτης και διαφοροποιούνται καθώς ανέρχονται προς το ανώτερο τμήμα αυτής σε διάστημα 3-6 ημερών [10].

Φυσιολογικά, ο ρυθμός παραγωγής των επιθηλιακών κυττάρων από την κρύπτη προς τον αυλό του εντέρου, είναι ίσος με τον ρυθμό καταστροφής αυτών. Όταν η αύξηση του λόγου παραγωγής/καταστροφής κυττάρων αυξηθεί, οδηγεί στη δημιουργία νεοπλάσματος. Ως νεόπλασμα ορίζεται οποιαδήποτε μη φυσιολογική συσσώρευση κυττάρων, τα οποία προέρχονται από το ίδιο προγονικό κύτταρο [11].

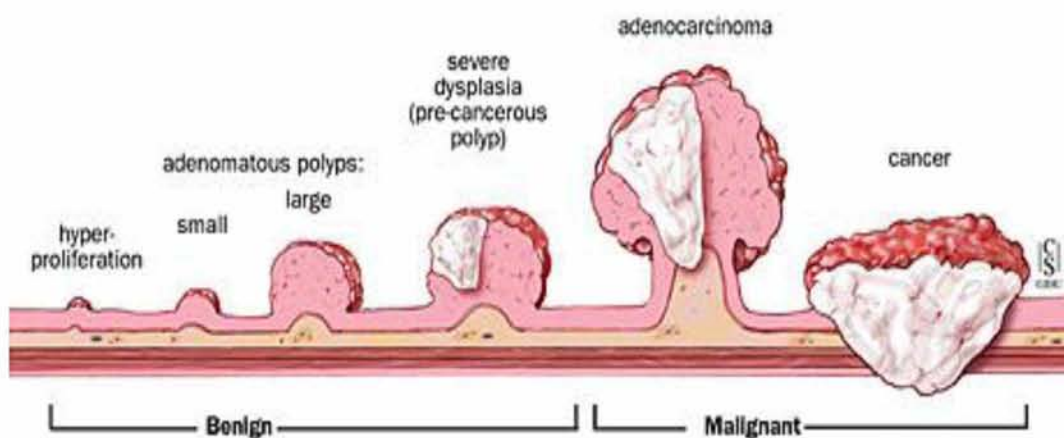


**Εικόνα 2** Χρώση αιματοξυλίνης/ηφωσίνης (H/E) στην οποία διακρίνονται ο υποβλεννογόνιος χιτώνας (α), η βλεννογόνια μυική στιβάδα (β) και ο βλεννογόνος (γ), στο χόριο του οποίου διακρίνονται οι εντερικές κρύπτες (κρύπτες Lieberkühn) (δ) και το μονόστιβο κυλινδρικό καλυπτικό επιθήλιο (Εικόνα από [www.pathologyoutlines.com](http://www.pathologyoutlines.com))



### 5.1.2 Στάδια ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου

Οι όγκοι του παχέος εντέρου εμφανίζονται αρχικά ως πολύποδες, δηλαδή μάζες κυττάρων, οι οποίες προβάλλουν από το τοίχωμα του εντέρου προς τον αυλό (Εικ.3) [11].

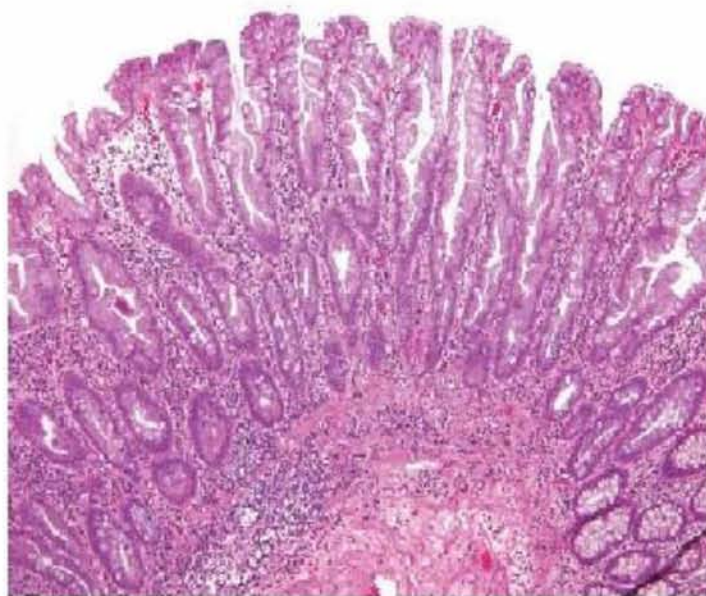


Εικόνα 3 Στάδια ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου. Εικόνα από [hopkinscoloncancercenter.org](http://hopkinscoloncancercenter.org)

Υπάρχουν κυρίως δύο τύποι πολύποδων, των οποίων η διάκριση γίνεται ιστολογικά (Εικ. 4) [12].



A

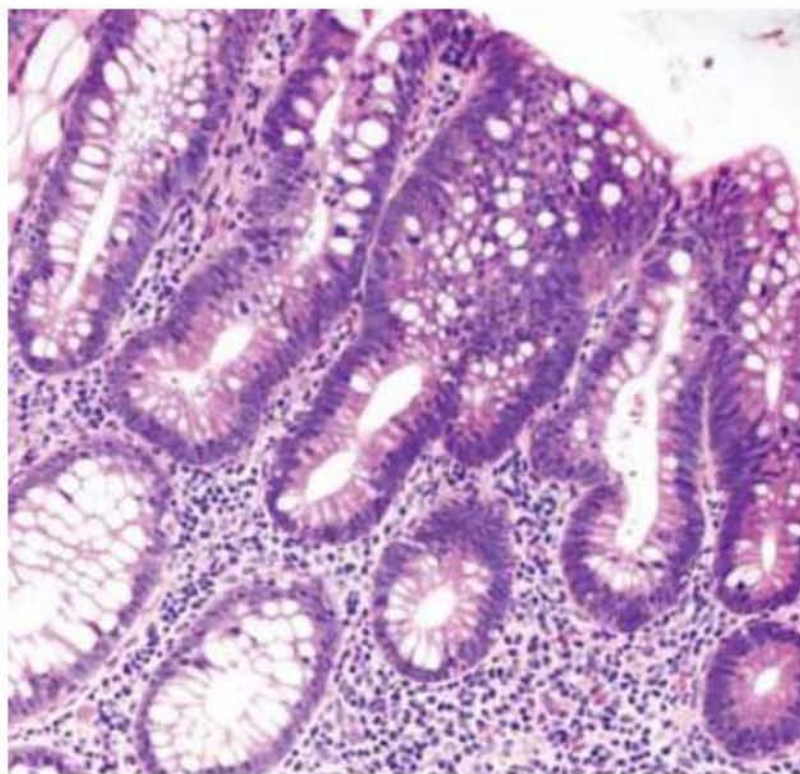


B

Εικόνα 4 Χρώση H/E στην οποία διακρίνονται αδενωματώδης (A) και υπερπλαστικός πολύποδας (B) Εικόνα από Vogelstein Bert, Kinzler Kenneth W Genetic Basis of Human Cancer, The, 2nd Edition, 2002 και [group14.pbworks.com](http://group14.pbworks.com)

Ο πρώτος τύπος πολύποδα είναι μη δυσπλαστικός ή υπερπλαστικός και αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων με παρόμοια φυσιολογική λειτουργία, τα οποία διατάσσονται σε μονήρη στιβάδα πάνω στην βασική μεμβράνη (Εικ. 4Α). Οι πολύποδες αυτού του τύπου σπάνια εξελίσσονται σε νεοπλάσματα. Ο άλλος τύπος πολύποδα ονομάζεται αδενωματώδης και είναι δυσπλαστικός, αφού παρουσιάζει μια ανώμαλη ενδοκυτταρική και διακυτταρική οργάνωση. Στο συγκεκριμένο πολύποδα εμφανίζεται πολυστιβάδωση επιθηλιακών κυττάρων, οι πυρήνες των οποίων είναι βαθυχρωματικοί, μεγαλύτεροι των φυσιολογικών κυττάρων και ανέρχονται έως το μέσο ή και την κορυφή των κυττάρων (Εικ 4Β).

Μακροσκοπικά τα αδενώματα διακρίνονται σε έμμισχα και άμισχα ή επίπεδα, ενώ μικροσκοπικά ταξινομούνται σε λαχνωτά ( >75% λαχνωτό στοιχείο), σωληνολαχνωτά ( 25-75% λαχνωτό στοιχείο) και σωληνώδη (<25% λαχνωτό στοιχείο). Η δυσπλασία του επιθηλίου των αδενωμάτων διακρίνεται σε χαμηλού και υψηλού βαθμού. Το ποσοστό του λαχνωτού στοιχείου και ο βαθμός της επιθηλιακής δυσπλασίας αυξάνει με το μέγεθος του αδενώματος (Εικ. 5).



**Εικόνα 5 Χρώση H/E στην οποία διακρίνεται σωληνώδες αδένωμα (tubular adenoma) παχέος εντέρου. Εικόνα από Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol 2012;3(3):153-173**

Όσο το αδένωμα εξελίσσεται, αυξάνει η πιθανότητα να γίνει διηθητικό (αδενοκαρκίνωμα), καθώς και η πιθανότητα να δώσει μεταστάσεις.

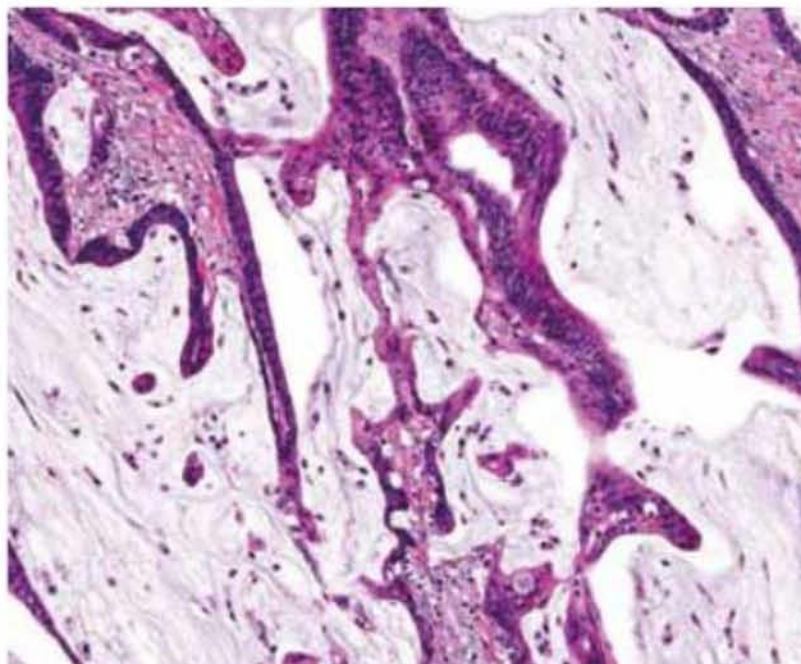


Τα αδενοκαρκινώματα είναι οι πιο συχνοί κακοήθεις όγκοι του κόλου, ωστόσο μπορεί να εμφανιστούν και άλλες μορφές κακόηθων νεοπλασμάτων (π.χ. λεμφώματα, σαρκώματα), που προέρχονται από μη επιθηλιακά κύτταρα [13].

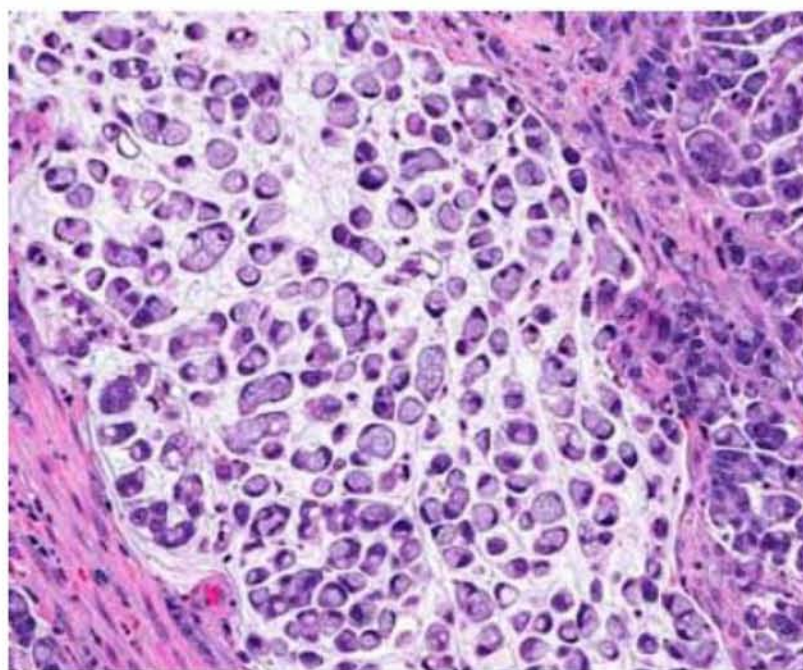
### **5.1.3 Τύποι καρκίνου του παχέος εντέρου**

Οι νεοπλασίες στο παχύ έντερο (colorectal neoplasia) δεν είναι σπάνιες, καθώς το 5% των ανθρώπων μεταξύ 40-50 ετών έχουν αδενωματώδη πολύποδα. Το ποσοστό αυτό προσεγγίζει το 50% σε ανθρώπους ηλικίας άνω των 70 ετών. Αδενώματα που έχουν διάμετρο < 10mm έχουν πολύ μικρή πιθανότητα να αναπτύξουν κακοήθεια, ενώ όγκοι με διάμετρο > 10mm έχουν 15% πιθανότητα να γίνουν διηθητικοί σε διάστημα 10 ετών [14].

Το 95% των καρκίνων του παχέος εντέρου είναι αδενοκαρκινώματα, ενώ το υπόλοιπο 5% είναι νευροενδοκρινείς όγκοι και μικροκυτταρικά καρκινώματα. Στην κατηγορία των αδενοκαρκινωμάτων συμπεριλαμβάνονται τα βλεννώδη, με συχνότητα εμφάνισης 10-15% (Εικ. 6) και τα signet ring cell καρκινώματα (Εικ. 7) με συχνότητα εμφάνισης 0,1-2,4% αντίστοιχα [15]. Τα signet ring cell καρκινώματα έχουν κακή πρόγνωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, ενώ σε σύγκριση με άλλους τύπους αδενοκαρκινωμάτων παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα περιτοναϊκών εμφυτεύσεων και λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα παρουσιάζονται συνήθως σε πιο προχωρημένο στάδιο, εμφανίζουν συχνότερα λεμφαδενικές μεταστάσεις από τους μη βλεννώδεις όγκους, αλλά έχουν παρόμοια πρόγνωση όταν εξετάζονται κατά στάδιο.



Εικόνα 6 Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα. Εικόνα από Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol 2012;3(3):153-173



Εικόνα 7 Signet ring cell καρκίνωμα. Εικόνα από Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol 2012;3(3):153-173

Η θεραπεία των καλοήθων όγκων γίνεται με αφαίρεση είτε κατά την κολονοσκόπηση είτε εγχειρητικά. Οι κακοήθεις όγκοι αφαιρούνται χειρουργικά, ενώ υπάρχει και η ανάγκη περαιτέρω θεραπείας εφόσον υπάρχει μετάσταση. Το συχνότερο σημείο μετάστασης είναι οι λεμφαδένες του

μεσεντερίου (mesenteric lymph nodes) [16]. Αν υπάρχει μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα, όπως η επιφάνεια του περιτόναιου (peritoneal surface) ή το ήπαρ, η χειρουργική επέμβαση δεν μπορεί να οδηγήσει από μόνη της σε θεραπεία, αλλά οι ασθενείς με μεταστατική νόσο υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία [17].

#### 5.1.4 Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)

Ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου καθορίζεται από την έκταση του σχηματισμού σωληνωδών δομών και τον προσανατολισμό των νεοπλασματικών κυττάρων και σχετίζεται άμεσα με την πρόγνωση [15].

Οι βαθμοί διαφοροποίησης είναι οι εξής:

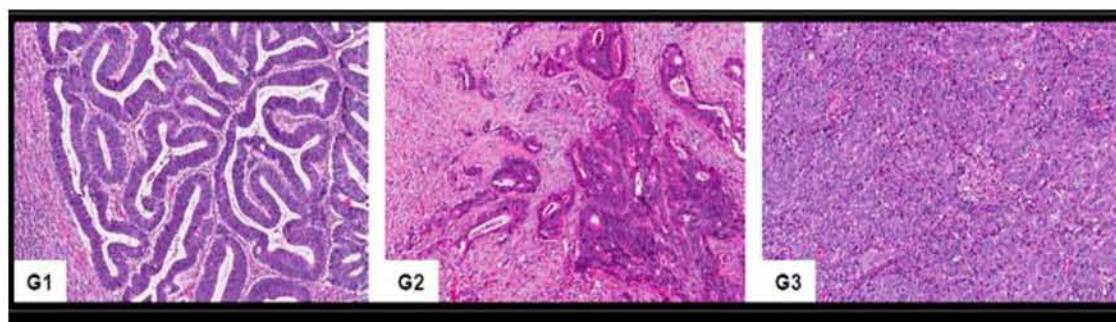
**GX:** Ο βαθμός διαφοροποίησης δεν μπορεί να εκτιμηθεί

**G1:** Όγκος καλά διαφοροποιημένος

**G2:** Όγκος μέτρια διαφοροποιημένος

**G3:** Όγκος χαμηλά διαφοροποιημένος

**G4:** Αδιαφοροποίητος όγκος



Εικόνα 8 Χρώσεις H/E, στις οποίες διακρίνονται αδενοκαρκινώματα με διαφορετικούς βαθμούς διαφοροποίησης. Εικόνα από Huret JL, Dessen P, Bernheim A Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

Τα καρκινώματα Grade I μοιάζουν ιστολογικά με τα αδενώματα, εμφανίζουν καλά σχηματισμένα αδένια με ομοιόμορφους βασικά τοποθετημένους πυρήνες, χωρίς αξιοσημείωτη απώλεια της πολικότητάς τους.

Στα καρκινώματα Grade II οι σωληνώδεις (tubular) δομές μπορεί να είναι απλές, σύνθετες ή ήπια ανώμαλες με απώλεια πολικότητας του πυρήνα.

Στα καρκινώματα Grade III παρατηρούνται σωληνώδεις δομές σε ποσοστό < 50% του όγκου.



Σημαντικό ποσοστό (>50%) των χαμηλά διαφοροποιημένων αδενοκαρκινωμάτων εμφανίζει μετάσταση σε λεμφαδένες, ενώ οι καλώς διαφοροποιημένοι όγκοι δίνουν μεταστάσεις με μικρότερη συχνότητα.

Ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκινώματος είναι ανάλογος της διήθησης στο εντερικό τοίχωμα. Οι όγκοι με βαθμό διαφοροποίησης G1-G2 χαρακτηρίζονται χαμηλού βαθμού (low grade) κακοήθειας, ενώ οι όγκοι με βαθμό διαφοροποίησης G3-G4 χαρακτηρίζονται ως υψηλού βαθμού (high grade) κακοήθειας.

### 5.1.5 Σταδιοποίηση των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου

Η πρόγνωση για τον καρκίνο του παχέος εντέρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο του όγκου κατά τη διάγνωση [18]. Οι Παθολογοανατόμοι χρησιμοποιούν μια σειρά από παραμέτρους, όπως εντόπιση του όγκου, μέγεθος, κατάσταση του όγκου, κατάσταση εγχειρητικών ορίων, βάθος διήθησης, παρουσία ή μη θετικών λεμφαδένων, διήθηση αγγείων κ.α. προκειμένου να καθορίσουν το στάδιο της νόσου και να παρέχουν πληροφορίες στους κλινικούς ιατρούς σχετικά με την πρόγνωση του ασθενούς και την ανάγκη ή όχι για επικουρική θεραπεία.

Για πολλά χρόνια για τη σταδιοποίηση των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου χρησιμοποιούσαν την κλασική ταξινόμηση κατά Dukes, καθώς και την ταξινόμηση κατά Astler-Coller. Ωστόσο, η ανάγκη για ένα πιο εύχρηστο και τυποποιημένο σύστημα οδήγησε στην επικράτηση της ταξινόμησης κατά TNM.

- **Σύστημα Dukes** [19, 20]
- **Σύστημα Astler-Coller** [21, 22]
- **Σύστημα TNM** [23, 24]

#### 5.1.5.1 Ταξινόμηση κατά Dukes

Τα στάδια κατά Dukes είναι τα εξής:

**Στάδιο A:** Ο όγκος περιορίζεται στο τοίχωμα του εντέρου και δεν επεκτείνεται πέρα από αυτό.

**Στάδιο B:** Παρατηρείται διήθηση του μυϊκού χιτώνα, χωρίς διήθηση λεμφαδένων.

**Στάδιο C:** Ο όγκος επεκτείνεται πέραν του εντερικού τοιχώματος, ενώ παρατηρείται και διήθηση επιχώριων λεμφαδένων.

**Στάδιο D:** Παρατηρούνται μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα.

#### 5.1.5.2 Ταξινόμηση κατά Astler και Coller

Το 1954 οι Astler και Coller πρότειναν τροποποίηση του συστήματος Dukes, χωρίζοντας τα στάδια B και C ως εξής:

- **Στάδιο A:** Ο όγκος περιορίζεται στο βλεννογόνο του εντέρου και δεν επεκτείνεται πέρα από αυτό.
- **Στάδιο B1:** Ο όγκος περιορίζεται στον υποβλεννογόνο χιτώνα του εντέρου, ενώ δεν παρατηρείται διήθηση λεμφαδένων.
- **Στάδιο B2:** Ο όγκος περιορίζεται από τον μυϊκό χιτώνα, ενώ δεν παρατηρείται διήθηση λεμφαδένων.
- **Στάδιο C1:** Ο όγκος δεν επεκτείνεται πέραν του εντερικού τοιχώματος, αλλά παρατηρείται διήθηση επιχώριων λεμφαδένων.
- **Στάδιο C2:** Ο όγκος επεκτείνεται πέραν του εντερικού τοιχώματος και παρατηρείται διήθηση επιχώριων λεμφαδένων.
- **Στάδιο D:** Ο όγκος επεκτείνεται πέραν του εντερικού τοιχώματος, ενώ παρατηρούνται και μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα.

#### 5.1.5.3 Ταξινόμηση κατά TNM

Η ταξινόμηση των όγκων του ορθού και κόλου με το σύστημα TNM παρέχει περισσότερες πληροφορίες συγκριτικά με τα υπόλοιπα συστήματα κατάταξης [25]. Η συγκεκριμένη ταξινόμηση είναι σε συμφωνία με την ταξινόμηση κατά Dukes και προσφέρει περισσότερες λεπτομέρειες ανά υποκατηγορία ασθενών. Η ταξινόμηση με το σύστημα TNM περιλαμβάνει το βάθος διήθησης του πρωτοπαθούς όγκου μέσα ή πέρα από τα εντερικά τοιχώματα (T), την διήθηση ή προσκόλληση (adherence) σε γειτονικά όργανα, την έκταση των διηθημένων λεμφαδένων (N) και την παρουσία ή όχι μεταστάσεων σε απομακρυσμένα όργανα (M).

## **Ταξινόμηση κατά TNM:**

### **T (Tumor) : Πρωτοπαθής εστία**

T0: Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς εστίας του όγκου

Tx: Δεν υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης της έκτασης του όγκου

Tis: Καρκίνωμα in situ

T1: Ο όγκος περιορίζεται στον βλεννογόνο και στον υποβλεννογόνιο χιτώνα

T2: Ο όγκος περιορίζεται στο εντερικό τοίχωμα χωρίς να διηθείται ο ορογόνος χιτώνας

T3: Διήθηση του ορογόνου με ή χωρίς επέκταση σε παρακείμενους ιστούς

T4a: Ο όγκος εισβάλλει στην επιφάνεια του περιτόναιου

T4b: Ο όγκος εισβάλλει ή είναι προσκολλημένος σε άλλα όργανα

### **N (Nodes): Λεμφαδένες**

N0: Απουσία διήθησης λεμφαδένων

Nx: Οι επιχώριοι (κοντινοί) λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν

N1: Διήθηση 1-3 περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων

N1a: Διήθηση ενός περικολικού ή περιορθικού λεμφαδένα

N1b: Διήθηση 2-3 περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων

N2: Διήθηση τεσσάρων ή περισσότερων περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων

N2a: Διήθηση 4-6 περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων

N2b: Διήθηση επτά ή περισσότερων περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων

N3: Διήθηση λεμφαδένων πέραν των περικολικών ή περιορθικών

### **M (Metastasis): Μετάσταση**

Mx: Η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί

M0: Δεν παρατηρείται μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα

M1: Παρατηρείται μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα

M1a: Μετάσταση σε ένα απομακρυσμένο όργανο ή περιοχή (π.χ. ήπαρ, πνεύμονας, ωοθήκη, απομακρυσμένος λεμφαδένας)

M1b: Μετάσταση σε περισσότερα από ένα απομακρυσμένα όργανα ή στο περιτόναιο

Εφ' όσον προσδιοριστούν μετεγχειρητικά οι παραπάνω παράμετροι για έναν ασθενή με καρκίνωμα του παχέος εντέρου, οι πληροφορίες που προκύπτουν συνδυάζονται για τον καθορισμό του σταδίου της νόσου. Η σταδιοποίηση αυτή αποτελεί τον πιο ισχυρό και αξιόπιστο προγνωστικό

δείκτη της νόσου και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο σχεδιασμό της θεραπευτικής στρατηγικής. Πράγματι, το εν λόγω σύστημα ταξινόμησης σχεδιάστηκε αρχικά για την πρόβλεψη της πρόγνωσης της νόσου. Εντούτοις, η λειτουργική του σημασία έχει επεκταθεί, καθώς αποτελεί βασική παράμετρο για την επιλογή της θεραπείας και των ασθενών που θα συμπεριληφθούν σε κλινικές δοκιμές [26].

<b>Στάδιο</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>
0	Tis	N0	M0	-
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4a	N0	M0	B
IIC	T4b	N0	M0	B
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C
	T1	N2a	M0	C
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C
	T2-T3	N2a	M0	C
	T1-T2	N2b	M0	C
IIIC	T4a	N2a	M0	C
	T3-T4a	N2b	M0	C
	T4b	N1-N2	M0	C
IVA	Όλα τα πιθανά T	Όλα τα πιθανά N	M1a	
IVB	Όλα τα πιθανά T	Όλα τα πιθανά N	M1b	

**Πίνακας 1 Ταξινόμηση κατά TNM - Αντιστοιχία με σύστημα Dukes.**

## 5.2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Μετά τον προσδιορισμό του σταδίου της νόσου ακολουθεί από τον θεράποντα ιατρό η επιλογή του καταλληλότερου θεραπευτικού σχήματος. Συνήθως το στάδιο καθορίζεται πριν από την επέμβαση με βάση τις κλινικές και ακτινολογικές εξετάσεις, ενώ το οριστικό στάδιο γίνεται γνωστό με την παθολογοανατομική εξέταση του όγκου, ο οποίος έχει αφαιρεθεί με χειρουργική επέμβαση. Η θεραπεία της νόσου μπορεί να περιλαμβάνει, εκτός της χειρουργικής επέμβασης, επικουρική θεραπεία (adjuvant treatment) με χημειοθεραπευτικά ή ακτινοθεραπευτικά σχήματα, χρήση βιολογικής θεραπείας ή συνδυασμού αυτών. Τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης με μοναδική θεραπεία τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου είναι [27]:

- Στάδιο I: 85%-95%
- Στάδιο II: 60%-80%
- Στάδιο III: 30%-60%
- Στάδιο IV: μέχρι 10%, ενώ ο μέσος όρος επιβίωσης είναι περίπου 9 μήνες [28]

Η επικουρική θεραπεία συνιστάται συνήθως σε ασθενείς με όγκο σταδίου III και IV, αλλά και σταδίου II, όταν αυτοί χαρακτηρίζονται υψηλού κινδύνου, όπως οι ασθενείς που ανήκουν στα στάδια IIB και IIC [27].

### 5.2.1 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία έχει ως σκοπό την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων ή την πρόκληση βλαβών σε αυτά. Η χορήγηση γίνεται από το στόμα ή ενδοφλέβια και δρα σε όλο το σώμα. Τα σημαντικότερα φάρμακα εναντίον του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι οι φθοριοπυριμιδίνες, που δίνονται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες φθοριοπυριμιδίνες είναι η 5-φθοριουρακίλη (5-FU), η καπεσιταβίνη (capecitabine) και ο συνδυασμός ουρακίλη-τεγκαφούρη (UFT) [29],[30]. Συχνά οι φθοριοπυριμιδίνες χορηγούνται σε συνδυασμό με τη λευκοβορίνη (LV), γνωστή και ως φολινικό οξύ, η οποία ενισχύει την αποτελεσματικότητα της φθοριοπυριμιδίνης, ενώ μπορεί να συνδυαστούν και με άλλα φάρμακα, όπως η οξαλιπλατίνη (FOLFOX) και η ιρινοτεκάνη (FOLFIRI) προσφέροντας υψηλότερα ποσοστά απόκρισης (Response Rates,RRs) και μεγαλύτερη ελεύθερη εξέλιξης επιβίωση (Progression-Free Survival,PFS) [29],[30],[31],[32].

Τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης των ασθενών μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας, είτε ως θεραπεία πρώτης γραμμής (first line treatment), είτε ως επικουρική θεραπεία (adjuvant treatment) είναι αυξημένα σε σχέση με τους ασθενείς, οι οποίοι δεν λαμβάνουν άλλη θεραπεία πέραν του χειρουργείου. Τα ποσοστά αυτά είναι:

- Στάδιο I: Δεν χορηγείται θεραπεία πέραν του χειρουργείου και τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης είναι 85%-95% [27].
- Στάδιο II: Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η χρήση χημειοθεραπείας βελτιώνει τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης περίπου 2%-4% (72% χωρίς χημειοθεραπεία, 76% με χορήγηση θεραπείας (Gill et al) και 80% χωρίς χημειοθεραπεία, 82% με χορήγηση θεραπείας (International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials-IMPACT). Συνεπώς, θεωρείται χρήσιμη κυρίως στους ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου (σταδίου IIB και IIC) [33], [34], [35].
- Στάδιο III: Στο στάδιο αυτό συνιστάται η επικουρική θεραπεία, η οποία βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσης έως και 15% [36]
- Στάδιο IV: Σε αυτό το στάδιο, ο μέσος όρος επιβίωσης εξαρτάται από το σχήμα θεραπείας που χορηγείται. Το σχήμα 5-φθοριουρακίλης/λευκοβορίνης αυξάνει το μέσο όρο επιβίωσης στους 12 μήνες, ενώ η πρόσθηκη ιρινοτεκάνης ή οξαλιπλατίνης αυξάνει το μέσο όρο επιβίωσης στους 14 με 19 μήνες [28].

### **5.2.2 Θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες**

Ως θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες ορίζεται η χρήση κατάλληλων ουσιών, όπως αντισώματα ή μικρά μόρια - αναστολείς, που έχουν σχεδιαστεί για να εμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και συνήθως στοχεύουν στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) ή στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) [37].

#### **5.2.2.1 Βιολογική θεραπεία έναντι του EGFR**

Τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό τον EGF-υποδοχέα στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα η σύνδεση αντισωμάτων, όπως η σετουξιμάμπη ή η πανιτουμουμάμπη στον υποδοχέα να παρεμβαίνει στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Η σετουξιμάμπη (cetuximab) είναι ένα χμιαϊρικό IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα, που προσδένεται στον EGFR με μεγαλύτερη συγγένεια από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) και τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης-α (Transforming Growth Factor-α, TGF-α) εμποδίζοντας την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα [38], ενώ αλλάζει και τη δράση της ιρινοτεκάνης και της ακτινοθεραπείας εναντίον των καρκινικών κυττάρων [39]. Η χρήση της περιορίζεται σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (στάδιο IV), καθώς διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως δεν έχει ωφέλιμη δράση σε ασθενείς με καρκίνο σταδίου II και III [40]. Έρευνα των Karapetis et al [41] έδειξε ότι αυξάνει τον ελεύθερο εξέλιξης χρόνο της νόσου από 1,8 σε 3,7 μήνες σε ασθενείς σταδίου IV, των οποίων οι όγκοι δεν φέρουν μετάλλαξη στο ογκογονίδιο KRAS, ενώ είναι ακόμη πιο αποτελεσματική σε συνδυασμό με ιρινοτεκάνη [38]. Η πανιτουμουμάμπη (panitumumab) είναι ένα πλήρως ανθρώπινο IgG2 μονοκλωνικό αντίσωμα που δρα κατά του EGF-υποδοχέα, και αυξάνει τον ελεύθερο εξέλιξης χρόνο της νόσου από 7,3 εβδομάδες σε 8, όπως προκύπτει στην έρευνα των Van Cutsem et al. σε ασθενείς με όγκους που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε διάφορα σχήματα χημειοθεραπείας [42].

Τα πιθανά σχήματα θεραπείας, ανάλογα το με το στάδιο της νόσου και σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας (European Society of Medical Oncology, ESMO) είναι τα ακόλουθα:

### **Στάδιο 0 (in situ καρκίνωμα)**

Στο στάδιο αυτό ο όγκος περιορίζεται στο βλεννογόνο και δεν εισβάλλει στο υποβλεννογόνο με αποτέλεσμα να μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα με απλή χειρουργική εκτομή. Οι όγκοι μεγαλύτερου μεγέθους απομακρύνονται με τμηματική εκτομή του εντέρου, η οποία ακολουθείται από αναστόμωση. Περαιτέρω θεραπεία δεν είναι απαραίτητη, καθώς ο όγκος περιορίζεται στο επιφανειακό στρώμα του εντέρου [43].

### **Στάδιο I**

Στο στάδιο αυτό ο όγκος διεισδύει στον υποβλεννογόνο και το μυϊκό χιτώνα του εντέρου, με αποτέλεσμα να απαιτείται ευρύτερη χειρουργική εκτομή του εντέρου, ώστε να αφαιρεθεί το τμήμα του παχέος εντέρου όπου είναι εντοπισμένος, ενώ παράλληλα αφαιρούνται και οι περιφερικοί λεμφαδένες. Συνήθως δεν απαιτείται περαιτέρω θεραπεία [43].

## **Στάδιο II**

Ο όγκος έχει διηθήσει πέρα από το μυϊκό χιτώνα, ενώ ενδέχεται να έχει διηθήσει και σε όργανα πέραν του παχέος εντέρου και του ορθού, συνεπώς απαιτείται αφαίρεση του όγκου και των διηθημένων οργάνων μέσω χειρουργικής επέμβασης. Σε ορισμένους ασθενείς συνιστάται πρόσθετη θεραπεία για την αποφυγή υποτροπής της νόσου, όπως χημειοθεραπεία για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και συνδυασμός χημειο-/ακτινοθεραπείας για τον καρκίνο του ορθού [44].

## **Στάδιο III**

Ο όγκος έχει δώσει μεταστάσεις σε γειτονικούς λεμφαδένες, ενώ ο πρωτοπαθής όγκος περιορίζεται στο έντερο ή έχει διηθήσει σε παρακείμενα όργανα. Η θεραπεία περιλαμβάνει αφαίρεση του καρκινικού ιστού χειρουργικά και επικουρική (adjuvant) θεραπεία, η οποία μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου.

## **Στάδιο IV**

Ο όγκος έχει επεκταθεί και έχει δώσει μεταστάσεις σε απομακρυσμένα, όπως το ήπαρ και οι πνεύμονες. Στην προκειμένη περίπτωση χορηγείται χημειοθεραπεία ή συνδυασμός χημειο- και βιολογικής θεραπείας. Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν ανεγχείρητη μεταστατική νόσο. Ωστόσο, με προσεκτική σταδιοποίηση μπορούν να εντοπιστούν μεταστάσεις που αφαιρούνται χειρουργικά, εφόσον το μέγεθος τους μειωθεί μετά από την κατάλληλη θεραπεία. Επομένως, είναι σημαντικό να καθοριστεί εάν ο ασθενής έχει εγχειρήσιμη ή ανεγχείρητη νόσο που μπορεί να γίνει εγχειρήσιμη μετά από χημειοθεραπεία.

## **Θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες**

Για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας με βιολογικούς παράγοντες λαμβάνεται υπόψιν το μοριακό προφίλ του όγκου, καθώς η σετουξιμάμπη και η πανιτουμουμάμπη δεν είναι δραστικές εναντίον των όγκων που φέρουν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS. Αν η θεραπεία πρώτης ή δεύτερης γραμμής αποτύχει, τότε ο συνδυασμός σετουξιμάμπης και ιρινοτεκάνης είναι η προτιμώμενη θεραπεία.



### **5.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

Η αυξανόμενη γνώση και κατανόηση του μοριακού υπόβαθρου και της επίδρασης αυτού στην εξελικτική πορεία των αδενωμάτων του παχέος εντέρου σε αδenoκαρκινώματα έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη βιολογικών δεικτών για την πρόγνωση και την πρόβλεψη της πορείας της νόσου. Η αλληλεπίδραση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών φαίνεται πως επηρεάζει την παραπάνω διαδικασία [46]. Η δημιουργία αυτών των αλλαγών διευκολύνεται από την απώλεια της γενωμικής σταθερότητας, η οποία εμφανίζεται ως: α) χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal INstability-CIN), και β) μικροδορυφορική αστάθεια (MicroSatellite Instability-MSI).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι κατά την ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων του παχέος εντέρου συμβαίνει πλήθος γενετικών και επιγενετικών αλλαγών σε συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η διαρκής ενεργοποίηση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού και οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS και στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, εμφανίζονται στην πλειονότητα των όγκων του παχέος εντέρου, χωρίς να αποκλείεται και η παρουσία ή συνύπαρξη άλλων μεταλλάξεων ή επιγενετικών τροποποιήσεων πέρα από αυτές.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του ογκογονιδίου KRAS, η ανίχνευση μεταλλάξεων ή/και απώλεια λειτουργικότητας του p53, η χρωμοσωμική και μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability, MSI) έχουν μελετηθεί εκτενώς προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, η ανίχνευση ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του ογκογονιδίου KRAS αποτελεί προβλεπτικό δείκτη για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με αντι-EGFR αναστολείς [47].

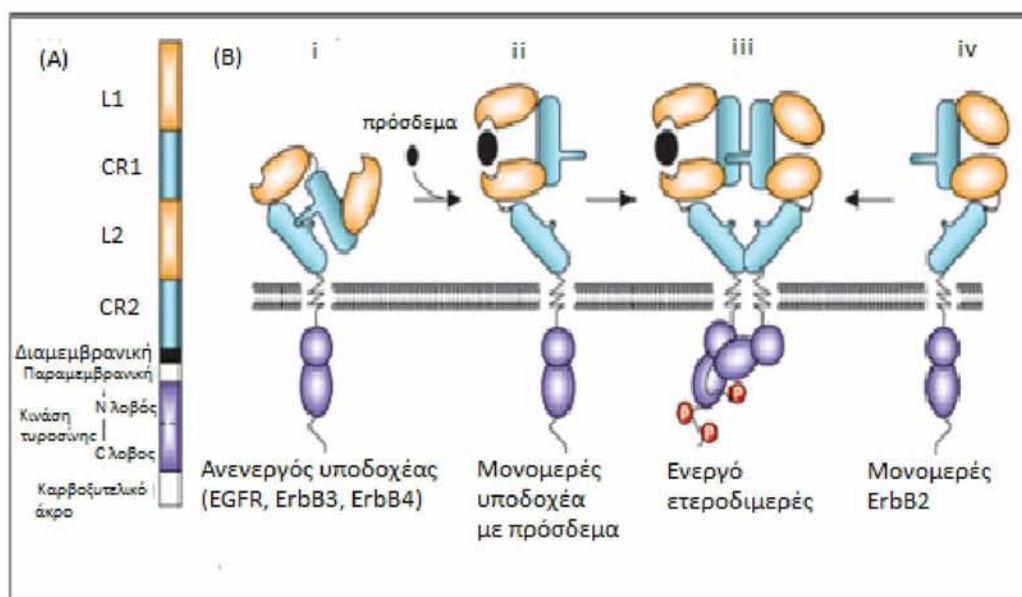
#### **5.3.1 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)**

Ο EGF-υποδοχέας είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με δράση κινάσης τυροσίνης και αποτελεί μέλος της οικογένειας των c-ErbB υποδοχέων. Διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά των επιθηλιακών κυττάρων και των όγκων με προέλευση από τα κύτταρα αυτά [48].

### 5.3.1.1 Δομή του EGF- υποδοχέα

Ο EGFR, γνωστός και ως HER-1 ή c-erbB-1, ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας c-ErbB που περιγράφηκε. Το υπεύθυνο γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 (7p12) και κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 170 kDa.

Ο EGF-υποδοχέας αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα (αμινοτελικό άκρο), μια διαμεμβρανική περιοχή με δομή α-έλικας, που συγκρατεί τον υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Το εξωκυττάριο τμήμα αποτελείται από τέσσερις υπο-περιοχές, τις L1 και L2 (περιοχές πλούσιες σε επαναλήψεις, καθώς και τις CR1 και CR2, οι οποίες περιέχουν επαναλήψεις κυστεΐνης. Η περιοχή CR1 περιέχει ένα μοτίβο β-φουρκέτας (β-hairpin loop) απαραίτητο για τη λειτουργία του υποδοχέα (Εικ. 9) [49].



Εικόνα 9 Δομή των ErbB υποδοχέων: (Α) Απεικόνιση των περιοχών των υποδοχέων ErbB. (Β) Σχηματική απεικόνιση του διμερισμού και ενεργοποίησης του υποδοχέα. i) Απουσία προσδέματος, ο EGFR, ο ErbB3 και ο ErbB4 εμφανίζουν μια κλειστή διαμόρφωση, η οποία σταθεροποιείται από τις περιοχές CR1 και CR2 ii) Η προσκόλληση του προσδέματος μεταξύ των L1 και L2 περιοχών δημιουργεί επέκταση της δομής του υποδοχέα, η οποία εκθέτει τη φουρκέτα διμερισμού της CR1 περιοχής, με αποτέλεσμα τον ομο- ή ετεροδιμερισμό του υποχέα iii) Ο διμερισμός του υποδοχέα οδηγεί στην ένωση του N-λοβού της κινάσης τυροσίνης του ενός υποδοχέα με τον C-λοβό του άλλου υποδοχέα και φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου, το οποίο δρα πλέον ως περιοχή πρόσδεσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μορίων. iv) Ο υποδοχέας ErbB2 είναι μόνιμα στην εκτεταμένη μορφή, έτοιμος να αλληλεπιδράσει με τους άλλους ErbB υποδοχείς. Εικόνα από M.J. Wieduwilt, M.M. Moasser *The epidermal growth factor receptor family :Biology driving targeted therapeutics Cell. Mol. Life Sci. 65(2008) 1566-1584*

### 5.3.1.2 Μεταλλάξεις του EGF-υποδοχέα

Έχουν παρατηρηθεί παραλλαγμένες μορφές του υποδοχέα λόγω μεταλλάξεων με συχνότερη τον τύπο III, που ονομάζεται EGFR VIII ή de2-7EGFR ή AEGFR [50]. Η παραλλαγμένη αυτή μορφή εμφανίζει έλλειμμα των αμινοξέων 6-273 που βρίσκονται στο εξωκυττάριο τμήμα λόγω αναδιάταξης του γονιδίου. Στον υποδοχέα EGFR VIII παρατηρείται έλλειψη των εξωνίων 2-7 συνολικού μήκους 801 ζευγών βάσεων, που κωδικοποιούν φυσιολογικά την περιοχή του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα. Ο υποδοχέας που κωδικοποιείται έχει μοριακό βάρος 145 kDa και ενώ δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα προσδέματά του βρίσκεται συνεχώς σε ενεργό μορφή [4,50]. Ο EGFR VIII φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νεοπλασιών, καθώς είναι ένας μόνιμα ενεργοποιημένος υποδοχέας, που δρα ανεξάρτητα από την επίδραση των προσδετών [51].

Ποικίλες άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον EGF-υποδοχέα έχουν καταγραφεί στα γλοιώματα, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο των ωοθηκών, στον καρκίνο του προστάτη, ενώ σπάνια εμφανίζονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου [52]. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι υπερεκφράζεται σε νεοπλάσματα μαστού, πνεύμονα, στομάχου, παχέος εντέρου και κεφαλής- τραχήλου [53], [54].

### 5.3.1.3 Συνδέτες του EGF-υποδοχέα (EGFR ligands)

Η διαθεσιμότητα ειδικών προσδετών καθορίζει τη μετάδοση του μηνύματος μέσα στο κύτταρο, καθώς η πρόσδεση οδηγεί σε διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση του EGF-υποδοχέα στο καρβοξυτελικό του άκρο και ενεργοποίηση των μεταγενέστερων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαίρεσης και επιβίωσης [55].

Οι πιο συνηθισμένοι προσδέτες του EGFR είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης -α (Transforming Growth Factor-α, TGF-α), η αμφιρεγκουλίνη (Amphiregulin, AR), ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας που μπορεί να δεσμεύεται με την ηπαρίνη (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor, HB-EGF) και η β-σελουλίνη (Betacellulin, BTC), με σημαντικότερους τους δύο πρώτους [56].

Η απεικόνιση των δομών της εξωκυττάριας περιοχής του EGFR μετά τη σύνδεση των EGF ή TGF-α συνδετών δείχνει ότι η σύνδεση στις L1 και L2 περιοχές οδηγεί στην επέκταση του υποδοχέα (extended form) και την αποκάλυψη της θηλειάς διμερισμού, που επιτρέπει τελικά τον

διμερισμό του υποδοχέα με ένα ακόμα μόριο του EGF-υποδοχέα ή με ένα μόριο υποδοχέα της ίδιας οικογένειας (Εικ. 11) [48]. Έτσι, προκαλείται ο ομοδιμερισμός των μονομερών υπομονάδων του υποδοχέα και η δημιουργία τριμερών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ο ομοδιμερισμός προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα.

Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης του EGF-υποδοχέα λειτουργούν και ως θέσεις πρόσδεσης για πολλές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια επάγουν την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (signal transduction cascades) [53]. Μεταξύ των μονοπατιών που ενεργοποιούνται είναι το μονοπάτι των MAP κινασών (MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase), της κινάσης της φωσφοϊνοσιτόλης (PI3K), της αντιαποπτωτικής Akt κινάσης και άλλων ρυθμιστών της μεταγραφής. Επίσης, ενεργοποιούνται και παράγοντες της αντιγραφής όπως οι c-fos, c-jun, c-myc, καθώς και μεταφορείς μηνυμάτων και ενεργοποιητές της αντιγραφής, όπως οι stat, NF-kB και μέλη της οικογένειας Ets [56],[57],[58].

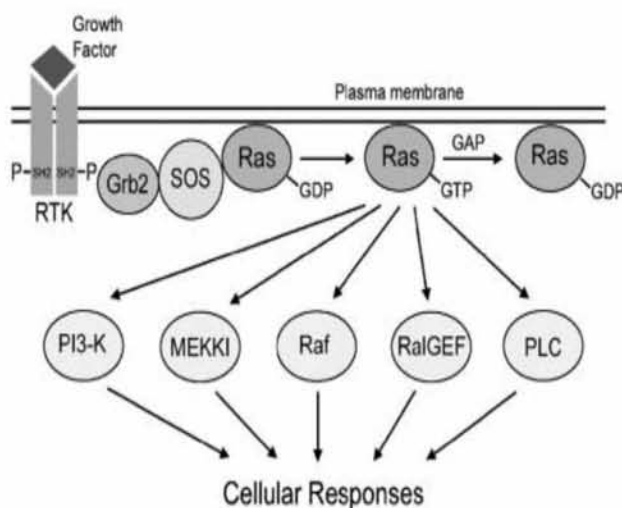
Στα φυσιολογικά κύτταρα το μήνυμα τελικά απενεργοποιείται μέσω της ενδοκυττάρωσης του συμπλέγματος υποδοχέα-προσδέτη. Το περιεχόμενο των παραγόμενων ενδοσωμάτων διασπάται και αποσυντίθεται εάν το μήνυμα που οδήγησε στην αρχική ενεργοποίηση οφείλεται στον EGF προσδέτη ή ανακυκλώνεται από την κυτταρική μεμβράνη αν η αρχική ενεργοποίηση οφείλεται στον TGF-α προσδέτη [59]. Ο Shtiegman και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGF-υποδοχέα σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (L858R, del746-750 και L858R/T790M) οδηγούν στη παραγωγή υποδοχέων, η ενδοκύτταρωση και αποδόμηση των οποίων γίνεται με μικρότερους ρυθμούς σε σχέση με αυτές του φυσιολογικού υποδοχέα, ώστε η ενεργοποίηση των μεταγενέστερων μονοπατιών μεταγωγής σήματος να διαρκεί περισσότερο από το φυσιολογικό [60].

### **5.3.2 RAS/RAF/MAPK/ERK μονοπάτι**

Το κύριο μονοπάτι που ενεργοποιείται από το διμερισμό του EGF-υποδοχέα είναι το RAS/RAF/MAPK/ERK μονοπάτι. Η φωσφορυλίωση των τυροσινών του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) και Src2 [48]. Η πρόσδεση της Grb2 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Sos (son of sevenless). Η πρωτεΐνη Sos είναι παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης και όταν ενεργοποιείται απομακρύνει ένα μόριο GDP από μέλη της οικογένειας των RAS πρωτεϊνών (HRAS ή KRAS) και

το αντικαθιστά με ένα μόριο GTP, που οδηγεί σε ενεργοποίηση του RAS ογκογονιδίου [61],[62],[63].

Η πρωτεΐνη Ras λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης (switch) μεταγωγής σήματος και εναλλάσσεται μεταξύ δύο βασικών μορφών. Η ανενεργός μορφή εμφανίζεται συνδεδεμένη με GDP μόριο, ενώ η ενεργός μορφή είναι συνδεδεμένη με GTP μόριο. Συνεπώς, η ανταλλαγή GDP με GTP από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Sos προκαλεί την ενεργοποίηση της Ras πρωτεΐνης. Πρόκειται για μία μικρή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 21 KDa, η οποία συνδέεται με την εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και εμφανίζεται ενδογενής υδρολυτική ενεργότητα του GTP σε GDP (ενεργότητα GTPάσης) [64], [65]. Στην οικογένεια των πρωτεϊνών Ras, ανήκουν οι HRAS, NRAS και KRAS πρωτεΐνες. Στόχοι των ενεργοποιημένων Ras πρωτεϊνών αποτελούν πρωτεΐνες όπως η Raf, η PI3-K και οι RalGEF με ένα πλήθος αποτελεσμάτων για το κύτταρο (Εικ. 10) [64].

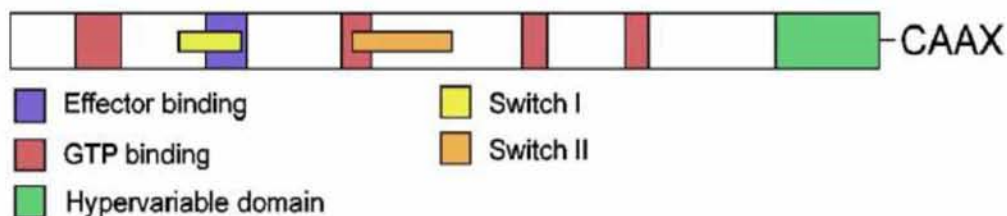


**Εικόνα 10** Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras και των σηματοδοτικών μονοπατιών. Εικόνα από Bret B. Friday, Alex A. Adjei K-ras as a target for cancer therapy *Biochimica et Biophysica Acta* 1756 (2005) 127-144

Οι πρωτεΐνες H-, N- και K-ras εμφανίζουν ομολογία κατά 85%. Το μήκος των H-Ras, N-Ras και K-Ras4A είναι 188 αμινοξέα, ενώ η K-Ras4B ισομορφή περιέχει ένα παραπάνω αμινοξύ. Τα πρώτα 165 αμινοξέα είναι ιδιαίτερα συντηρημένα στις τέσσερις αυτές πρωτεΐνες, ενώ τα τελευταία 25 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου εμφανίζουν σημαντική ποικιλία. Οι συντηρημένες αλληλουχίες αποτελούν τις περιοχές πρόσδεσης του GTP, τις περιοχές πρόσδεσης των μορίων-τελεστών (effectors), τις θηλίες Switch I και Switch II, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) και τις πρωτεΐνες GAP (GTPase Activating Protein). Με την πρόσδεση του GTP στην Ras πρωτεΐνη



προκαλείται αλλαγή της κρυσταλλικής δομής της με αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες GEF και GAP. Η μεταβλητή αμινοξική αλληλουχία στο καρβοξυτελικό άκρο είναι απαραίτητη για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι K-ras4A και K-ras4B (Εικ. 11) [64].



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση της δομής της KRas πρωτεΐνης. Πολλαπλές περιοχές συμμετέχουν στην πρόσδεση του GTP. Η περιοχή Switch I είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες GAP, ενώ η περιοχή Switch II αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες GEF. Η υπερμεταβλητή περιοχή αποτελείται από μη συντηρημένα αμινοξέα, ένα CAAX box και μια περιοχή πλούσια σε λυσίνες που εμφανίζεται στην K-ras 4B. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων στην υπερμεταβλητή περιοχή καθορίζουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Εικόνα από Bret B. Friday, Alex A. Adjei K-ras as a target for cancer therapy *Biochimica et Biophysica Acta* 1756 (2005) 127-144

Ένας από τους κύριους στόχους της ενεργοποιημένης Ras πρωτεΐνης είναι η πρωτεΐνη Raf-1, η οποία αποτελεί μια κυτταροπλασματική κινάση σερίνης-θρεονίνης. Πρόκειται για το πρώτο μέλος της οικογένειας των κινασών, που μεταφέρουν το μήνυμα από την πλασματική μεμβράνη στον πυρήνα.

Ενεργοποίηση της κινάσης Raf-1 έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση μελών της οικογένειας MAPKK/MEK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase), με πιο συνηθισμένες τις MEK1 και MEK2 πρωτεΐνες. Αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν πλήθος κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση (CDKs: κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες) [64].

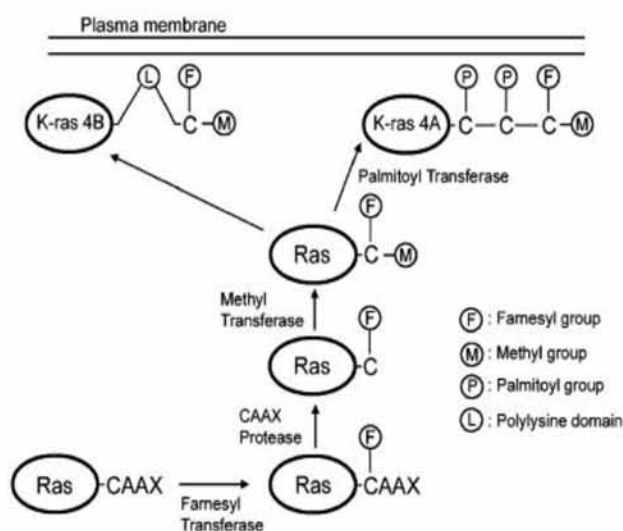
Στα κυριότερα πρωτεϊνικά υποστρώματα των MEK κινασών συγκαταλέγονται μέλη της οικογένειας των MAPK/ERK κινασών, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω διπλής φωσφορυλίωσης σε αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης. Ένας υποπληθυσμός των ενεργοποιημένων ERK κινασών, παρουσία του EGF αυξητικού παράγοντα, μετακινείται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ρυθμίζει τη δραστηριότητα διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων μέσω εκλεκτικής φωσφορυλίωσης, όπως ο Elk1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες, αφού φωσφορυλιωθούν, συνδέονται εκλεκτικά στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων προκαλώντας την ενεργοποίηση της μεταγραφής τους [66],[67],[68].

Το μήνυμα μεταδίδεται μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων των κατάλληλων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων και τελικά τη διαίρεση των επιθηλιακών κυττάρων. Για την καταστολή αυτού του σήματος χρειάζεται να επανέλθει η ενεργός μορφή Ras-GTP στην αρχική ανενεργό μορφή Ras-GDP μέσω υδρόλυσης του GTP σε GDP. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της χαμηλής υδρολυτικής ενεργότητας GTPάσης της Ras πρωτεΐνης, η οποία ενισχύεται από την αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικά μέλη της οικογένειας των GAP (GTPase-accelerating protein), όπως η NF1-GAP/neurofibromin και p120-GAP [69].

Η σημασία των GAPs στη ρύθμιση της ενεργότητας της Ras πρωτεΐνης φαίνεται από το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του RAS γονιδίου, που συμμετέχουν στη δημιουργία όγκων, συνήθως οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνών που δεν έχουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τις GAPs. Φυσιολογικά, η σηματοδότηση από τις Ras πρωτεΐνες είναι παροδική λόγω της εγγενούς δραστηριότητας GTPάσης, αλλά και της δράσης των GAPs. Η παρατεταμένη σηματοδότηση, λόγω μεταλλάξεων στο RAS γονίδιο, ή υπερέκφρασης των πρωτεϊνών Ras, είτε λόγω δυσλειτουργία της NF1-GAP/neurofibromin είναι γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση [64].

### 5.3.3 KRAS: Δομή και λειτουργία

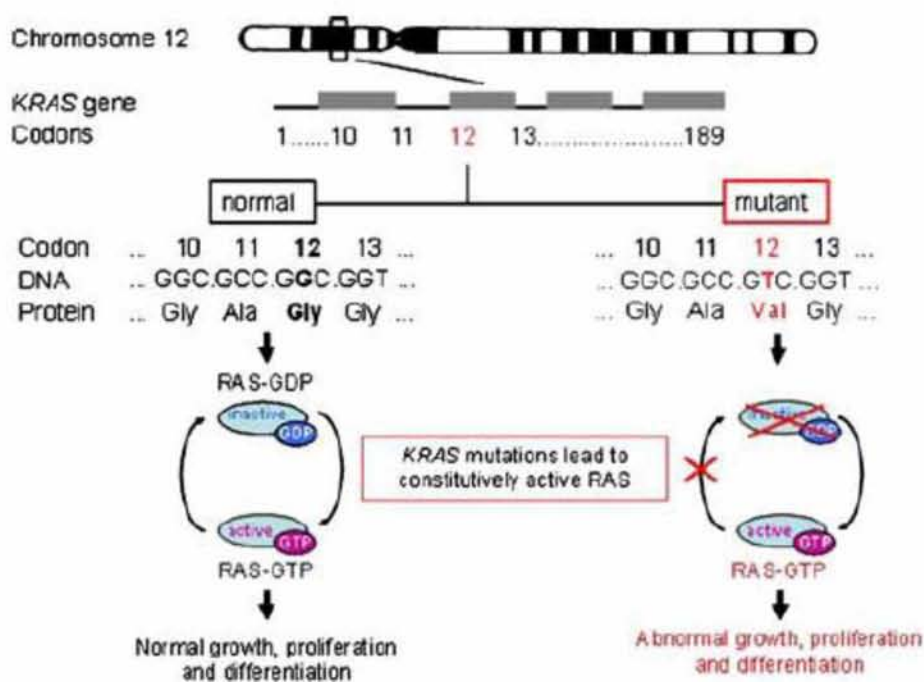
Η KRas πρωτεΐνη είναι προϊόν του ογκογονιδίου KRAS, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 12. Απαντάται σε δύο εναλλακτικές μορφές, τις 4A και 4B, οι οποίες προκύπτουν με διαφορετική ωρίμανση (Εικ. 12). Οι διαφορετικές μορφές εμφανίζουν ξεχωριστές αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο με αποτέλεσμα τη διαφορετική μετα-μεταφραστική τροποποίησή τους.



**Εικόνα 12 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών Ras. Εικόνα από Bret B. Friday, Alex A. Adjei K-ras as a target for cancer therapy *Biochimica et Biophysica Acta* 1756 (2005) 127-144**



Στα γονίδια RAS έχουν ανιχνευτεί πολλές μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της πρωτεΐνης στην ενεργό της μορφή. Οι πιο συχνές εμφανίζονται στα εξόνια 2, 3 και 4 και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12, 13, 61 και 146 και καλύπτουν ποσοστό >95%. Μεταλλάξεις έχουν καταγραφεί επίσης και στα κωδικόνια 10, 11, 15, 18 και 22, αλλά η βιολογική τους σημασία δεν είναι ξεκάθαρη [64].



Εικόνα 13 Δομή και λειτουργία φυσιολογικού έναντι μεταλλαγμένου KRAS γονιδίου. Εικόνα από J.H.J.M. van Krieken, A. Jung, T. Kirchner, F. Carneiro, R. Seruca, F.T. Bosman, P. Quirke, J.F. Flejou, T. Plato Hansen, G. De Hertogh, P. Jares, C. Langner, G. Hoefler, M. Ligtenberg, D. Tiniakos, S. Tejpar, G. Bevilacqua, A. Ensari *KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program Virchows Arch (2008) 453:417-431*

Ο σημαντικός ρόλος του KRAS στην ογκογένεση οδήγησε στην ανάπτυξη στρατηγικών για την θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου. Οι στρατηγικές αυτές ποικίλλουν από την αναστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω αντινοσηματικών (antisense) ολιγονουκλεοτιδίων μέχρι και την αναστολή της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των πρωτεϊνών μέσω αναστολέων όπως η φαρνεσυλ-τρανσφεράση, με σκοπό την καταστολή των τελεστών του σηματοδοτικού μονοπατιού. Πολλές από αυτές τις στρατηγικές έχουν αποτελεσματική δράση εναντίον των όγκων, αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την αποσαφήνιση του ρόλου της αναστολής της πρωτεΐνης KRAS στη θεραπεία [70].



### 5.3.3.1 KRAS και καρκίνος παχέος εντέρου

Το ογκογονίδιο KRAS εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων στους όγκους του παγκρεάτος και του παχέος εντέρου [64].

Περίπου 40% των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου φέρουν μετάλλαξη στο KRAS γονίδιο. Περισσότερες από 3000 σημειακές μεταλλάξεις έχουν αναγνωριστεί και έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση αμινοξέος, ενώ είναι ανεξάρτητες από μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να συμβούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον EGF-υποδοχέα. Οι συχνότερες μεταλλάξεις του KRAS συμβαίνουν στα κωδικόνια 12, 13 του εξωνίου 2 του γονιδίου (Εικ. 13). Μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί και στα κωδικόνια 61 και 146 σε μικρότερα ποσοστά (<1%, <4% αντίστοιχα). Η παρουσία των προαναφερθέντων μεταλλάξεων οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας του όγκου στη θεραπεία με φάρμακα όπως το cetuximab [71].

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια της οικογένειας RAS συμβαίνουν συνήθως στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου και πολλές μελέτες δείχνουν ότι αποτελούν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, καθώς φαίνονται να σχετίζονται με όγκους προχωρημένου σταδίου, αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και φτωχή πρόγνωση [64].

Η ανίχνευση της παρουσίας ή μη μεταλλάξεων στο KRAS ογκογονίδιο (KRAS mutation status) παίζει σημαντικό ρόλο στη χορήγηση θεραπευτικών μέσων σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς τα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα που μπλοκάρουν εξωκυττάρια τον EGF-υποδοχέα δεν είναι αποτελεσματικά στην αναστολή των μονοπατιών εάν αυτά είναι ενεργοποιημένα από μόνιμα ενεργές Ras πρωτεΐνες [65].

Οι KRAS μεταλλάξεις σχετίζονται με χαμηλή ανταπόκριση στη θεραπεία, μειωμένη ελεύθερης νόσου επιβίωση (Progression Free Survival, PFS) και μειωμένη συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS) σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου που λαμβάνουν ως θεραπεία το μονοκλωνικό αντίσωμα cetuximab ή συνδυασμό αυτού με χημειοθεραπεία [65],[72]. Ανάλογες μελέτες δείχνουν ότι στο 92% των ασθενών με όγκους που έφεραν κάποια μετάλλαξη στο KRAS δεν υπήρχε αποτελεσματικότητα στη θεραπεία με το panitumumab [73].

### 5.3.4 Έκφραση του EGF-υποδοχέα στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Τα μέλη της οικογένειας των ErbB πρωτεϊνών εμφανίζουν συχνά υπερέκφραση σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπως για παράδειγμα το γονίδιο EGFR. Ο HER2 υποδοχέας υπερεκφράζεται στο 25%-30% των καρκίνων του μαστού και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση και μικρότερη επιβίωση των ασθενών [74]. Στα φυσιολογικά κύτταρα η έκφραση του EGFR ποικίλλει από 40.000 έως 100.000 υποδοχείς ανά κύτταρο [75], ενώ σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού μπορεί να φτάσει και τα  $2 \times 10^6$  μόρια ανά κύτταρο [76], [77]. Παρόμοιες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο των νεφρών, στον καρκίνο της κεφαλής-τραχήλου, καθώς και των ωοθηκών [78]. Υπερέκφραση σε μικρότερο ποσοστό παρατηρείται στον καρκίνο του παγκρέατος και σε γλοιώματα [49].

Στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα το EGFR γονίδιο υπερεκφράζεται στο 40%-80% των ασθενών [79] και σχετίζεται άμεσα με υψηλό μεταστατικό δυναμικό και χαμηλή διαφοροποίηση του όγκου [80].

Πολλές μελέτες εστιάζουν στο αν μπορεί η υπερέκφραση και η μεγάλη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων ή των πρωτεϊνών του υποδοχέα να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη διάγνωση και πρόγνωση της ασθένειας σε ασθενείς με διάφορες μορφές καρκίνου. Ο Valbohm και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, οι οποίοι είχαν χαμηλά επίπεδα mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου είχαν υψηλότερη διάμεση συνολική επιβίωση (longer overall survival) [81], ενώ ο Dziadziuszko και συνεργάτες ανέφεραν ότι η συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου ήταν μεγαλύτερη σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι οποίοι εμφάνιζαν απόκριση στη θεραπεία με gefitinib σε αντίθεση με τους ασθενείς οι οποίοι δεν ανταποκρίνονταν στη θεραπεία αυτή [82].

Σε πολλούς ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, στους οποίους παρατηρείται μείωση του μεγέθους του όγκου μετά από θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του EGFR, εμφανίζεται αυξημένος αριθμός αντιγράφων του EGFR γονιδίου [83]. Σε αυτούς τους ασθενείς φαίνεται πως το μέγεθος του όγκου καθορίζεται από το μονοπάτι του EGFR και έτσι ένα μέρος των ασθενών αυτών ανταποκρίνονται στην αντι-EGFR θεραπεία σε αντίθεση με τους ασθενείς, οι οποίοι εμφανίζουν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων του EGFR. Η απόκριση στη θεραπεία δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τις μεταλλάξεις που ενδέχεται να εμφανίζει το EGFR γονίδιο, καθώς αυτές είναι πολύ σπάνιες στον καρκίνο του παχέος εντέρου [84].

### 5.3.5 Έκφραση του KRAS στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Αύξηση της συγκέντρωσης των mRNA μεταγράφων του KRAS γονιδίου παρατηρείται σε διάφορες νεοπλασίες, όπως στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [85]. Η αύξηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με το στάδιο του όγκου καθώς και με αυξημένη πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες. Ανάλογο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και στον καρκίνο του ενδομητρίου, όπου η αύξηση των mRNA μεταγράφων αλλά και των αντιγράφων του KRAS γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της χαρακτηριστικής μορφολογίας του ενδομητρίου από τα κύτταρα του όγκου, απώλεια των υποδοχέων των ορμονών, υψηλό grade και αυξημένη πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες [86]. Στη μελέτη των Birkeland et al., (2012) τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων φαίνεται να είναι αρκετά υψηλότερα στους δευτερογενείς όγκους συγκριτικά με τον πρωτογενή όγκο [86].

### 5.3.6 Επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Υπάρχουν ελάχιστες μελέτες σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων. Στην πλειοψηφία των μελετών η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης γίνεται είτε ανοσοϊστοχημικά, είτε μέσω του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων (copy number).

Η ερευνητική ομάδα του Chung και των συνεργατών του [87] κατέληξε στο συμπέρασμα πως η εκτίμηση της έκφρασης της EGFR πρωτεΐνης ανοσοϊστοχημικά ενδέχεται να μην αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για τη μελέτη της διαφορικής απόκρισης των ασθενών σε φάρμακα. Παρατήρησαν πως φάρμακα όπως η σετουξιμάμπη εμφάνιζαν αποτελεσματικότητα σε όγκους, οι οποίοι δεν εμφάνιζαν αύξηση της έκφρασης του EGF-υποδοχέα. Θεώρησαν πως αυτό συνέβη λόγω της πιθανής εμφάνισης ψευδώς αρνητικών όγκων όσον αφορά στην υπερέκφραση του EGFR, κάτι που ίσως να οφείλεται στο γεγονός πως οι εγκλεισμένοι σε παραφίνη καρκινικοί ιστοί που χρησιμοποιούνται υφίστανται αλλοιώσεις με το πέρασμα του χρόνου, που οδηγούν στη σταδιακή καταστροφή των πρωτεϊνών του ιστού, με αποτέλεσμα η χρώση του υποδοχέα με ειδικά αντισώματα να μην είναι δυνατή, όπως υποστηρίζουν οι Atkins et al. [88]. Σε δύο ξεχωριστές μελέτες του Moroni και των συνεργατών του [89],[90], η ανίχνευση της αύξησης του αριθμού αντιγράφων του EGFR γονιδίου (copy number) μεφθορίζοντα in situ υβριδισμό (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) φαίνεται πως σχετίζεται με αυξημένη απόκριση και αύξηση της συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκαν τα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα σετουξιμάμπη και πανιτουμουμάμπη. Ωστόσο, η απόκριση δεν ήταν ίδια για όλους τους ασθενείς

με αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου, ενδεχομένως λόγω αρκετών ψευδώς θετικών δειγμάτων.

Η προσπάθειά τους να ανιχνεύσουν τον αριθμό αντιγράφων του EGFR γονιδίου με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) δεν απέδωσε σαφή αποτελέσματα, γιατί το DNA των καρκινικών κυττάρων αναμειγνύεται με το DNA των φυσιολογικών και έτσι αλλοιώνονται τα αποτελέσματα σχετικά με τα αντίγραφα του γονιδίου στα καρκινικά κύτταρα [89].

Έρευνα του Italiano και συνεργατών του [91] εμφανίζει διαφορετική άποψη καθώς οι ασθενείς, οι οποίοι εμφανίζουν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων του EGFR γονιδίου (copy number) έχουν καλύτερες πιθανότητες απόκρισης στη θεραπεία με σετουξιμάμπη, σε αντίθεση με όσους εμφανίζουν αύξηση του αριθμού αντιγράφων του EGFR γονιδίου. Η σχέση μεταξύ του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου και της απόκρισης στην αγωγή με αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Ελάχιστες μελέτες εξετάζουν την έκφραση του KRAS σε πρωτεϊνικό επίπεδο στις διάφορες νεοπλασίες. Μία από αυτές είναι η μελέτη του Liang και των συνεργατών του στην οποία μετρήθηκαν με Western blot ανάλυση τα επίπεδα της πρωτεΐνης σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Παρατήρησαν αυξημένη συγκέντρωση mRNA μεταγράφων και πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα, ενώ ήταν στατιστικά σημαντική η συσχέτισή της με όγκους οι οποίοι είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν μεταστάσεις [78].

## 6 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 6.1 ΥΛΙΚΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε δείγματα 30 ασθενών με αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου, που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση στο Πανεπιστημιακό Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Μετά τη μονιμοποίηση και εμπέδωση των χειρουργικών παρασκευασμάτων, πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο για την επιλογή αμιγώς καρκινικού και φυσιολογικού ιστού.

### 6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 6.2.1 Εκτίμηση επιπέδων έκφρασης του EGF-υποδοχέα (mRNA μετάγραφα)

##### 6.2.1.1 Απομόνωση RNA από μονιμοποιημένο ιστό

Η απομόνωση του RNA από τομές παραφίνης έγινε με τη χρήση του RNeasy FFPE kit (Qiagen, Hilden, Germany), ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

1. Λήψη 4-5 τομών πάχους 10  $\mu\text{m}$  σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.
2. Απομάκρυνση της παραφίνης με χρήση 1 mL διαλύματος ξυλόλης.
3. Ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αφαίρεση της ξυλόλης και προσθήκη 1 mL διαλύματος απόλυτης αιθανόλης (100%).
5. Επανάληψη του σταδίου 3.
6. Έκθεση των ιστών στον αέρα μέχρι εξάτμισης της αιθανόλης που έχει απομείνει σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Προσθήκη 240  $\mu\text{L}$  PKD διαλύματος, το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων, 10  $\mu\text{L}$  πρωτεϊνάσης K και ανάδευση.
8. Επώαση για 15 λεπτά στους 55  $^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια για 15 λεπτά στους 80  $^{\circ}\text{C}$ .
9. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  RBC διαλύματος, το οποίο περιέχει μεγάλη συγκέντρωση αλάτων και επιτρέπει την απομάκρυνση του γενωμικού DNA.
10. Έντονη ανάδευση, μεταφορά του διαλύματος σε στήλη gDNA Eliminator για την απομάκρυνση του γενωμικού DNA και φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 30 δευτερόλεπτα.
11. Προσθήκη 1200  $\mu\text{L}$  απόλυτης αιθανόλης στο διάλυμα και ανάδευση.
12. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη RNeasy MinElute Spin και φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 15 δευτερόλεπτα.

13. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος RPE στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 10000 rpm για 15 δευτερόλεπτα.
14. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος RPE στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 10000 rpm για 2 λεπτά.
15. Φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 5 λεπτά για απομάκρυνση της υπολειπόμενης αιθανόλης από τη στήλη.
16. Μεταφορά της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf και προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  νερού ελεύθερου από RNAσες.
17. Φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 2 λεπτά και έκλυση του RNA.
18. Έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε 2% gel αгарόζης.
19. Ποσοτικοποίηση και έλεγχος καθαρότητας του RNA με φωτομέτρηση στα 260 nm / 280 nm. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε 1:100 αραίωση (6  $\mu\text{L}$  RNA σε 594  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ). Ο λόγος της απορρόφησης 260 nm / 280 nm πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,7 - 1,9, ώστε να θεωρείται καλής ποιότητας το RNA, χωρίς προσμίξεις από DNA και πρωτεΐνες. Η τελική συγκέντρωση του RNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) βρίσκεται από τον τύπο  $\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{ποσοστό αραίωσης (100)}$ .

#### 6.2.1.2 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA έγινε με το Sensiscript RT Kit της Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany). Για τελικό όγκο cDNA 20  $\mu\text{l}$  χρησιμοποιήθηκε 1  $\mu\text{g}$  RNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ανάμειξη RNA και νερού ελεύθερου από RNάσες έως τελικό όγκο 12  $\mu\text{l}$ .
2. Επώαση στους 65 °C για 5 λεπτά.
3. Προσθήκη κατάλληλου μίγματος που περιέχει την αντίστροφη μεταγραφάση, ρυθμιστικό διάλυμα, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τυχαία εξαμερή (Random Hexamers) και RNase αναστολέα σε τελικό όγκο 20  $\mu\text{l}$ .
4. Επώαση στους 37 °C για 60 λεπτά.
5. Προσωρινή διατήρηση στους 4 °C.

Με την ολοκλήρωση της σύνθεσης τα cDNA αποθηκεύονται στους -20 °C.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ
Ρυθμιστικό διάλυμα (αρχική συγκέντρωση 10X)	2 μl (τελική συγκέντρωση 1X)
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) (αρχική συγκέντρωση 5 mM)	2 μl (τελική συγκέντρωση 0,5 mM)
Τυχαία εξαμερή (αρχική συγκέντρωση 5 mM)	2 μl (τελική συγκέντρωση 1μM)
RNAse αναστολέας (αρχική συγκέντρωση 20 units/μL)	1 μl (τελική συγκέντρωση 10 units)
Αντίστροφη μεταγραφάση	1 μl
ddH <sub>2</sub> O + RNA	12 μl
Τελικός Όγκος cDNA	20 μl

**Πίνακας 2 Συγκεντρώσεις και ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση cDNA**

Η επιτυχής σύνθεση των cDNA δειγμάτων ελέγχθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Συγκεκριμένα, τμήμα του εξωνίου 15 του BRAF γονιδίου ενισχύθηκε επιλεκτικά με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Εκτός από τα cDNA δείγματα χρησιμοποιήθηκε και μάρτυρας (No Template Control, NTC), που αντί για cDNA περιείχε ddH<sub>2</sub>O, για τον έλεγχο επιμολύνσεων.

Το BRAF είναι ένα ογκογονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική κινάση σερίνης-θρεονίνης και ανήκει στην πρωτεϊνική οικογένεια των RAF κινάσων. Η 5'→3' αλληλουχία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του BRAF γονιδίου είναι η ακόλουθη:

BRAF Πρόσθιος εκκινητής : 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'

BRAF Ανάστροφος εκκινητής : 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'

Τόσο η σύνθεση του cDNA όσο και η PCR για την επιλεκτική ενίσχυση του BRAF γονιδίου πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf στις παρακάτω συνθήκες:

1. Αρχική αποδιάταξη → 95°C για 5 λεπτά
2. 35 κύκλοι από επαναλαμβανόμενα βήματα:



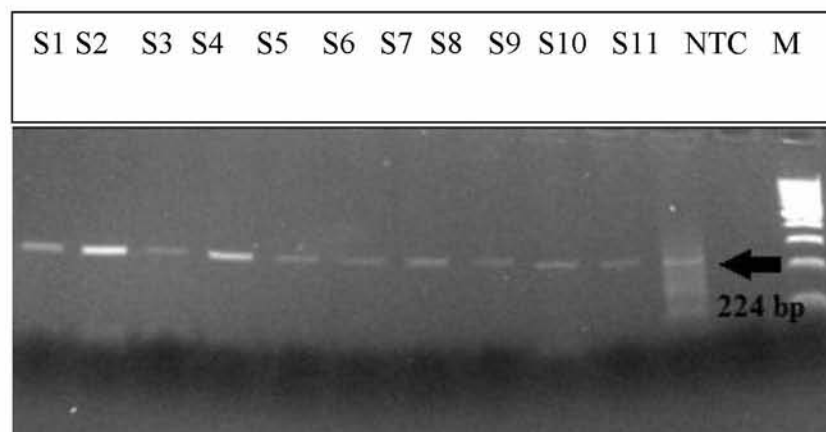
- Αποδιάταξη → 95°C για 1 λεπτό
  - Υβριδισμός εκκινητών → 57°C για 2 λεπτά
  - Επιμήκυνση → 72°C για 2 λεπτά
3. Τελική επιμήκυνση → 72°C για 10 λεπτά
  4. Διατήρηση στους 4 °C.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</b>	
<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ</b>
Ρυθμιστικό διάλυμα (10X αρχική συγκέντρωση)	5 μl (1X τελική συγκέντρωση)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM αρχική συγκέντρωση)	2 μl (2 mM τελική συγκέντρωση)
Δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs (40 mM αρχική συγκέντρωση)	2 μl (1,6 mM τελική συγκέντρωση)
Πρόσθιος εκκινητής (10 pmols/μl)	2 μl (τελική συγκέντρωση 0,4 pmols/μl)
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmols/μl)	2 μl (τελική συγκέντρωση 0,4 pmols/μl)
TAQ DNA πολυμεράση (5 units/μl, INVITROGEN)	0,4 μl (2 units)
DNA	7 μl
ddH <sub>2</sub> O	29,6 μl
<b>ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ</b>	<b>50 μl</b>

**Πίνακας 3 Συγκεντρώσεις και ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην PCR για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του BRAF γονιδίου.**

Το PCR προϊόν, που έχει μέγεθος 224 bp, υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και παρατήρηση σε UV ακτινοβολία (Εικ. 14).



Εικόνα 14 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων (S1 – S11, μεγέθους 224 bp) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. NTC: No Template Control, δείγμα χωρίς cDNA για έλεγχο επιμολύνσεων. M: 100 bp ladder, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (INVITROGEN).

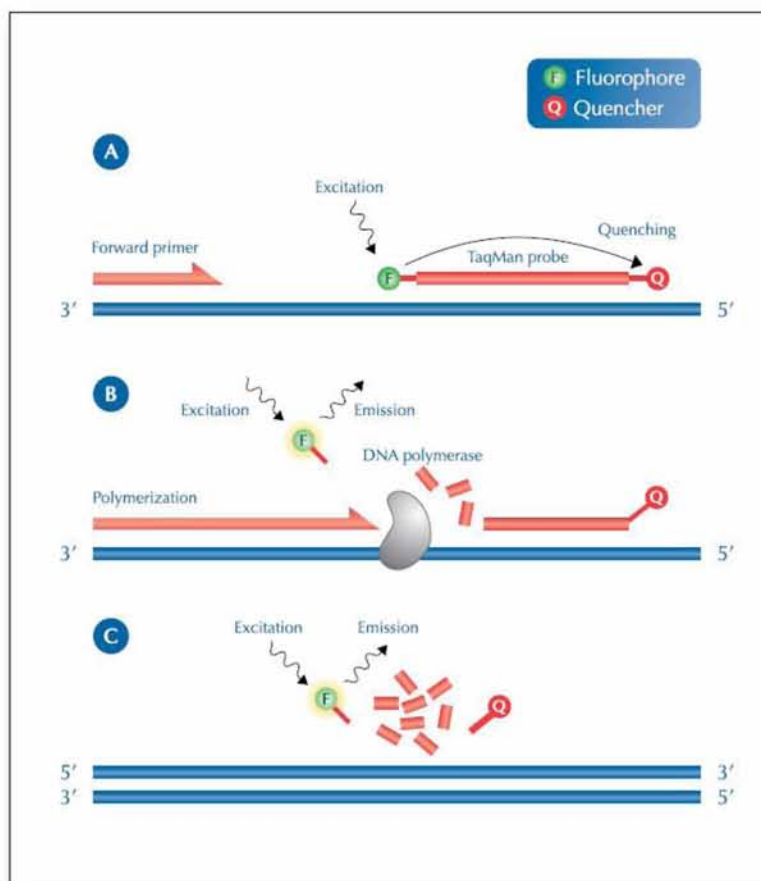
### 6.2.1.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) αποτελεί μια τεχνική ανάλυσης των DNA ή RNA μορίων, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο. Τα προϊόντα της PCR προσδιορίζονται ποσοτικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των προϊόντων πραγματοποιείται με πλήθος μεθόδων. Μία από αυτές είναι η χρήση κατάλληλων χρωστικών όπως η SYBR Green I, η οποία έχει τη δυνατότητα να ενσωματώνεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA και να φθορίζει. Έτσι, κατά την πορεία της PCR αντίδρασης, η ποσότητα του δίκλωνου DNA-στόχου αυξάνεται εκθετικά με συνέπεια την παράλληλη αύξηση της ποσότητας της χρωστικής SYBR Green I που ενσωματώνεται σε δίκλιωνα μόρια DNA και οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού που εκπέμπεται. Σε κάθε κύκλο είναι αναμενόμενο ότι στη φάση επιμήκυνσης της αντίδρασης ο φθορισμός αυξάνεται σταδιακά, ενώ είναι πολύ μικρός ή απουσιάζει εντελώς στη φάση της αποδιάταξης.

Άλλη μέθοδος περιλαμβάνει ανιχνευτές υβριδοποίησης (HybProbes), που είναι ειδικοί για συγκεκριμένες αλληλουχίες. Κάθε ανιχνευτής φέρει μια φθορίζουσα ουσία. Ο ένας ανιχνευτής φέρει προσδεσμένη μια ουσία-δότη στο 3' άκρο και ο άλλος μια ουσία-δέκτη στο 5' άκρο. Οι αλληλουχίες των ανιχνευτών είναι σχεδιασμένες με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιούνται σε κοντινές περιοχές. Όταν υβριδοποιούνται οι ανιχνευτές, μεταφέρεται ενέργεια από την ουσία-δότη στην ουσία-δέκτη, με αποτέλεσμα αυτή να εκπέμπει φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα του DNA-στόχου που παράγεται κατά την αντίδραση.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τη χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης (Taqman probes). Αυτή βασίζεται στη σύζευξη δύο βασικών διεργασιών. Η πρώτη είναι η κατασκευή ανιχνευτών με διπλή σήμανση (ανιχνευτές υδρόλυσης ή Taqman), οι οποίοι

έχουν την ιδιότητα να εκπέμπουν φθορισμό κατά τη διάσπασή τους, επειδή στο ένα άκρο φέρουν φθορίζουσα ουσία (fluorophore) και στο άλλο μια χρωστική απορρόφησης (quencher). Η δεύτερη διεργασία είναι η εξωνουκλεολυτική 5'→3' δράση της TAQ πολυμεράσης, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση των παραπάνω ανιχνευτών. Όταν ο ανιχνευτής βρίσκεται στην ελεύθερη άθικτη μορφή του δεν ανιχνεύεται εκπομπή φθορισμού, λόγω της απορρόφησης του φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας από τη χρωστική απορρόφησης (quencher) ενώ κατά την υβριδοποίηση του σε έναν από τους κλώνους του μορίου-στόχου, ο ανιχνευτής διασπάται με τη δράση της TAQ πολυμεράσης και η φθορίζουσα ουσία (fluorophore) απομακρύνεται από την χρωστική απορρόφησης (quencher) με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται φθορισμός (Εικ. 15). Η αύξηση του φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο και είναι ευθέως ανάλογη του παραγόμενου PCR προϊόντος.



**Εικόνα 15 Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των ανιχνευτών υδρόλυσης (Taqman probes)**

Η ποσότητα του παραγόμενου PCR προϊόντος σε κάθε μέθοδο εκτιμάται μέσω του εκπεμπόμενου φθορισμού σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος ανά περίπτωση.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Lightcycler® 480 Instrument II (Εικ. 16) και χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές υδρόλυσης (Taqman probes), ειδικοί για τα γονίδια EGFR και β-μικροσφαιρίνης που μελετήθηκαν.

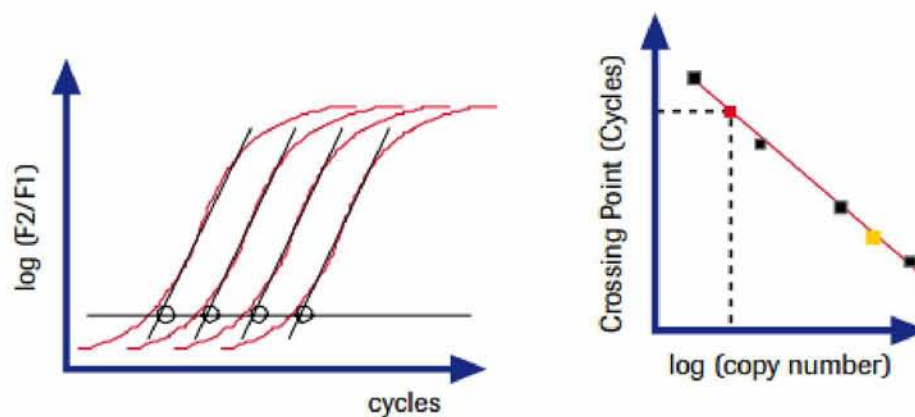


**Εικόνα 16 Θερμικός κυκλοποιητής Lightcycler® 480 Instrument II (ROCHE DIAGNOSTICS)**

Για τον υπολογισμό των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργήθηκε από το σύνολο των cDNA μορίων (cDNA pool) των δειγμάτων της μελέτης, το οποίο φωτομετρήθηκε στα 260/280nm και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του συνόλου των cDNA μορίων. Κατόπιν, από το σύνολο των cDNA μορίων πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές λογαριθμικές αραιώσεις γνωστής συγκέντρωσης, βάσει των οποίων δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη για κάθε ένα από τα γονίδια ξεχωριστά (Εικ. 17).

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η ένδειξη (Cp, Crossing Point) δείχνει πότε κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση. Εφόσον σε όλα τα δείγματα η αρχική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι ίδια, ο κύκλος (Cp) είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσης του παραγόμενου PCR προϊόντος. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του παραγόμενου PCR προϊόντος τόσο πιο νωρίς (μικρότερο Cp) εισέρχεται το δείγμα στην εκθετική φάση. Ωστόσο, για να μπορεί να εκτιμηθεί η συγκέντρωση κάθε δείγματος πρέπει να είναι εντός της πρότυπης καμπύλης. Για το λόγο αυτό, κατασκευάζονται αρχικά διαδοχικές αραιώσεις που καθορίζουν το εύρος της πρότυπης καμπύλης ξεχωριστά για κάθε γονίδιο.





**Εικόνα 17 Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης και μέτρησης mRNA μεταγράφων**

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα που μελετήσαμε εκτιμήθηκαν σε σχέση με την πρότυπη καμπύλη. Η πρότυπη καμπύλη περιλαμβάνει διαδοχικές αραιώσεις γνωστής συγκέντρωσης. Στα προς εξέταση δείγματα, η συγκέντρωση του παραγόμενου PCR προϊόντος υπολογίζεται αυτόματα από το λογισμικό του θερμικού κυκλοποιητή βάσει του κύκλου (Cp) που δείχνει πότε το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση.

Οι πειραματικές συνθήκες που ακολουθήσαμε με τη χρήση των ανιχνευτών υδρόλυσης (Taqman probes) ήταν οι εξής:

1. **Αρχική Αποδιάταξη**→95 °C για 10 λεπτά
2. **35 κύκλοι από επαναλαμβανόμενα στάδια:**
  - **Αποδιάταξη**→95 °C για 10 δευτερόλεπτα
  - **Υβριδισμός εκκινητών**→60 °C για 30 δευτερόλεπτα
  - **Επιμήκυνση**→72 °C για 1 δευτερόλεπτο
3. **Ψύξη** →40 °C για 30 δευτερόλεπτα

Η μέτρηση του φθορισμού γινόταν σταθερά σε κάθε κύκλο της PCR αντίδρασης στο στάδιο της επιμήκυνσης.

Σε κάθε πείραμα εκτός από τα υπό εξέταση δείγματα, συμπεριλαμβανόταν ένα δείγμα χωρίς cDNA (No Template Control, NTC) και ένα από τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης της πρότυπης καμπύλης. Η ανάλυση γινόταν με την ολοκλήρωση του πειράματος και την εισαγωγή της πρότυπης καμπύλης.



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου είναι τα εξής:

#### **EGFR γονίδιο**

<b>ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</b>	
ddH <sub>2</sub> O	4 µl
EGFR Primer-Probe Mix	1 µl
480 Master Mix	10 µl
cDNA	5 µl
Τελικός όγκος	<u>20 µl</u>

**Πίνακας 4** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη Real Time PCR για τη μέτρηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου

#### **Γονίδιο β2-μικροσφαιρίνης (β2M)**

<b>ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</b>	
ddH <sub>2</sub> O	4 µl
B2M Primer-Probe Mix	1 µl
480 Master Mix	10 µl
cDNA	5 µl
Τελικός όγκος	<u>20 µl</u>

**Πίνακας 5** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη Real Time PCR για τη μέτρηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του γονιδίου της β2M

Το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης, δεδομένου ότι εκφράζεται καθολικά και δεν μεταβάλλεται η έκφρασή του μεταξύ των φυσιολογικών και των καρκινικών ιστών, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας των cDNA μορίων που παράχθηκαν από τα εξεταζόμενα δείγματα. Παράλληλα, στα υπό εξέταση δείγματα απομονώθηκε DNA και τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο KRAS.

### 6.2.2 Προσδιορισμός KRAS μεταλλάξεων στα δείγματα

Για τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων στο KRAS ογκογονίδιο πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA και ακολούθησε επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του εξωνίου 2 (κωδικόνια 12, 13) του KRAS γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Η παρουσία ή μη μεταλλάξεων στο συγκεκριμένο τμήμα του KRAS γονιδίου έγινε με τη χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP). Στα δείγματα που έφεραν μεταλλάξεις, η ταυτοποίηση της μετάλλαξης έγινε με ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) σε ABI 3500 γενετικό αναλυτή (Applied Biosystems, Life technologies, USA).

#### 6.2.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το PureLink<sup>®</sup> Genomic DNA kit της εταιρείας Invitrogen. Η διαδικασία για την απομόνωση ήταν η εξής:

1. Λήψη 4-5 τομών πάχους 10 μm σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.
2. Αφαίρεση της παραφίνης με χρήση 1 mL διαλύματος ξυλόλης.
3. Καλή ανακίνηση (vortex) και φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).
4. Αφαίρεση της ξυλόλης από το δείγμα του ιστού με τη χρήση 1 mL διαλύματος απόλυτης αιθανόλης (100%).
5. Επανάληψη του βήματος 3.
6. Έπωση των ιστών στους 25 °C μέχρι εξάτμισης της αιθανόλης που έχει απομείνει σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Προσθήκη 180 μL διαλύματος πέψης (PureLink<sup>®</sup> Genomic Digestion Buffer), 20 μL διαλύματος Πρωτεϊνάσης K και ισχυρή ανάδευση (vortex).
8. Έπωση σε υδατόλουτρο στους 50 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.
9. Σύντομη φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 1 λεπτό για να κατακαθίσουν τα δείγματα.
10. Προσθήκη 20 μl διαλύματος RNase A στο διάλυμα, ανάδευση και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την ενζυμική διάσπαση του RNA.
11. Προσθήκη 200 μl διαλύματος λύσης/πρόσδεσης (PureLink<sup>®</sup> Genomic Lysis/Binding Buffer) και ανάδευση (vortex).
12. Προσθήκη 200 μL διαλύματος απόλυτης αιθανόλης και ανάδευση.

13. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη με φίλτρο (PureLink® Spin Column) και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 2 λεπτά.
14. Προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης (Wash Buffer I) στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό.
15. Προσθήκη 500 μl διαλύματος πλύσης (Wash Buffer II) στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 3 λεπτά.
16. Μεταφορά της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.
17. Προσθήκη 100 μl ddH<sub>2</sub>O και επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
18. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 3 λεπτά και έκλυση του γενωμικού DNA.
19. Αποθήκευση στους 4°C ή στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

#### 6.2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για το KRAS ογκογονίδιο

Μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα, έγινε επιλεκτική ενίσχυση (PCR) του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων. Στην περιοχή αυτή του γονιδίου συσσωρεύεται η πλειοψηφία των «ενεργοποιητικών» μεταλλάξεων (>90%). Οι 5' → 3' εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου είναι οι ακόλουθοι:

**Πρόσθιος εκκινήτης : 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'**

**Ανάστροφος εκκινήτης : 5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3'**

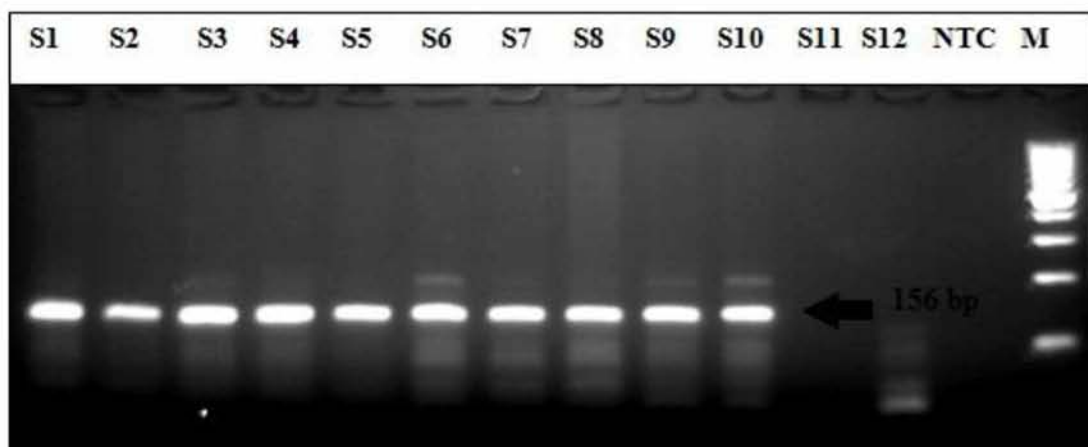
Η διεξαγωγή των PCR αντιδράσεων έγινε στις παρακάτω συνθήκες:

1. **Αρχική αποδιάταξη** → 94 °C για 5 λεπτά
2. **35 κύκλοι με τα ακόλουθα στάδια:**
  - **Αποδιάταξη** → 94 °C για 1 λεπτό
  - **Υβριδισμός εκκινήτων** → 54 °C για 1 λεπτό
  - **Επιμήκυνση** → 72 °C για 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση** → 72 °C για 10 λεπτά

ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ
Ρυθμιστικό διάλυμα(10x αρχική συγκέντρωση)	5 μl (1X τελική συγκέντρωση)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM αρχική συγκέντρωση)	2 μl (2 mM τελική συγκέντρωση)
Δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs (40 mM αρχική συγκέντρωση)	2 μl (1,6 mM τελική συγκέντρωση 1,6 mM)
Πρόσθιος εκκινητής (10 pmols/μl)	2 μl (0,4 pmols/μl τελική συγκέντρωση)
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmols/μl)	2 μl (0,4 pmols/μl τελική συγκέντρωση)
TAQ Πολυμεράση (5 units/μL, INVITROGEN)	0,5 μl (2,5 units)
DNA	7 μl
ddH <sub>2</sub> O	29,5 μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	50 μl

**Πίνακας 6 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος του KRAS γονιδίου**

Το= τμήμα που ενισχύεται έχει μήκος 156 ζεύγη βάσεων. Η αντίδραση PCR ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, παρατήρηση σε UV ακτινοβολία και αποθήκευση των δεδομένων με φωτογράφιση (Εικ. 18).



Εικόνα 18 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε gel αγαρόζης 3% μετά από επιλεκτική ενίσχυση του γονιδίου KRAS S1 – S12 δείγματα, NTC; αρνητικός μάρτυρας (No Template Control), M: 100 bp ladder, μάρτυρας γνωστού μεγέθους (INVITROGEN).

### 6.2.2.3 Ανίχνευση της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12 (hot spot) του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου με χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης υπόκεινται σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MvaI (BstNI) (THERMO FISCHER SCIENTIFIC) σε θερμοκρασία 37 °C για περίπου 24 ώρες (overnight). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Προϊόν PCR	Ένζυμο MvaI	MvaI buffer	H <sub>2</sub> O	Τελικός όγκος
10 μl	1.5 μl	3 μl	15.5 μl	30 μL

Πίνακας 7 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της μετάλλαξης του κωδικονίου 12 με χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης

Ακολουθεί έλεγχος των προϊόντων της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% μαζί με μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους και παρατήρηση σε UV ακτινοβολία. Ο αριθμός των ζωνών που εμφανίζει κάθε δείγμα εξαρτάται από την αλληλουχία του κωδικονίου 12 του γονιδίου KRAS.

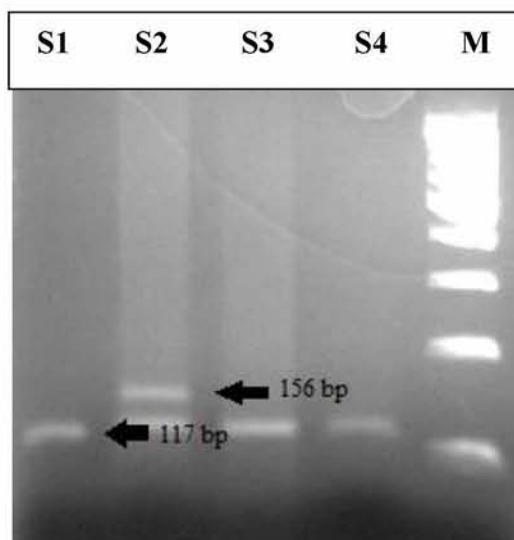
Το MvaI είναι μία περιοριστική ενδονουκλεάση, που έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει και να τέμνει το δίκλωνο DNA στις παρακάτω περιοχές, όπου W = A ή T:



Η φυσιολογική αλληλουχία του κωδικονίου 12 του γονιδίου KRAS είναι 5' GGT 3'

3' CCA 5'

Όταν υπάρχει η φυσιολογική αλληλουχία στο κωδικόνιο αυτό, το ένζυμο MvaI τέμνει το δίκλωνο μόριο στην περιοχή αυτή. Έτσι, κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης, εφόσον και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια στον πληθυσμό των κυττάρων από τα οποία απομονώθηκε γενετικό υλικό, φέρουν τη συγκεκριμένη φυσιολογική αλληλουχία στο κωδικόνιο 12 εμφανίζεται μόνο μία ζώνη μεγέθους 117 ζευγών βάσεων. Το μικρότερο τμήμα μεγέθους 39 βάσεων δεν είναι ορατό στην ηλεκτροφόρηση. Παρουσία μετάλλαξης στην πρώτη ή δεύτερη βάση του κωδικονίου 12 έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της αλληλουχίας συνεπώς δεν αναγνωρίζεται και δεν τέμνεται στη συγκεκριμένη θέση από το περιοριστικό ένζυμο MvaI. Κατά την ηλεκτροφόρηση, εφόσον υπάρχει μετάλλαξη προκύπτουν δύο ζώνες. Η μικρότερη αφορά στην φυσιολογική αλληλουχία που υπάρχει και αναγνωρίζεται από το ένζυμο, ενώ η μεγαλύτερη, μεγέθους 156 ζευγών βάσεων, αφορά στην μεταλλαγμένη αλληλουχία, όπου χάνεται η θέση αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο (Εικ. 19). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει έναν πρώτο έλεγχο των δειγμάτων που φέρουν ή όχι μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου, προκειμένου να ελεγχθούν άλλες πιθανές θέσεις μεταλλάξεων στο συγκεκριμένο γονίδιο. Η περαιτέρω ταυτοποίηση της μετάλλαξης και η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλλαγής γίνεται με αλληλούχιση των προϊόντων PCR σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).



**Εικόνα 19** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με το περιοριστικό ένζυμο MvaI (THERMO FISCHER SCIENTIFIC). Δείγματα S1, S3, S4: φέρουν τη φυσιολογική αλληλουχία στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου (1 ζώνη). Δείγμα S2: φέρει μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 (2 ζώνες) M: 100 bp ladder, μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους (INVITROGEN).



#### 6.2.2.4 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)

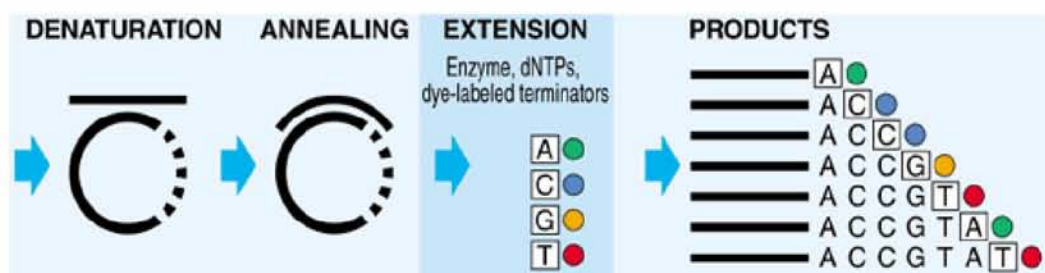
Για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στο εξόνιο 2 του γονιδίου KRAS ακολούθησε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Για το σκοπό αυτό τα προϊόντα της PCR αντίδρασης υπόκεινται σε καθαρισμό προκειμένου να απομακρυνθεί περίσσεια εκκινητών και άλλες προσμίξεις. Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε το QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για τον καθαρισμό είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη PB διαλύματος (5X του όγκου του PCR προϊόντος)
2. Μεταφορά του διαλύματος σε στήκη QIAquick Spin και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 750 μl PE διαλύματος και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 1 λεπτό με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας αιθανόλης από τη στήλη.
5. Μεταφορά της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 ml.
6. Προσθήκη 30 μl δίσ απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) στη στήλη, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 2 λεπτά για την έκλυση των καθαρισμένων PCR προϊόντων.

Η εκτίμηση της ποσότητας του προϊόντος μετά τον καθαρισμό έγινε με ηλεκτροφόρηση 2 μl του καθαρισμένου PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Παράλληλα ηλεκτροφορείται μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους για εκτίμηση της συγκέντρωσης (ng) του κάθε δείγματος, προκειμένου να ακολουθήσει η αντίδραση για ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger.

Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τη μέθοδο Sanger απαιτείται ένας εκκινητής ομόλογος προς το ένα άκρο της αλληλουχίας που πρόκειται να καθοριστεί, DNA πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και ειδικά σημασμένα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια έχουν έλλειψη της υδροξυλομάδας (-OH) στον 3' άνθρακα, οπότε κατά τον πολυμερισμό του τμήματος από την DNA πολυμεράση, αν ενσωματωθεί ένα διδεοξυριβονουκλεοτίδιο αντί ενός δεοξυριβονουκλεοτιδίου προκαλείται τερματισμός της σύνθεσης της αλυσίδας, καθώς η υδροξυλομάδα (-OH) του 3' άνθρακα του κάθε νουκλεοτιδίου είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού και τον πολυμερισμό της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τμημάτων με διαφορά

μοριακού βάρους ενός νουκλεοτιδίου ανάλογα με το που τερματίστηκε η σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας (Εικ. 20). Στη συνέχεια τα προϊόντα είτε ηλεκτροφορούνται και παρατηρούνται σε UV ακτινοβολία, είτε γίνεται ανάλυση του φθορισμού με τη χρήση ειδικών συσκευών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) που περιέχει διδεοξυριβονουκλεοτίδια διαφορετικά σημασμένα για κάθε αζωτούχο βάση και τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν στον γενετικό αναλυτή ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).



Εικόνα 20 Βήματα προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αντιδράσεις που θα επιτρέψουν την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των δειγμάτων. Η ποσότητα των καθαρισμένων PCR προϊόντων που χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω αντίδραση ήταν 10 ng/αντίδραση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 θέσεων (plate). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ/αντίδραση
TR (Terminator Dye)	4 µl
5x ρυθμιστικό διάλυμα	2 µl
Εκκινητής	1 µl
PCR προϊόν + H <sub>2</sub> O	13 µl
Τελικός όγκος	20 µl

Πίνακας 8 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

1. **Αρχική αποδιάταξη** → 96 °C για 1 λεπτό
2. **25 κύκλοι με τα ακόλουθα στάδια:**
  - **Αποδιάταξη** → 96 °C για 1 δευτερόλεπτα

- **Υβριδισμός εκκινητών** → 50 °C για 5 δευτερόλεπτα
- **Επιμήκυνση** → 60 °C για 4 λεπτά

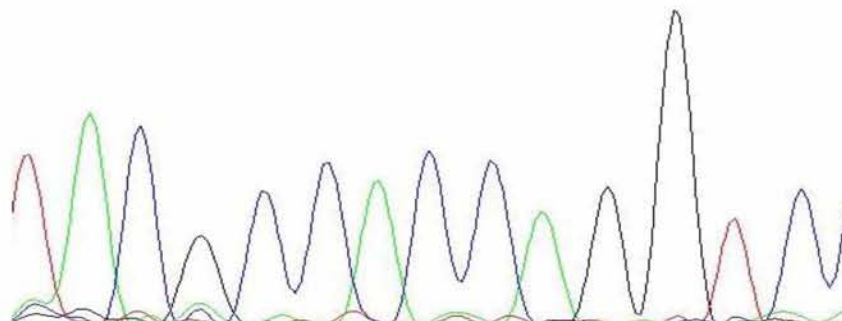
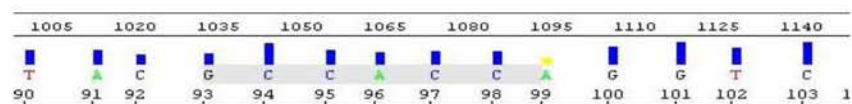
### 3. Διατήρηση στους 4 °C

Ακολούθησε εκ νέου καθαρισμός των προϊόντων για απομάκρυνση καταλοίπων της προηγούμενης αντίδρασης, όπως χρωστικής, εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτιδίων και αλάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

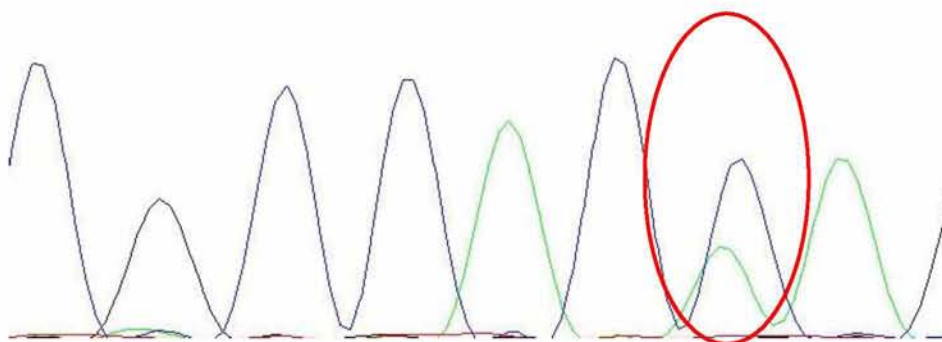
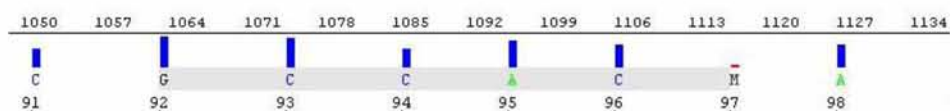
Σε κάθε PCR προϊόν που προυπήρχε στην πλάκα προστέθηκαν:

1. 20 μl/αντίδραση διαλύματος (Xterminator), το οποίο δεσμεύει εκκινητές που δεν ενσωματώθηκαν κατά την προηγούμενη αντίδραση και τα ελεύθερα άλατα.
2. 90 μl/αντίδραση διαλύματος καθαρισμού (SAM solution).
3. Ανάδευση.
4. Καλή ανακίνηση για 30 λεπτά στις 1400 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκέντρωση στις 3500 rpm για 2 λεπτά.
6. Τοποθέτηση της πλάκας στον γενετικό αναλυτή ABI 3500.

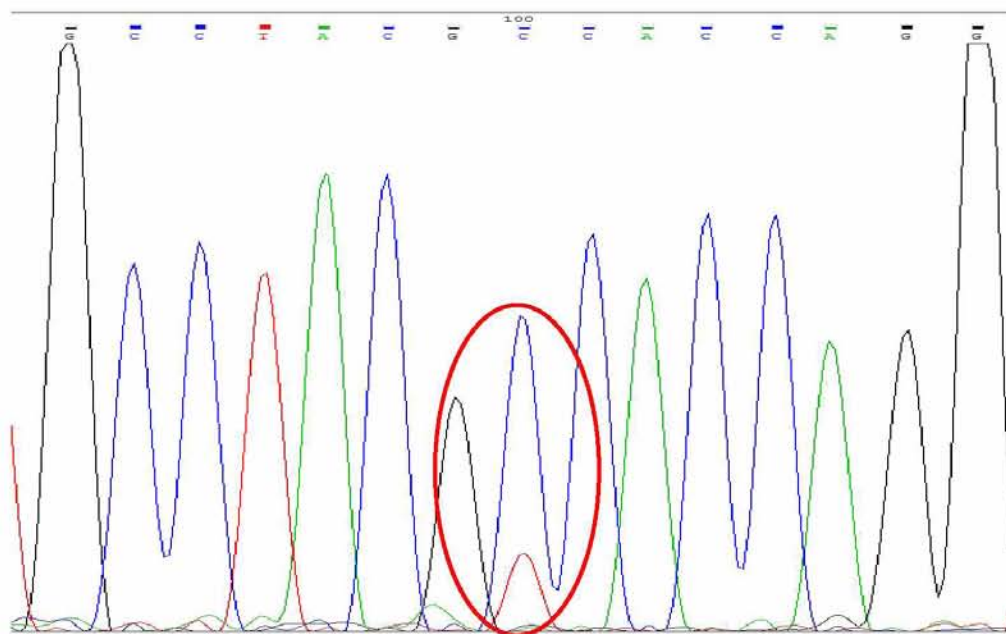
Στη συνέχεια, με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού προγράμματος έγινε η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των δειγμάτων και η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στο εξόνιο 2 του KRAS γονιδίου (Εικ. 21, 22, 23).



Εικόνα 21 Φυσιολογική αλληλουχία κωδικονίων 12, 13 του εξωνίου 2 του ογκογονιδίου KRAS.



Εικόνα 22 Αλληλουχία μεταλλαγμένου κωδικονίου 12 (Gly12Cys, GGT>TGT) του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου.



Εικόνα 23 Αλληλουχία μεταλλαγμένου κωδικονίου 13 (Gly13Asp, GGC>GAC) του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου.

## 6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε 30 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση στο Πανεπιστημιακό Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Μετά τη μονιμοποίηση και εμπέδωση των χειρουργικών παρασκευασμάτων, πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Με τη βοήθεια ιατρού Παθολογοανατόμου έγινε επιλογή φυσιολογικού και αμιγώς καρκινικού ιστού ανά ασθενή.

### 6.3.1 Κλινικοεργαστηριακές Παράμετροι

Συμμετείχαν συνολικά 30 ασθενείς, εκ των οποίων οι 13 (43,33%) ήταν άνδρες, ενώ οι 17 (56,67%) ήταν γυναίκες. Η ανάλυση των ιστολογικών παραμέτρων έδειξε ότι 5/30 ασθενείς (16,67%) εμφάνιζε όγκους μεγέθους 2-4 cm, 17/30 ασθενείς (56,5%) εμφάνιζε όγκους μεγέθους 4-6 cm και 8/30 ασθενείς (26,67%) είχε όγκους μεγέθους 6-8 cm. Όσον αφορά στην εντόπιση του όγκου, σε 14/30 ασθενείς (46,67%) ο όγκος βρισκόταν στο αριστερό κόλον, ενώ σε 16/30 ασθενείς (53,33%) ο όγκος εντοπίστηκε στο δεξιό κόλον.

Με τη βοήθεια ιατρού Παθολογοανατόμου έγινε μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών και εκτίμηση του βαθμού αγγειακής και περινευρικής διήθησης. Συγκεκριμένα, 13/30 ασθενείς (43,33%) εμφάνισαν διήθηση των γειτονικών αγγείων, ενώ 17/30 ασθενείς (56,67%) δεν είχαν αγγειακή διήθηση. Παράλληλα, 8/30 ασθενείς (26,67%) είχαν περινευρική διήθηση.

Με βάση τις κλινικές πληροφορίες που συλλέχθηκαν, 7/30 ασθενείς (23,33%) είχαν προυπάρχον αδένωμα, ενώ 23/30 ασθενείς που μελετήθηκαν (76,67%) δεν είχαν εμφανίσει κάποια μορφή αδενώματος. Τέλος, εξετάζοντας την παράμετρο της διήθησης των λεμφαδένων, διαπιστώσαμε ότι 17/30 ασθενείς (56,67%) δεν εμφάνιζαν διήθηση περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων. Αντιθέτως, 5/30 ασθενείς (16,67%) εμφάνιζαν διήθηση ενός έως τριών περικολικών ή περιορθικών λεμφαδένων και 8/30 ασθενείς (26,67%) εμφάνιζαν διήθηση σε περισσότερους από τέσσερις περικολικούς ή περιορθικούς λεμφαδένες. Οι κλινικοεργαστηριακές παράμετροι που εξετάστηκαν στους υπό μελέτη ασθενείς αναφέρονται συνολικά στον Πίνακα 9.



<b>Κλινικοεργαστηριακές παράμετροι</b>	<b>Αριθμός (N)</b>	<b>Συχνότητα (%)</b>
<b>Φύλο</b>		
• Άνδρας	13	43,33
• Γυναίκα	17	56,67
<b>Ηλικία</b>		
• 30-40	2	6,67
• 50-60	6	20,00
• 61-70	7	23,33
• 71-80	9	30,00
• 81-90	6	20,00
<b>Εντόπιση</b>		
• Αριστερά	14	46,67
• Δεξιά	16	53,33
<b>Μέγεθος</b>		
• 2-4 cm	5	16,67
• 4-6 cm	17	56,67
• 6-8 cm	8	26,67
<b>Αγγειακή διήθηση</b>		
• ΝΑΙ	13	43,33
• ΟΧΙ	17	56,67
<b>Περινευρική διήθηση</b>		
• ΝΑΙ	8	26,67
• ΟΧΙ	22	73,33
<b>Προϋπάρχον αδένωμα</b>		
• ΝΑΙ	7	23,33
• ΟΧΙ	23	76,67
<b>Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)</b>		
• Grade 1	4	13,33
• Grade 2	12	40,00
• Grade 3	14	46,67
<b>pN_stage</b>		
• N0	17	56,67
• N1	5	16,67
• N2	8	26,67
<b>Ιστολογικός υπότυπος</b>		
• Νευροενδοκρινής διαφοροποίηση	1	3,33
• Αδενοκαρκίνωμα	28	93,33
• Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα	1	3,33
<b>Στάδιο κατά Dukes</b>		

• B1	4	13,33
• B2	14	46,67
• C2	12	40,00

**Πίνακας 9 Κλινικοεργαστηριακές παράμετροι και συχνότητες εμφάνισης**

### 6.3.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων του KRAS ογκογονιδίου (KRAS status)

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την παρουσία ή μη μεταλλάξεων στο εξώνιο 2 του KRAS γονιδίου, στο οποίο εντοπίζονται οι πιο συχνές “ενεργοποιητικές” μεταλλάξεις (>90-95%). Μετά την ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ακολούθησε η τεχνική ανάλυσης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 3%. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση παρουσίας μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση MvaI (THERMOFISHER SCIENTIFIC), που αναγνωρίζει και τέμνει την φυσιολογική και όχι τη μεταλλαγμένη αλληλουχία του KRAS γονιδίου. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων έγινε με ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).

Από την ανάλυση των δειγμάτων προέκυψε ότι οι 12/30 ασθενείς (40,00%) έφεραν κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS, ενώ οι 18/30 ασθενείς (60,00%) έφεραν τη φυσιολογική αλληλουχία στο εξώνιο 2 του KRAS γονιδίου (Πίνακας 10).

Μετάλλαξη KRAS	Αριθμός (N)	Συχνότητα (%)
• Παρούσα	12	40,00
• Απουσία	18	60,00

**Πίνακας 10. Συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου (εξώνιο2).**

Όσον αφορά στο είδος της μετάλλαξης που έφεραν οι ασθενείς, 4/12 ασθενείς (33,33%) έφεραν τη μετάλλαξη Gly12Val (GGT>GTT), 3/12 ασθενείς (25%) έφεραν τη μετάλλαξη Gly12Asp (GGT>GAT), 2/12 ασθενείς (16,67%) έφεραν τη μετάλλαξη Gly12Cys (GGT>TGT), 1/12 ασθενείς (8,33%) έφεραν τη μετάλλαξη Gly12Arg (GGT>CGT), 1/12 ασθενείς (8,33%) έφεραν τη μετάλλαξη Gly12Ala (GGT>GCT). Ένας ασθενής (1/12, 8,33%) έφερε μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου και συγκεκριμένα τη μετάλλαξη Gly13Asp (GGC>GAC) (Πίνακας 11).

<b>KRAS μεταλλάξεις</b>	<b>Αριθμός (N)</b>	<b>Συχνότητα (%)</b>
Gly12Val (GGT>GTT)	4	33,33
Gly12Asp (GGT>GAT)	3	25,00
Gly12Cys (GGT>TGT)	2	16,67
Gly12Arg (GGT>CGT)	1	8,33
Gly12Ala (GGT>GCT)	1	8,33
Gly13Asp (GGC>GAC)	1	8,33
Σύνολο	12	100,00

**Πίνακας 11. Κατανομή μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου (εξώνιο 2).**

### **6.3.3 Εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης (mRNA μετάγραφα) του EGFR γονιδίου.**

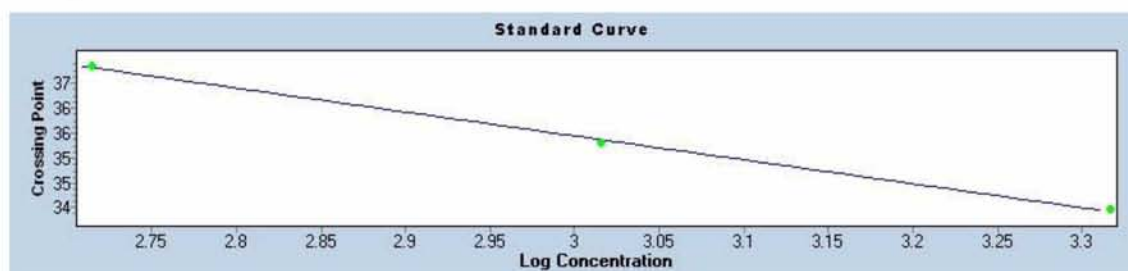
Για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR). Απομονώθηκε RNA από τομές παραφίνης από φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό (ζεύγη) για κάθε ασθενή. Στη συνέχεια εκτιμήσαμε την καθαρότητα και τη συγκέντρωση του RNA με φωτομέτρηση στα 260/280 nm.

Χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA για την κατασκευή cDNA μορίων. Όλα μας τα ζεύγη (φυσιολογικός ιστός- νεοπλασματικός ιστός) ανά ασθενή είχαν την ίδια αρχική ποσότητα ολικού RNA. Η ποιότητα των cDNA μορίων ελέγχθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) τμήματος του εξωνίου 15 του BRAF γονιδίου. Όλα τα δείγματα (ζεύγη φυσιολογικού – νεοπλασματικού ιστού) είχαν επιτυχή ενίσχυση.

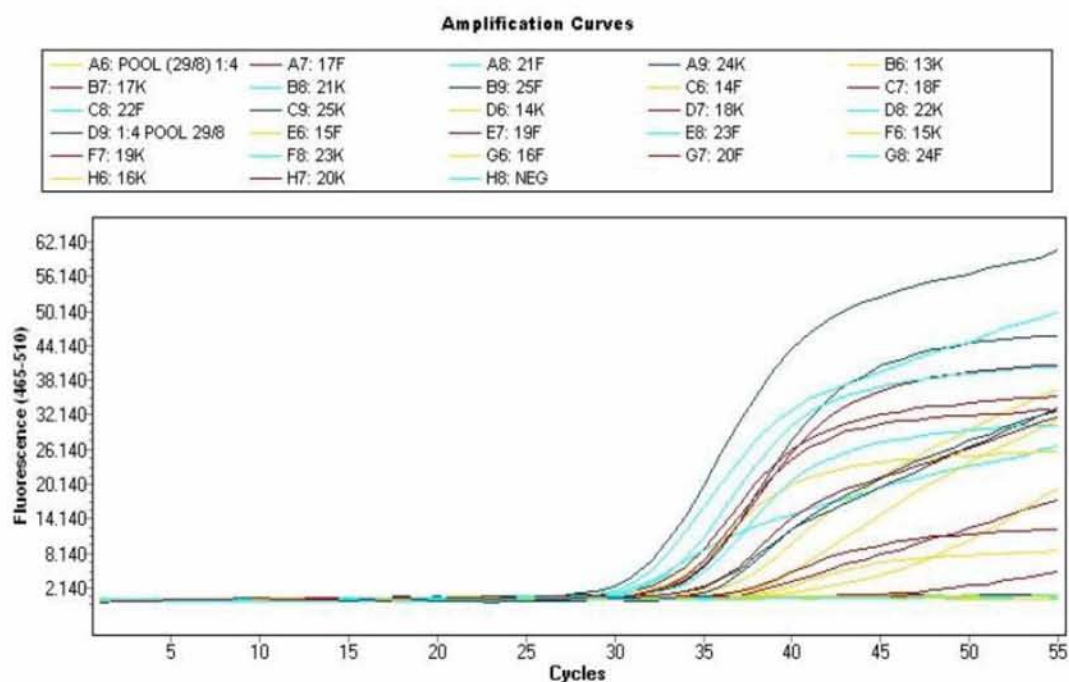
Χρησιμοποιώντας ίση ποσότητα από το σύνολο των cDNA μορίων φτιάξαμε μία δεξαμενή (cDNA pool) των δειγμάτων της μελέτης μας. Με διαδοχικές λογαριθμικές αραιώσεις γνωστής συγκέντρωσης της δεξαμενής αυτής κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη τόσο για το EGFR γονίδιο, όσο και για το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την ποιότητα και συνοχή των cDNA μορίων μας.

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Lightcycler® 480 Instrument II και τα ζεύγη δειγμάτων (φυσιολογικός-νεοπλασματικός ιστός) ανά ασθενή εξετάστηκαν σε ζεύγη (duplicates). Κατά το στάδιο της επιμήκυνσης γινόταν μέτρηση του φθορισμού. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης των παραγόμενων mRNA μεταγράφων (copies), έγινε με βάση την ένδειξη Cp (Crossing point), σύμφωνα με την οποία φαίνεται σε ποιον κύκλο εισέρχεται το κάθε δείγμα στην εκθετική φάση.

Εφόσον σε όλα τα δείγματα η αρχική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι ίδια (1μg RNA), ο κύκλος (Cp) είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσης του παραγόμενου PCR προϊόντος. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του παραγόμενου PCR προϊόντος τόσο πιο νωρίς (μικρότερο Cp) μπαίνει το δείγμα στην εκθετική φάση. Βάσει λοιπόν της πρότυπης καμπύλης που έχει φτιαχτεί με διαδοχικές αραιώσεις γνωστής συγκέντρωσης, ανάλογα με το Cp του κάθε δείγματος και σύμφωνα με το λογισμικό του προγράμματος προκύπτει ο αριθμός των mRNA μεταγράφων (copies) (Εικ. 25).



Εικόνα 24. Πρότυπη καμπύλη για το EGFR γονίδιο



**Εικόνα 25. Μέτρηση των mRNA μεταγράφων (copies) του EGFR γονιδίου στον θερμικό κυκλοποιητή Lightcycler® 480 Instrument II με RT-PCR.**

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μέτρησης της έκφρασης του EGFR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός δειγμάτων ασθενών (N)	Φυσιολογικός ιστός (copies)	Καρκινικός ιστός (copies)
1	335	739
2	0,5	10600
3	76,4	182
4	265	3380
5	1520	7320
6	0,3	205
7	135	522
8	254	0,7
9	0,2	0,6
10	0,7	312
11	230	0,3
12	3730	3630
13	239	802

<b>14</b>	19,3	1010
<b>15</b>	3580	560
<b>16</b>	260	1830
<b>17</b>	0,9	1010
<b>18</b>	2710	404
<b>19</b>	16800	277
<b>20</b>	0,6	180
<b>21</b>	0,2	10100
<b>22</b>	4270	31700
<b>23</b>	1450	8010
<b>24</b>	150	3680
<b>25</b>	1316	2780
<b>26</b>	2497	6231
<b>27</b>	2901	3124
<b>28</b>	1186	1720
<b>29</b>	1259	4501
<b>30</b>	1613	3650

**Πίνακας 12. Επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR ανά ασθενή (ζεύγη φυσιολογικού- νεοπλασματικού ιστού).**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού IBM® SPSS® Statistics 22. Το εύρος κατανομής των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου κυμαίνεται από 0,2 έως 16800 copies για τους φυσιολογικούς ιστούς (μέση τιμή 1559,97, διάμεση τιμή 262,5) και από 0,3 έως 31700 copies για τους καρκινικούς ιστούς (μέση τιμή 3672,81, διάμεση τιμή 1775).

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την κανονικότητα των δεδομένων χρησιμοποιώντας τα τεστ Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk, προκειμένου να γίνει επιλογή μεταξύ παραμετρικών ή μη παραμετρικών τεστ για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων τα δεδομένα των μετρήσεων δεν εμφανίζουν κανονική κατανομή, οπότε η στατιστική τους ανάλυση έγινε με τη βοήθεια μη παραμετρικών τεστ. Συγκεκριμένα για τη μελέτη της διαφορετικής έκφρασης του γονιδίου EGFR στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με τους καρκινικούς χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon signed ranked τεστ.



Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου στους καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφραση στους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών ( $p=0,031<0,05$ ), όπως άλλωστε φαίνεται και από τη μέση τιμή των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου στους φυσιολογικούς ιστούς (1559,97 copies) σε σχέση με τη μέση τιμή στους καρκινικούς ιστούς (3672,81 copies).

Όσον αφορά στη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους πραγματοποιήθηκαν τα μη παραμετρικά τεστ Mann-Whitney και Kruskal-Wallis. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης (mRNA μετάγραφα) του EGFR γονιδίου δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο, το μέγεθος του όγκου, την αγγειακή και περινευρική διήθηση, τον υπότυπο του όγκου, το στάδιο κατά Dukes και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου ( $p>0,05$ ).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πέντε ασθενείς παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου στον νεοπλασματικό ιστό σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στο φυσιολογικό ιστό. Η πλειοψηφία των ασθενών αυτών είχαν περισσότερους από τέσσερις θετικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα.

Παράλληλα, η σύγκριση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων και του status του KRAS γονιδίου (παρουσία-απουσία μεταλλάξεων) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p>0,05$ ).

Το σύνολο των ασθενών αυτών έχει εξεταστεί στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής που διεξάγεται ταυτόχρονα στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στα πλαίσια αυτά είχε γίνει συλλογή νωπού ιστού από φυσιολογική και νεοπλασματική περιοχή του όγκου ανά ασθενή. Δεδομένου ότι μέρος της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου των ασθενών αυτών, προχωρήσαμε σε σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με αυτά που προέκυψαν από τη λήψη και επεξεργασία νωπού ιστού σε ζεύγη (φυσιολογικός-νεοπλασματικός ιστός) ανά ασθενή.

Χρησιμοποιώντας για τη στατιστική συγκριτική ανάλυση το Wilcoxon signed ranked μη παραμετρικό τεστ, λόγω της μη κανονικής κατανομής που εμφανίζουν τα δείγματα της μελέτης μας, προέκυψε ότι υπάρχει συμφωνία μεταξύ των μετρήσεων τόσο σε νωπό (frozen) όσο και σε μονιμοποιημένο ιστό (FFPE). Συγκεκριμένα, η σύγκριση μεταξύ των φυσιολογικών ιστών (frozen vs FFPE) ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση

( $p=0,04<0,05$ ) και η σύγκριση μεταξύ των νεοπλασματικών ιστών (frozen vs FFPE) ανέδειξε επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,011<0,05$ ).

Τέλος, συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου ανά ζεύγη φυσιολογικού-νεοπλασματικού ιστού, τόσο σε νωπό (frozen) όσο και σε μονιμοποιημένο ιστό (FFPE) προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις και συγκεκριμένα ( $p=0,001<0,05$ ,  $p=0,008<0,050$ ) αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο μονιμοποιημένος ιστός (FFPE) μπορεί να χρησιμοποιηθεί άριστα και με αξιόπιστα αποτελέσματα για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης ποικίλων μοριακών παραγόντων. Συνεπώς, παρέχεται η δυνατότητα για πλήθος αναδρομικών μελετών και παρακάμπτεται η προϋπόθεση της ύπαρξης νωπού κατεψυγμένου ιστού για τέτοιου είδους μελέτες.

## 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την 4<sup>η</sup> πιο συχνή αιτία θανάτου με υψηλή συχνότητα εμφάνισης κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες. Νεότερα επιδημιολογικά στοιχεία, καθώς και στοιχεία που αφορούν στο γενετικό προφίλ του καρκίνου του παχέος εντέρου, αποδεικνύουν ότι πρόκειται για μία ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων με σύνθετες μορφολογικές, γενετικές και επιγενετικές διαταραχές [92].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGF-υποδοχέα είναι ιδιαίτερα μελετημένο στον καρκίνο του παχέος εντέρου [93], [94]. Προκειμένου να αδρανοποιηθεί η σηματοδότηση μέσω του EGFR μονοπατιού έχουν αναπτυχθεί EGFR- στοχεύουσες θεραπείες, τόσο μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων που δρουν στον υποδοχέα εξωκυττάρια, όσο και μέσω μικρών μορίων-αναστολέων κινάσης τυροσίνης (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs) που δρουν ενδοκυττάρια στην περιοχή του υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Η χρήση συγκεκριμένων θεραπευτικών σχημάτων στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου παρουσιάζει καλά αποτελέσματα [95].

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το EGFR γονίδιο υπερεκφράζεται σε νεοπλάσματα του παχέος εντέρου, ενώ σε αντίθεση με άλλους καρκίνους οι EGFR-ενεργοποιητικές μεταλλάξεις είναι σπάνιες [96]. Το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζουν υπερέκφραση του EGFR φτάνει το 60-80% [97] και συχνά σχετίζεται με όγκους οι οποίοι έχουν χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης και παρουσιάζουν συχνά διήθηση γειτονικών λεμφαδένων ή αιμοφόρων αγγείων. Η υπερέκφραση του EGFR γονιδίου φαίνεται να συμβαίνει κατά την διαδικασία της καρκινογένεσης [98],[99].

Αν και υπάρχουν μελέτες, οι οποίες υποδεικνύουν πως δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση της πρόγνωσης των ασθενών με την υπερέκφραση του υποδοχέα [100],[101], ωστόσο, στην πλειοψηφία τους φαίνεται να υποστηρίζουν πως η έκφραση του EGFR γονιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των νεοπλασιών του παχέος εντέρου και στην εξέλιξη τους προς κακοήθεις τύπους.

Μέχρι σήμερα, οι μηχανισμοί υπερέκφρασης του EGFR στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν είναι απόλυτα κατανοητοί. Σε μεγάλο ποσοστό προηγούμενων μελετών, η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του EGF-υποδοχέα έγινε είτε ανοσοϊστοχημικά, είτε με μέτρηση των αντιγράφων του EGFR γονιδίου με φορίζοντα in situ υβριδισμό (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH). Υπάρχουν σχετικά λίγες μελέτες που εκτιμούν

τα επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) και σε νωπούς ιστούς.

Ο Chung και οι συνεργάτες του [102] κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η μέτρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης του EGF-υποδοχέα μέσω ανοσοιστοχημικής χρώσης ενδέχεται να μην αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για τη μελέτη της διαφορικής απόκρισης των ασθενών σε φάρμακα όπως το cetuximab, λόγω πιθανής εμφάνισης ψευδώς αρνητικών τιμών. Ο Atkins και οι συνεργάτες του υποστηρίζουν ότι με το πέρασμα του χρόνου οι πρωτεΐνες ενδεχομένως υφίστανται αλλοιώσεις με αποτέλεσμα η χρώση με ειδικά αντισώματα να μην είναι αποτελεσματική [103].

Σε δύο ξεχωριστές μελέτες των Moroni et al. [89],[104] η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του EGFR γονιδίου με φθορίζοντα in situ υβριδισμό (FISH) φαίνεται πως σχετίζεται με αυξημένη απόκριση και αύξηση της συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκαν τα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα cetuximab και panitumumab. Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι ίδια για όλους τους ασθενείς με αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου, γεγονός που υποστηρίζει την ύπαρξη πιθανώς ψευδώς θετικών τιμών.

Ωστόσο, ο Italiano και οι συνεργάτες του [105] σε σχετική μελέτη τους διατυπώνουν διαφορετική άποψη καθώς υποδηλώνουν ότι ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων του EGFR γονιδίου έχουν καλύτερες πιθανότητες απόκρισης στη θεραπεία με cetuximab, σε αντίθεση με όσους εμφανίζουν αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του EGFR γονιδίου. Η σχέση μεταξύ του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου του υποδοχέα και της απόκρισης στην αγωγή με αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση και ενδέχεται να μην αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για τη διάκριση των ασθενών.

Ελάχιστες μελέτες έχουν προσδιορίσει την έκφραση του EGF-υποδοχέα σε επίπεδο mRNA μεταγράφων ειδικότερα σε μονιμοποιημένους (FFPE) ιστούς. Στη δική μας μελέτη συμπεριλήφθησαν 30 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου με RT-PCR σε μονιμοποιημένο (FFPE) ιστό. 24/30 ασθενείς (80%) είχαν υπερέκφραση του EGFR σε επίπεδο mRNA μεταγράφων στον καρκινικό τους ιστό συγκριτικά με αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν υπερέκφραση του EGFR σε ποσοστά 60-80% σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης (mRNA μετάγραφα) του EGFR γονιδίου ( $p=0,031<0,05$ ), σε

σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών. Σε προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου [106] τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων σχετίζονται με καλύτερη συνολική επιβίωση όταν λαμβάνουν cetuximab ως θεραπεία. Αντίστοιχη μελέτη σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [107] υποστηρίζει ότι τα επίπεδα έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων ήταν υψηλότερα σε εκείνους που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με gefitinib συγκριτικά με εκείνους που δεν ανταποκρίθηκαν.

Η αύξηση των mRNA μεταγράφων του EGF-υποδοχέα μπορεί να οφείλεται σε πολλούς λόγους που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Σε μελέτη των Wong και των συνεργατών του σε κακοήγη γλοιώματα [108], η αύξηση των mRNA μεταγράφων του υποδοχέα σχετίζεται κατά κανόνα με αλλαγές στη δομή του γονιδίου του, που οδηγούν στην ενίσχυση της έκφρασης του. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν σε μελέτη τους στον καρκίνο του μαστού οι Bhargava et al. [109], όπου η υπερέκφραση των mRNA μεταγράφων του υποδοχέα οδηγεί και σε αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης του υποδοχέα, ενώ φαίνεται να σχετίζεται και με ενίσχυση του γονιδίου του, όπως αυτή ανιχνεύεται με in situ υβριδισμό με χρωμογόνο (Chromogen In Situ Hybridization, CISH).

Μια τέτοια αλλαγή μπορεί να είναι η μεταβολή των αριθμού των επαναλήψεων του δινοκλεοτιδίου CA στη μικροδορυφορική αλληλουχία στο εσώνιο 1 του γονιδίου του EGFR, η οποία όπως παρατήρησαν οι Gebhardt et al. [110] μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε πενταπλάσια αύξηση του ρυθμού έκφρασης του γονιδίου σε επιδερμοειδείς καρκινικές κυτταρικές σειρές, αν οι επαναλήψεις μειωθούν κάτω από 12 σε αριθμό σε σχέση με 14-21 που είναι φυσιολογικά.

Επιπλέον, μια πιθανή εξήγηση είναι αλλαγές που ενδεχομένως αυξάνουν τον χρόνο ημιζωής του EGFR mRNA μορίου, με αποτέλεσμα να προκαλείται συσσώρευση των mRNA μορίων του υποδοχέα. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, που μελέτησαν οι Seth et al. το 1999 [111], φαίνεται πως αυξημένη συγκέντρωση TGF- $\alpha$  οδηγεί στη μετάδοση μηνύματος που προκαλεί μεγαλύτερη σταθερότητα στο mRNA του υποδοχέα, ενώ ο EGF σε μικρότερο βαθμό φαίνεται να προκαλεί την αύξηση της μεταγραφής του υποδοχέα. Στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, η σύνθεση των προσδεμάτων EGF και TGF- $\alpha$  γίνεται από τα ίδια τα κύτταρα, όταν προσδεθούν στον EGF-υποδοχέα ο EGF και ο TGF- $\alpha$ , με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας αυτοκρινής βρόχος ανατροφοδότησης (autocrine loop), που οδηγεί τελικά στην συσσώρευση mRNA μεταγράφων του EGFR στο εσωτερικό του κυττάρου. Ομοίως, οι Jinno et al. το 1988 [112] είχαν παρατηρήσει σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του οισοφάγου, ότι η επίδραση του προσδέματος EGF στις

κυτταρικές σειρές προκαλούσε σημαντική αύξηση του χρόνου ημιζωής των EGFR mRNA μορίων από 0,9-2,2 ώρες μέχρι και πάνω από 6 ώρες μέσα στα κύτταρα.

Η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα στον καρκίνο του παχέος εντέρου γίνεται σε πολλά επίπεδα, οπότε είναι σημαντική η περαιτέρω διερεύνηση για τους μηχανισμούς, που εμπλέκονται στην αύξηση της έκφρασης του, αλλά και το πως αυτή η αύξηση σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να αποτελέσει έναν χρήσιμο βιοδείκτη για εξατομικευμένα και περισσότερο αποτελεσματικά σχήματα θεραπείας.

Αξίζει επίσης να επισημάνουμε την ύπαρξη μικρού αριθμού ασθενών οι οποίοι εμφάνισαν μειωμένη έκφραση του EGF-υποδοχέα στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό. Η πλειοψηφία των ασθενών αυτών είχαν περισσότερους από τέσσερις θετικούς λεμφαδένες. Ο μικρός αριθμός των ασθενών δεν επιτρέπει στατιστική ανάλυση, ωστόσο συνιστά περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να εκτιμηθεί εάν η μειωμένη έκφραση σχετίζεται με υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Επιπλέον, σύμφωνα με τις προαναφερθείσες μελέτες, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης μπορεί να σχετίζονται με πιθανή καλύτερη συνολική επιβίωση όταν οι ασθενείς λάβουν συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα.

Παράλληλα, μελετήσαμε στους ασθενείς την παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων στο KRAS ογκογονίδιο που βρίσκεται στο ίδιο μονοπάτι σηματοδότησης. Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων και του status του KRAS γονιδίου (παρουσία- απουσία μεταλλάξεων) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p > 0,05$ ). Η σύγκριση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως το φύλο, το μέγεθος του όγκου, την αγγειακή και περινευρική διήθηση, τον υπότυπο του όγκου, το στάδιο κατά Dukes και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Τέλος, συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων των ίδιων ασθενών σε νωπό κατεψυγμένο ιστό και σε μονιμοποιημένο (FFPE) ιστό, προέκυψαν ανάλογα αποτελέσματα με ισχυρές στατιστικές συσχετίσεις. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι ο μονιμοποιημένος (FFPE) ιστός μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά και να δώσει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στη μελέτη επιπέδων έκφρασης ποικίλων μοριακών δεικτών. Συνεπώς, παρέχεται η δυνατότητα για πλήθος αναδρομικών μελετών και δεν αποτελεί πλέον απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη νωπού κατεψυγμένου ιστού για μελέτες ποσοτικοποίησης διαφόρων παραμέτρων.



## **8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**
2. **Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology.BMJ 2000;321(7264):805–808**
3. **Fatima A. Hagggar, Robin P. Boushey Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival and Risk Factors Clin Colon Rectal Surg. Nov 2009; 22(4): 191–19**
4. **Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2005. 2008, Bethesda, MD**
5. **American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures Special Edition 2005. Oklahoma City, OK: American Cancer Society; 2005; Available from: [http://www.cancer.org/docroot/STT/stt\\_0.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp). Accessed May 26, 2009**
6. **O’Connell JB, Maggard MA, Liu JH, et al. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. Am Surg 2003;2003(69):866–872**
7. **O’Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. Am J Surg 2004;187(3):343–348**
8. **Janout V, Kollarova H. Epidemiology of colorectal cancer.Biomed Pap Med Fac Univ Palacku Olomouc Czech Repub 2001;145:5–10**
9. **Jemal A, Clegg LX, Ward E, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. Cancer 2004;101(1):3–27**
10. **Lipkin M, Bell B, Shelrock P: Cell proliferation kinetics in gastrointestinal tract of man. J Clin Invest 42:767, 1963**
11. **Genetic Basis of Human Cancer, The , 2<sup>nd</sup> Edition Vogelstein,Bert,Kinzler,Kenneth W**
12. **Kent Th, Mitros FA: Polyps of the colon and rectum, in Norris HT (eds): Pathology of the Colon, Small Intestine and Anus, Vol 2.New York, Churchill-Livingstone, 1983, p.167**
13. **Cooper HS: Carcinoma of the colon and rectum, in Norris HT (eds): Pathology of the colon, small intestine and Anus, Vol 2. New York, Churchill-Livingstone, 1983,p.201**
14. **Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL: Natural History of untreated colonic polyps. Gastroenterology 93:1009,1987.**

15. Akkoma AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma *Int J Clin Exp Med* 2014 Sep 15;7(9):2828-35
16. Beart RW: Colorectal cancer, in Holleb AI, Fink DJ, Murphy GP (eds): *American Cancer Society Textbook of Clinical Oncology*. Atlanta, American Cancer Society, 1991, pp 213-218
17. Cancer Facts & Figures 1998, American Cancer Society. 1998.
18. Fenoglio-Presier CM, Pascal RR, Perzin KH. Tumors of the Large and Small Intestine. *AFIP Fascicle, 2nd Series*.1990;34:261-2.
19. Harpaz N, Saxena R. Modern Surgical Pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM, editors. *Gastrointestinal Tract, Large Intestine*. 1st ed. Vol 1. Saunders; 2003. pp. 749-852
20. Skandalakis WCW, John E. Surgical anatomy and technique. Skandalakis Quality Medical Publishing; 1995. p. 409
21. Silva JS, Georgiade GS, Dilley WG, McCarty KS Sr, Wells S Jr, McCarty KS Jr. Menstrual cycle-dependent variations of breast cyst fluid proteins and sex steroid receptors in the normal human breast. *Cancer*. 1983;51:1297-302
22. Parl F, Schonbaum C, Cox D, Cavener D. Detection of estrogen receptor mRNA in human uterus. *Mol Cell Endocrinol*. 1987;52:235-42.
23. Hoff MB, Chang WW, Mak KM. Effect of estrogen on cell proliferation in colonic mucosa of the mouse. *Virchows Arch*. 1981;35:263-73.
24. Santos GF, Scott GK, Lee WM, Liu E, Benz C. Estrogen induced post transcriptional modulation of c-myc protooncogene expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1988;263:9565-8.
25. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2002:5, 113.
26. Quirke P, Williams GT, Ectors N, et al. The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol* 2007;8:651-7.)
27. R. Labianca, B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandalà, A. Cervantes, D. Arnold Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Annals of Oncology* 24 (Supplement 6): vi64-vi72, 2013
28. Miguel A. Rodriguez-Bigas, MD, Edward H. Lin, MD and Christopher H. Crane, MD Stage IV Colorectal Cancer, *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6<sup>th</sup> Edition 2003

29. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1041–1047
30. de Gramont A, Figer A, Seymour M et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938–2947
31. Tournigand C, Andre T, Achille E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2008; 26:2006-2012
32. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil leucovorin, irinotecan and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22:1209-1214
33. Adjuvant Chemotherapy Use for Medicare Beneficiaries With Stage II Colon Cancer Deborah Schrag, Sheryl Rifas-Shiman, Leonard Saltz, Peter B. Bach, and Colin B. Begg *J Clin Oncol* 20:3999-4005. © 2002
34. Pooled Analysis of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy for Stage II and III Colon Cancer: Who Benefits and by How Much? Sharlene Gill, Charles L. Loprinzi, Daniel J. Sargent, Stephan D. Thomé, Steven R. Alberts, Daniel G. Haller, Jacqueline Benedetti, Guido Francini, Lois E. Shepherd, Jean Francois Seitz, Roberto Labianca, Wei Chen, Stephen S. Cha, Michael P. Heldebrant, and Richard M. Goldberg *J Clin Oncol* 22:1797-1806. © 2004 by American Society of Clinical Oncology
35. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer—International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) investigators. *J Clin Oncol* 17:1356-1363, 1999
36. E. Van Cutsem & J. Oliveira On behalf of the ESMO Guidelines Working Group Primary colon cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up *Annals of Oncology* 20 (Supplement 4): iv49–iv50, 2009
37. E. Van Cutsem, A. Cervantes, B. Nordlinger & D. Arnold, on behalf of the ESMO Guidelines Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up *Annals of Oncology* 25 (Supplement 3): iii1-iii9, 2014]
38. David Cunningham, M.D., Yves Humblet, M.D., Ph.D., Salvatore Siena, M.D., David Khayat, M.D., Ph.D., Harry Bleiberg, M.D., Ph.D., Armando Santoro, M.D., Danny Bets, M.Sc., Matthias Mueser, M.D., Andreas Harstrick, M.D., Chris Verslype, M.D., Ph.D.,

**Ian Chau, M.B., B.S., and Eric Van Cutsem, M.D., Ph.D. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer N Engl J Med 2004;351:337-45**

**39. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. Clin Cancer Res 2002;8:994-1003**

**40. Effect of Oxaliplatin, Fluorouracil and Leucovorin with or without Cetuximab on survival among patients with resected stage III Colon Cancer Steven R. Alberts , MD; Daniel J. Sargent, PhD; Suresh Nair, MD; Michelle R. Mahoney, MS; Margaret Mooney, MD; Stephen N. Thibodeau, PhD; Thomas C. Smyrk, MD; Frank A. Sinicrope, MD; Emily Chan, MD, PhD; Sharlene Gill, MD; Morton S. Kahlenberg, MD; Anthony F. Shields, MD, PhD; James T. Quesenberry, MD; Thomas A. Webb, MD; Gist H. Farr, MD; Barbara A. Pockaj, MD; Axel Grothey, MD; Richard M. Goldberg, MD AMA. 2012;307(13):1383-1393**

**41. Christos S. Karapetis, M.D., Shirin Khambata-Ford, Ph.D., Derek J. Jonker, M.D., Chris J. O'Callaghan, Ph.D., Dongsheng Tu, Ph.D., Niall C. Tebbutt, Ph.D., R. John Simes, M.D., Haji Chalchal, M.D., Jeremy D. Shapiro, M.D., Sonia Robitaille, M.Sc., Timothy J. Price, M.D., Lois Shepherd, M.D.C.M., Heather-Jane Au, M.D., Christiane Langer, M.D., Malcolm J. Moore, M.D., and John R. Zalcberg, M.D., Ph.D K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. N Engl J Med 359;17 2008**

**42. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al: Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 25:1658-1664, 2007**

**43. R. Labianca, B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandalà, A. Cervantes, D. Arnold Early Colon Cancer:ESMO Clinical Practical Guidelines Ann Oncol 2013; 24 (Suppl 6): vi64-vi72**

**44. Al B. Benson III, Deborah Schrag, Mark R. Somerfield, Alfred M. Cohen, Alvaro T. Figueredo, Patrick J. Flynn, Monika K. Krzyzanowska, Jean Maroun, Pamela McAllister, Eric Van Cutsem, Melissa Brouwers, Manya Charette, and Daniel G. Haller American Society of Clinical Oncology Recommendations on Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon CancerJ Clin Oncol 22:3408-3419. © 2004**

**45. Erin S. O'Connor, David Yu Greenblatt, Noelle K. LoConte, Ronald E. Gangnon, Jinn-Ing Liou, Charles P. Heise, and Maureen A. Smith Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer With Poor Prognostic Features J Clin Oncol 29:3381-3388. © 2011**

46. Shibayama M, Maak M, Nitsche U, Gotoh K, Rosenberg R, Janssen KP. Prediction of metastasis and recurrence in colorectal cancer based on gene expression analysis: Ready for the clinic? *Cancers* 2011, 3, 2858-2869
47. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR and KRAS status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat. Rev.* 2009, 35, 262-271
48. M.J. Wieduwilt, M.M. Moasser The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics *Cell. Mol. Life Sci.* 65(2008) 1566-1584
49. Linggi B and Carpenter G (2006) ErbB receptors: New insights on mechanism and biology. *Trends Cell Biol* 16,649-656
50. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, et al. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 2001;12:745-60
51. Tang CK, Gong XQ, Moscatello DK et al. EGFR VIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:3081-7
52. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5268-72
53. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232
54. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the erbB signaling network. *Nat Rev (Mol Cell Biol)* 2001;2:127-137
55. Roy S. Herbst Review of epidermal growth factor receptor biology *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol.59, No.2 Supplement, pp. 21-26, 2004
56. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene M ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies *J Clin Invest.* 2007;117(8):2051–2058.
57. Biswas DK, Cruz AP, Gansberger E, et al. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: a major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *PNAS USA* 2000;97:8542-7.
58. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, et al. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1999;274: 17209-18.
59. Wells A. Molecules in focus: EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31: 637-43
60. K Shtiegman , BS Kochupurakkal , Y Zwang , G Pines , A Starr , A Vexler , A Citri, MKatz , S Lavi , Y Ben-Basat , S Benjamin , S Corso , J Gan , RB Yosef , S Giordano

and Y Yarden Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling *Oncogene* (2007) 26, 6968–6978

61. Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y. and Schlessinger, J. (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5192–5201.

62. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442

63. Hallberg, B., Rayter, S. I. and Downward, J. (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.* 269, 3913–3916

64. Bret B. Friday, Alex A. Adjei K-ras as a target for cancer therapy *Biochimica et Biophysica Acta* 1756 (2005) 127-144

65. Krieken J.H.J.M., Jung A., Kirchner T., Carneiro F, Seruca R., Bosman F.T., Quirkne P., Flejou J.F., Hansen P.T., de Hertogh G., Jares P., Langner C., Hoefler G., Ligtenberg M., Tiniakos D., Tejpar S., Bevilacqua G., Ensari A. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program *Virchows Arch* (2008) 453:417-431

66. M. Maekawa, E. Nishida, T. Tanoue, Identification of the Antiproliferative protein Tob as a MAPK substrate, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37783 – 37787

67. P.P. Roux, B.A. Ballif, R. Anjum, S.P. Gygi, J. Blenis, Tumorpromoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13489 – 13494

68. B.J. Ledwith, S. Manam, A.R. Kraynak, W.W. Nichols, M.O. Bradley, Antisense-fos RNA causes partial reversion of the transformed phenotypes induced by the c-Ha-ras oncogene, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 1545 – 1555

69. A. Bernards, J. Settleman, GAP control: regulating the regulators of small GTPases, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 377– 385.),

70. Antonio T Baines, Dapeng Xu & Channing J Der Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues

71. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer και KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild type metastatic colorectal cancer *British Journal of Cancer* (2009) 101,715-721



72. **Lievre A., Bachet JB, Le Corre D., Boige V., Landi B., Emile JF., Cote JF., Tomasic G., Penna C., Ducreux M., Rougier P., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P. KRAS Mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer Cancer Res 2006;66:3992-3995**
73. **Amado R.G., Wolf M., Peeters, Van Cutsem E., Siena S., Freeman D.J., Juan T., Sikorski R., Suggs S., Radinsky R., Patterson S.D., Chang D.D. Wild-Type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer J Clin Oncol 2008;26:1626-1634**
74. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-182**
75. **Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. Annu Rev Biochem 1979;48: 193-216**
76. **Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. Cancer Invest 1991;9:553-562**
77. **Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. Int J Cancer 1997;70:722-726**
78. **Herbst RS, Langer CJ. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: The emergin role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancer. Semin Oncol 2002;29:27-36**
79. **Fujito S, Enokimori T, Tezuka N, et al. A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer. Eur J Cancer 1996;32A:2070-2074**
80. **Pavelic K, Banjac Z, Pavelic J, et al. Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma. Anticancer Res 1993;13:1133-1137**
81. **Vallbohmer D, Zhan W, Gordon M, Yand DY, Yun J, Press OA, Rhodes KE, Sherrod AE, Iqbal S, Danenberg KD, Groshen S, Lenz HJ (2005) Molecular determinants of cetuximab efficacy J Clin Oncol 23:3536-3544**
82. **Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F, Park S, Tanaka K, Danenberg PV, Baron AE, Crino L Franklin WA, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M, Danenberg KD, Hirsch FR (2006) Epideraml growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 12:3078-3084**

83. Mauro Moroni, Silvio Veronese, Silvia Benvenuti, Giovanna Marrapese, Andrea Sartore-Bianchi, Federica Di Nicalantonio, Marcello Gambacorta, Salvatore Siena, Alberto Bardelli. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005;6:279-86
84. Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med* 2004;351:2883.
85. Liang H, Zhang J, Shao C, Lijing Z, Xu W, Sutherland L, Wang K Differential expression of RBM5, EGFR and KRAS mRNA and protein in non-small cell lung cancer tissues. *Journal of Experimental & Clinical Research* 2012, 31:36
86. E Birkeland, E Wik, S Mjøs, EA Hoivik, J Trovik, HMJ Werner, K Kusonmano, K Petersen, MB Raeder, F Holst, AM Øyan, K-H Kalland, LA Akslen, R Simon, C Krakstad and HB Salvesen KRAS gene amplification and overexpression but not mutation associates with aggressive and metastatic endometrial cancer. *British Journal of Cancer* (2012) 107, 1997-2004
87. V Ki Young Chung, Jinru Shia, Nancy E. Kemeny, Manish Shah, Gary K. Schwartz, Archie Tse, Audrey Hamilton, Dorothy Pan, Deborah Schrag, Lawrence Schwartz, David S. Klimstra, Daniel Fridman, David P. Kelsen, and Leonard B. Saltz Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors That Do Not Express the Epidermal Growth Factor Receptor by Immunohistochemistry *J Clin Oncol* 2005, 23:1803-1810
88. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, et al: Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: Variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 52:893-901, 2004
89. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A., Nicolantonio F., Gambacorta M., Siena S., Bardelli A.: Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to anti-EGFR treatment in colorectal cancer: A cohort study. *Lancet Oncol* 6:279-286, 2005
90. Andrea Sartore-Bianchi, Mauro Moroni, Silvio Veronese, Carlo Carnaghi, Emilio Bajetta, Gabriele Luppi, Alberto Sobrero, Carlo Barone, Stefano Cascinu, Giuseppe Colucci, Enrico Cortesi, Michele Nichelatti, Marcello Gambacorta, and Salvatore Siena Epidermal Growth Factor Receptor Gene Copy Number and Clinical Outcome of Metastatic Colorectal Cancer Treated With Panitumumab *J Clin Oncol* 2007 25:3238-3245
91. Antoine Italiano, Philippe Follana, Francois-Xavier Caroli, Jean-Luc Badetti, Daniel Benchimol, Georges Garnier, Jean Gugenheim, Juliette Haudebourg, Frederique

Keslair, Gerard Lesbats, Grard Lledo, Jean-Francois Roussel, Florence Pedeutour and Eric Francois Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors for Which FISH Analysis Does Not Detect an Increase in EGFR Gene Copy Number *Annals of Surgical Oncology* 15(2):649–654

92. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, et al.: Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* 2011, 60: 397-411.

93. Tedesco KL, Lockhart AC, Berlin JD.: The epidermal growth factor receptor as a target for gastrointestinal cancer therapy. *Curr Treat Options Oncol* 2004, 5:393– 403.

94. Harding J, Burtneess B.: Cetuximab: An epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 2005, 41:107–127.

95. CL Arteaga et al.: Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The Oncologist* 2002, 7: 31-39.

96. Garcia-Alfonso, P., Salazar, R., Garcia-Foncillas, J., Musulen, E., Garcia-Carbonero, R., Paya, A., Perez-Segura, P., Ramon y Cajal, S., Navarro, S.: Guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma (CRC): a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol.* 2012, 14: 726–739.

97. Messa C, Russo F, Caruso, MG, et al.: EGF, TGF- $\alpha$ , and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 1998, 37:285–289.

98. Malecka-Panas E, Fligiel SE, Relan NK, et al.: Azoxymethane enhances ligand-induced activation of EGF receptor tyrosine kinase in the colonic mucosa of rats. *Carcinogenesis* 1996, 17:233–237.

99. Roberts RB, Min L, Washington MK, et al.: Importance of epidermal growth factor receptor signaling in establishment of adenomas and maintenance of carcinomas during intestinal tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:1521–1526.

100. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, et al.: The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdm gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993, 71:2454–2460.

101. McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al.: Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002, 38:2258–2264.

102. Ki Young Chung, Jinru Shia, Nancy E. Kemeny, Manish Shah, Gary K. Schwartz, Archie Tse, Audrey Hamilton, Dorothy Pan, Deborah Schrag, Lawrence Schwartz, David S.

Klimstra, Daniel Fridman, David P. Kelsen, and Leonard B. Saltz.: Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors That Do Not Express the Epidermal Growth Factor Receptor by Immunohistochemistry. *J ClinOncol* 2005, 23: 1803-1810.

103. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, et al: Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: Variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2004, 52: 893-901.

104. Andrea Sartore-Bianchi, Mauro Moroni, Silvio Veronese, Carlo Carnaghi, Emilio Bajetta, Gabriele Luppi, Alberto Sobrero, Carlo Barone, Stefano Cascinu, Giuseppe Colucci, Enrico Cortesi, Michele Nichelatti, Marcello Gambacorta, and Salvatore Siena Epidermal Growth Factor Receptor Gene Copy Number and Clinical Outcome of Metastatic Colorectal Cancer Treated With Panitumumab *J ClinOncol* 2007 25:3238-3245.

105. Antoine Italiano, Philippe Follana, Francois-Xavier Caroli, Jean-Luc Badetti, Daniel Benchimol, Georges Garnier, Jean Gugenheim, Juliette Haudebourg, Frederique Keslair, Gerard Lesbats, Grard Lledo, Jean-Francois Roussel, Florence Pedeutour and Eric Francois Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors for Which FISH Analysis Does Not Detect an Increase in EGFR Gene Copy Number *Annals of Surgical Oncology* 15(2):649–654

106. Ma ES, Wong CL, Law FB et al. Detection of *KRAS* mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis. *J Clin Pathol* 2009; 62:886–89.

107. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancer to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* 2007, 67:2643-2648

108. Albert J. Wong, Sandra H. Bigner, Darrel D. Bigner, Kenneth W. Kinzler, Stanley R. Hamilton, Bert Vogelstein Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84, pp. 6899-6903, October 1987

109. Rohit Bhargava, William L Gerald, Allan R Li, Qiulu Pan, Priti Lal, Marc Ladanyi and Beiyun Chen EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations *Modern Pathology* (2005) 18, 1027–1033

110. Frank Gebhardt, Kurt S. Zanker, and Burkhard Brandt Modulation of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Transcription by a Polymorphic Dinucleotide Repeat in Intron 1 *Vol. 274, No. 19, Issue of May 7, pp. 13176–13180, 1999*

- 111. D Seth, K Shaw, J Jazayeri and PJ Leedman Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF- $\alpha$  in human prostate cancer cells British Journal of Cancer (1999) 80(5/6), 657–669**
- 112. Yoshihiro Jinno, Glenn T.Merlino and Ira Pastan A novel effect of EGF on mRNA stability Nucleic Acids Research Volume 16 Number 11 1988**