



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Βασιλόπουλος**



**Διδακτορική Διατριβή**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΟΝΟ-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (SNP) ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΗΣ ΘΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΟΛΟΟΡΘΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ.**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΟΛΟΟΡΘΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»**

Υπό

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟ-ΒΕΛΛΙΟ ΚΑΜΠΟΣΙΩΡΑ, MD, FRCP**

**ΕΙΔΙΚΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

**Consultant in Medical Oncology, The Midyorkshire Hospitals NHS Trust, UK**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

© 2018 ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ-ΒΕΛΛΙΟΣ ΚΑΜΠΟΣΙΩΡΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5218, 2<sup>η</sup>/20-09-2018 ΓΣΕΣ):

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής (Επιβλέπων)** Δρ. Γεώργιος Βασιλόπουλος  
Καθηγητής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Χρίστος Παπανδρέου  
Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Σπυρίδων Ποταμιάνος  
Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Δήμας  
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης  
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ανδρέας Καψωριτάκης  
Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Παναγιώτης Λιάκος  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## *Ευχαριστίες*

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο ερευνητικό κέντρο Wellcome Trust Brenner Building, του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου St James's στο Leeds του Ηνωμένου Βασιλείου και στο ερευνητικό εργαστήριο του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του νοσοκομείου Μετροπόλιταν στον Πειραιά Αττικής.

Ευχαριστώ θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές της τριμελούς επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής Καθηγητές Δρ. Γεώργιο Βασιλόπουλο, Χρήστο Παπανδρέου και Σπυρίδων Ποταμιάνο για την αμέριστη βοήθειά τους στην εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης. Ευγνώμων αισθάνομαι απέναντι στον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Κωνσταντίνο Δήμα για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του, καθώς και για την καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τη συνεισφορά του Καθηγητή Δρ. Γεωργίου Φούντζηλα, του Βιολόγου Dr. Sam Murray, της βιοστατιστικού Κυριακής Μανούσου και βεβαίως ένα τεράστιο ευχαριστώ στους ασθενείς που συμμετέχουν στα ερευνητικά πρωτόκολλα της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας (ΕΣΟΟ). Ξεχωριστή μνεία θα ήθελα να κάνω στους συνεργάτες Dr Alan Anthoney και Dr Francesco Del Galdo που συνέβαλαν καίρια στην απόκτηση της υποτροφίας μου από τη European Society of Medical Oncology. Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω τον εκλιπόντα Καθηγητή Δρ. Ευάγγελο Μπριασούλη ο οποίος με καθοδήγησε στα πρώτα βήματα της επιστημονικής μου πορείας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στη μητέρα μου Βασιλική για την αμέριστη στήριξη της και στον πατέρα μου Δημοσθένη που αγωνίστηκε για να εκπληρώσω το όνειρο μου της απόκτησης του πτυχίου Ιατρικής .

Τέλος, ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά τον άνθρωπο η οποία έχει στηρίξει τόσο εμένα όσο και τα υπέροχα παιδιά μας Δημοσθένη και Ιάσωνα σε όλη μου την πορεία έως σήμερα, τη σύζυγό μου Ιωάννα.

*De profundis*

*Κωνσταντίνος-Βελλιος Καμποσιώρας*

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### Προσωπικές πληροφορίες

**Επώνυμο:** Καμποσιώρας  
**Όνομα:** Κωνσταντίνος-Βέλλιος  
**Ημερομηνία γέννησης:** 17 Νοεμβρίου 1975  
**Τόπος γέννησης:** Αθήνα  
**Υπηκοότητα:** Ελληνική  
**Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμος, πατέρας 2 παιδιών  
**Διεύθυνση κατοικίας:** 1Headingley Mews, WF1 3AB, Wakefield, UK  
**Τηλέφωνο εργασίας:** +44 01924 543838  
**Κινητό τηλέφωνο:** +44 0750034771  
**E-mail:** [kambkons1@yahoo.gr](mailto:kambkons1@yahoo.gr);  
[konstantinos.kamposioras@midvorks.nhs.uk](mailto:konstantinos.kamposioras@midvorks.nhs.uk)

### Σπουδές

- 1993 Απολυτήριο Λυκείου με βαθμό «Πολύ Καλά»
- 2000 Πτυχιούχος του Ιατρικού Πανεπιστημίου “Albert Szent Gyorgyi” Szeged-Ιατρική Σχολή, Ουγγαρίας (αγγλόφωνο πρόγραμμα ) με βαθμό πτυχίου «Άριστα»
- 2001 Αναγνώριση του Τίτλου Σπουδών Doctor of General Medicine, που απονεμήθηκε από το άνωθεν πανεπιστήμιο, ως ισότιμος και αντίστοιχος προς τα χορηγούμενα πτυχία από τα Τμήματα Ιατρικής των Σχολών Επιστήμων Υγείας των Ελληνικών Α.Ε.Ι.

### Τίτλοι-Βεβαιώσεις

- Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας (Αθήνα 21/01/2010)
- European Certification in Medical Oncology (Berlin 20/09/2009)

### Μεταπτυχιακή κλινική εμπειρία

07/2013-Σήμερα Consultant in Medical Oncology, the Mid Yorkshire Hospitals NHS Trust, UK; Upper GI Cancer Lead; Cancer Research Lead; Acute Oncology Lead

07/2103-04/2016 Honorary Consultant in Leeds Teaching Hospital NHS Trust

07/2011-07/2013 Επιμελητής Β Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

03/2011- 02/2012 Honorary Clinical and Research Fellow στο Ογκολογικό τμήμα του St James’ Hospital, Leeds, UK (ομάδα Γαστρεντερικού καρκίνου και μελετών φάσης Ι)

03/2010-02/2011 Επικουρικός Επιμελητής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

09/2009-11/2009 Honorary Clinical Fellow στο Ογκολογικό τμήμα του St James’ Hospital, Leeds, UK (ομάδα Γαστρεντερικού καρκίνου και μελετών φάσης Ι)

11/2007 – 01/2010	Ειδικευόμενος Παθολογικής-Ογκολογίας , Ογκολογικό τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ», Αθήνα
08/2008-09/2007	Ειδικευόμενος Παθολογικής-Ογκολογίας, Ογκολογικό τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων
04/2004-05/2006	Ειδικευόμενος Παθολογίας στο Π.Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο»
01/2003-09/2003	Ειδικευόμενος Παθολογίας στο Ναυτικό Νοσοκομείο Σαλαμίνας
11/2001 – 12/2002	Αγροτικός Ιατρός Άγονου περιφερικού ιατρείου Δαμασκηιάς
07/2001 – 10/2001	Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο Κοζάνης

### Διακρίσεις -Υπότροφίες

- **ESMO Travel Grant:** for attending the “*ESMO Precentorship on Gastric cancer*” (Berlin-Germany 7-8/12/2012)
- **ESMO Translational Research Fellowship** με τίτλο “*Molecular characterisation of the stromal microenvironment in pancreatic adenocarcinoma and its role in tumour progression and prognosis*” στο St James' Institute of Oncology (Leeds, UK), Section of Oncology and Clinical Research; Cancer Research UK Clinical Centre (2010)
- Υπότροφος Εξωτερικού **Εταιρείας Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ)** στα πλαίσια των Ερευνητικών Προγραμμάτων 2010
- **ESMO Clinical Visit** στη μονάδα σαρκώματος του Instituto Nazionale Tumori, Milan, Italy (11/01/2010-16/02/2010)
- **ESMO TRU Visit** “Focus on GIST, STS, Melanoma”– (Instituto Nazionale Tumori, Milan, Italy 6-9/10/2008)
- Υπότροφος Εσωτερικού **Εταιρείας Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ)** στα πλαίσια των Ερευνητικών Προγραμμάτων 2006 για την εκπόνηση έρευνας με θέμα «Μελέτη Σημειακών Μεταλλάξεων του Υποδοχέα EGFR σε Πρωτοπαθή Καρκινώματα των Χοληφόρων και Συσχέτιση με Κλινικο-Παθολογοανατομικά Χαρακτηριστικά»
- **ESMO - Travel Grant** για την παρακολούθηση του *33rd ESMO Congress, (12-16 September 2008, Stockholm Sweden)*
- **ESMO - Travel Grant** για την παρακολούθηση του *1st international conference “Translational Research in Oncology”* (Forli/Italy 14-16/5/2008)

### Ερευνητική Δραστηριότητα/Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα

- Cancer Research Lead στο MidYorkshire Hospitals NHS Trust
- Κύριος ερευνητής (Principal Investigator) σε κλινικές μελέτες για ασθενείς με νεοπλασίες του γαστρεντερικού συστήματος στο MidYorkshire Hospitals NHS Trust (GO2, RTL advanced, RTL perioperative, FOCUS-4, FOXROT, SCOT, Add-Aspirin, Easy- Switch)
- Ερευνητική εμπειρία στο τμήμα Early Phase Clinical Trials Clinic του Leeds Teaching Hospital υπό την καθοδήγηση του Dr Anthoney (2011-2012)
- Μέλος του προγράμματος *EUROCHIP 2* Hellenic Group (από 5/2006) με συμμετοχή στη συνάντηση του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (31/5/07) με θέμα: “Discussion for the development of a population based Cancer Registry in Greece”. (*To*

*EUROCHIP είναι ένα πολυεθνικό πρόγραμμα επιδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα με στόχους την προώθηση της πρόληψης, τις διαδικασίες έγκαιρης διάγνωσης και τον έλεγχο του καρκίνου). Στα πλαίσια του προγράμματος συμμετείχα σε εντατικό εκπαιδευτικό πρόγραμμα με θέμα “Cancer Registries planning and Implementation” (29/5/06-09/06/06, Reggio Emilia, Italy)*

- Γραμματέας και ερευνητής της Πανελλήνιας Ένωση Διαρκούς Ιατρικής Έρευνας-*PanHellenic Association for Continual Medical Research-PACMeR*). Η PACMeR πραγματοποίησε μεγάλη πανελλαδική έρευνα για τις πρακτικές πρωτογενούς πρόληψης στον ελληνικό πληθυσμό και τις συνήθειες ιατρών πρωτοβάθμιας υγείας ως προς τη συνταγογράφηση προληπτικών εξετάσεων

### **Διδακτική εμπειρία**

- Εκπαιδευτικός υπεύθυνος για ειδικευόμενους ιατρούς και νοσηλευτικό προσωπικό στο Mid Yorkshire Hospitals NHS Trust (Advanced Nurse Practitioner και Upper GI specialist Nurse) (2015-)
- Διαλέξεις σε τεταρτοετείς φοιτητές ιατρικής για τη βιολογία του καρκίνου, καρκίνο του μαστού και Ογκολογικά επεισόδια (2010-2012)
- Διαλέξεις στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα Μοριακής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας (2010)
- Εκπαιδευτής στο ΙΕΚ ΕΚΑΒ ΚΟΖΑΝΗΣ στην ειδικότητα « διασώστης - πλήρωμα ασθενοφόρου» (2002-2003)

### **Μέλος επιστημονικών επιτροπών**

- Προεδρεύων (Chair) του ESMO Oncology PRO Working Group (2018-2020)
- Μέλος του ESMO GI faculty group (2018-)
- Μέλος του ESMO Oncology PRO Working Group (2012-2018)
- Εκλεγμένο Μέλος τη επιτροπής της Ομάδας Νέων Ελλήνων Ογκολόγων (από τον Απρίλιο 2011)
  - Υπεύθυνος Επικοινωνίας της Ιστοσελίδας της ΕΟΠΕ για τη ONEO
- Flims Alumni Club (2012 – σήμερα)
- ESMO Young Oncology Committee (YOC) (2009-2013)
  - Υπεύθυνος του YOC Journal club
- EUROCHIP-2 Hellenic Group (5/2006-5/2007)
- Γραμματέας της PanHellenic Association for Continual Medical Research (PACMeR)

### Δημοσιευμένες εργασίες σχετικά με τη διδακτορική διατριβή

**Kamposioras K**, Tsimplouli C, Verbeke C, Anthony A, Daoukopoulou A, Papandreou C, Sakellaridis N, Vassilopoulos G, Potamianos S, Liakouli V, Migneco F, Del Galdo F, Dimas K. *Silencing of caveolin-1 in fibroblasts rather than in epithelial tumour cells results in increased tumor growth rate and chemoresistance in a human pancreatic cancer model* (Accepted in International Journal of Oncology)

### Υποτροφίες σχετιζόμενες με τη διδακτορική διατριβή

ESMO Translational Research Fellowship: “*Molecular characterisation of the stromal microenvironment in pancreatic adenocarcinoma and its role in tumour progression and prognosis*” St James' Institute of Oncology (Leeds, UK), Section of Oncology and Clinical Research; Cancer Research UK Clinical Centre (2010)

### Παρουσιάσεις αναρτημένων ανακοινώσεων (Posters) σχετιζόμενες με τη διδακτορική διατριβή

- Kamposioras K., Tsimplouli C, Migneco G., Papadopoulos V., Anthony A., Papandreou C., Sakellaridis N., DelGaldo F., Dimas K The role of caveolin-1 in aggressiveness and chemo-resistance of pancreatic duct adenocarcinoma 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, Σμύρνη 2015
- K. Kamposioras, A. Anthony, A. Cairns, C. Menon, AM Smith, C. Verbeke, F. DelGaldo Lack of Caveolin-1 Mimics SHH Stimulation in Pancreatic Adenocarcinoma, Promoting EMT and Tumour Migration EACR-22, Βαρκελώνη 2012

### Άλλες δημοσιευμένες εργασίες

1. Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, Magouliotis D, **Kamposioras K**, Ulukaya E, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? J Proteomics. 2018 Feb 1. pii: S1874-3919(18)30043-5
2. Papaxoinis G, **Kamposioras K**, Germetaki T, Weaver J, Stamatopoulou S, Nasralla M, Zoe Kordatou Z, Owen-Holt V, Anthony A, Mansoor W Predictive factors of thromboembolic complications in patients with esophagogastric adenocarcinoma undergoing preoperative chemotherapy Acta Oncol. 2018 Jan 8:1-9.
3. Papadopoulos V, Tsapakidis K, Riobo Del Galdo NA, Papandreou CN, Del Galdo F, Anthony A, Sakellaridis N, Dimas K, **Kamposioras K**. The Prognostic Significance of the Hedgehog Signaling Pathway in Colorectal Cancer. Clin Colorectal Cancer. 2016 Jun;15(2):116-27.
4. Califano R, Karamouzis MV, Banerjee S, de Azambuja E, Guarneri V, Hutka M, Jordan K, **Kamposioras K**, Martinelli E, Corral J, Postel-Vinay S, Preusser M, Porcu L, Torri V. Use of adjuvant chemotherapy (CT) and radiotherapy (RT) in incompletely resected (R1) early stage Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): a



- European survey conducted by the European Society for Medical Oncology (ESMO) young oncologists committee. *Lung Cancer*. 2014 Jul;85(1):74-80.
5. **Kamposioras K**, Anthoney A, Fernández Moro C, Cairns A, Smith AM, Liaskos C, Verbeke CS. Impact of intrapancreatic or extrapancreatic bile duct involvement on survival following pancreatoduodenectomy for common bile duct cancer. *Br J Surg*. 2014 Jan;101(2):89-99.
  6. **Kamposioras K**, Konstantara A, Kotoula V, Lakis S, Kouvatseas G, Akriviadis E, Vrettou E, Dionysopoulos D, Krikelis D, Papadopoulou K, Charalambous E, Chrisafi S, Konstantaras C, Fountzilias G. The prognostic significance of WNT pathway in surgically-treated colorectal cancer:  $\beta$ -catenin expression predicts for disease-free survival. *Anticancer Res*. 2013 Oct;33(10):4573-84.
  7. **Kamposioras K.**, Pentheroudakis G., Pavlidis N Exploring the Biology of Cancer of Unknown Primary: breakthroughs and drawbacks. *European Journal of Clinical Investigation*. 2013 May;43(5):491-500.
  8. Vlachostergios PJ, Gioulbasanis I, Ghosh S, Tsatsanis C, Papatsibas G, Xyrafas A, Hatzidaki E, Vasiliou C, **Kamposioras K**, Agelaki S, Margioris AN, Nasi D, Georgoulis V, Papandreou CN. Predictive and prognostic value of LPS-stimulated cytokine secretion in metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol*. 2013 Mar 5.
  9. Vrettos I., **Kamposioras K**, Peridis S., Aninos D., Kazika S., Spathis A., Karakitsios P., Angelos Papadopoulos A. Concurrent pleural infiltration by Chronic Lymphocytic Leukemia and adenocarcinoma of unknown primary site diagnosed by effusion cytology *Diagnostic Cytopathology Diagn Cytopathol*. 2012 Jul 26
  10. Papatsimpas G, **Kamposioras K.** , Kallirroï Goula K, Papaparaskeva K., Loukides S, Kotoulas C., Kelekis N.e, Nikolaos Xiros N. Pectasides D. Koumarianou A Hepatoid Pancoast tumor. A case report and review of the literature *Lung Cancer*. 2012 Aug;77(2):239-45
  11. Vrettos I, **Kamposioras K**, Kontodimopoulos N, Pappa E, Georgiadou E, Haritos D, Papadopoulos AA, Niakas D. Comparing Health-Related Quality of Life of Cancer Patients under Chemotherapy and of Their Caregivers. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:135283.
  12. Tzovaras AA, **Kamposioras K**, Ardavanis A. Predictors for the development of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: in search for the most accurate biomarker. *Arch Med Sci*. 2011 Dec 31;7(6):925-7.
  13. Vlachostergios PJ, Gioulbasanis I, **Kamposioras K**, Georgoulis P, Baracos VE, Ghosh S, Maragouli E, Georgoulis V, Papandreou CN. Baseline Insulin-Like Growth Factor-I Plasma Levels, Systemic Inflammation, Weight Loss and Clinical Outcome in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Oncology*. 2011 Oct 4;81(2):113-118.
  14. Apostol I, Baban A, Nicula F, Suteu O, Coza D, Amati C, Baili P; EUROCHIP Working Group. Cervical cancer assessment in Romania under EUROCHIP-2. *Tumori*. 2010 Jul-Aug;96(4):545-52.
  15. Valerianova Z, Panayotova Y, Amati C, Baili P; EUROCHIP Working Group. Cervical cancer screening in Bulgaria--past and present experience. *Tumori*. 2010 Jul-Aug;96(4):538-44.
  16. Viberga I, Engele L, Baili P; EUROCHIP Working Group. Past, present and future of the cervical cancer screening in Latvia. *Tumori*. 2010 Jul-Aug;96(4):529-37.

17. Veerus P, Arbyn M, Amati C, Paolo B; EUROCHIP Working Group. Impact of implementing a nationwide cervical cancer screening program on female population coverage by Pap-tests in Estonia. *Tumori*. 2010 Jul-Aug;96(4):524-8
18. **Kamposioras K**, Pentheroudakis G., Pectasides D, Pavlidis N. Malignant Melanoma of Unknown Primary site. To make the long story short. A systematic review of the literature *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 May 28.
19. Karampoiki V., Alevizaki P., Lakiotis V., Loukidou E., Terzoudi A., Gkinosati A., Panou C., Ioakeimidou A., **Kamposioras K.**, Valachis A., Tsali L., Pantazi E., Koukourakis G., Karathanasi I., Thanopoulou E., Mauri D. Evaluating the strength of potential misplaced priorities in opportunistic cancer screening practice in Greece *J BUON*. 2010 Jan-Mar;15(1):164-73
20. Papadopoulos A., Vrettos I., **Kamposioras K.**, Anagnostopoulos F., Giannopoulos G., Pectasides D., Niakas D., Economopoulos T. Impact of cancer patients' disease awareness on their family members' health related quality of life (HRQL) A cross-sectional survey *Psychooncology*. 2010 Mar 17. [Epub ahead of print]
21. Mauri D, **Kamposioras K**, Tsali L, Bristianou M, Valachis A, Karathanasi I, Georgiou C, Polyzos NP. Overall survival benefit for weekly vs. three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2010 Feb;36(1):69-74.
22. Koukourakis G., Kouloulis V., Platoni K., Koukourakis M., Maravelis G., Fotineas A., Zacharias G., **Kamposioras K.**, Mauri D., Kelekis N. Results of a five split-field technique of postoperative 3d radiation therapy in patients with gastric adenocarcinoma *Cancer Therapy Vol 7*, 373-377, 2009
23. Mauri D, Valachis A, Polyzos IP, Polyzos NP, **Kamposioras K**, Pesce LL. Osteonecrosis of the jaw and use of bisphosphonates in adjuvant breast cancer treatment: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Aug;116(3):433-9. Epub 2009 Jun 12.
24. Pectasides D, Pectasides E, Papaxoinis G, Koumarianou A, Psyrris A, Xiros N, Tountas N, **Kamposioras K**, Papatsibas G, Floros T, Gouveris P, Karageorgopoulou S, Economopoulos T. Combination chemotherapy with docetaxel, vinorelbine and estramustine phosphate in metastatic androgen-resistant prostate cancer: a single institution experience. *Anticancer Res*. 2009 Feb;29(2):769-75.
25. D. Mauri, C. Panou, A. Valachis, **K. Kamposioras**, L. Tsali Tyrosine kinase inhibitors in treatment of fibrous histiocytoma *Exp Oncol* 2009 31, 1, 1–3
26. D. Mauri, A. Valachis, N. P. Polyzos, I. Cortinovis, V. Karampoiki, E. Loukidou, P. Alevizaki, **K. Kamposioras**, G. Kouris, P. Alexandropoulou, L. Tsali, C. Panou, A. Stamatelopoulos, V. Lakiotis, A. Spiliopoulou, A. Terzoudi, A. Ioakimidou, I. Karathanasi, M. Bristianou, G. Casazz, N. Pavlidis Screening practice and misplaced priorities *Clinical and Translational Oncology* (accepted)
27. Mauri D, Karampoiki V, Mauri J, **Kamposioras K**, Alexiou G, Ferentinos G, Tsali L, Karathanasi I, Peponi C; SESy\_Europe Task Force. Double-blind control of the data manager doesn't have any impact on data entry reliability and should be considered as an avoidable cost. *BMC Med Res Methodol*. 2008 Oct 20;8:66.
28. Karathanasi I, **Kamposioras K**, Cortinovis I, Karampoiki V, Alevizaki P, Dambrosio M, Zorba E, Panou C, Pantazi E, Bristianou M, Kouiroukidou P, Bouiatiotis E, Xilomenos A, Zavou D, Casazza G, Mauri D; PACMeR. Moving

- ahead in diabetics' cancer screening; food for thought from the Hellenic experience. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2009 Jan 23.
29. Pectasides D, Pectasides E, Papaxoinis G, Skondra M, Gerostathou M, Karageorgopoulou S, **Kamposioras C**, Tountas N, Koumarianou A, Psyrris A, Macheras A, Economopoulos T. Testicular Function in Poor-Risk Nonseminomatous Germ Cell Tumors Treated with Methotrexate, Paclitaxel, Ifosfamide, and Cisplatin Combination Chemotherapy *J Androl*. 2009 Jan 8. [Epub ahead of print]
  30. Pectasides D, Pectasides E, Papaxoinis G, Xiros N, **Kamposioras K**, Tountas N, Economopoulos T. Methotrexate, paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin in poor-risk nonseminomatous germ cell tumors. *Urol Oncol*. 2008 Dec 24. [Epub ahead of print]
  31. **Kamposioras K**, Mauri D, Alevizaki P, Ferentinos G, Karampoiki V, Kouiroukidou P, Zorba E, Proiskos A, Chasioti D, Panou C, Gkinosati A, Chatziioannou I, Aggelinas G, Xilomenos A. Cancer screening in Greece. Guideline awareness and prescription behavior among Hellenic physicians. *Eur J Intern Med*. 2008 Oct;19(6):452-60
  32. Pectasides D, **Kamposioras K**, Papaxoinis G, Papachristodoulou . Pectasides E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer *Cancer Treat Rev*. 2008 Nov;34(7):603-13.
  33. Zacharias G, Xilomenos A, Koukourakis G, **Kamposioras K**, Mauri D, Chasioti D, Bristianou M, Ferentinos G, Levantakis I, Tsali L, Valachis A, Karampoiki V. Responsibilities in cancer preventive care in Greece. A physicians' survey *Clin Transl Oncol*. 2008 Apr;10(4):231-4.
  34. **Kamposioras K**, Mauri D, Valachis A, Tsali L, Polyzos NP. Low colorectal cancer screening rates and primary care physicians' behavior. *Am J Gastroenterol*. 2008 Mar;103(3):804-5.
  35. Briasoulis E, **Kamposioras K**, Tzovaras V, Pafitanis G, Kostoula A, Mavridis A, Pavlidis N. CENP-B specific anti-centromere autoantibodies heralding small cell lung cancer. A case study and review of the literature *Lung Cancer*. 2008 May;60(2):302-6.
  36. **Kamposioras K**, Pentheroudakis G, Malamou-Mitsi V, Pappa L, Bafa M, Pavlidis N. Can circulated lung cancer cells pass to the urine without apparent urine tract metastases? A single centre series *Lung Cancer*. 2008 Apr;60(1):141-5
  37. Karampoiki V, Flores FJ, Altinoz H, Chojnacka M, Karentzou I, Dambrosio M, Colichi C, Oxiuzova T, Kanavoura E, de Sousa BA, Ivanova D, Mauri J, Alexiou G, Mauri D, **Kamposioras K**, Maragkaki A, Peponi C. Screening Evaluation System – Europe met skin cancer screening *Cent Eur J Public Health* 2007; 15 (1): 66–68
  38. **Kamposioras K**, Mauri D, Tsekoura P, Valachis A, Tsappi M, Polyzos N Impact of chest radiography screening on healthcare spending *Am J Manag Care*. 2007; 13, 218-219
  39. Polyzos NP, Mauri D, Tsappi M, Tzioras S, **Kamposioras K**, Cortinovic I, Casazza G. Combined Vitamin C and E Supplementation During Pregnancy For Preeclampsia Prevention: A Systematic Review. *Obstet Gynecol Surv*. 2007 Mar;62(3):202-206.
  40. Pazarlis P, Mauri D, Cortinovic I, Katsigiannopoulos K, Alevizaki P, Koukourakis G, Casazza G, **Kamposioras K**, Chatziioannou I, Milousis A, Papakonstantinou A, Karathanasi I, Alexiou G, Proiskos A, Mitrogianni Z, Peponi C. Socio-

- demographic status and alcohol drinking patterns among Greek healthy adults. *Cent Eur J Public Health*. 2006 Dec;14(4):160-7.
41. D. Mauri, **K. Kamposioras**, N.P. Polyzos, F. J. Rivas Flores, H. Altinoz, M. Chojnacka, I. Karentzou, M. Dambrosio, C. Colich, , T. Oxiuzova, E. Kanavoura<sup>8</sup>, B. A. M. da Silva Alves deSousa, D. Ivanova, J. Mauri, V.Karampoiki, A. Maragkaki, A. Xilomenos Rethinking anticancer screening strategies saving lives at front line. Results from SESy\_Europe task force *Exp Oncol*. 2006 Sep;28(3):252-3.
  42. Mauri D, **Kamposioras K**, Proiskos A, Xilomenos A, Peponi C, Dambrosio M, Zacharias G, Koukourakis G, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Old Habits Die Hard: Chest Radiography for Screening Purpose in Primary Care *Am J Manag Care*. 2006;12:650-656
  43. Polyzos NP, Vittoraki A, Tsappi M, Mauri D, Spiliopoulou A, Tzioras S, **Kamposioras K**, Ioakeimidou A. Food for Thought in Women's health. Gynecologist: New European Gatekeeper in Chlamydia Trachomatis infection *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85(10):1156-9.
  44. **Kamposioras K**, Mauri D, Golfopoulos V, Ferentinos G, Zacharias G, Xilomenos A, Polyzos P. N, Bristianou M, Chasioti D, Milousis A, Vittoraki A, Koukourakis G, Chatziioannou I, Papadopoulos P. Colorectal cancer screening coverage in Greece. PACMeR 02.01 study collaboration. *Int J Colorectal Dis*. 2007 May;22(5):475-81
  45. Elefsiniotis IS, Vezali E, **Kamposioras K**, Pantazis KD, Tontorova R, Ketikoglou I, Moulakakis A, Saroglou G. Immunogenicity of recombinant hepatitis b vaccine in treatment-naïve and treatment-experienced chronic hepatitis c patients. the effect of pegylated Interferon plus ribavirin treatment *World J Gastroenterol* 2006 July 21; 12(27): 4420-4424
  46. Xilomenos A, Mauri D, **Kamposioras K**, Gkinosati A, Zacharias G, Sidiropoulou V, Papadopoulos P, Chatzimichalis G, Golfopoulos V, Peponi C, Pacmer PA. Colorectal cancer screening awareness among physicians in Greece. *BMC Gastroenterol*. 2006 Jun 6; 6:18.
  47. **Kamposioras K**, Casazza G, Mauri D, Lakiotis V, Cortinovic I, Xilomenos A, Peponi C, Golfopoulos V, Milousis A, Kakaridis D, Zacharias G, Karathanasi I, Ferentinos G, Proiskos A, Panhellenic Association For Continual Medical Research. Screening chest radiography results from a Greek cross-sectional survey. *BMC Public Health*. 2006 Apr 29;6:113.
  48. Proiskos A, Loukidou E, **Kamposioras K**, Bristianou M, Zina V, Pliadi O, Karakatsanis A, Alexiou G, Gkoukoutsis A, Mauri D. Screening chest radiography in Primary Care: an underestimate belief *Eur J Gen Pract*. 2005 Jun;11(2):76-7

## Δημοσιευμένες εργασίες σε ελληνικά περιοδικά:

1. M. Lotti -Lykousa, A.A. Papadopoulos, I. Vrettos, **K. Kamposioras**, E. Pappa, P. Andriopoulos, D. Niakas The incidence of depression in primary health care *Arch Hellen Med*, 29(1), January-February 2012, 77-84
2. I. Gioulbasanis, **K. Kamposioras**, D. Doufexis, P.J. Vlachostergios, M. Makridou, Z. Giannousi, S. Ghosh, M. Tzereme, C. N. Papandreou, V. Georgoulas Predictive and prognostic value of the Glasgow Prognostic Score

(GPS) in Greek patients with metastatic lung cancer Forum of Clinical Oncology March 2011

3. I. Vrettos, A. Papadopoulos, **K Kamposioras**, P. Zachos, C. Kokalis, K. Balabanis, Niakas, T. Economopoulos Clinical utility of routine chest X-ray (CXR) during patient admission in a tertiary hospital Radiothechnology 22, Winter 2010
4. I.Vrettos, **K Kamposioras**, F. Spanoudi, E.Georgiadou [Misuse of Radiological examinations: Reasons- Consequences-Interventions. Review of the literature] Radiothechnology 19 Winter 2009

#### Δημοσιευμένες εργασίες σε βιβλία

1. N. P. Polyzos, S. Tzioras, D. Mauri, M. Tsappi, A. Valachis, C. Dritsas, K. **Kamposioras** C. Panou, L. Tsali Chapter, Aromatase Inhibitors in Ovulation Induction: Myth or Reality? Aromatase Inhibitors: Types, Mode of Action and Indications Editor: J. R. Lamonte, Novapublishers
2. **K. Kamposioras** and E. Briasoulis Chapter: Hormonotherapy of bone metastases BONE METASTASES: A TRANSLATIONAL AND CLINICAL APPROACH Editors: Dimitrios Kardamakis, Edward Chow, Vassilios Vassiliou Publisher Springer (The Netherlands) (2014)
3. Mauri D, **Kamposioras K**, Valachis A, Polyzos NP, Lakiotis V, Proiskos A, Tsekoura P, Koukourakis G, Xilomenos A, Zacharias G, Karampoiki V, Karathanasi I, Spiliopoulou A. “European vs. North American cancer screening attitude and practices in primary care. A systematic review and a critical appraisal for the implementation of evidence based and non evidence based tests”. in “Health Knowledge, Attitudes, and Practices.” Editors: Patricia I. Eddington and Umberto V. Mastolli, Novapublishers, New York. [Chapter commissioned by invitation by the Editor on March 29, 2007].
4. Andrea Micheli, Paolo Baili and EUROCHIP-2 Working Chapter 9 Group Information on cancer in Responding to the challenge of cancer in Europe by Michel P Coleman, Delia-Marina Alexe, Tit Albreht, Martin McKee

Σημαντικός αριθμός παρουσιάσεων αναρτημένων ανακοινώσεων (Posters) σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια.

#### Reviewer for the following journals

Oncology Reports  
Cytopathology  
BMC Public Health  
World Journal of Gastroenterology  
Medicine  
Cancer Treatment and Research Communications  
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology

#### Editorial Board

Cancer Treatment and Research Communications

**«Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων (SNP) που αφορούν στο μεταβολισμό της οξαλιπλατινας σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο. ανάλυση αναφορικά με την τοξικότητα και την αποτελεσματικότητα.**

**Επίδραση του μικροπεριβαλλοντος στην εξέλιξη του κολοορθικού καρκίνου και άλλων νεοπλασιών του γαστρεντερικού συστήματος»**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ-ΒΕΛΛΙΟΣ ΚΑΜΠΟΣΙΩΡΑΣ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**1. Δρ. Γεώργιος Βασιλόπουλος Καθηγητής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων)**

**2. Δρ. Χρίστος Παπανδρέου Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης**

**3. Δρ. Σπυρίδων Ποταμιάνος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κακοήθειες του γαστρεντερικού συστήματος αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στο γενικό πληθυσμό. Παρά την αρχική αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων, στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα καρκινικά κύτταρα θα εμφανίσουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία ενώ οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν παρενέργειες από τη θεραπεία. Στην παρούσα μελέτη αναλύουμε το ρόλο των γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων (SNPs) σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, στην ανάπτυξη αντίστασης και τοξικότητας σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, καθώς και το ρόλο του μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη αντίστασης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου παγκρέατος.

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι πολυμορφισμοί σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να συνεισφέρουν στις διαφορές μεταξύ ασθενών στη δραστηριότητα και τοξικότητα αντινεοπλασματικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης και της οξαλιπλατίνας. Αρχικός σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η ύπαρξη πολυμορφισμών στα γονίδια επιδιόρθωσης DNA, ERCC1 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1) και XPD (Xeroderma pigmentosum group D protein) σε σχέση με την ανταπόκριση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου που έλαβαν θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνα, την ιρινοτεκάνη και τη 5-φθοριοπυριμιδίνη. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε DNA από περιφερικά μονοπύρηνια και χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR-RFLP (polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism) για να καθοριστεί ο γονότυπος των XPD-751 και ERCC1-118. Η ύπαρξη των SNPs συσχετίστηκε αναδρομικά με τα κλινικά δεδομένα του πληθυσμού. Συνολικά αναλύθηκαν δείγματα από 243 ασθενείς (111 έλαβαν επικουρική θεραπεία και 132 θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου). 232 ασθενείς είχαν επιτυχές RFLP αποτέλεσμα για τον ERCC1 πολυμορφισμό και 146 για τον XPD πολυμορφισμό.

Οι δυο γονότυποι ήταν σε απόλυτη ισορροπία αλληλίων. Στο συγκεκριμένο πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των πολυμορφισμών με την τοξικότητα ή την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Εντούτοις, ο KQ πολυμορφισμός, φάνηκε να σχετίζεται με καλύτερη πενταετή επιβίωση σε ασθενείς που έλαβαν οποιαδήποτε μορφή επικουρικής θεραπείας αλλά όχι σε αυτούς που έλαβαν θεραπεία με βάση την

οξαλιπλατίνα. Η συσχέτιση του αυτή θα πρέπει να μελετηθεί προοπτικά σε μεγαλύτερο πληθυσμό που θα λάβει όμοια θεραπεία.

Η έκφραση της Caveolin-1 (Cav-1) έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του όγκου και την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία στον καρκίνο του παγκρέατος. Περαιτέρω στόχος της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση της σημασίας της έκφρασης της Cav-1 στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τους ινοβλάστες του στρώματος, στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη χημειοαντίστασης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, σε μοντέλο ανοσοανεπαρκούς ποντικού. Επιδιώξαμε επίσης να αξιολογήσουμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση της Cav-1 στο καρκινικό επιθήλιο και στο στρώμα του όγκου σε ιστολογικά δείγματα καρκίνου παγκρέατος. Η ανοσοϊστοχημική χρώση των πτωχά διαφοροποιημένων τμημάτων ιστού έδειξε ασθενή και ισχυρή έκφραση Cav-1 στα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου και στους στρωματικούς ινοβλάστες, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι καλά διαφοροποιημένες περιοχές χαρακτηρίστηκαν από ισχυρή επιθηλιακή έκφραση της Cav-1. Η μειορρύθμιση της Cav-1 σε καρκινικά κύτταρα οδήγησε σε αυξημένο πολλαπλασιασμό *in vitro*, αλλά δεν είχε αντίκτυπο στην χημειοαντοχή και την ανάπτυξη *in vivo*. Αντίθετα, η μειωμένη έκφραση του Cav-1 σε ινοβλάστες είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ανάπτυξη και τη χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων όταν ινοβλάστες και καρκινικά κύτταρα ενέθηκαν σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς, για να αναπτύξουν μεικτά ξενομοσχεύματα από ινοβλάστες και καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η μειορρύθμιση της Cav-1 σε ινοβλάστες συσχετίζεται με την ανάπτυξη αυξημένου πολλαπλασιασμού του όγκου και χημειοαντίσταση *in vivo*. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να διερευνηθεί κατά πόσον η στόχευση του Cav-1 στο στρώμα μπορεί να αντιπροσωπεύσει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παγκρέατος.



## Abstract

Gastrointestinal malignancies constitute a major cause of morbidity and mortality in the general population. Despite the initial efficacy of chemotherapeutic agents, in most cases cancer cells will develop drug resistance while patients may experience treatment side effects. In the present study we analyze the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes in the development of drug resistance and toxicity in colorectal cancer patients, as well as the role of the microenvironment in the resistance development of pancreatic cancer cell lines.

Recent data suggest that polymorphisms in DNA repair genes may contribute to patient differences in the activity and toxicity of antineoplastic drugs, including oxaliplatin. The primary objective of this study was to evaluate the relation of ERCC1 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1) and XD (Xeroderma pigmentosum group D protein) SNPs with tumor response and toxicity in a cohort of patients with colorectal cancer that received chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan or 5-fluoropyrimidine base regimes. All patients supplied a peripheral blood sample from which genomic DNA was extracted from PBMCs. A polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to determine the genotype of both XPD-751 and ERCC1-118. SNP frequency was correlated with the clinical data. In total, 243 samples patients were analyzed (111 patients received adjuvant therapy and 132 first line treatment for metastatic colorectal cancer).

Both genotypes were in allelic equilibrium. There was no correlation of toxicity and survival with the polymorphisms we studied. However, KQ SNP was predictive of improved 5 year survival in patients treated with any kind of adjuvant treatment but not in those treated with oxaliplatin based treatment. This observation should be studied prospectively in a large, homogenously treated population.

Caveolin-1 (Cav-1) expression has been correlated with tumor growth and chemotherapy resistance in pancreatic cancer. Furtheron, we explored the significance of Cav-1 expression in pancreatic cancer cells as compared to fibroblasts on cancer cell proliferation and chemoresistance, both *in vitro* and *in vivo*, in an immunodeficient mice model. We also aimed to evaluate the immunohistochemical expression of Cav-1 in the epithelial and stromal component of pancreatic

cancer tissue specimens. Immunohistochemical staining of poorly differentiated tissue sections showed strong and weak Cav-1 expression in epithelial tumor cells and stromal fibroblasts respectively. Conversely, well differentiated areas were characterized by weak epithelial Cav-1 expression. Cav-1 down regulation in cancer cells resulted in increased proliferation *in vitro*, but had no impact on chemoresistance and growth gain *in vivo*. In contrast, reduced expression of Cav-1 in fibroblasts resulted in a growth advantage and chemoresistance of cancer cells when they were co-injected in immunodeficient mice to develop mixed fibroblast/cancer cells xenografts. Our results suggest that downregulation of Cav-1 in fibroblasts correlate with increased tumor proliferation rate *in vivo* and chemoresistance. Further studies are warranted to explore whether targeting Cav-1 in the stroma may represent a novel therapeutic approach in pancreatic cancer.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	22
1.1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	22
1.1.1 Βιολογία του Καρκίνου.....	23
1.1.1.1 Αυτάρκεια σημάτων ανάπτυξης.....	25
1.1.1.2 Μη ευαισθησία σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης.....	25
1.1.1.3 Αποφυγή απόπτωσης.....	26
1.1.1.4 Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού.....	27
1.1.1.5 Επαγωγή της Αγγειογένεσης.....	28
1.1.1.6 Επέκταση και μετάσταση της νόσου.....	28
1.1.1.7 Επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού.....	31
1.1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου.....	32
1.1.2.1 Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	35
1.1.2.2 Αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος.....	42
1.1.3 Θεραπεία του καρκίνου.....	43
1.1.3.1 Χειρουργική εξαίρεση.....	43
1.1.3.2 Ακτινοθεραπεία.....	43
1.1.3.3 Αντί-Νεοπλασματικοί Παράγοντες.....	44
1.1.3.3.1 Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες.....	44
1.1.3.3.2 Ορμονικές Θεραπείες.....	48
1.1.3.3.3 Βιολογικές θεραπείες.....	49
1.1.3.3.4 Ανοσοθεραπεία.....	51
1.2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	53
1.2.1 Θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	54
1.2.2 Θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος.....	55
1.2.3 Μηχανισμοί Χημειοαντοχής.....	56
1.2.3.1 Χημειοαντοχή λόγω μειωμένης ενεργοποίησης ή/και αυξημένης απενεργοποίησης των φαρμάκων.....	58
1.2.3.2 Χημειοαντοχή οφειλόμενη σε αυξημένη κυτταρική απέκκριση φαρμάκου και μειωμένη ενδοκυττάρια συσσώρευση.....	59
1.2.3.3 Χημειοαντοχή οφειλόμενη στην αποφυγή της απόπτωσης.....	60
1.2.3.4 Τροποποίηση του φαρμακευτικού στόχου.....	61
1.2.3.5 Αλλαγές στον επισκευαστικό μηχανισμό της βλάβης του DNA.....	62
1.2.3.6 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη και χημειοαντοχή του όγκου.....	68

1.2.4	Η Καβεολίνη-1 και τα μικροσπήλαια (caveolae) .....	70
2.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	78
3.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ .....	79
3.1	Μέρος Α - Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων .....	80
3.1.1.	Απομόνωση και γενοτύπηση DNA .....	80
3.1.2	Γενοτύπηση του απομονωθέντος γενομικού DNA των ΜΚΠΑ .....	82
3.1.3	Στατιστική Ανάλυση αποτελεσμάτων .....	83
3.2	Μέρος Β – Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος 86	
3.2.1	Χημικά Αντιδραστήρια .....	86
3.2.2	Κύτταροκαλλιέργειες .....	87
3.2.3	Αποσιώπηση της Cav-1 στα κύτταρα BxPC3 .....	87
3.2.4	Αθανατοποίηση των ινοβλαστών του δέρματος και αποσιώπηση της Cav-1 .	88
3.2.5	Στύπωμα Western (Western Blot) .....	88
3.2.6	Απομόνωση RNA και ανάλυση με RT-PCR.....	90
3.2.7	Εκτίμηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού (τεχνική BrdU) .....	90
3.2.8	Τεχνική κάλυψης (επούλωσης) του κενού διακυτταρικού χώρου.....	91
3.2.9	Δοκιμή χημειοταξίας/μετανάστευσης.....	91
3.2.10	<i>In vitro</i> κυτταροτοξική δράση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων .....	93
3.2.11	<i>In vivo</i> μελέτες.....	95
3.2.12	Ανοσοϊστοχημεία.....	96
3.2.13	Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων .....	97
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	98
4.1	Μέρος Α - Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων.....	99
4.1.1	Εκτίμηση τοξικότητας.....	105
4.1.2	Συσχέτιση δεικτών επιβίωσης με τους πολυμορφισμούς σε ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία.....	116
4.1.3	Συσχέτιση δεικτών επιβίωσης με τους πολυμορφισμούς σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής .....	125
4.2	Μέρος Β – Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος. 130	
4.2.1	Η ανοσοϊστοχημική εξέταση αποκάλυψε ετερογενή έκφραση της καβεολίνης-1 σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο .....	130
4.2.2	Δημιουργία παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών με μειωμένη έκφραση Cav-1 .....	133

4.2.3	Μειορρύθμιση της έκφρασης της Cav-1 έχει σαν αποτέλεσμα την οριακή αύξηση της σύνθεσης του DNA, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αυξημένη μετανάστευση / κινητικότητα των κυττάρων BxPC3 .....	135
4.2.4	Μειορρύθμιση της έκφρασης της Cav-1 στους ινοβλάστες αυξάνει τη χημειοταξία και την ικανότητα των κυττάρων BxPC3 να μεταναστεύουν .....	137
4.2.5	Η επίδραση της έκφρασης της Cav-1 στη χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων	139
4.2.6	Μειωμένα επίπεδα Cav-1 στο στρώμα επάγουν την ανάπτυξη των όγκων από BxPC3 σε ξενομοσχεύματα.....	141
4.2.7	Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των όγκων στα ξενομοσχεύματα δεν ανέδειξε διαφορά στην ποσότητα του στρώματος μεταξύ των όγκων.....	149
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	151
5.1	Μέρος Α - Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων.....	152
5.2	Μέρος Β – Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος	159
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	165
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	167

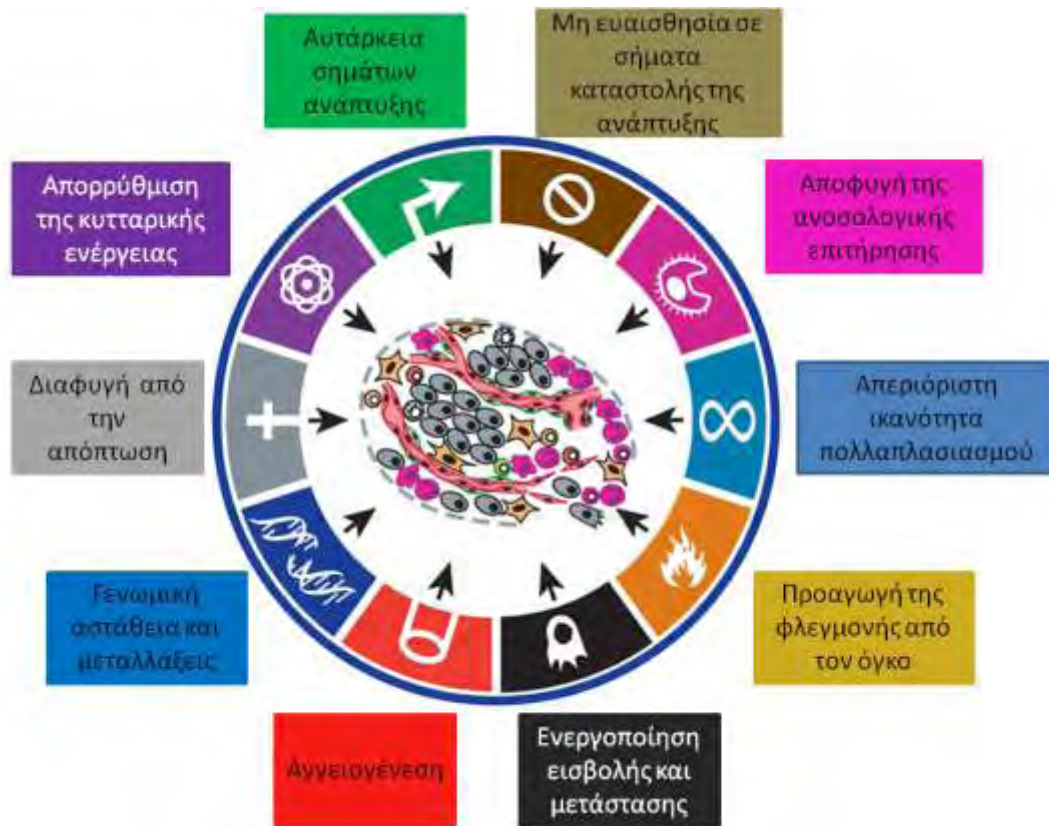
# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **1.1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### 1.1.1 Βιολογία του Καρκίνου

Με τον όρο «καρκίνο» περιγράφεται ένα σύνολο ασθενειών κατά τις οποίες μη φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού διαιρούνται ανεξέλεγκτα και μπορούν να εισβάλουν παρακείμενους ιστούς ή/και να μεταναστεύσουν σε άλλα σημεία του σώματος μέσω του αίματος (αιματογενής διασπορά) ή των λεμφαγγείων (λεμφαγγειακή διασπορά).

Η δημιουργία, η αύξηση και η εγκαθίδρυση ενός κακοήθους νεοπλασματος βασίζεται στην αυτοτελή δυσλειτουργία οκτώ βασικών ρυθμιστικών κυκλωμάτων της φυσιολογίας ενός κυττάρου, όπως αυτά περιγράφηκαν από τους Hanahan και Weinberg στην επικαιροποιημένη ανάλυση των χαρακτηριστικών του καρκίνου το 2011 (εικόνα 1) [1]. Στην αρχική τους πραγματεία, το 2000, περιέγραψαν τα πρώτα έξι κύρια χαρακτηριστικά: αυτάρκεια σημάτων ανάπτυξης, μη ευαισθησία σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης, αποφυγή σημάτων που οδηγούν στον αποπτωτικό θάνατο, απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού, παρατεταμένη αγγειογένεση, ικανότητα εισβολής σε άλλους ιστούς και μετάσταση [2]. Η περαιτέρω έρευνα και κατανόηση των διαδικασιών της καρκινογένεσης κατά τη επόμενη δεκαετία που ακολούθησε, ανέδειξε τέσσερα ακόμα χαρακτηριστικά που βοηθούν την καρκινογένεση. Την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να τροποποιήσουν ή να αναπρογραμματίσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό με αποτέλεσμα την καλύτερη υποστήριξη του πολλαπλασιασμού τους καθώς και την αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης από τα T και B λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς. Τέλος, η γενωμική αστάθεια που προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα τις γενετικές αλλοιώσεις που προωθούν την εξέλιξη του όγκου και η προαγωγή της φλεγμονής από τον όγκο.



**Εικόνα 1:** Η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων φέρουν γονότυπο που είναι αποτέλεσμα έξι βασικών αλλαγών στη φυσιολογική φυσιολογία των κυττάρων και υπαγορεύει συλλογικά την ανάπτυξη κακοήθη όγκων

Πηγή εικόνας: Hanahan and Weinberg, 2011



### **1.1.1.1 *Αυτάρκεια σημάτων ανάπτυξης***

Το θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να διατηρούν συνεχόμενο πολλαπλασιασμό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μια σειρά εναλλακτικών τρόπων: Μπορούν να παράγουν αυξητικούς παράγοντες που δρουν ως συνδέτες σε υποδοχείς που παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα, οδηγώντας σε αυτοκρινή πολλαπλασιαστική διέγερση. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να στέλνουν σήματα στα φυσιολογικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που δρουν στα καρκινικά κύτταρα [3]. Η επαγωγή των επιπέδων των υποδοχέων που μπορούν να αντιδρούν σε μικρές συγκεντρώσεις συνδετών, η ενεργοποίηση των υποδοχέων ανεξάρτητα των προσδετών καθώς και η ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μορίων κάτωθεν του υποδοχέα αποτελούν εναλλακτικούς τρόπους αυτόματου κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην τελευταία περίπτωση σωματικές μεταλλάξεις γονιδίων μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως η μετάλλαξη του B-raf γονιδίου στο κακοήθες μελάνωμα που ενεργοποιεί το Raf-MAPK μονοπάτι, και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παίζουν τα πρώτο-ογκογονίδια μέσω της μετάδοσης σημάτων μέσω υποδοχέων. Όταν όμως τα πρώτο-ογκογονίδια μεταλλαχτούν συντελούν στην απορρύθμιση της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### **1.1.1.2 *Μη ευαισθησία σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης***

Σε αντιδιαστολή, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να παρακάμπτουν ισχυρά προγράμματα που ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που φυσιολογικά καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, βοηθούν την επιδιόρθωση των λαθών του DNA και καθορίζουν τον κυτταρικό θάνατο. Όταν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δε δουλεύουν επαρκώς, τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν ανεξέλεγκτα. Περίπου 30 ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν αναγνωριστεί, όπως τα p53, BRCA1, BRCA2, APC, και RB. Τα δύο πρωτότυπα γονίδια είναι αυτά που κωδικοποιούν την

έκφραση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB) και της πρωτεΐνης TP53 που λειτουργούν κομβικά στην απόφαση για τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν ή να οδηγηθούν στον αποπτωτικό θάνατο.

### **1.1.1.3 Αποφυγή απόπτωσης**

Η απόπτωση είναι ένα στενά επιτηρούμενο γονιδιακά-καθορισμένο πρόγραμμα που ρυθμίζει την ανάπτυξη και την κυτταρική ομοιόσταση και συντελεί στην αποτελεσματική εξάλειψη των δυσλειτουργικών κυττάρων του οργανισμού. Ελαττωματική απόπτωση προκαλεί καρκίνο ή αυτοάνοσες ασθένειες ενώ αυξημένος κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκαλέσει εκφυλιστικές ασθένειες και ανοσοανεπάρκεια [4]. Υπάρχουν δυο κύριοι διακεκριμένοι οδοί ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού: (i) το "εξωγενές μονοπάτι" που λαμβάνει και επεξεργάζεται σήματα εξωκυττάρου θανάτου και συμπεριλαμβάνει μέλη της υπεροικογένειας του υποδοχέα TNF – όπως ο υποδοχέας TNFa, ο υποδοχέα Fas-L, και οι υποδοχείς TRAIL και (ii) την "ενδογενή οδό" που περιλαμβάνει τα μιτοχόνδρια που απελευθερώνει αποπτωτικούς παράγοντες, όπως το κυτόχρωμα c, από το διαμεμβρανικό χώρο. Και οι δύο οδοί οδηγούν στην ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης που χαρακτηρίζονται ως «κασπάσες», οι οποίες οδηγούν σε ένα καταρράκτη πρωτεόλυσης ενεργών κασπασών που φέρνουν εις πέρας την απόπτωση, κατά την οποία το κύτταρο αποσυντίθεται και καταναλώνεται από τα γειτονικά κύτταρα και φαγοκύτταρα [5]. Μια νέα αποπτωτική οδός αποτελεί εκείνη που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κασπάσης-12 σε απόκριση του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι ανεξάρτητη του κυτοχρώματος-c.

Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μια ποικιλία μηχανισμών για περιορισμό ή αποφυγή της απόπτωσης. Η πιο συνηθισμένη είναι η απώλεια του ογκοτασταλτικού γονιδίου TP53, η οποία εξαλείφει τον κρίσιμο αισθητήρα βλάβης από το κύκλωμα επαγωγής της απόπτωσης. Εναλλακτικά, με την υπερέκφραση αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. Bcl-2, Bcl-xL) όπως μπορεί να συμβεί σε μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα [6] ή των σημάτων επιβίωσης (Igf 1 / 2), ή τη μειορρύθμιση προαποπτωτικών παραγόντων (Bax, Bim, Puma) επιτυγχάνεται η αποφυγή της απόπτωσης.

Στην άλλη μορφή κυτταρικού θανάτου, που ονομάζεται νέκρωση, παρατηρείται κατακρήμνιση της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα να ελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο όπου σηματοδοτούν την έναρξη φλεγμονής που μπορεί υπό συνθήκες να προάγει την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων.

#### **1.1.1.4 Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα μπορούν να ακολουθήσουν ένα περιορισμένο αριθμό διαδοχικών κύκλων ανάπτυξης και διαίρεσης. Φραγμό στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αποτελεί η γήρανση των κυττάρων, που είναι μη αναστρέψιμη, μη πολλαπλασιαστική αλλά βιώσιμη κατάσταση και η κρίση, η οποία συνεπάγεται κυτταρικό θάνατο. Σε σπάνιες περιπτώσεις τα κύτταρα μπορούν να υπερκεράσουν την κατάσταση κρίσης και να βρεθούν σε κατάσταση απεριόριστου πολλαπλασιασμού που ονομάζεται αθανατοποίηση. Το μήκος των τελομερών (telomeres), που αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις βάσεων γουανίνης-θυμίνης (GT fusion motifs) και βρίσκονται στο τέλος των χρωμοσωμάτων, καθορίζει τον αριθμό κυτταρικών κύκλων που μπορούν να ακολουθηθούν [7]. Τα τελομερή προστατεύουν το κύτταρο κατά τη φάση της σύνθεσης από την επερχόμενη γήρανση του, με τη βοήθεια της τελομεράσης, μια εξειδικευμένη DNA πολυμεράση, η οποία προσθέτει επιμέρους αλληλουχίες βάσεων στο DNA των τελομερών. Η τελομεράση είναι σχεδόν απύσα στα περισσότερα πρωτογενή κύτταρα του οργανισμού μας αλλά εκφράζεται λειτουργικά στη συντριπτική πλειοψηφία (-90%) των αθανατοποιημένων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών. Η συσχέτιση της με την κυτταρική αθανασία και την ενεργοποίηση της κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης δηλώνει ότι η λειτουργία της τελομεράσης είναι αναγκαία συνθήκη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [8].

### **1.1.1.5 Επαγωγή της Αγγειογένεσης**

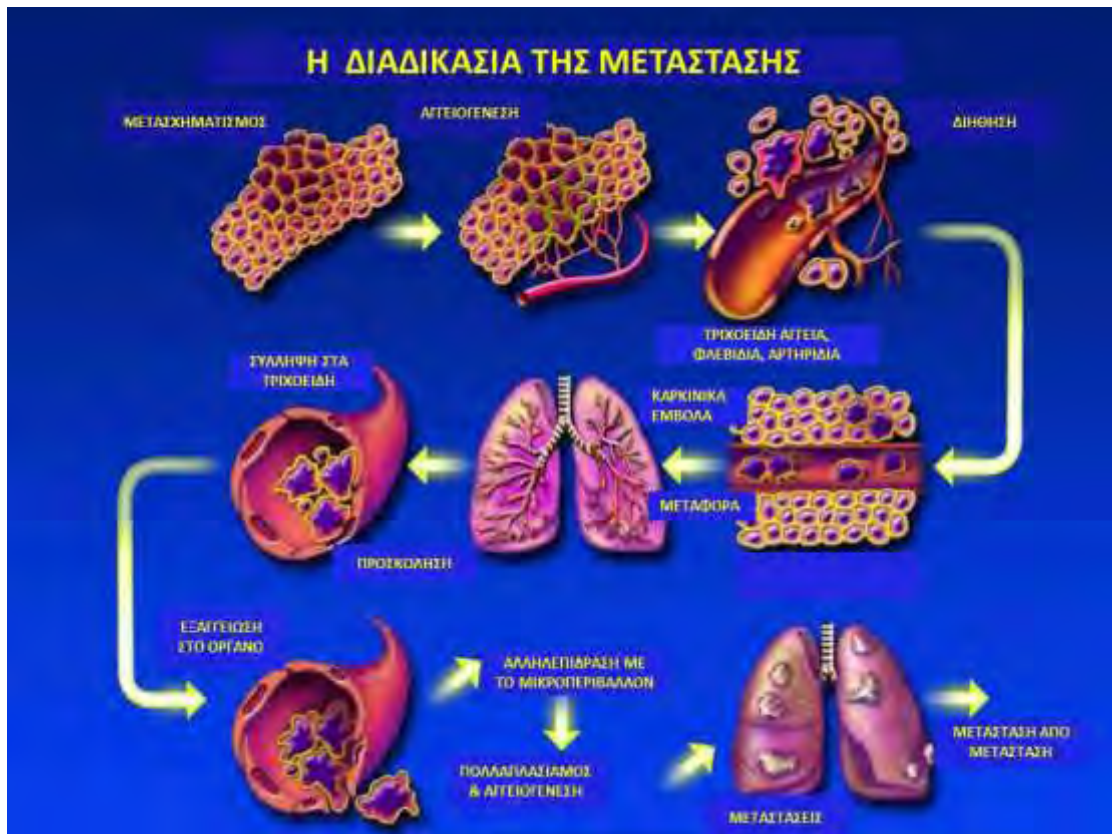
Ομοίως με τους φυσιολογικούς ιστούς, οι όγκοι απαιτούν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο καθώς και την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα και των προϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού. Η νεοαγγείωση που επάγεται από τον όγκο υποστηρίζει αυτή την ανάγκη. Μετά την εμβρυογένεση, το αγγειακό σύστημα παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδρανές. Στον ενήλικα, η αγγειογένεση μπορεί να ενεργοποιηθεί, αλλά μόνο προσωρινά, ως μέρος φυσιολογικών διαδικασιών, όπως η επούλωση τραυμάτων και ο γυναικείος αναπαραγωγικός κύκλος. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, ευνοείται η έκκριση των αγγειογόνων παραγόντων έναντι των αγγειοστατικών με αποτέλεσμα την έναρξη της αγγειογένεσης. Έτσι ο λεγόμενος «αγγειογόνος διακόπτης» (angiogenic switch) ενεργοποιείται, προκαλώντας τη βλάστηση νέων αγγείων από φυσιολογικά που βοηθούν στη διατήρηση και την επέκταση του νεοπλάσματος [9].

Η διαδικασία της αγγειογένεσης ελέγχεται στενά από την ισορροπία μεταξύ αγγειογόνων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγων (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor - FGF), και αγγειοστατικών παραγόντων όπως η θρομβοσπονδίνη 1. Η αγγειογένεση επάγεται ακόμα και σε πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης διηθητικών καρκίνων, ακόμα και σε προκαρκινικές καταστάσεις, και δικαίως αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου [10].

### **1.1.1.6 Επέκταση και μετάσταση της νόσου**

Ο όρος "μετάσταση" περιγράφηκε αρχικά το 1829 από τον Jean Claude Recamier και είναι το καθοριστικό χαρακτηριστικό ενός κακοήθους όγκου. Η εξάπλωση των νεοπλασμάτων και η εγκατάστασή τους σε γειτονικούς ιστούς είναι το κύριο αίτιο θανάτων από την νόσο του καρκίνου, ενώ συχνά η νόσος είναι ήδη μεταστατική κατά τη διάγνωση. Κλινικό-παθολογικές παρατηρήσεις έχουν αποκαλύψει ότι αν και η μετάσταση του όγκου μπορεί να εμφανιστεί νωρίς, όταν ο πρωτογενής όγκος είναι μικρός ή ακόμα και μη ανιχνεύσιμος, στην πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται αργότερα όταν ο πρωτογενής όγκος είναι μεγαλύτερος.

Το αποτέλεσμα της διαδικασίας εξαρτάται από τις εγγενείς ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων και την απόκριση του ξενιστή. Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν στη μετάσταση είναι αντίστοιχη για όλους τους καρκίνους και περιλαμβάνει συγκεκριμένα βήματα (εικόνα 2) [11]. Μετά τον αρχικό μετασχηματισμό, τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσονται προοδευτικά και συχνά αργά. Σημαντικό βήμα αποτελεί η ανάπτυξη αγγειακού δικτύου, η οποία πραγματοποιείται όταν ο όγκος υπερβαίνει τα 1-2 χιλ. σε διάμετρο, με την έκκριση αγγειογενετικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα [12]. Ακολουθεί η τοπική διήθηση του στρώματος του ξενιστή από τα κύτταρα του όγκου τα οποία έχουν την ικανότητα να αποκολλούνται από τον ιστό προέλευσης, και στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω φλεβιδίων και λεμφικών καναλιών, τα οποία προσφέρουν μικρή αντίσταση στην εισβολή των κυττάρων του όγκου [13]. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η επιβίωση και η αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης των κυττάρων που διακινούνται μέσω της κυκλοφορίας. Στη συνέχεια τα κύτταρα θα σταματήσουν στα τριχοειδή του οργάνου όπου θα μεταναστεύσουν και θα εξέλθουν από τα αγγεία (extravasation), με μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς που εμπλέκονται στην αρχική διήθηση του ιστού. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται εντός του παρεγχυματικού οργάνου με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεταστατικής εστίας. Στο όργανο στόχος, επάγεται εκ νέου η αγγειογένεση και αποφεύγεται η ανοσολογική επιτήρηση. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεταστάσεων από μεταστάσεις.



**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση της μεταστατικής διαδικασίας  
 Πηγή εικόνας: Talmadge et al 2010

### **1.1.1.7 Επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού**

Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα περιλαμβάνει και προσαρμογές του μεταβολισμού των κυττάρων με σκοπό την ενεργειακή κάλυψη της ανάπτυξης και διαίρεσης. Κάτω από αερόβιες συνθήκες τα φυσιολογικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη γλυκόζη με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια. Σε αναερόβιες συνθήκες προτιμάται η γλυκόλυση και μόνο μικρή ποσότητα πυρουβικού οξέως προωθείται στα μιτοχόνδρια και ο μεταβολισμός οδηγείται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Ο Otto Warburg, το 1930 περιέγραψε ότι ακόμα και με την παρουσία οξυγόνου, τα καρκινικά κύτταρα τροποποιούν το μεταβολισμό της γλυκόζης και την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας, οδηγώντας σε μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως «αερόβια γλυκόλυση». Έτσι τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ξεπεράσουν την κατά περίπου 18 φορές μικρότερη παραγωγή ATP από τη γλυκόλυση σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορύλιωση. Αυτό το καταφέρνουν με την αυξημένη ενεργοποίηση μεταφορέων γλυκόζης και συγκεκριμένα του GLUT1, με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση εισόδου γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα. Η οδός της γλυκόλυσης συνδέεται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως τα RAS και MYC και ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το P53, τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αποφυγή κυτταροστατικού ελέγχου και την απόπτωση. Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένοι όγκοι μπορεί να περιέχουν δύο υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων με διαφορετικές οδούς παραγωγής ενέργειας. Ένας υποπληθυσμός που εξαρτάται από τη γλυκόζη (Warburg-effect) και εκκρίνει γαλακτικό οξύ, και ένας δεύτερος που κατά προτίμηση εισάγει και αξιοποιεί το παραγόμενο γαλακτικό οξύ από τα γειτονικά κύτταρα [14].

## 1.1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου

Ο καρκίνος αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Με βάση τα δεδομένα του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ), είναι η 3<sup>η</sup> συχνότερη αιτία θανάτου με 14.1 εκατομμύρια νέα περιστατικά και 8.1 εκατομμύρια θανάτους το 2012 [15]. Το 2018 αναμένονται 1.735.350 νέα περιστατικά καρκίνου και 609.640 θάνατοι από καρκίνο στις Η.Π.Α [16]. Οι δέκα πιο συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο ανά φύλο φαίνεται στην εικόνα 3.

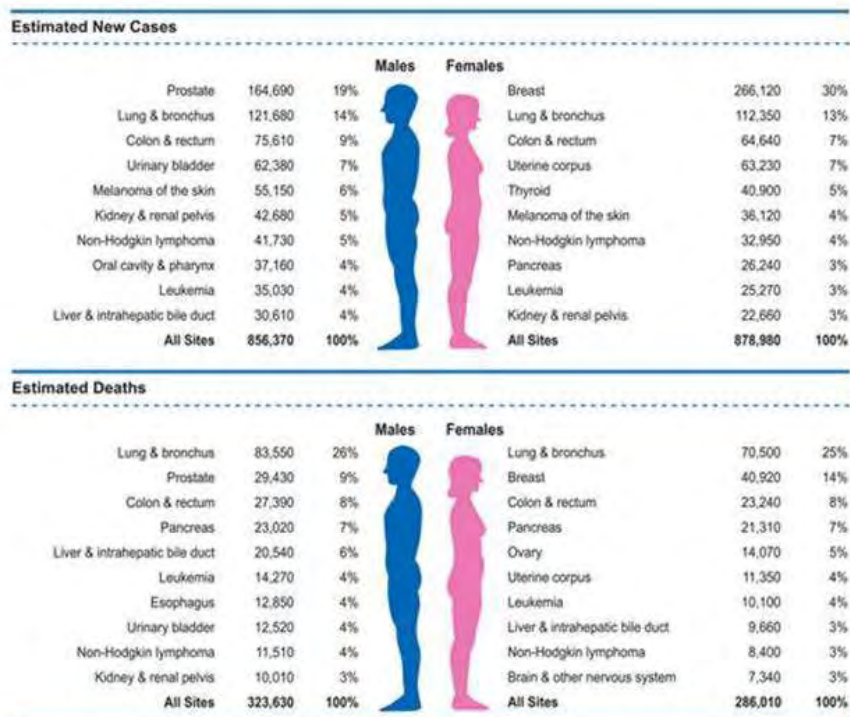
Σύμφωνα με τα δεδομένα από τη Eurostat, ο καρκίνος ήταν η αιτία θανάτου για 1,3 εκατομμύρια ανθρώπους στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) το 2013 αποτελώντας την αιτία θανάτου για το 26% του πληθυσμού [17]. Οι άνδρες (726.500 θάνατοι) επηρεάστηκαν περισσότερο από τις γυναίκες (570.300). Επιπλέον, ο καρκίνος αντιπροσωπεύει την αιτία θανάτου για περισσότερο από το ένα τρίτο (37%) όλων των θανάτων για τον πληθυσμό της ΕΕ με ηλικία μικρότερη των 65 ετών και λιγότερο από το ένα τέταρτο (23%) για τον πληθυσμό ηλικίας 65 ετών και άνω. Ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, προκαλώντας το θάνατο περίπου 270.000 ατόμων (ή 21% όλων των θανάτων λόγω καρκίνου), και ακολουθείται από τον καρκίνο του παχέος εντέρου (153.100 ή 12%), τον καρκίνο του μαστού (92.600 ή 16% μόνο για τον θηλυκό πληθυσμό), τον καρκίνο του παγκρέατος (81.300 ή 6%) και τον καρκίνο του προστάτη (72.700 ή 10% μόνο για τον αρσενικό πληθυσμό).

Σύμφωνα με την ίδια πηγή στην Ελλάδα υπήρξαν σχεδόν 29.000 θάνατοι από καρκίνο το 2013 (17.547 άνδρες και 11.297 γυναίκες) αποτελώντας την αιτία θανάτου για το ένα τέταρτο του πληθυσμού. Στην Ελλάδα και στην Ισπανία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δυο φύλων.

Η διάδοση των προληπτικών εξετάσεων για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου και η βελτίωση των θεραπευτικών επιλογών έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης και την αύξηση του αριθμού των ασθενών με μακρά επιβίωση. Στις αρχές του 2016 περισσότεροι από 15.5 εκατομμύρια Αμερικανών με διάγνωση καρκίνου ήταν ζωντανοί ενώ έως το 2026 η προβαλλόμενη εκτίμηση ανέρχεται στους 20.3 εκατομμύρια [18] (εικόνα 4).



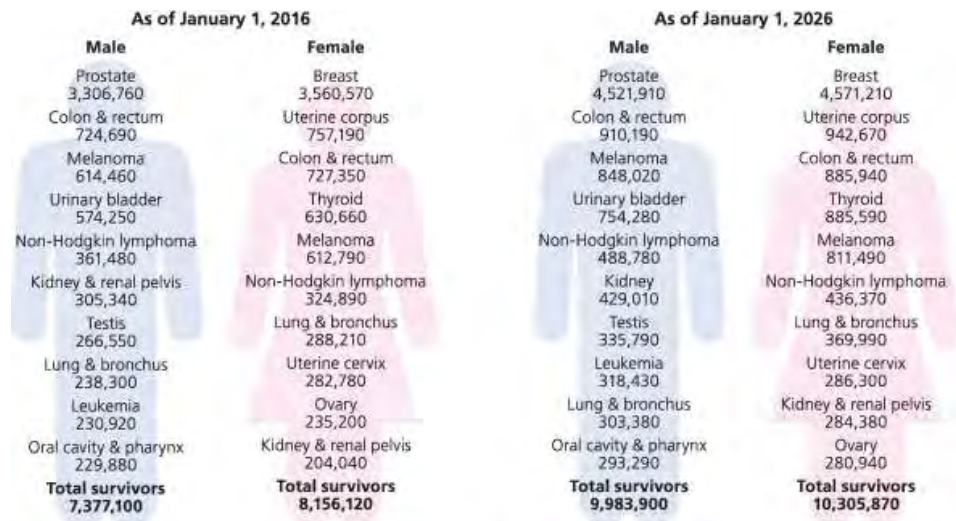
## Cancer statistics, 2018



Cancer statistics, 2018, Volume: 68, Issue: 1, Pages: 7-30, First published: 04 January 2018, DOI: (10.3322/caac.21442)

**Εικόνα 3:** Οι δέκα συχνότεροι καρκίνοι ανά φύλο

Πηγή εικόνας: Siegel et al. 2018



**Εικόνα 4:** Επιβιώσαντες με καρκίνο το 2016 και 2026

Πηγή εικόνας: Siegel et al 2016

### **1.1.2.1 Καρκίνος του παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) είναι η τρίτη πιο κοινή αιτία καρκίνου που διαγιγνώσκεται στους άνδρες και η δεύτερη στις γυναίκες. Τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου είναι η πιο κοινή κακοήθεια του γαστρεντερικού σωλήνα[16]. Εμφανίζεται πιο συχνά μεταξύ των ηλικιών 60 και 79 ετών ενώ η συχνότητα τους αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αν και είναι ασυνήθιστο να εμφανιστούν πριν από την ηλικία των 40 ετών, η ανάπτυξή τους είναι δυνατή λόγω γενετικής προδιάθεσης και της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα [19, 20].

Παγκοσμίως, ο ΚΠΕ αντιπροσωπεύει το 9,7% του συνολικού αριθμού των θανάτων από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού στις γυναίκες και τον καρκίνο του πνεύμονα και του προστάτη στους άνδρες. Τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου είναι μία από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως. Το 2012 εκτιμάται ότι προκάλεσε 650.000 θανάτους παγκοσμίως [15]. Το 2016, σχεδόν 135.000 άνθρωποι αναμένονται να νοσήσουν από ορθοκολικό καρκίνο και 49.000 να χάσουν τη ζωή τους στις Ηνωμένες Πολιτείες [21].

Το 2014, περίπου 153.000 άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από τον καρκίνο του παχέος εντέρου στην ΕΕ των 28, που ισοδυναμεί με το 11,3% όλων των θανάτων από καρκίνο και 3,1% του συνολικού αριθμού θανάτων από οποιαδήποτε αιτία [17]. Το ποσοστό των θανάτων που αποδόθηκε σε καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν 3,4% για τους άνδρες και 2,8% για τις γυναίκες. Το τυποποιημένο ποσοστό θνησιμότητας για τον καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν 30,5 ανά 100.000 κατοίκους. Το ποσοστό του συνολικού αριθμού των θανάτων που αποδόθηκε στον καρκίνο παχέος εντέρου έφτασε στο 4,1% στην Κροατία, στο 2,5% στην Ελλάδα ενώ το χαμηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε στην Κύπρο (2,0%) που αποτελεί το χαμηλότερο ποσοστό στην ΕΕ των 28 κρατών. Για τα περισσότερα κράτη μέλη, το τυποποιημένο ποσοστό των θανάτων από καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν υψηλότερο για τους άνδρες παρά για τις γυναίκες με εξαίρεση τη Λετονία και την Εσθονία όπου η διαφορά ήταν αμελητέα.

Το υψηλότερο τυποποιημένο ποσοστό θνησιμότητας για τον καρκίνο του παχέος εντέρου μεταξύ καταγράφηκε στην Ουγγαρία (55 ανά 100.000 κατοίκους),

ακολουθούμενη από την Κροατία και τη Σλοβακία με τιμές γύρω στα 50 ανά 100.000 κατοίκους. Η Ελλάδα, η Φινλανδία και η Κύπρος ήταν τα μόνα κράτη μέλη που ήταν κάτω από 25 ανά 100.000 κατοίκους.

Η επιβίωση εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο και αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου είναι το TNM (Tumor, Node, Metastasis) αλλά στην περίπτωση του ΚΠΕ η σταδιοποίηση κατά Dukes καθώς και τροποποίηση της κατά Astler-Coler χρησιμοποιούνται εξίσου [22]. (Πίνακας 1, εικόνα 5).

Η κατά Dukes σταδιοποίηση κατατάσσει τους όγκους σε τρεις κύριες κατηγορίες (A, B, C)

Dukes A, για όγκους που περιορίζονται στο βλεννογόνο (εικόνα 6)

Dukes B1, για όγκους που εκτείνονται μέσα στη μυϊκή στιβάδα αλλά δεν την ξεπερνούν

Dukes B2, για όγκους που ξεπερνούν το τοίχωμα του εντέρου αλλά χωρίς συμμετοχή λεμφαδένων

Dukes C, για όγκους με τοπικά διηθημένους λεμφαδένες.

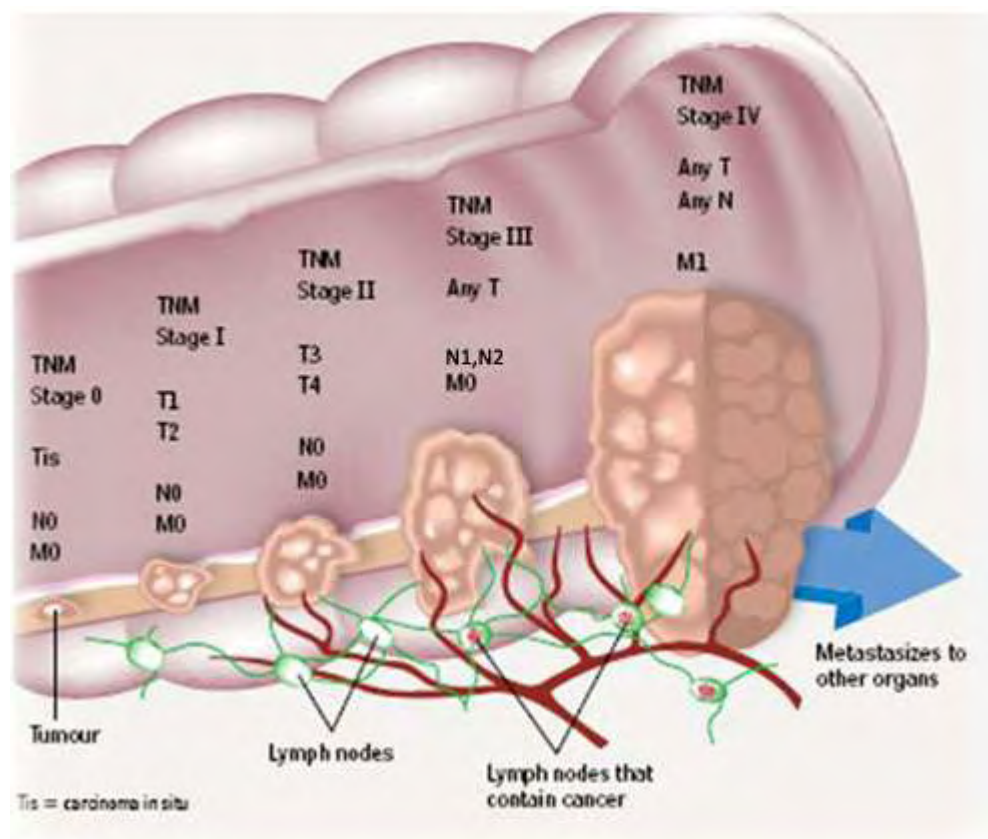
Το στάδιο C χωρίζεται επιπλέον στο C1, για όγκους που περιορίζονται στο τοίχωμα του εντέρου και στο C2, για όγκους που το διαπερνούν.

Από τις αρχές του 2018 η 8<sup>η</sup> έκδοση του American Joint Committee on Cancer (AJCC) άρχισε να χρησιμοποιείται. Η κύρια διαφορά με την προηγούμενη έκδοση είναι ο διαχωρισμός του σταδίου M1b σε M1b (μεταστάσεις σε 2 ή περισσότερα όργανα χωρίς τη συμμετοχή του περιτοναίου-μικροσκοπικά επιβεβαιωμένο) και M1c (μικροσκοπικά επιβεβαιωμένες περιτοναϊκές μεταστάσεις με ή χωρίς μεταστάσεις σε άλλα όργανα).

Στάδιο	T	N	M	Dukes	MAC	Ορισμός	Κατηγορία
Στάδιο 0	Tis	N0	M0	–	–	Εντοπισμένο καρκίνωμα (in situ): ένας κακοήθης όγκος που περιορίζεται στο βλεννογόνο, και δεν διηθεί το υποβλεννογόνο. N0: χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις	Εντοπισμένος Κολοορθικός Καρκίνος
Στάδιο I	T1	N0	M0	A	A	Ο όγκος διηθεί το υποβλεννογόνο (T1) ή τον μυϊκό χιτώνα (T2)	
	T2	N0	M0	A	B1		
Στάδιο IIA	T3	N0	M0	B	B2	Ο όγκος διηθεί τον μυϊκό χιτώνα και επεκτείνεται έως τον υπό-ορογόνο (T3)	
Στάδιο IIB	T4a	N0	M0	B	B2	Ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο (T4a) και/ή απευθείας διηθεί τα όργανα ή τις δομές στον ενδοπεριτοναϊκό χώρο (T4b)	
Στάδιο IIC	T4b	N0	M0	B	B3		
Στάδιο IIIA	T1-T2	N1/N1	M0	C	C1	Ο όγκος έχει δημιουργήσει μεταστάσεις στους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες. Το στάδιο III διαχωρίζεται σε 3 διαφορετικά στάδια τα οποία εξαρτώνται από την διήθηση του όγκου τοπικά και τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων  <ul style="list-style-type: none"> <li>Στάδιο IIIA: Ο όγκος διηθεί το υποβλεννογόνο (T1) ή τον μυϊκό χιτώνα (T2) και έχει εξαπλωθεί σε 1-3 τοπικούς λεμφαδένες (N1); N1a: μετάσταση σε ένα λεμφαδένα, N1b μετάσταση σε 2-3</li> </ul>	
Στάδιο IIIB	T1	c N2a	M0	C	C1		
	T3-T4a	N1/N1 c	M0	C	C2		
	T2-T3		M0	C	C1/C2		
	T1-T2		M0	C	C1		

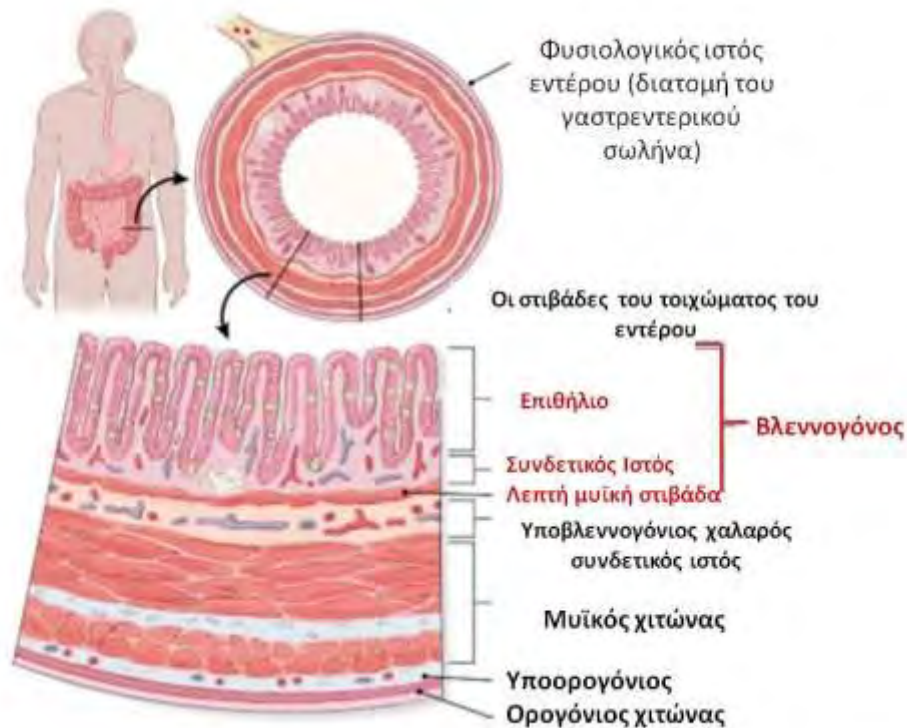
Στάδιο IIIc	T4a	N2a	M0	C	C2	<p>λεμφαδένες, N1c: σε 4-6 λεμφαδένες (N2a), N1c: Εναποθέσεις όγκων στο υπό-ορογόλιο μεσεντέριο, ή στους ελεύθερους περιτοναίου παρακολικούς ιστούς, χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Στάδιο IIIb: Ο όγκος μπορεί να διηθεί μέχρι το σπλαχνικό περιτόναιο (T4a) αλλά έχει εξαπλωθεί σε τοπικούς λεμφαδένες. N2b: μετάσταση σε περισσότερους από 7 τοπικούς λεμφαδένες</li> <li>• Στάδιο IIIc: Ο όγκος διηθεί πέραν του μυϊκού χιτώνα μέχρι και γειτονικά όργανα (T4b) και έχει εξαπλωθεί τοπικούς λεμφαδένες</li> </ul>	
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2		
	T4b	N2a	M0	C	C3		
		N2b N1-N2					
Στάδιο IVA	Any T	Any N	M1a	–	–	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα. M1a: Μεταστάσεις σε ένα όργανο ή περιοχή (π.χ. ήπαρ, πνεύμονες). M1b: Μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανο ή στο περιτόναιο	Προχωρημένος Κολοορθικός Καρκίνος
Στάδιο IVB	Any T	Any N	M1b				

**Πίνακας 1:** Σταδιοποίηση του Καρκίνου παχέος εντέρου



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση σταδίων νόσου του ΚΠΕ

Πηγή εικόνας: <http://www.surgerytoday.com/education/wp-content/uploads/2013/05/colon-cancer.jpg>



**Εικόνα 6:** Οι τέσσερις στιβάδες του τοιχώματος του εντέρου

1. Ο Βλεννογόνος που αποτελείται από το επιθήλιο, το Ινοσυνδετικό Στρώμα ( Lamina propria ) και τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα
2. Υποβλεννογόνιος χαλαρός συνδετικός ιστός
3. Μυϊκός χιτώνας με την έσω στιβάδα με τις κυκλοτερώς διατασσόμενες λείες μυϊκές ίνες και την έξω στιβάδα με τις επιμήκειες λείες μυϊκές ίνες
4. Ο Ορογόνιος χιτώνας

Πηγή εικόνας: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>



Η επιβίωση συνδέεται στενά με το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση. Σε στάδιο I η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται μεταξύ 85%–95%, σε στάδιο II μεταξύ 60%–80%, ενώ στο στάδιο III μεταξύ 30%–60% [23]. Στην περίπτωση μεταστατικής νόσου η πενταετής επιβίωση εκτιμάται μόνο στο 10-11% αλλά σε περιπτώσεις ολιγομεταστατικής νόσου που επιτυγχάνεται η αφαίρεση των μεταστάσεων σε υγιή όρια επιτυγχάνεται μακρά επιβίωση ή και ίαση σε 20-50% [24].

### **1.1.1.2 Αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος**

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες στην Ευρώπη μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα του παχέος εντέρου και του προστάτη[21, 25]. Ομοίως, αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες μετά από τον καρκίνο του μαστού του παχέος εντέρου και του πνεύμονα[25]. Η πενταετής επιβίωση παραμένει στο 5%, ενώ η πρόγνωση αυτής της μορφής καρκίνου δεν έχει βελτιωθεί τα τελευταία είκοσι χρόνια με αποτέλεσμα τα ποσοστά επιπολασμού και θνητότητας να είναι παρόμοια [26]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων (80%) οι ασθενείς διαγιγνώσκονται με τοπικά προχωρημένη-ανεγχείρητη ή μεταστατική νόσο. Η πενταετής επιβίωση ακόμα και σε περιπτώσεις χειρουργικής εξαίρεσης της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 15%-20%. Ο αριθμός θανάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση για το έτος 2016 υπολογίζεται στους 77.749 ενώ είναι η μόνη αιτία θανάτου από καρκίνο της οποίας η συχνότητα αυξάνει τα τελευταία χρόνια και στα δυο φύλα [25]. Είναι επομένως εύλογη η ανάγκη για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου, την κατανόηση της φαρμακευτικής αντίστασης καθώς και η ανακάλυψη αποτελεσματικότερων μορφών θεραπείας.

### **1.1.3 Θεραπεία του καρκίνου**

Η θεραπεία του καρκίνου πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων μεθόδων ανάλογα με την επέκταση και τη βιολογική συμπεριφορά της νόσου, το βέλτιστο αποτέλεσμα που μπορεί να επιτευχθεί καθώς και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ασθενή. Η θεραπευτική προσέγγιση πρέπει να προτείνεται από το ογκολογικό συμβούλιο και να αποφασίζεται με τον ασθενή. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά οι κύριες μορφές θεραπείας.

#### **1.1.3.1 Χειρουργική εξαίρεση**

Αποτελεί την κύρια θεραπευτική μέθοδο για ίαση των ασθενών με συμπαγείς όγκους. Σκοπός της τεχνικής αυτή είναι η αφαίρεση του εντοπισμένου όγκου σε υγιή όρια (R0 εκτομή). Με την εξέλιξη της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας, ο συνδυασμός των θεραπευτικών επιλογών επιτυγχάνει, σε επιλεγμένες περιπτώσεις, την επίτευξη μακροχρόνιας επιβίωσης σε ασθενείς με μεταστατική, αρχικά ανεγχείρητη, νόσο. Σε πολλές περιπτώσεις το χειρουργείο ακολουθείται από επικουρική χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία για να αποτρέψει την υποτροπή της νόσου από καρκινικά κύτταρα που παραμένουν ή που ήδη κυκλοφορούν στον οργανισμό.

#### **1.1.3.2 Ακτινοθεραπεία**

Η Ακτινοθεραπεία αποτελεί σημαντικό τμήμα της θεραπείας του καρκίνου και σχεδόν ο ένας στους δύο ασθενείς υποβάλλεται σε αυτού του είδους τη θεραπεία, κατά την πορεία της νόσου του. Η Ακτινοθεραπεία ουσιαστικά είναι η χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών (φωτονίων, ηλεκτρονίων, πρωτονίων κλπ.), με σκοπό την ίαση ή την ανακούφιση των συμπτωμάτων από νεοπλασματικά νοσήματα, με παράλληλη προφύλαξη των γειτονικών φυσιολογικών ιστών. Η ακτινοβολία παράγεται μέσω ραδιενεργών πηγών (κυρίως ακτινοβολία  $\gamma$ ) από τη μεταστοιχείωση ραδιενεργών ατόμων ή μέσω γραμμικών επιταχυντών οι οποίοι παράγουν ακτινοβολία X. Η παραγόμενη Ακτινοβολία σχηματίζει ιόντα και εναποθέτει ενέργεια

στα κύτταρα των ιστών από τους οποίους διέρχεται. Η απορρόφηση των ιοντίζουσων ακτινοβολιών από τα βιολογικά υλικά, δημιουργεί ιονισμό και διεγέρσεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οι οποίες είναι εξαιρετικά χημικά δραστικές. Η αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών με οργανικά μόρια (π.χ. DNA) μπορεί να προκαλέσει μεταβολή ή/και βλάβη στη δομή του οργανικού μορίου, με τελικό αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου.

Υπάρχουν δυο κύρια είδη ακτινοθεραπείας. Το πρώτος είναι η εξωτερική Ακτινοθεραπεία, κατά την οποία η ακτινοβολία παράγεται από κατάλληλους επιταχυντές και κατευθύνεται στον όγκο, και το δεύτερο η Βραχυθεραπεία, κατά την οποία η ακτινοβολία πραγματοποιείται εκ των έσω με την τοποθέτηση ραδιενεργών πηγών μέσα ή δίπλα στον όγκο. Η συμβατική δισδιάστατη (2D), η Διαμορφούμενης έντασης (IMRT), η απεικονιστικά καθοδηγούμενη (IGRT), η στερεοτακτική και η θεραπεία με φορτισμένα σωματίδια (πρωτόνια ή ιόντα άνθρακα είναι μορφές εξωτερικής ακτινοβολίας).

### **1.1.3.3 Αντί-Νεοπλασματικοί Παράγοντες**

#### **1.1.3.3.1. Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες**

Η χημειοθεραπεία έχει ως σκοπό το θάνατο ή την πρόκληση βλαβών σε κύτταρα με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, όπως τα καρκινικά. Ο πρώτος χημειοθεραπευτικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μουστάρδα του αζώτου το 1943 σε ασθενή με λεμφοβλαστική λευχαιμία αφού πρώτα είχε παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια του Πρώτου Παγκοσμίου πολέμου ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας προκαλούσε λευκοπενία. Από τότε πάνω από 100 χημειοθεραπευτικές ουσίες έχουν εγκριθεί από το FDA (US Food and Drug Administration) και το EMA (European Medical Association) με ποικίλους μηχανισμούς δράσης. Η χημειοθεραπεία αποτελεί μια συστηματική μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου καθώς μπορεί να επηρεάσει κύτταρα όχι μόνο στο όργανο προέλευσης αλλά και κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει σε άλλα όργανα ή κυκλοφορούν στο αίμα.

Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές όπως η ακτινοθεραπεία για να βελτιώσει το κλινικό αποτέλεσμα ενώ μπορεί να χορηγηθεί

πριν ή μετά το χειρουργείο ή τη ριζική ακτινοθεραπεία - εισαγωγική (neoadjuvant) ή επικουρική (adjuvant) θεραπεία, αντίστοιχα. Συχνά βέβαια χρησιμοποιείται με σκοπό την παρηγορική (palliative) αντιμετώπιση της μη ιάσιμης νόσου, για τη βελτίωση τη συνολικής επιβίωσης και τη διατήρηση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες εκτός από τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα προσβάλλει και τα φυσιολογικά κύτταρα, που έχουν την ιδιότητα του γρήγορου πολλαπλασιασμού, όπως κύτταρα του μυελού των οστών, του βλεννογόνου του γαστρεντερικού συστήματος και τα κύτταρα του αναπαραγωγικού συστήματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών όπως η μυελοκαταστολή, η ναυτία, ο έμετος ή και διάρροια καθώς και διαταραχή της αναπαραγωγής, ακόμα και στειρότητα.

Παρακάτω περιγράφονται επιγραμματικά οι κύριες κατηγορίες χημειοθεραπευτικών παραγόντων καθώς και οι νεότερες θεραπείες στην αντιμετώπιση του καρκίνου περιλαμβανόμενων της ανοσοθεραπείας και νεώτερων βιολογικών παραγόντων.

#### **1.1.3.3.1.1 Αλκυλιωτικοί παράγοντες (alkylating agents)**

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν την παλαιότερη κατηγορία αντικαρκινικών παραγόντων. Η ενεργή αλκυλιωτική ομάδα περιλαμβάνει το ιόν του άμινο-αιθυλενίου (-N-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-) <sup>+</sup>. Αυτά τα εντόνως αντιδραστικά παράγωγα συνδέονται ομοιοπολικά με βιολογικά μόρια που είναι πλούσια σε ηλεκτρόνια. Τα άτομα που είναι πιθανότερο να αλκυλιωθούν είναι το θείο, το άζωτο, το οξυγόνο και ο φωσφόρος. Η αντίδρασή τους με το DNA αποτελεί τη βάση για το αντικαρκινικό αποτελέσματά τους. Η πιο συχνή περιοχή της αλκυλίωσης του DNA είναι η N7 θέση της γουανίνης. Ωστόσο, μπορεί να εμφανιστεί δέσμευση στη θέση O6 και N1 της γουανίνης, στη θέση N7, N8 και N1 της αδενίνης, στη θέση N3 της κυτοσίνης και στη θέση O4 της θυμιδίνης.

Το τελικό αποτέλεσμα της αλκυλίωσης του DNA είναι η αναστολή της αντιγραφής του DNA, η οποία με τη σειρά της μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή RNA και πρωτεϊνών τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε κύτταρα όγκου, και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Η κυτταρική απάντηση στη διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπειρα επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA. Η αναγνώριση της εκτεταμένης βλάβης του DNA από το p53 μπορεί να

οδηγήσει σε απόπτωση ενώ η μετάλλαξη του p53 έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με αντοχή στους αλκυλιωτικούς παράγοντες.

Πέντε κύριοι τύποι αλκυλιωτικών παραγόντων χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία νεοπλασματικών ασθενειών. Τα αλκυλοσουλφονικά (Busulfan), οι υπερίτες αζώτου (nitrogen mustards) όπως η μελφαλάνη, η χλωραμβουκίλη, η κυκλοφωσφαμίδη και η ιφωσφαμίδη, οι νιτροζουρίες (nitrosureas) όπως η καρμουστίνη [BCNU] και η στρεπτοζοτοκίνη, (CCNU), οι αζιριδίνες (θειοτέπα) και οι τριαζίνες (triazenes) δηλαδή η δακαρβαζίνη και η τεμοζολομίδη.

#### **1.1.3.3.1.2 Άλατα του λευκόχρυσου (platinum complexes)**

Οι ενώσεις λευκόχρυσου χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία του καρκίνου. Οι τρεις ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι η σισπλατίνη, η καρβοπλατίνη και η οξαλιπλατίνη. Οι ενώσεις αυτές συνδυάζονται συχνά με άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα, στοχευτικούς παράγοντες και / ή την ακτινοθεραπεία σε ένα ευρύ φάσμα όγκων. Τα άλατα λευκόχρυσου προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικών προσαγωγών (adducts) με το κυτταρικό DNA.

#### **1.1.3.3.1.3 Αντιμεταβολίτες (antimetabolites)**

Οι αντιμεταβολίτες παρεμποδίζουν τη σύνθεση του DNA και του RNA. Οι περισσότεροι αντιμεταβολίτες ενεργούν κατά τη φάσης S του κυτταρικού κύκλου, αλλά ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, μπορούν να δράσουν και στη φάση G1 ή G2 / M του κύκλου. Οι περισσότεροι αντιμεταβολίτες είναι δομικά ανάλογα μορίων που φυσιολογικά εμπλέκονται στη διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης. Άλλοι αντιμεταβολίτες αναστέλλουν συγκεκριμένα ένζυμα που χρειάζονται για τη σύνθεση βασικών κυτταρικών ενώσεων. Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες αντιμεταβολιτών. Αυτοί που εμποδίζουν την μετατροπή του φολικού οξέως (folic acid) σε φολινικό οξύ (folinic acid), όπως η μεθοτρεξάτη που είναι ισχυρός αναστολέας της αναγωγάσης του διυδροφυλλικού οξέος (dihydrofolate reductase – DHFR) και η πεμετρεξίδη που αναστέλλει τρία ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του φολικού οξέος με αποτέλεσμα την μειωμένη σύνθεση DNA και RNA. Τα ανάλογα των πυριμιδών όπως η 5-φθοριοουρακίλη (5-Fu), η καπεσιταβίνη

(που είναι προφάρμακο της 5-Fu), η κυταραβίνη και η γεμισιταβίνη και τα ανάλογα των πουρινών όπως οι θειοπουρίνες και η φλουδαραβίνη, αναστέλλουν τη σύνθεση των πυριμιδινών και των πουρινών αντίστοιχα.

#### **1.1.3.3.1.4 Αναστολείς των Τοποϊσομερασών (topoisomerase inhibitors)**

Οι τοποϊσομεράσες του DNA είναι βασικά κυτταρικά ένζυμα που ρυθμίζουν μια σειρά κυτταρικών διεργασιών όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Αναστολή αυτών των ενζύμων αυτών από φάρμακα που στοχεύουν είτε την τοποϊσομεράση I (ιρινοτεκάνη και τοποτεκάνη) ή την τοποϊσομεράση II (π.χ. οι ανθρακυκλίνες δοξορουβικίνη, επιρουβικίνη, μιτοξαντρόνη και δαουνορουβικίνη, η ετοποσίδη, και αμσακρίνη) αποτρέπουν τη σύνθεση του DNA

#### **1.1.3.3.1.5 Παράγοντες έναντι της Τουμπουλίνης (Tubulin-active agents)**

Κατά τη κυτταρική διαίρεση (μίτωση) τα χρωμοσώματα κατατάσσονται στην μιτωτική άτρακτο βασικό συστατικό της οποίας αποτελούν οι μικροσωληνίσκοι. Οι μικροσωληνίσκοι δημιουργούνται από τον πολυμερισμό της  $\alpha$ - και  $\beta$ - τουμπουλίνης.

Οι δυο κύριες οικογένειες χημικών ενώσεων που διαταράσσουν τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, οι ταξάνες και τα αλκαλοειδή της βίνκα, έχουν ισχυρή αντικαρκινική δραστηριότητα. Τα αλκαλοειδή της βίνκα, με κύριους αντιπροσώπους τη βινκριστίνη, η βινβλαστίνη, τη βινορελβίνη και τη βινφλουνίνη, δεσμεύονται από τις απολήξεις των αναπτυσσόμενων μικροσωληνίσκων, εμποδίζοντας την προσθήκη περισσότερων διμερών της τουμπουλίνης, καταστέλλοντας έτσι την δημιουργία της ατράκτου προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 / M. Τα κύτταρα τελικά οδηγούνται στο θάνατο λόγω απόπτωσης.

Οι ταξάνες συνδέονται στους μικροσωληνίσκους σε θέσεις δέσμευσης διαφορετικές από αυτές των αλκαλοειδών της βίνκα. Η πακλιταξέλη και η δοσεταξέλη δεσμεύονται από τη  $\beta$ -τουμπουλίνη, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και την αναστολή της διαδικασίας συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησής τους. Νεότεροι παράγοντες που σταθεροποιούν τους

μικροσωληνίσκους, όπως η ναμπ-πακλιταξέλη, η καμπαζιταξέλη, η εριμπουλίνη και η ιξαμπεπιλόνη, έχουν αρχίσει πρόσφατα να χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη.

#### **1.1.3.3.1.6 Διάφορα**

Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται κυτταροτοξικοί παράγοντες που δεν μπορούν να καταταραχθούν στις προηγούμενες κατηγορίες. Περιλαμβάνονται τα κυτταροτοξικά αντιβιοτικά όπως η βλεομυκίνη (bleomycin), η οποία προκαλεί μονή και διπλή θραύση του DNA, η μιτομυκίνη-C που επηρεάζει τη λειτουργία του DNA και ακτινομυκίνη-D που αναστέλλει τη δημιουργία του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Η Υδροξουρία προκαλεί αναστολή της σύνθεσης DNA με αναστολή της ενζυματικής μετατροπής των ριβονουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια, δρώντας ως αναστολέας της αναγωγής του ριβονουκλεοτιδίου.

Η τραβεκτεδίνη είναι ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας που προέρχεται από το θαλάσσιο χιτωνόζωο *Ecteinascidia turbinata*. Δεσμεύεται στη μικρή αύλακα του DNA, και οδηγεί στην παρεμπόδιση ενδοκυττάρων μεταγραφικών οδών και πρωτεϊνών επισκευής DNA.

#### **1.1.3.3.2 Ορμονικές Θεραπείες**

Οι επιλεκτικοί τροποποιητές των οιστρογονικών υποδοχέων όπως η ταμοξιφαίνη ή η τορεμιφαίνη εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού με αναστολή τόσο της μετατόπισης όσο και της πυρηνικής δέσμευσης των οιστρογονικών υποδοχέων (ER). Χρησιμοποιούνται τόσο στην επικουρική θεραπεία όσο και την για αντιμετώπιση της μεταστατικής νόσου ασθενών με καρκίνο του μαστού ο όγκος των οποίων εκφράζει οιστρογονικούς υποδοχείς.

Η φουλβεστράνη είναι ένας άλλος οιστρογονικός ανταγωνιστής με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια με τους ER σε σχέση με τη ταμοξιφαίνη.

Οι αναστολείς της αρωματάσης (AAs) είναι παράγοντες που αναστέλλουν την αρωματάση, ένα μικροσωματικό ένζυμο της οικογένειας του κυτοχρώματος P450. Η αρωματάση καταλύει το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης της οιστρόνης (E1) και της οιστραδιόλης (E2). Η έκφραση αρωματάσης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού



συμβάλλει στην ενδοκρινή διέγερση της ανάπτυξης του όγκου. Η αναστροζόλη και η λετροζόλη είναι οι κύριοι μη στεροειδείς ΑΑς και ασκούν αναστρέψιμο ανταγωνιστικό αποτέλεσμα συνδεδεμένοι με το άτομο σιδήρου της αρωματάσης. Η εξαμεστάνη, είναι ένας στεροειδής ΑΑ που δεσμεύεται μη αναστρέψιμα στην ενεργό θέση του ενζύμου και το απενεργοποιεί προκαλώντας την ταχεία αποσύνθεσή του. Οι ΑΑς χρησιμοποιούνται σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με όρμονο-ευαίσθητο καρκίνο του μαστού τόσο στην επικουρική όσο και με μεταστατικό νόσο.

Ανάλογα (βουσερελίνη, γοσερελίνη λευπρορελίνη και τριπτορελίνη) ή ανταγωνιστές (δεγαρελίξη) της ορμόνης απελευθέρωσης της γοναδοτροπίνης (Gonadotropin-releasing hormone- GnRH) χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη και του μαστού (γοσερελίνη). Προγεστερινοειδή όπως η μεδροξυπρογεστερόνη και η μεγεστρόλη, δρουν μειώνοντας τα επίπεδα της ωχρινοτρόπου ορμόνης και των οιστρογονικών υποδοχέων. Χρησιμοποιούνται σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού ή σε προχωρημένο καρκίνωμα ενδομήτριο.

Τα αντιανδρογόνα (βικαλουταμίδα, νιλουταμίδα, φλουταμίδα) είναι ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR). Αναστέλλουν τη δέσμευση ανδρογόνων και εμποδίζουν τη μετατόπιση του συμπλόκου υποδοχέα-ανδρογόνου από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη.

Νεότεροι παράγοντες όπως η ενζαλουταμίδα και η αμπιρατερόνη έχουν δείξει εντυπωσιακά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του ευνούχο-άντοχου καρκίνου του προστάτη.

### **1.1.3.3 Βιολογικές Θεραπείες**

#### ***1.1.3.3.1 Αναστολείς Υποδοχέων αυξητικών παραγόντων***

Οι αναστολείς των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων έχουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal Antibodies - mAbs) στοχεύουν τις εξωκυττάρειες περιοχές των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση, και χορηγούνται ενδοφλέβια. Οι αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης (Tyrosine Kinase Inhibitors - TKIs) είναι από του στόματος φάρμακα που εμποδίζουν την ενδοκυττάρια

σηματοδότηση, οδηγώντας σε απορύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και της μετάστασης.

Τα μέλη των διαμεμβρανικών υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (οικογένεια ERBB / HER) είναι ισχυροί μεσολαβητές της κυτταρικής ανάπτυξης και ανάπτυξης. Η οικογένεια HER αποτελείται από τέσσερις υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης: τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor receptor - EGFR, γνωστός και ως Her1), τον ERBB2 (Her2), τον ERBB3 (Her3) και ERBB4 (Her4). Η σύνδεση αυξητικών παραγόντων με την εξωκυττάρια περιοχή των υποδοχέων ERBB (εκτός από το Her2) οδηγεί στη σταθεροποίηση και το διμερισμό των υποδοχέων που είναι σημαντικός για την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση και ευόδωση ενδοκυττάριας σηματοδότησης.

Παράγοντες που στοχεύουν κατά των ERBB υποδοχέων χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη. Μονολωνικά αντισώματα έναντι του EGFR (π.χ. η σετουξιμάμπη και η πανιτουμουμάμπη) όπως και TKIs (γεφινιμίμπη και ερλοτινιμίμπη) χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου και του καρκίνου του πνεύμονα, αντίστοιχα. Ομοίως, η τραστουζουμάμπη και η λαπατινιμίμπη είναι το μονολωνικό αντίσωμα και ο TKI, αντίστοιχα, που στοχεύει τον Her2 υποδοχέα με ευρεία χρήση στον καρκίνο του μαστού. Νεότεροι αντι-Her2 παράγοντες, όπως η αφατινιμίμπη και η περτουζουμάμπη, έχουν εισέλθει στην κλινική πράξη για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και μείωση της τοξικότητας.

#### ***1.1.3.3.2 Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες***

Οι κύριοι στόχοι της αντιαγγειογενετικής θεραπείας είναι η αναστολή της αγγειογένεσης του όγκου με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες διαθέσιμων παραγόντων με αντιαγγειογενετική δράση: τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους και οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs) που αναστέλλουν πολλαπλούς προ-αγγειογενετικούς υποδοχείς.

Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF) συνδέεται και ενεργοποιεί τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (VEGFR) που αποτελείται από ένα

εξωκυττάριο τμήμα, μια διαμεμβρανική περιοχή και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. Οι υποδοχείς είναι ένζυμα που μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από την τριφωσφορική αδενοσίνη σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες στόχους κατά τον διμερισμό που προκαλείται από εξωκυττάρια σηματοδότηση, μεταδίδοντας σήματα από το εξωτερικό του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα.

Υπάρχουν τρεις ισομορφές του VEGFR: ο VEGFR-1 (Flt-1), ο VEGFR-2 (KDR / Flk-1) και ο VEGFR-3 (Flt-4), αλλά οι περισσότερες γνωστές βιολογικές επιδράσεις του VEGF-A έρχονται μέσω του VEGFR-2. Τα κύρια μονοκλωνικά αντισώματα είναι η μπεβασιζουμάβη (bevacizumab) που δεσμεύει το VEGF-A και η αφλιμπερσέπτη (Aflibercept) που δεσμεύει τους VEGF-A και B καθώς και το αυξητικό παράγοντα του πλακούντα. Οι κύριοι αναστολείς κινάσης της τυροσίνης είναι η σοραφενίμπη, η σουνιτινίμπη, η παζοπανίμπη, η αξιτινίμπη και η ραμουσιρουμάμπη που αναστέλλουν πολλαπλούς στόχους εκτός του VEGFR.

#### **1.1.3.3.4 Ανοσοθεραπεία**

Ανοσοθεραπεία είναι οποιαδήποτε θεραπεία χρησιμοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα για την καταπολέμηση των ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η ομάδα φαρμάκων που ονομάζονται «αναστολείς σημείων ελέγχου» (checkpoint inhibitors), είναι η πιο ευρέως εφαρμοσμένη μορφή ανοσοθεραπείας στον καρκίνο. Εμποδίζουν τη λειτουργία μηχανισμού που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για να διακόψουν την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η Ιπιλιμουμάμπη (Ipilimumab), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναστέλλει τη δραστηριότητα μιας πρωτεΐνης που αποκαλείται κυτταροτοξικό T λεμφοκυτταρικό αντιγόνο-4 (CTLA-4), στην επιφάνεια κυρίως των CD4 T-κυττάρων ήταν ο πρώτος checkpoint inhibitor που πήρε έγκριση για την αντιμετώπιση του μεταστατικού μελανώματος το 2011. Η CTLA-4 αναστέλλει τη δραστηριότητα των T-κυττάρων και η ιπιλιμουμάμπη, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της CTLA-4, προκαλεί την ενεργοποίηση και εξάπλωση των T-κυττάρων, τα οποία συμβάλλουν στη διήθηση και εξόντωση των καρκινικών κυττάρων.

Η έρευνα και η ανάπτυξη φαρμάκων στον τομέα της ανοσοθεραπείας είναι ραγδαία την τελευταία δεκαετία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η αναστολή της

σηματοδότησης της οδού PD-1/PD-L1. Η πρόσδεση του συνδέτη PD-L1 που βρίσκεται στα καρκινικά κύτταρα, στον υποδοχέα πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (PD-1) που βρίσκεται στα T κύτταρα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και επομένως την ανοσοεπιτήρηση του όγκου. Μονοκλωνικά αντισώματα όπως η πεμπρολιζουμάμπη (pembrolizumab) και η νιβολουμάμπη (nivolumab) που προσκολλούνται και αναστέλλουν τον PD-1 και η ατεζολιζουμάμπη (atezolizumab) και η αβελουμάμπη (avelumab) που προσκολλούνται στο PD-L1 συνεχώς λαμβάνουν έγκριση από το FDA για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου όπως του καρκίνου του νεφρού, του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του ουροθηλιακού καρκίνου και του κολοορθικού καρκίνου με μικροδορυφορική αστάθεια, μεταξύ άλλων.

## **1.2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### 1.2.1 Θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου

Η θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Στα αρχικά στάδια της νόσου (στάδια I ως III) η θεραπεία είναι κυρίως η χειρουργική εξαίρεση του όγκου. Η επέμβαση στο στάδιο III και υψηλού ρίσκου σταδίου II, ακολουθείται από επικουρική χημειοθεραπεία η οποία στοχεύει στη μείωση της πιθανότητας υποτροπής της νόσου [23]. Υψηλού ρίσκου στάδιο II θεωρείται όταν υπάρχουν ένας ή περισσότεροι παράγοντες κινδύνου: χαμηλός βαθμός διαφοροποίησης του όγκου (Grade 3), διήθηση των αιμοφόρων αγγείων, διήθηση του λεμφικού ή και περινευρικού ιστού της περιοχής, απόφραξη ως αρχική εκδήλωση ή διάτρηση του εντέρου, διήθηση παθολογοανατομικά-μικροσκοπικά (R1) ή μακροσκοπικά (R2) των χειρουργικών ορίων εκτομής, μεγάλο βάθος εισβολής του καρκινώματος στο τοίχωμα του εντέρου και τέλος ανεπαρκής αριθμός των εξαιρεθέντων λεμφαδένων (<12 συνολικά).

Η επικουρική χημειοθεραπεία με βάση την 5-φθοριο ουρακίλη (5-Fu) αποτελεί θεραπεία εκλογής μετά το χειρουργείο σε υψηλού ρίσκου σταδίου II και σε στάδιο III ΚΠΕ. Ο συνδυασμός 5-Fu με οξαλιπλατίνα (συνδυασμός FOLFOX ή XELOX όταν η οξαλιπλατίνα συνδυάζεται με καπεσιταμπίνη, την από του στόματος χορηγούμενη συσκευασία του 5-Fu) έχει αποδειχτεί η ενδεδειγμένη επικουρική θεραπεία σε τρεις μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες με όφελος στην επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) και στην συνολική επιβίωση, ιδίως σε νόσο σταδίου III [27-29].

Σε τοπικά προχωρημένη μη εξαιρεσίμη ή μεταστατική νόσο, η κύρια θεραπεία είναι η χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με νεότερους βιολογικούς παράγοντες που στοχεύουν είτε την αγγειογένεση (μπεβασιζουμάμπη, αφλιμπερσέπτη) ή τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), όπως η σετουξιμάμπη και η πανιτουμουμάμπη. Ο στόχος της θεραπείας εξαρτάται από το αν μπορεί να επιτευχθεί χειρουργική εξαίρεση της νόσου είτε εξ' αρχής είτε μετά από εισαγωγική θεραπεία. Αν αυτό δεν είναι εφικτό, στόχος είναι ο έλεγχος και η επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου, η παράταση της επιβίωσης και η διατήρηση της ποιότητας ζωής. Διάφοροι αλγόριθμοι έχουν δημοσιευτεί που περιγράφουν την αντιμετώπιση των ασθενών βάσει διαφορετικών κλινικών σεναρίων [30].

Στην περίπτωση της θεραπείας πρώτης γραμμής σε τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο διάφοροι κυτταροτοξικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρέως.

Οι συνδυασμοί φροθοιοπυριμιδινών με οξαλιπλατίνα (FOLFOX ή XELOX) ή ιρινοτεκάνη (FOLFIRI) αποτελούν τις κύριες επιλογές.

### **1.2.2 Θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος**

Η χειρουργική εξαίρεση ακολουθούμενη από επικουρική χημειοθεραπεία με γεμισιταβίνη ή 5-φθοριοουρακίλη αποτελεί την θεραπεία εκλογής για τον καρκίνο του παγκρέατος [31, 32]. Μόνο το 15% των περιπτώσεων όμως θα εμφανιστεί με εξαιρεσίμη νόσο. Η πλειονότητα των ασθενών θα εκτεθεί σε παρηγορική χημειοθεραπεία με βάση τη γεμισιταβίνη ή τη 5-φθοριοουρακίλη με χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης.

Η γεμισιταβίνη αποτέλεσε τη θεραπεία εκλογής στην πρώτη γραμμή για τη αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του παγκρέατος για πολλά χρόνια [33]. Ο συνδυασμός του φαρμάκου με άλλους κυτταροτοξικούς παράγοντες έχει δείξει μικρό όφελος στη συνολική επιβίωση αλλά αυτό δεν έχει μεταφραστεί σε αλλαγή στην κλινική πράξη λόγω της αυξημένης τοξικότητας και του οριακού οφέλους [34]. Ομοίως, οι συνδυασμοί με νεότερους βιολογικούς παράγοντες απέτυχαν να δείξουν σημαντικό όφελος στην επιβίωση. Η μόνη επιτυχημένη μελέτη ήταν ο συνδυασμός γεμισιταβίνης με την ερλοτινίμη, έναν αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, που έδειξε 12 ημέρες όφελος επιβίωσης σε σύγκριση με τη γεμισιταβίνη μόνη της [35]. Όπως ήταν αναμενόμενο ο συνδυασμός δεν επικράτησε στην κλινική πράξη.

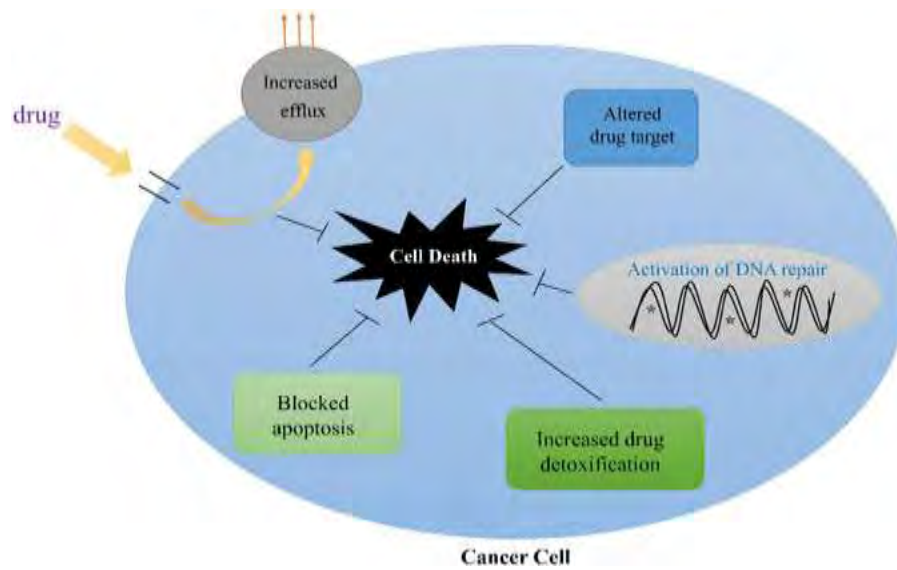
Τα τελευταία χρόνια δυο μελέτες επέτυχαν να αναδείξουν τους συνδυασμούς FOLFIRINOX (5-Fu/ Ιρινοτεκάνη/ Οξαλιπλατίνα) [36] και γεμισιταβίνης/ ναμπ-πακλιταξέλης [37] ως τις νέες θεραπείες εκλογής πρώτης γραμμής για τον καρκίνο του παγκρέατος επιτυγχάνοντας βελτίωση τόσο στο ελεύθερο προόδου νόσου επιβίωση όσο και στη συνολική επιβίωση, όταν συγκρίθηκαν με γεμισιταβίνη. Παρόλα αυτά η μέση επιβίωση ακόμα και με το συνδυασμό τριών φαρμάκων δεν καταφέρνει να ξεπεράσει τους 11,1 μήνες και η ανάγκη για καλύτερες θεραπείες παραμένει επιτακτική.

### 1.2.3 Μηχανισμοί Χημειοαντοχής

Είναι αντιληπτό ότι η χημειοθεραπεία αποτελεί σημαντικό όπλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου, είτε αυτή χρησιμοποιείται για αποτροπή της επανεμφάνισης της νόσου μετά το χειρουργείο (επικουρική θεραπεία) ή ως παρηγορική θεραπεία σε μη ιάσιμη, μεταστατική νόσο. Τα καρκινικά κύτταρα όμως καταφέρνουν να αποκτήσουν αντίσταση στους χημικοθεραπευτικούς παράγοντες μέσα από μια σειρά ξεχωριστών μηχανισμών και μονοπατιών.

Η χημειοαντοχή μπορεί να είναι είτε εγγενής που σχετίζεται με γενετικά χαρακτηριστικά που έχουν τα καρκινικά κύτταρα για να επιβιώσουν σε δυσμενές περιβάλλον ή επίκτητη που αναπτύσσεται μετά από την έκθεση των κυττάρων στα φάρμακα και που μπορεί να σχετίζεται σε εμφάνιση μεταλλάξεων, αυξημένη έκφραση του θεραπευτικού στόχου ή ενεργοποίηση εναλλακτικών σηματοδοτικών μονοπατιών [38]. Η χημειοαντοχή μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη συσσώρευση του παράγοντα στα κύτταρα, σε αυξημένη αποβολή του φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα, σε τροποποίηση του μεταβολισμού του φαρμάκου, σε τροποποίηση στον στόχο ή στο σηματοδοτικό μονοπάτι του που στοχεύει το φάρμακο, σε αυξημένη επισκευή της επαγόμενης, από τους παράγοντες, βλάβης του DNA και αναστολή της απόπτωσης (εικόνα 7).





**Εικόνα 7: Μηχανισμοί Χημειοαντοχής**

Πηγή εικόνας : Kachalaki et al. 2016

### 1.2.3.1 Χημειοαντοχή λόγω μειωμένης ενεργοποίησης ή/και αυξημένης απενεργοποίησης των φαρμάκων

Τα περισσότερα αντινεοπλασματικά φάρμακα μεταβολίζονται από 1<sup>ης</sup> ή 2<sup>ης</sup> φάσης ένζυμα που βρίσκονται στο ήπαρ, στο έντερο ή στον ίδιο τον καρκινικό ιστό [39]. Μερικά αντινεοπλασματικά φάρμακα πρέπει να υποστούν ενεργοποίηση για να επιτελέσουν το κυτταροτοξικό τους αποτέλεσμα. Το κυτόχρωμα P450 (CYP) είναι ένα από τα κύρια ένζυμα 1<sup>ης</sup> φάσης που καταλύουν την οξείδωση πολλών χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Ενδεικτικά, η κυκλοφωσφαμίδη, η ιφωσφαμίδη, η δακαρβαζίνη, η προκαρβαζίνη, η τεγκαφούρη, η ταμοξιφαίνη, και η θειοτέπα, ενεργοποιούνται από ποικίλα CYPs και σχηματίζουν ενεργές μορφές που σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Από την άλλη, ορισμένα αντικαρκινικά φάρμακα αδρανοποιούνται από το κυτόχρωμα. Για παράδειγμα το CYP3A4 μεταβολίζει τις ταξάνες, τα αλκαλοειδή της *vinca*, την ταμοξιφαίνη, την ιματινίμη και τη σοραφενίμη. Η μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας μετά από γενετικές μεταλλάξεις μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην δραστικότητα και τοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων που μεταβολίζονται κυρίως από τα CYPs.

Τα ένζυμα 2<sup>ης</sup> φάσης καταλύουν τη σύζευξη των φαρμάκων με φορτισμένα στοιχεία, όπως η γλουταθειόνη, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται περισσότερο πολικοί μεταβολίτες που αποτελούν καλό υπόστρωμα για διάφορους μεταφορείς. Σημαντικά ένζυμα φάσης 2 είναι UDP τρανσφεράσες του γλυκουρονικού οξέος (UDP-glucuronosyltransferases (UGTs)), τρανσφεράσες της γλουταθειόνης S (glutathione S-transferases (GSTs)), μεθυλο-τρανσφεράσες (methyltransferases), N ακέτυλο-τρανσφεράσες (N-acetyltransferases) και θειο-τρανσφεράσες (sulfotransferases). Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα μεταβολίζονται/ αδρανοποιούνται από αυτά τα ένζυμα. Για παράδειγμα η αδριαμυκίνη, η βουσουλφάνη, η καρμουστίνη, η χλωραμβουκίλη, η cis-πλατίνη, η οξαλιπλατινα, η κυκλοφωσφαμίδη, η μελφαλάνη, η μιτοξαντρόνη και thiotepa αποτελούν ισχυρό υπόστρωμα για τα GSTs.

Η ιρινοτεκάνη μετατρέπεται κυρίως στον ενεργό μεταβολίτη της SN-38 από τις καρβόξυ - εστεράσες του ήπατος που στη συνέχεια αδρανοποιείται από το UGT1A1 [40]. Επομένως, η αυξημένη ή μειωμένη δραστικότητα των ένζυμων σύζευξης όταν υπάρχουν γενετικές μεταλλάξεις μπορεί να αλλάξει την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων που κυρίως μεταβολίζονται από αυτά τα

ένζυμα. Ένα άλλο σημαντικό ένζυμο στην αδρανοποίηση των φαρμάκων είναι η αφυδρογονάση της διυδροπυριμιδίνης (DPD) που μεταβολίζει την 5-φθοριουρακίλη (5-Fu). Η υπερέκφραση του DPD στον ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στις φθοριοπυριμιδίνες [41].

### **1.2.3.2 Χημειοαντοχή οφειλόμενη σε αυξημένη κυτταρική απέκκριση φαρμάκου και μειωμένη ενδοκυττάρια συσσώρευση**

Τόσο οι πρωτογενείς όσο και επίκτητοι μηχανισμοί αντίστασης μπορεί να οφείλονται σε τροποποιήσεις στο μηχανισμό μεταφοράς των αντικαρκινικών φαρμάκων. Σημαντικό ρόλο σε αυτό το μηχανισμό έχουν οι ενεργείς μεταφορείς των φαρμάκων με κυριότερο αντιπρόσωπο τους μεταφορείς κασετών πρόσδεσης ATP (ATP-binding cassette (ABC) transporters)

Η υπερέκφραση αυτών των μεταφορέων στα καρκινικά κύτταρα προκαλεί αντίσταση σε πολλούς κυτταροτοξικούς παράγοντες κατά την χημειοθεραπεία [42]. Μεταξύ αυτών, η γλυκοπρωτεΐνη-P (P-glycoprotein (P-gp/ MDR1/ABCB1), οι πρωτεΐνες σχετιζόμενες με αντοχή πολλών φαρμάκων (MDR-associated proteins (MRPs/ABCCs), και η πρωτεΐνη αντίστασης σε καρκίνο μαστού (BCRP/ABCG2) σχετίζονται με χημειοαντίσταση στους όγκους.

Η MDR1 (ABCB1/P-gp) ήταν ο πρώτος μεταφορέας που ανακαλύφθηκε. Εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς σε χαμηλά επίπεδα, και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε επιθηλιακά κύτταρα που έχουν εκκριτικό ρόλο όπως στο βλεννογόνο του λεπτού και παχέος εντέρου, τους πόρους του παγκρέατος και των χοληφόρων καθώς και τα εγγύς νεφρικά σωληνάρια. Εκφράζεται και σε πολλούς όγκους με αποτέλεσμα την πρωτογενή των αντίσταση, διώχνοντας το φάρμακο έξω από τα καρκινικά κύτταρα. Πολλά αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά όπως η ακτινιμυκίνη- D, οι ταξάνες, οι ανθρακυκλίνες και τα αλακαλοειδή της *vinca* αποτελούν υπόστρωμα για τη MDR1.

Κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να παγιδεύσουν τα φάρμακα και να αναπτύξουν αντίσταση με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η παγίδευση με τη χρήση εξωκυττάρων κυστιδίων που φυσιολογικά χρησιμοποιούνται για την έκκριση σηματοδοτικών μορίων που θα

προσδεθούν σε κύτταρα στόχους. Τέτοιου είδους κυστίδια συμμετέχουν στην φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Τα εξωκυττάρια κυστίδια προκαλούν αντίσταση μέσω δέσμευσης των φαρμάκων. Με αυτή τη διαδικασία τα κύτταρα παγιδεύουν το φάρμακο μειώνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του και περιορίζουν την αποτελεσματικότητά του [43, 44]. Για παράδειγμα, έχουν βρεθεί εκκριτικά εξωσωμάτια που περιέχουν σισπλατίνη σε κύτταρα μελανώματος ανθεκτικά στην σισπλατίνη [45].

Στη δεύτερη περίπτωση βρίσκουμε τους ABC μεταφορείς που βρίσκονται όχι μόνο στην μεμβράνη του πλάσματος αλλά και στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων. Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια που περιέχουν ποικίλα ένζυμα για την πέψη των μεγαλομοριακών ενώσεων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι λυσοσωμικοί ABC μεταφορείς μεταφέρουν το φάρμακο μέσα στο λυσοσώμα όπου παρεμποδίζεται η δράση του. Οι Seebacher et al έδειξαν το στρες, στο οποίο υποβάλλονται τα καρκινικά κύτταρα από το μικροπεριβάλλον του όγκου, οδηγεί σε ανακατανομή των P-gp μεταφορέων από την μεμβράνη του πλάσματος στην μεμβράνη των λυσοσωμάτων και μπορεί να οδηγήσει στην παγίδευση της Doxorubicin μέσα στα λυσοσώματα μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά της [46].

### ***1.2.3.3 Χημειοαντοχή οφειλόμενη στην αποφυγή της απόπτωσης***

Η αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, της απόπτωσης, της αυτοφαγίας ή της προγραμματισμένης νέκρωσης, εμφανίζεται ως ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης και της ανάπτυξης χημειοαντοχής.

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες κατά κανόνα επάγουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση των κασπασών έχει κεντρικό ρόλο στην επίτευξη της απόπτωσης. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές όπως τη κατάτμηση του DNA, τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τη συρρίκνωση των κυττάρων και τη διόγκωση της κυτταρικής μεμβράνης για να ακολουθήσει η καταστροφή το κυττάρου [47].

Οι κασπάσες ρυθμίζονται από την οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως τις Bax, Bad, Bok

and Bak που δρουν ως ενεργοποιητές και αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως Bcl-xL, Bcl-2, Bclw and MCL1 που δρουν ως αναστολείς της απόπτωσης. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας ενεργοποιούν τις κασπάσες και προγραμματίζουν τον κυτταρικό θάνατο με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τις μεμβράνες των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα οι αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας εμποδίζουν την απόπτωση, αναστέλλοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τις μεμβράνες των μιτοχονδρίων

Είναι συχνό εύρημα, τα καρκινικά κύτταρα να ξεφεύγουν από τον κυτταρικό θάνατο υπερεκφράζοντας αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως τη Bcl-2, με αποτέλεσμα την αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Η υπερέκφραση του Bcl-2 χαρακτηρίζει το θυλακιώδες λέμφωμα που προκαλείται από την χρωμοσωμική μετάθεση του Bcl-2 ογκογονιδίου μέσα στο γονίδιο της βαριάς αλυσού της ανοσοσφαιρίνης.

Από την άλλη, σωματικές μεταλλάξεις που προκαλούν αδρανοποίηση της προ-αποπτωτικής δράσης του Bax γονιδίου έχουν παρατηρηθεί σε συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες.

#### ***1.2.3.4 Τροποποίηση του φαρμακευτικού στόχου***

Μεταλλάξεις που τροποποιούν τα επίπεδα έκφρασης του φαρμακευτικού στόχου των αντινεοπλασματικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της θεραπείας μπορούν να οδηγήσουν σε χημειοαντοχή. Στο κύτταρο, η 5-Φθοριοουρακίλη (5-Fu) μεταβολίζεται σε 5-φθοριο-2-δεοξυουριδίνη-5-μονοφωσφορική (5-FdUMP), η οποία είναι ισχυρός αναστολέας του ενζύμου θυμιδική συνθετάση (thymidylate synthase -TS) που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η έκφραση της TS αυξάνεται όταν τα καρκινικά κύτταρα εκτίθενται στη 5-Fu μέσω αναστολής της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης η οποία προκαλείται από την σύζευξη της 5-FdUMP στην TS [48]. Αυξημένη έκφραση της TS έχει συσχετιστεί με χημειοαντοχή ενώ επηρεάζει την συνολική επιβίωση των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 5-Fu [49, 50]. Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη ευνουχοάντοχου καρκίνου προστάτη λόγω γονιδιακής ενίσχυσης του ανδρογονικού υποδοχέα μετά από θεραπεία ανδρογονικού αποκλεισμού, π.χ. με λευπρολίδη ή βικαλουταμίδα [51].

Διάφοροι καρκίνοι εξαρτώνται από συγκεκριμένες ογκογενετικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε κινάσες. Η ανάπτυξη κυττάρων με υπολειμματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο – γονίδια- φρουροί- (gatekeeper genes) αποτελεί συχνό μηχανισμό ανάπτυξης αντίστασης σε παράγοντες που στοχεύουν ογκογενετικές κινάσες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη αντίστασης στους αναστολείς του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) όπως το gefitinib και το erlotinib που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), με την ανάπτυξη της δευτερογενούς μετάλλαξης EGFR-T790M [52]. Η μετάλλαξη αυτή προκύπτει από την παρουσία σημειακής μετάλλαξης με αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος θρεονίνη σε μεθειονίνη στη θέση 790 του γονιδίου EGFR και τη στερική αλλαγή της δομής του υποδοχέα με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης του erlotinib σε αυτόν.

### **1.2.3.5 Αλλαγές στον επισκευαστικό μηχανισμό της βλάβης του DNA**

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επιδιορθώσουν βλάβες του DNA που προκαλούνται από φάρμακα που βλάπτουν το DNA μπορεί να καθορίσει τη χημειοευαισθησία του όγκου. Πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα επάγουν βλάβη DNA είτε άμεσα (για παράδειγμα φάρμακα με βάση την πλατίνα) είτε έμμεσα (για παράδειγμα, οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης). Η κυτταρική απόκριση στη βλάβη του DNA είναι η επισκευή ή ο κυτταρικός θάνατος. Συνεπώς, η ικανότητα αποκατάστασης βλάβης του DNA των καρκινικών κυττάρων έχει σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα των φαρμάκων που καταστρέφουν το DNA.

Η επισκευή του DNA είναι μια σύνθετη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται διάφορες πρωτεΐνες. Κανονικά, τα κύτταρα υποβάλλονται σε απόπτωση μετά από ατελή επισκευή του DNA [53]. Τα παράγωγα της πλατίνας (π.χ., σισπλατίνη, οξαλιπλατίνη και καρβοπλατίνη) επάγουν απόπτωση και κυτταρικό θάνατο αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA δημιουργώντας ένδο-ελικτικούς σταυροειδείς δεσμούς, που οδηγεί σε βλάβη του DNA.

Το σύστημα επισκευής αποκοπής νουκλεοτιδίων [Nucleotide excision repair (NER)] περιλαμβάνει περίπου 30 πρωτεΐνες σε κύτταρα θηλαστικών που συναρμολογούνται σταδιακά για να σχηματίσουν ένα σημαντικό κυτταρικό

μηχανισμό που προωθεί την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες NER είναι οι ομάδες C και G του XP (xeroderma pigmentosum) (XPC και XPG), RNA πολυμεράση (RNAP), η ομάδα A και ομάδα B του συνδρόμου Cockayne (CSA και CSB), ο μεταγραφικός παράγοντας ΠΗ (TFIIH), ERCC1, XPF (ή ERCC4), DNA πολυμεράση και DNA λιγάση. Δυο υπομηχανισμοί έχουν περιγραφεί που έχουν αντίστοιχα στάδια και διαφέρουν μόνο στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο αρχικό στάδιο αναγνώρισης της βλάβης. Ο μηχανισμός *Transcription Coupled Repair (TCR)* επιδιορθώνει γονίδια που εκφράζονται με τη βοήθεια του συμπλόκου RNAP/CSA/CSB [54] ενώ ο μηχανισμός *Global Genomic Repair (GGR)* επιδιορθώνει βλάβες σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες δεν εκφράζονται.

Διάφορες πρωτεΐνες του συστήματος όπως η *Excision Repair Cross-Complementing group 1 (ERCC1)* και η *Xeroderma Pigmentosum Group D (XPD)* συμμετέχουν στην επιδιόρθωση και στην αντοχή του DNA στις βλάβες οδηγώντας στην αντίσταση στα παράγωγα της πλατίνας [55] (εικόνα 8). Αυξημένα επίπεδα στην έκφραση των ERCC1 και XPD mRNA και πρωτεϊνών έχουν συσχετιστεί με αυξημένη αντίσταση σε θεραπεία με παράγωγα της πλατίνας έναντι διαφόρων καρκίνων [56-58]. Αυξημένη έκφραση άλλων στοιχείων του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA, όπως το xeroderma pigmentosum A (XPA) και F (XPF) έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση και ανθεκτικότητα στα παράγωγα πλατίνας [59, 60].

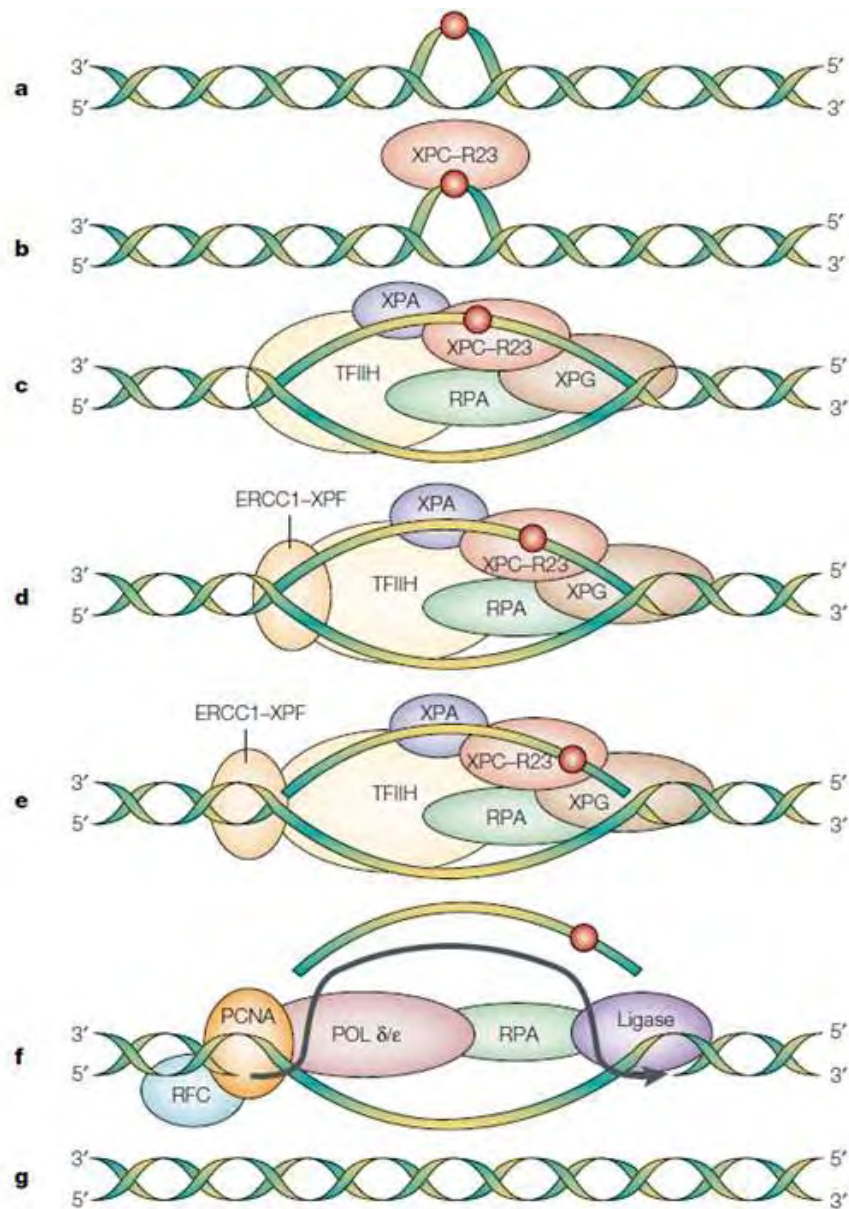
Το σύστημα επιδιόρθωσης της ανακολουθίας του DNA (Mismatch Repair-MMR) είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας και οι μεταλλάξεις στα γονίδια MMR όπως τα MLH1 και MSH2 μπορούν να οδηγήσουν στον φαινότυπο της μικρο-δορυφορικής αστάθειας (microsatellite instability, MSI). Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων διορθώνουν τις ασυμφωνίες νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Κληρονομούμενα ελαττώματα των γονιδίων MMR έχουν συνδεθεί με την αντίσταση σε διάφορες κυτταροτοξικές χημειοθεραπείες που καταστρέφουν το DNA, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων της πλατίνας [61, 62].

Το σύστημα επισκευής εκτομής βάσης [Base Excision Repair (BER)] είναι ένας μηχανισμός που επιδιορθώνει αλλοιώσεις (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, απαμίνωση) βάσης νουκλεοτιδίου και διορθώνει θραύσεις της μίας αλυσίδας του DNA (single strand breaks-SSBs). Μελετάται συχνότερα σε απόκριση της απαμίνωσης κυτοσίνης σε ουρακίλη, που συνήθως προκαλείται από υπεριώδη

ακτινοβολία και σε οξειδωμένη γουανίνη, η οποία είναι συχνά ο στόχος ελευθέρων ριζών [63].

Τα κρίσιμα ένζυμα σε αυτόν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης είναι οι DNA γλυκοζυλάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες τροποποιημένες βάσεις DNA και διασπών την ανώμαλη βάση υδρολύοντας το γλυκοζυλικό δεσμό που συνδέει τη βάση με το DNA. Αυτή η θέση αναγνωρίζεται στη συνέχεια από ενδονουκλεάσες, όπως η Ape1, ως απουρινική / απυριμιδική, που εισάγουν SSBs. Η PARP-1 δεσμεύεται στο SSB και προσελκύει επιδιορθωτικά ένζυμα. Στη συνέχεια αποσυνδέεται επιτρέποντας την προσθήκη του συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου και τη συγκόλληση με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης β (POLβ) και της XRCC1-DNA λιγάσης IIIα και έτσι την ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης. Ο BER θεωρείται μηχανισμός επισκευής DNA υψηλής πιστότητας και απαιτείται για την προφύλαξη από την καρκινογένεση που προκαλείται μέσω οξειδωτικής καταστροφής του DNA στο έντερο, τον πνεύμονα και το δέρμα [64].





**Εικόνα 8:** Το σύστημα επισκευής αποκοπής νουκλεοτιδίων (NER) [65]

- a. Το NER λειτουργεί όταν υπάρχουν βλάβες βάσης του DNA οι οποίες παραμορφώνουν το σχήμα της έλικας του DNA. Τέτοιες βλάβες προκαλούνται από εξωγενείς παράγοντες όπως τα χημικά καρκινογόνα και την υπεριώδη ακτινοβολία
- b. Η βλάβη αυτή αναγνωρίζεται από την XPC πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται σταθερά με άλλη πρωτεΐνη που ονομάζεται HHRAD23B (R23).

- c. Η σύνδεση του ετεροδιμερούς XPC-R23 ακολουθείται από τη δέσμευση αρκετών άλλες πρωτεΐνες (XPA, RPA, TFIIH και XPG). Τα XPA και RPA πιστεύεται ότι διευκολύνουν την αναγνώριση της βλάβης της βάσης. Ο TFIIH είναι μια υπομονάδα του μηχανισμού εκκίνησης μεταγραφής της RNA πολυμεράσης II, Αποτελείται από έξι υπομονάδες και περιέχει δύο ελικάσες του DNA (την XPB και XPD) που ξετυλίγουν την έλικα του DNA γειτονικά της βλάβης. Αυτή η τοπική μετουσίωση δημιουργεί μια «φούσκα» στο DNA μήκους 20-30 ζευγών βάσεων.
- d. Η επακόλουθη δέσμευση του ετεροδιμερούς υπομονάδας ERCC1-XPF ολοκληρώνει το σύμπλοκο του NER.
- e. Το XPG είναι μια διπλή / μονόκλωνη DNA ενδονουκλεάση που κόβει το φωσφοδιεστερικού δεσμού του DNA 3' από τη βλάβη. Αντίστροφα, σύμπλοκο ERCC1-XPF είναι μια ενδονουκλεάση που κόβει το φωσφοδιεστερικού δεσμού του DNA 5' από τη βλάβη. Αυτή η διτροπική τομή δημιουργεί ένα θραύσμα ολιγονουκλεοτιδίου ~ μήκους 27-30 νουκλεοτιδίων το οποίο περιλαμβάνει την κατεστραμμένη βάση.
- f. Το θραύσμα αποκόπτεται από το γονιδίωμα, ταυτόχρονα με την αποκατάσταση του κενού των 27-30 νουκλεοτιδίων μέσω επισκευαστικής σύνθεσης. Η επισκευαστική σύνθεση απαιτεί τις DNA πολυμεράσες δ ή ε, καθώς και τις βοηθητικές πρωτεΐνες αντιγραφής PCNA, RPA και RFC. Η ομοιοπολική ακεραιότητα των κατεστραμμένων κλώνων στη συνέχεια αποκαθίσταται με τη βοήθεια μιας λιγάσης του DNA.
- g. Το DNA επιστρέφει στη φυσική του μορφή.

ERCC1: excision repair crosscomplementing-1, 1 PCNA: αντιγόνο πυρηνικού πολλαπλασιασμού κυττάρων. POL: πολυμεράση. RFC: παράγοντας αντιγραφής C. RPA: πρωτεΐνη αντιγραφής A. TFIIH: μεταγραφικός παράγοντας IIH. XP: xeroderma pigmentosum

Πηγή εικόνας: Friedberg et al.2001

Το γονίδιο ERCC1 (excision repair cross complementation–group 1) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 (19q13.3) και κωδικοποιεί την 32kDa (~ 300 αμινοξέα) ERCC1 ενδονουκλεάση που στον άνθρωπο συνεργάζεται με την σχεδόν τριπλάσια βαρύτερη πρωτεΐνη XPF για την επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Υπάρχουν δύο κύριοι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ERCC1, που δεν μεταβάλλουν την αλληλουχία των αμινοξέων και τη δομή της πρωτεΐνης: ο rs3212986 (που επίσης ονομάζεται ERCC1 C8092A ή \*197G > T) και ο rs11615 (που επίσης ονομάζεται ERCC1 T19007C ή ERCC1C118T ή ERCC1 Asn118Asn). Ο πρώτος βρίσκεται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR), και ο δεύτερος αντιστοιχεί σε σημειακή μεταβολή στο εξόνιο 4. Και οι δύο φαίνεται να επηρεάζουν τη σταθερότητα και τα επίπεδα του πυρηνικού mRNA του ERCC1 και συνεπώς την έκφραση της πρωτεΐνης ERCC1 [66]. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο C118T [αντικατάσταση της κυτιδίνης από θυμίνη (C→T)] του rs11615, ακόμη και αν δεν καθορίζει μια αλλαγή στο αμινοξύ (Asn 118 Asn), υποτίθεται ότι μειώνει την αποτελεσματικότητα μετάφρασης του ERCC1mRNA με επακόλουθη μειωμένη έκφραση πρωτεΐνης ERCC1. Έχουν εντοπιστεί και άλλοι 3 πολυμορφισμοί που βρίσκονται στα ιντρόνια 3, 4 και 5: IVS3 + 74C> G (rs3212948), IVS4 + 86T> C (rs3212955) και IV5 + 33C> A (rs3212961), αντίστοιχα, που είναι πολύ πιο σπάνια και έχουν ερευνηθεί λιγότερο.

Το γονίδιο της ομάδας D του Xeroderma Pigmentosum (XPD), επίσης γνωστό και ως excision repair cross-complementing group 2 (ERCC2), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και κωδικοποιεί μια 5'-3' ελικάση που έχει μήκος 761 αμινοξέων με μοριακό βάρος 86.909 Da. Η ελικάση αποτελείται από 4 τομείς και είναι κύριο συστατικό του μεταγραφικού παράγοντα TFIIH [67]. Συμμετέχει στο ξετύλιγμα του κατεστραμμένου DNA, μετά από την αναγνώριση της βλάβης μέσω των μηχανισμών GGR ή TCR NER [68].

Πολυμορφισμοί του γονιδίου XPD έχουν παρατηρηθεί σχεδόν σε κάθε περιοχή της δομής της ελικάσης. Πολυμορφισμοί που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση νεοπλασίας είναι οι R156R (rs238406), D312N (rs1799793) και K751Q (rs13181). Ένας συχνός πολυμορφισμός του γονιδίου XPD απαντάται στο κωδικόνιο 751. Ονομάζεται rs13181, c.2251A>C, p.Lys751Gln ή K751Q, [Lys751Gln (rs13181, G> A)] και έχει μελετηθεί ως προς την αντίσταση σε πλατινούχα σκευάσματα.

### **1.2.3.6 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη και χημειοαντοχή του όγκου**

Πρώτος ο Paget το 1889 εισήγαγε την έννοια του μικροπεριβάλλοντος με τη λεγόμενη υπόθεση του «σπόρου και του εδάφους» (“seed and soil” hypothesis), κατά την οποία για την ανάπτυξη των σπόρων –καρκινικών κυττάρων- χρειάζεται το κατάλληλο έδαφος-μικροπεριβάλλον [69]. Με τον όρο μικροπεριβάλλον ή στρώμα του όγκου, περιγράφεται η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix-ECM), οι ινοβλάστες, τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα αγγεία του όγκου και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα. Ενώ για πολλές δεκαετίες θεωρούνταν ότι ο καρκίνος είναι η κλωνική ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, είναι πλέον κατανοητό ότι η επαγωγή και η ανάπτυξη του όγκου υποστηρίζεται από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος τα οποία βρίσκονται σε δυναμική αλληλεξάρτηση με τα καρκινικά κύτταρα [70]. Τα κύτταρα του στρώματος φαίνονται να επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων, να προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση, να ενεργοποιούν την αγγειογένεση και να διευκολύνουν τη μετάσταση [71-74]. Τα κύτταρα του στρώματος φαίνεται να καταστέλλουν την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού, συντελώντας περαιτέρω στην επιβίωση και ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον, το μικροπεριβάλλον φαίνεται να δημιουργεί φραγμό στη διήθηση θεραπευτικών παραγόντων στον όγκο. Για να λειτουργήσουν, τα φάρμακα πρέπει να περάσουν τα αιμοφόρα αγγεία και να εισέλθουν στον καρκινικό ιστό [75]. Η διαδικασία αυτή γίνεται με μεταγωγή (convection) και/ή διάχυση (diffusion). Η μεταγωγή εξαρτάται από τη διαφορά πίεσης μεταξύ του ενδαγγειακού και του μεσοκυττάριου χώρου, την αγγειακή διαπερατότητα, τον όγκο και τη δομή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Στους όγκους η διαφορά της ωσμωτικής πίεσης είναι συνήθως μηδενική, ενώ η υδροστατική πίεση του μεσοκυττάριου χώρου είναι συνήθως υψηλή και ίση με την τριχοειδή αρτηριακή πίεση [76]. Η κατάσταση αυτή μειώνει τη διαρροή μακρομορίων στον όγκο και ειδικότερα στο κεντρικό του τμήμα και οδηγεί σε χημειοαντοχή [77]. Οι παρατηρήσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται στην επικαιροποιημένη δημοσίευση των Hannahan και Weinberg για τα χαρακτηριστικά του καρκίνου [1].

Η αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους καθώς και με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, επιτυγχάνεται μέσω των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικοί υποδοχείς που συνδέουν τα κύτταρα με την ECM. Η έκφραση τους μπορεί να μεταβάλλεται στα καρκινικά κύτταρα ενώ η αυξημένη τους έκφραση σχετίζεται με βελτίωση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη χημειοαντοχής [78]. Η ιντεγκρίνη β1 έχει εμπλακεί στην ανάπτυξη αντοχής στην ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου, και ανάπτυξη αντίστασης στη λαπατινίμη και την τραστουζουμάμη σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών συμπεριλαμβανομένων των PI3K-AKT, ERK και NF-κB [79].

Οι ινοβλάστες αποτελούν κύρια κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος ρυθμίζοντας τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων μέσω της έκκρισης πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, αυξητικών και αγγειογενετικών παραγόντων. Φαίνεται να βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση με τα καρκινικά κύτταρα και μετά από τη λήψη ερεθισμάτων από τα καρκινικά κύτταρα οι ινοβλάστες αντιδρούν με την έκκριση αυξητικών παραγόντων που τροφοδοτούν τα καρκινικά κύτταρα [3]. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τον ρόλο των ινοβλαστών στην ανάπτυξη χημειοαντοχής όχι μόνος σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [80] αλλά και σε στοχεύουσες θεραπείες όπως οι RAF αναστολείς σε κύτταρα μελανώματος [81].

Το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος χαρακτηρίζεται από έντονη δεσμοπλαστική αντίδραση και ελλιπή αγγειογένεση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την περιορισμένη διήθηση των χημειοθεραπευτικών ουσιών στον όγκο με αποτέλεσμα το πτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα [82]. Προκλινικά μοντέλα σε ποντίκια έχουν αναδείξει ότι η στόχευση του μικροπεριβάλλοντος βελτιώνει τη διήθηση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στον όγκο με βελτίωση της επιβίωσης [83]. Η προσέγγιση αυτή δοκιμάζεται και στην κλινική πράξη σε μελέτες αρχικής φάσης.

#### 1.2.4 Η Καβεολίνη-1 και τα μικροσπήλαια (caveolae)

Τα Caveolae (Λατινικός όρος για το "little caves"- μικροσπήλαια) είναι μικρές, 50 έως 100 nm, εγκοιλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης, σχήματος φιάλης, εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια. Τα Caveolae μπορούν να υπάρχουν ως μεμονωμένες εγκοιλώσεις ή να βρίσκονται σε ανεξάρτητες συσπειρώσεις που μοιάζουν σαν σταφύλι και μακρούς σωληνοειδείς σχηματισμούς που προέρχονται από τη σύντηξη ενός Caveolae εντός του κυτταροπλάσματος. Τα Caveolae εντοπίστηκαν τη δεκαετία του 1950 σε τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα από τη χοληδόχο κύστη του ποντικού [84] . Από τότε, τα Caveolae έχουν βρεθεί σε μια ευρεία ποικιλία ιστών και κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των λιποκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των γραμμωτών και λείων μυϊκών κυττάρων, των ινοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων.

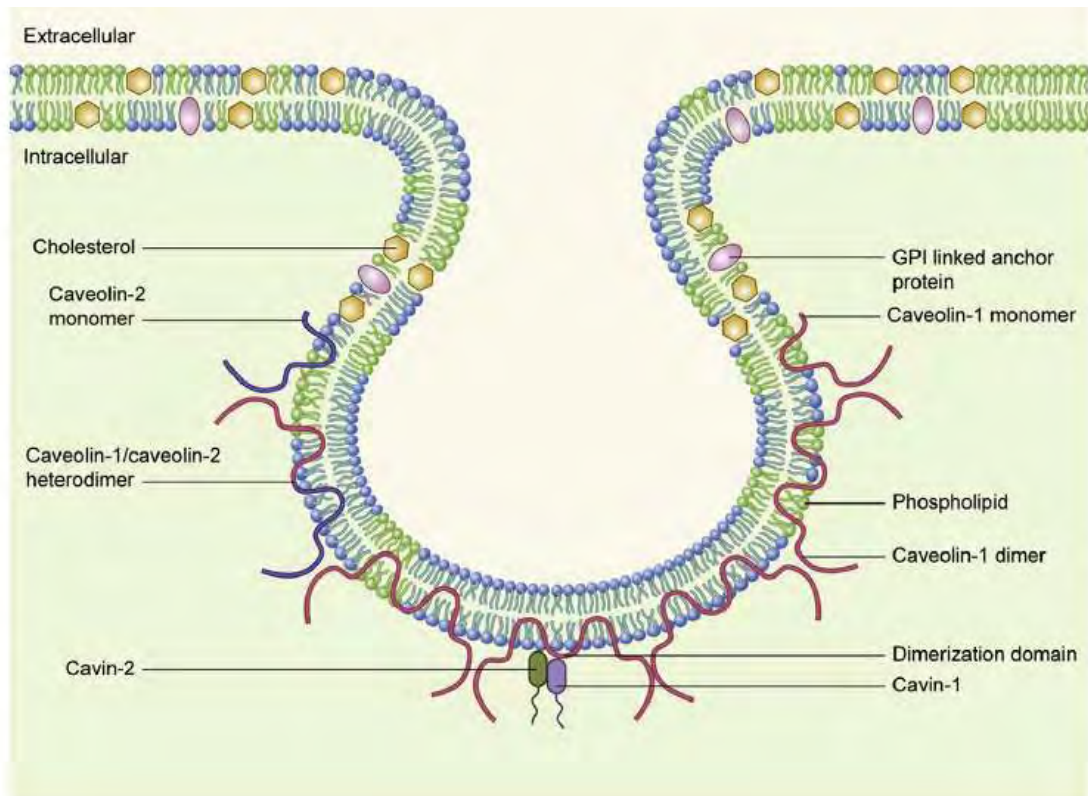
Τα Caveolae είναι πλούσια σε πρωτεΐνες με δομή ικρίωματος που είναι συνδεδεμένες με τη μεμβράνη και εμπλέκονται σε ποικιλία λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της ενδοκύττωσης, της μεταφοράς της χοληστερόλης καθώς και της ρύθμισης ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος. Τα Caveolae αρχικά είχαν θεωρηθεί ότι λειτουργούν ως κυστίδια μεταφοράς μακρομορίων. Από τότε, ο ρόλος τους έχει επεκταθεί στη μεταγωγή σήματος, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στην ομοιόσταση της χοληστερόλης, στην ενδοκύττωση, στην ανάπτυξη αλλά και στην καταστολή του όγκου. Έχει προταθεί ότι τα μέλη της οικογένειας της Caveolin (σπηλαιίνη) που είναι η Caveolin- 1, η Caveolin-2 και η Caveolin-3 λειτουργούν ως πρωτεΐνες με δομή ικρίωματος ώστε να συγκεντρωθούν και να οργανωθούν ειδικά λιπίδια (χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια και μόρια σηματοδότησης τροποποιημένων λιπιδίων) μέσα στις μεμβράνες των Caveolae. Αυτά τα μόρια περιλαμβάνουν υποδοχείς συζευγμένους με την πρωτεΐνη G, ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες, υποδοχείς τυροσινικών κινασών, μόρια του μονοπατιού της Ras ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης, τυροσινικές κινάσες της οικογενείας Src, ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C και συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (NOS) [85] .

Η Caveolin-1 (Cav-1) ανακαλύφθηκε το 1992 ως κύριο συστατικό των caveolae [86]. Λίγα χρόνια αργότερα βρέθηκαν οι δυο άλλες ισομορφές η Caveolin-2 (Cav-2) [87] και Caveolin-3 (Cav-3), που βρίσκεται στους σκελετικούς μύες, σε ορισμένα

λεία μυϊκά κύτταρα και νευρογλοιακά κύτταρα [88]. Την τελευταία δεκαετία έγινε αντιληπτό ότι εκτός από τις Cav-1 και Cav-3, που είναι κύριο συστατικό των μικροσπλαιίων, σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό, τη σταθεροποίηση και τη λειτουργία των Caveolae έχει και μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζεται Cavins (cavin1-4) [85] (εικόνα 9).

Ο ρόλος της Cav-2, η οποία δρα ως βοηθητική πρωτεΐνη αλλά δεν είναι απαραίτητη για σχηματισμό των Caveolae, παραμένει λιγότερο κατανοητός, και φαίνεται να συμμετέχει στην μετάδοση ενδοκυττάρων σημάτων μέσω υποδοχέων στη μεμβράνη του πλάσματος [85]. Η φωσφορυλιωμένη μορφή στη Ser-36 έχει ρόλο στη ρύθμιση της μίτωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι επίσης θετικός ρυθμιστής της κυτταρικής μιτογένεσης του μονοπατιού σηματοδότησης MAPK. Τέλος απαιτείται για την πυρηνική μετατόπιση που διεγείρεται από την ινσουλίνη και την ενεργοποίηση των MAPK1 και STAT3 και την επακόλουθη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου [89]. Η χοληστερόλη είναι ένα άλλο σημαντικό συστατικό των Caveolae, δεδομένου ότι τα φάρμακα που απομονώνουν ή εξαντλούν την ενδοκυττάρια χοληστερόλη οδηγούν στην εξαφάνιση των Caveolae [90].

Και οι τρεις Caveolins δείχνουν μια ασυνήθιστη τοπολογία με αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα στο κυτταρόπλασμα και μια μεγάλη υποθετική φουρκέτα ως ενδομεμβρανικό τμήμα. Ο σχηματισμός των Caveolae από την Cav -1 και Cav -3 περιλαμβάνει ολιγομερισμό και σύνδεση με τους τομείς των λιπιδικών σχεδίων που είναι πλούσια σε χοληστερόλη. Η Cav -1 δεσμεύεται με 1-2 μόρια χοληστερόλης και είναι παλμιτουλιωμένη στην C-τερματική περιοχή. Η εξάντληση της χοληστερόλης διαταράσσει τη δομή των Caveolae [86].



**Εικόνα 9:** Η αλληλεπίδραση των Caveolins με μέλη καβίνης για το σχηματισμό των caveolae, Οι Caveolin-1 και caveolin-2 μπορεί να υπάρχουν ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Η παρουσία των Cavin-1 και -2 επιτρέπει στις Caveolin-1 / Caveolin-2 να αλληλεπιδράσουν μέσα στην κυτταρική μεμβράνη για να σχηματίσουν έτερο-ολιγομερή στα caveolae, Απουσία των Cavin-1 ή του Cavin-2, τα ολιγομερή της καβεολίνης που είναι ενσωματωμένα στην κυτταρική μεμβράνη δεν μπορούν να συμβάλλουν στον σχηματισμό των σπηλαίων<sup>88</sup>.

Πηγή εικόνας: Gupta R et al. 2014



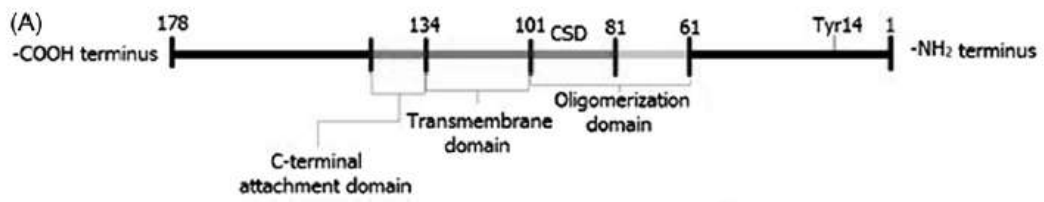
Η Caveolin-1 (Cav-1) είναι μια πρωτεΐνη 178 αμινοξέων μεγέθους 21- έως 24-kDa και είναι το κύριο συστατικό των Caveolae. Εκφράζεται σε αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα, σε ινοβλάστες, σε λιποκύτταρα και κύτταρα των λείων μυών [91]. Το γονίδιο της Cav-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 στην περιοχή q31.1. Η πρωτεΐνη συντίθεται αρχικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), μεταφέρεται στη συσκευή Golgi, και στη συνέχεια τη μεμβράνη του πλάσματος.

Υπάρχουν δύο ισομορφές της Cav-1: η Cav-1a, μία πρωτεΐνη 24 kDa η οποία περιέχει τα υπολείμματα 1-178 και η Cav-1b, η οποία είναι η N-αποκομμένη μορφή της Cav-1a, είναι 21 kDa που περιέχει τα υπολείμματα 32-178, είναι δηλαδή 31 αμινοξέα βραχύτερη από την a. Η ισομορφή b μεταφράζεται από το ίδιο mRNA με τη μακρύτερη μορφή, αλλά σε αποκλίνοντες χώρους έναρξης μετάφρασης. Και οι δύο ισομορφές έχουν δύο υδρόφιλες περιοχές στα C- και N-άκρα, και ένα υδρόφοβο κεντρικό πεδίο. *In vitro*, έχει δειχθεί ότι και οι δυο ισομορφές υποβάλλονται σε φωσφορυλίωση της σερίνης. Ωστόσο, μόνο η b-ισομορφή υποβάλλεται σε φωσφορυλίωση *in vivo*, υποδηλώνοντας διαφορετικές λειτουργίες που σχετίζονται με κάθε ισομορφή [92]. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης της Cav-1 από μια Src κινάση, αποσυνδέει τη Cav-1 από τα Caveolae και έτσι αυτά αποσταθεροποιούνται. Αυτή η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στη θέση 14 (Tyr-14) και επομένως είναι χαρακτηριστικό μόνο της Cav-1a.

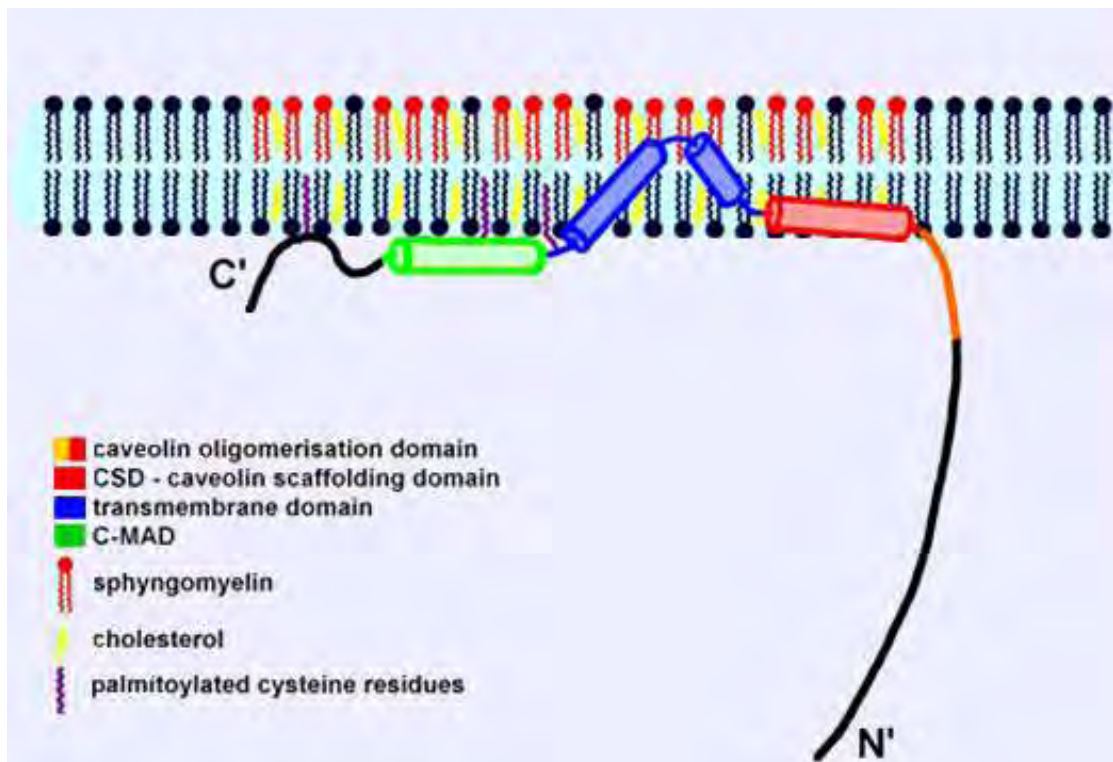
Έχουν οριστεί αρκετοί λειτουργικοί τομείς της Cav-1 (εικόνα 10). Οι περιοχές σύνδεσης στη μεμβράνη (membrane attachment domains-MAD) εντοπίζονται στα N- και C-άκρα και ορίζονται ως N- MAD (αμινοξέα 82-101) και C-MAD (αμινοξέα 135-150). Η Cav-1 περιέχει θέσεις παλμιτοϋλίωσης της κυστίνης στις θέσεις Cys<sub>133</sub>, 143 και 156, που εμπλέκονται στην αγκίστρωση στη μεμβράνη. Η κεντρική περιοχή (αμινοξέα 102-134, transmembrane domain-TMD) προτάθηκε αρχικά να είναι η διαμεμβρανική περιοχή, αλλά, όπως έγινε αντιληπτό από τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης, αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται στον έτερο-ολιγομερισμό της Cav-1 με τη caveolin-2 και σε ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Η caveolin scaffolding domain (CSD), που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 82-101), εμπλέκεται στη δέσμευση και αναστολή πρωτεϊνών που περιέχουν ένα καθορισμένο μοτίβο δεσμεύσεως caveolin, όπως XAAAAXAAX ή XAXAAAAX - όπου X είναι ένα αρωματικό αμινοξύ (Trp, Phe ή Tyr) και A οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ. Ο τομέας ολιγομερισμού (αμινοξέα 61-101) περιέχει τη CSD και κατευθύνει το σχηματισμό

όμο-ολιγομερών (14-16 μόρια Cav-1), τα οποία αλληλεπιδρούν με χοληστερόλη και μόρια σηματοδότησης [93].

Η Cav-1 είναι μια πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες: ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος, τις μεταφορές στη μεμβράνη και την ομοιόσταση των λιπιδίων. Η παρουσία των αρωματικών αμινοξέων στη CSD περιοχή επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση της Cav-1 με μια σειρά μορίων σηματοδότησης εντός των Caveolae. Αυτές οι πρωτεΐνες σηματοδότησης περιλαμβάνουν άλφα υπομονάδες της G-πρωτεΐνης, H-Ras, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταφορά ασβεστίου. τη συνθετάση του νιτρικού οξειδίου του ενδοθηλίου (Endothelial Nitric Oxide Synthase-eNOS), τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR), τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet Derived Growth factor receptor - PDGFR), τον αυξητικό παράγοντα των νευρώνων, ιντεγκρίνες, κινάσες σερίνης / θρεονίνης, φωσφολιπάσες, και κινάσες της οικογένειας Src.



(B)



**Εικόνα 10:** Η δομή της caveolin-1

Πηγή εικόνας: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CAV1ID932ch7q31.html>

Η συσχέτιση της Cav-1 με την ανάπτυξη καρκίνου έχει μελετηθεί από την ταυτοποίησή της. Αρχικά, περιγράφηκε ως ο κύριος στόχος του ιού του σαρκώματος Rous κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων σε νεοπλασματικά μέσω της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης στην πρωτεΐνη, υποδηλώνοντας ότι η CAV-1 μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα κρίσιμο στόχο κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας [94]. Αρκετές μελέτες από τότε έχουν αποκαλύψει τη σημασία της Cav-1 κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου ενώ η έκφρασή της ανιχνεύθηκε σε διαφορετικούς τύπους όγκων. Σε πολλές αναφορές, η έκφραση της Cav-1 βρέθηκε ότι σχετίζεται με την ιστολογική διαφοροποίηση, το μέγεθος και το στάδιο του όγκου, καθώς και με τη συνολική πρόγνωση. Σε άλλες μελέτες όμως, φάνηκε ότι μπορεί να έχει ογκοτασταλτικό ρόλο [93]. Ο διττός αυτός ρόλος φαίνεται να σχετίζεται με τη είδος του όγκου.

Η Cav-1 φαίνεται να ενέχεται σε πολλαπλές διαδικασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως το μετασχηματισμό των κυττάρων, την ανάπτυξη του όγκου, τον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση, τη φαρμακευτική αντοχή, την αγγειογένεση, τη κυτταρική διήθηση και μετανάστευση, την απόπτωση και τη μετάσταση. Η έλλειψη της Cav-1 προάγει το μονοπάτι PI3K/AKT, EGFR-MAPK και τη σηματοδότηση μέσω της Mitogen-activated protein kinase- MAPK σε καρκινικά κύτταρα μαστού και παγκρέατος καθώς και στους ινοβλάστες NIH 3T3. Μειωμένη έκφραση της Cav-1 έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, σαρκωμάτων και οστεοσαρκωμάτων, ενώ η επανέκφραση της Cav-1 αντέστρεψε το μετασχηματισμένο φαινότυπο. Αντίθετα, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο της Cav-1 στο να προάγει την ανάπτυξη του όγκου. Κλινικοπαθολογικές αναλύσεις σε ασθενείς με καρκίνο του οισοφάγου, του μαστού, του νεφρού, του εγκεφάλου, του πνεύμονα και του προστάτη ανέδειξαν αυτό το ρόλο. Η υπερέκφραση της caveolin-1 πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα έχει συσχετιστεί με επιθετική συμπεριφορά και δυσμενή πρόγνωση σε διάφορες μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος [95-99]. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στον παγκρεατικό καρκίνο έχει συσχετιστεί με το μέγεθος του όγκου, τη διαφοροποίηση, τα αυξημένα επίπεδα του καρκινικού δείκτη Ca 19-9 και γενικά με επιθετική βιολογική συμπεριφορά [95, 96, 100]. Εντούτοις, αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν περιγραφεί σε διάφορους καρκίνους [101] ενώ η απώλεια της caveolin-1 στο

στρώμα παρά στον όγκο έχει συσχετιστεί με δυσμενές κλινικό αποτέλεσμα [70, 102-106].

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την caveolin-1 ως σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη χήμειο- και άκτινο- αντοχής σε διάφορες μορφές καρκίνου [107, 108], ενώ φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη πολύ-φαρμακευτικής αντοχής (Multi Drug Resistance - MDR) [109]. Οι υπάρχουσες μελέτες όμως, εμφανίζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς τη σχέση της Cav-1 στην ανάπτυξη χημειοαντοχής στον καρκίνο του παγκρέατος [110-112]. Επιπλέον, δεν είναι σαφές εάν η έκφραση της Cav-1 στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα ή στους ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer Associated Fibroblasts-CAFs) καθορίζει την ανταπόκριση στη θεραπεία ή τη συνολική πρόγνωση [95, 104, 113]

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη μηχανισμών χημειοαντοχής σε συχνούς καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος.

Αρχικά μελετήθηκε η συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών συσχετιζόμενων με τη επιδιόρθωση βλαβών του DNA από τη δράση της οξαλιπλατίνας και της τοξικότητας και της αποτελεσματικότητας που προκαλείται σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία για κολοορθικό καρκίνο. Επιπλέον μελετήθηκε η επίπτωση των πολυμορφισμών των ERCC1-118 και XPD-751 σε πληθυσμό Ελλήνων ασθενών με κολοορθικό καρκίνο που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία με οξαλιπλατίνα.

Κατόπιν μελετήθηκε ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος και ιδίως των ινοβλαστών στην ανάπτυξη χημειοαντοχής στον καρκίνο του παγκρέατος. Πιο ειδικά αναλύθηκε ο ρόλος της έκφρασης της Cav-1 στους ινοβλάστες σε σύγκριση με την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα τόσο στην ανάπτυξη του όγκου όσο και σε σχέση με την χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων τόσο *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και *in vivo* χρησιμοποιώντας ζωικά πρότυπα καρκίνου που αναπτύχθηκαν με τη χρήση ανοσοκατασταλμένων ποντικών (ξενομοσχεύματα ανθρώπινου όγκου σε ποντίκια).

### **3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

### 3.1 Μέρος Α - Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων

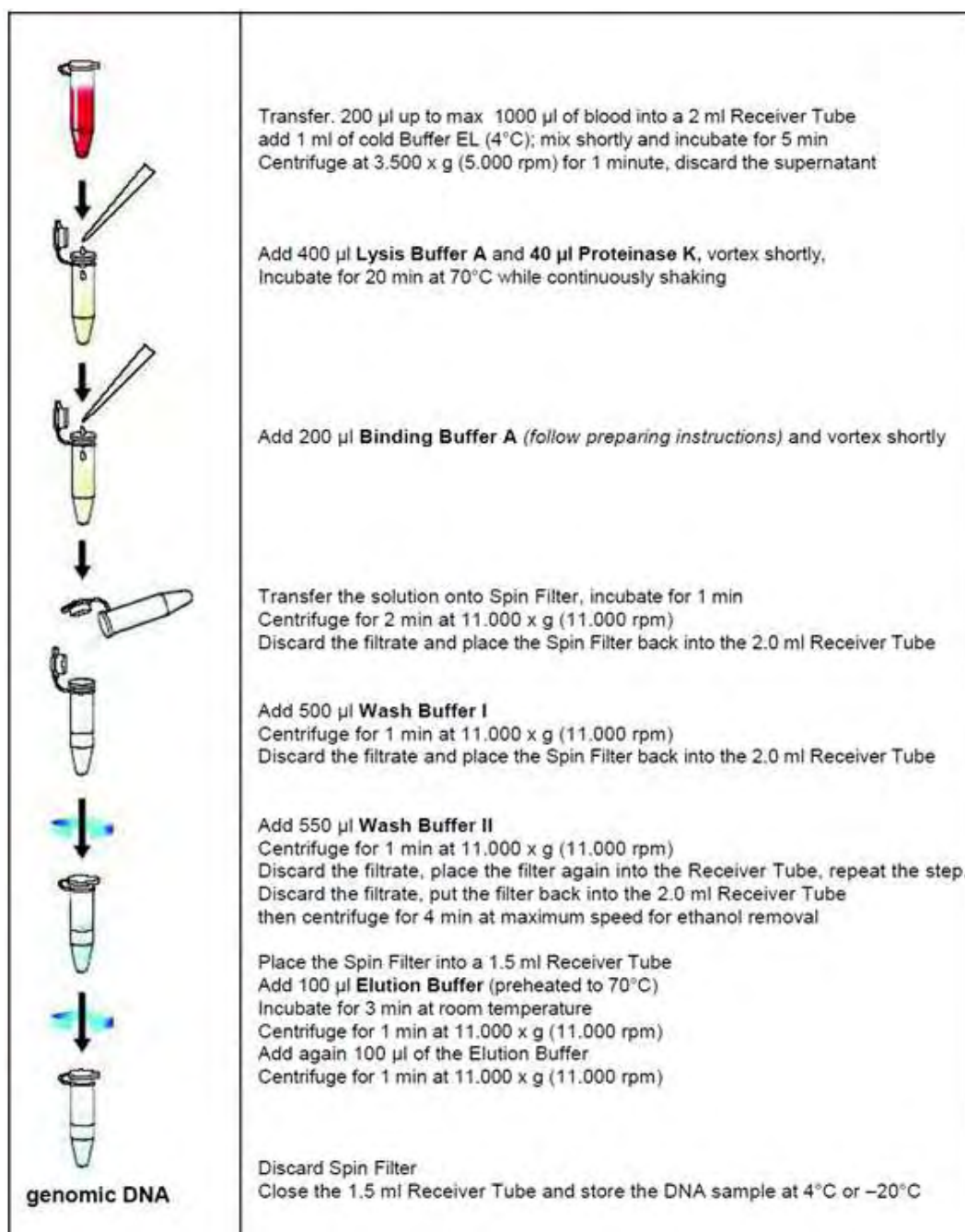
#### 3.1.1. Απομόνωση και γενοτύπηση DNA

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο που έλαβαν επικουρική ή πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία στα πλαίσια κλινικών μελετών της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας (ΕΣΟΟ, HeCOG).

Όλοι οι ασθενείς παρείχαν δείγμα περιφερικού αίματος από το οποίο εξήχθη κυτταρικό DNA από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΚΠΙΑ/Peripheral Blood MonoCytes,PBMCs) μετά από υπογεγραμμένη συγκατάθεση για τη χρήση του βιολογικού υλικού τους για ερευνητικούς σκοπούς.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκε 1 ml αίματος για να εξαχθεί καθαρό γονιδιωματικό DNA υπό αυστηρά αποστειρωμένες συνθήκες, ακολουθώντας τη διαδικασία επτά σταδίων του Invisorb® Spin Blood Midi Kit (Stratec Molecular GmbH, Βερολίνο, Γερμανία) για το σύστημα εξαγωγής DNA (εικόνα Α1). Το εκχυλισμένο DNA μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματομετρία και αντίστοιχη ανάλυση λογισμικού. Η τελική συγκέντρωση καθαρού DNA κυμαίνεται μεταξύ 10-95 ng / μl. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 5 - 10 μl για την πραγματοποίηση επάλληλης (nested) αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για να παραχθεί υψηλότερη απόδοση της ερευνηθείσας περιοχής του γονιδίου, όπου εντοπίζεται κάθε πολυμορφισμός που μελετήθηκε.





**Εικόνα Α1:** Απομόνωση DNA

Πηγή εικόνας: [http://www.negev-bioproducts.com/content/Images/CatalogImages/ProductVariations/PV\\_ID\\_30/InvisorbSpinBloodMidiKit2.pdf](http://www.negev-bioproducts.com/content/Images/CatalogImages/ProductVariations/PV_ID_30/InvisorbSpinBloodMidiKit2.pdf)

### 3.1.2 Γενοτύπηση του απομονωθέντος γενομικού DNA των ΜΚΠΑ

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επάλληλης (nested) αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με την ανάλυση των πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism) για τον προσδιορισμό του γονότυπου αμφότερων των ERCC1-C118T (κωδικόνιο 118 C→T, rs11615) και ERCC2/XPD-K751Q (κωδικόνιο 751 K→Q, rs13181).

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών ακολουθήσαμε το μέθοδο γενοτύπησης με TaqMan πολυμεράση (Applied Biosystems, Biosolutions, Athens, GR). Για τον πολυμορφισμό ERCC1-C118T τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ζεύγος εκκινητών 5'-TGCAAGAAGAGGTGGAGGAGG-3' και 5'-CTCCAGCTCTTGTGTCAGT-3' για τον πρώτο κύκλο PCR και το ζεύγος 5'-CTGTGGTTATCAAGGGTCATC-3 και 5'-TGGGCACCTCCAGGCCAAGA-3 για το δεύτερο κύκλο.

Οι αντίστοιχες συνθήκες PCR για κάθε γύρο ήταν: στον πρώτο γύρο, ένας κύκλος για 1 λεπτό στους 94 ° C (αρχική μετουσίωση), 35 κύκλοι για 1 λεπτό στους 94 ° C, 1 λεπτό στους 56 ° C (ανόπτηση), 1 λεπτό στους 72 ° C (επέκταση), που ακολουθείται από έναν κύκλο για 7 λεπτά στους 72 ° C. Στον επάλληλο (nested) γύρο, ακολουθήθηκαν παρόμοιες συνθήκες με τον πρώτο γύρο, εκτός από τους συνολικούς κύκλους της αντίδρασης οι οποίοι ήταν 30 αντί για 35. Και στους δύο γύρους, κάθε μίγμα αντίδρασης DNA περιείχε 0,5 μg DNA / 25 μl τελικού όγκου αντίδρασης. Το σύστημα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Colorless Go Taq Flexi® DNA Polymerase (Promega Corporation, WI, USA).

Στη συνέχεια τα προϊόντα (μεγέθους 333bp) υποβλήθηκαν σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση BsrDI (New England BioLabs, MA, USA) για 16 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% (FMC BioProducts, Rockland, Me, USA) μαζί με μία κλίμακα DNA 100 bp (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA), και εμφάνιση με υπεριώδη ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide).

Για τον πολυμορφισμό ERCC2/XPD-K751Q χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών 5'-CTCTGGATTATACGGACATC-3' και 5'-

GACGTGACAGTGAGAAATGTC-3' για τον πρώτο κύκλο PCR και το ζεύγος GAAGTGCAGCAGCTGCCTG-3' και 5'-CAAAGACCTTCTAGCACCCAC-3' για τον δεύτερο κύκλο της επάλληλης PCR. Οι συνθήκες της PCR ήταν οι ίδιες όπως και για τον πολυμορφισμό ERCC-C118T. Τα προϊόντα (μεγέθους 252bp) υποβλήθηκαν σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση PstI (Promega, Madison, WI, USA), για 16 ώρες στους 37°C και ακολούθησε ανάλυση όπως και για τον πολυμορφισμό ERCC1-C118T.

### 3.1.3 Στατιστική Ανάλυση αποτελεσμάτων

Στην παρούσα μελέτη, συμπεριλήφθηκαν 111 ασθενείς με κολορθικό καρκίνο (KOK) που υποβλήθηκαν σε επικουρική χημειοθεραπεία και 132 ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως διάμεσοι (εύρος), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως συχνότητες (%). Ο έλεγχος  $\chi^2$  (chi-square test) ή ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's exact test) χρησιμοποιήθηκαν για συγκρίσεις ομάδων κατηγορικών δεδομένων. Η ισορροπία Hardy-Weinberg μελετήθηκε με έλεγχος  $\chi^2$  (chi-square test) με ένα βαθμό ελευθερίας (degree of freedom).

Η συνολική επιβίωση (OS) ορίζεται ως ο χρόνος (σε μήνες) από την ημερομηνία διάγνωσης με KOK μέχρι την ημερομηνία του θανάτου του ασθενούς ή την τελευταία κλινική επαφή. Οι επιζώντες ασθενείς λογοκρίθηκαν την ημερομηνία της τελευταίας επαφής τους. Για την ομάδα των ασθενών που έλαβαν επικουρική θεραπεία, η επιβίωση ελεύθερου νόσου (DFS) ορίστηκε ως ο χρόνος (σε μήνες) από την ημερομηνία της διάγνωσης έως την τεκμηριωμένη πρώτη υποτροπή, τον θάνατο χωρίς προηγούμενη τεκμηριωμένη υποτροπή ή την τελευταία επαφή, όποιο και αν συνέβαινε πρώτο. Για την ομάδα που έλαβε θεραπεία πρώτης γραμμής, το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) ορίστηκε ως ο χρόνος (σε μήνες) από την ημερομηνία έναρξης της θεραπείας πρώτης γραμμής ως την υποτροπή, θάνατο χωρίς προηγούμενη τεκμηριωμένη υποτροπή ή τελευταία επαφή, όποιο και αν συνέβαινε πρώτο. Οι ασθενείς που απεβίωσαν χωρίς προηγούμενη υποτροπή αντιμετωπίστηκαν ως υποτροπιάζοντες κατά την ημερομηνία του θανάτου τους. Οι καμπύλες επιβίωσης εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kaplan-Meier και συγκρίθηκαν μεταξύ των

ομάδων με τη δοκιμασία log-rank. Οι συσχετίσεις μεταξύ των εξετασθέντων παραγόντων (βλέπε κατωτέρω) και του ποσοστού υποτροπής / θνησιμότητας αξιολογήθηκαν με τους δείκτες κινδύνου (Hazard Ratio) που εκτιμήθηκαν με μοντέλο αναλογικού κινδύνου Cox. Η διόρθωση Firth για μονότονη πιθανότητα χρησιμοποιήθηκε για την αναφορά λόγων κινδύνου στην περίπτωση υποομάδων με μικρό αριθμό συμβάντων.

Για την επικουρική ομάδα, μελετήθηκαν οι ακόλουθες κλινικοπαθολογικές παράμετροι σε σχέση με το DFS / OS: ηλικία κατά τη διάγνωση, φύλο, πρωτεύουσα θέση του όγκου (αριστερό κόλον, δεξί κόλον, ορθό), κατάσταση N (N0, N1, N2), στάδιο κατά Astler-Coller (B1/B2, C1/C2), ιστολογική διαφοροποίηση (G1, G2, G3), αγγειακή διήθηση (ναι, όχι), περινευρική διήθηση (ναι, όχι), λεμφαγγειακή διήθηση (ναι, όχι), διάτρηση (ναι, όχι), θεραπευτικά σχήματα (βασισμένα σε οξαλιπλατίνη, βασισμένα σε ιρινοτεκάνη, βασισμένα σε 5-Fu).

Για την ομάδα της πρώτης γραμμής μελετήθηκαν οι ακόλουθες κλινικοπαθολογικές παράμετροι σε σχέση με το PFS / OS: η ηλικία κατά τη διάγνωση, το φύλο, η ιστολογική διαφοροποίηση (G1, G2, G3), η λειτουργική ικανότητα κατά την κλίμακα ECOG (0, 1, 2), η πρωτεύουσα θέση του όγκου (αριστερό κόλον, δεξί κόλον, ορθό), η χορήγηση προηγούμενης επικουρικής θεραπείας (ναι, όχι) και τα θεραπευτικά σχήματα (βασισμένα σε οξαλιπλατίνη, βασισμένα σε ιρινοτεκάνη, βασισμένα σε 5-Fu).

Και για τις δύο ομάδες, εξετάστηκε το αποτέλεσμα των ακόλουθων SNPs ERCC1 (CC, CT, TT) και XPD (KK, KQ, QQ που αντιστοιχούν στα αμινοξέα σε Lys, Lys/Gln και Gln αντίστοιχα) ως προς το DFS / OS. Σε περίπτωση σημαντικής ή οριακά στατιστικά σημαντικής ( $p < 0,10$ ) επίδρασης ενός πολυμορφισμού στις μονομεταβλητές αναλύσεις, έγιναν επίσης πολυπαραγοντικές αναλύσεις προκειμένου να εκτιμηθεί το αποτέλεσμα (HR) του κάθε SNP προσαρμοσμένο για την επίδραση των επιλεγμένων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων. Οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι που ήταν στατιστικά σημαντικές ή οριακά στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,10$ ) στην μονομεταβλητή ανάλυση, συμπεριλήφθηκαν στις πολυμεταβλητές αναλύσεις.

Όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν ξεχωριστά στις ομάδες που έλαβαν επικουρική και πρώτης γραμμής θεραπεία. Σε κάθε ομάδα θεραπείας (επικουρική / πρώτη

γραμμή) διεξήχθησαν επίσης ξεχωριστές αναλύσεις υποομάδων βάσει των θεραπευτικών αγωγών: βασισμένη σε οξαλιπλατίνη, μη-βασισμένη σε οξαλιπλατίνη, βασισμένη σε ιρινοτεκάνη και βασισμένη σε 5-Fu. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SAS (SAS για Windows, έκδοση 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Ως επίπεδο σημαντικότητας  $p$  ορίστηκε το 5% (δίπλευρος έλεγχος)

### 3.2 Μέρος Β – Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος

Για τη μελέτη της επίδρασης της Cav-1 στην ανάπτυξη χημειοαντοχής στο καρκίνο του παγκρέατος ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία

#### 3.2.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Προμηθευτήκαμε τα καλλιεργητικά υλικά RPMI-1640 και DMEM από τη Gibco (Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο) ενώ τη L-γλουταμίνη, το PBS και τη τρυψίνη από τη GE Healthcare Life Sciences (GE Healthcare Life Sciences/Athal, Piscataway, NJ, USA). Το εμβρυικό ορό μοσχαριού από την Biowest και το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO) από την Eastman Kodak, (Columbus, GA, USA).

Από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) προμηθευτήκαμε το τριχλωροοξικό οξύ (trichloroacetic acid- TCA), το TEMED, το υδροχλωρικό οξύ, SDS, υπεροξείδιο του υδρογόνου, γλυκερίνη 99.9%, σουλφοροδαμίνη-β για την *in vitro* κυτταροτοξική δοκιμασία, το NP40 και τους αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών. Προμηθευτήκαμε τη 2-β-μερκαπτοαιθανόλη από τη Merck (Chemilab S.A., St. Louis, MO, USA) ενώ το χρωστικό διάλυμα Ponceau S και το Triton-X100 από την AppliChem (AppliChem GmbH, Darmstadt, Γερμανία). Η γλυκίνη  $\geq 99\%$  προμηθεύτηκε από τη Roth (ROTH, Karlsruhe, Γερμανία), ενώ οι δείκτες της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, το SDS ακρυλαμίδιο 30% και το αντιδραστήριο Quick Start Bradford Dye 1x για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών στα δείγματα μας από τη Bio-Rad (Bio-rad Laboratories Ltd, Hercules, CA, USA). Όλοι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (5-Fu, γεμισιταβίνη, δοξορουβικίνη, επιρουμπικίνη, σισπλατίνα, οξαλιπλατίνα, δοσεταξέλη και πακλιταξέλη) χορηγήθηκαν από την Ογκολογική μονάδα του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου της Λάρισας Τα πλαστικά υλικά για κυτταρικές καλλιέργειες προμηθεύτηκαν από τη Sarstedt (Sarstedt Ltd, Numbrecht, Germany).

### 3.2.2 Κύτταροκαλλιέργειες

Από την ATCC (American Type Culture Collection) προμηθευτήκαμε τις κυτταρικές σειρές BxPC3 (παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα), AsPC1 (μεταστατικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα), PANC-1 (επιθηλιοειδές καρκίνωμα παγκρεατικού πόρου) και MIAPaCa-2 (παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα). Οι ινοβλάστες του δέρματος προμηθεύτηκαν από τη Thermo Fisher Scientific (Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο). Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 και οι ινοβλάστες σε DMEM, εμπλουτισμένο με 5% εμβρυικό ορό μοσχαριού (FCS) αδρανοποιημένο με θερμότητα, καθώς και με 2 mM L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά. Μια μέρα πριν από κάθε πείραμα, το υλικό της καλλιέργειας ανανεωνόταν έτσι ώστε τα κύτταρα να έρχονται σε λογαριθμικό πολλαπλασιασμό. Οι καλλιέργειες και όλες οι επώσεις διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5 % CO<sub>2</sub> και 95% υγρασία.

### 3.2.3 Αποσιώπηση της Cav-1 στα κύτταρα BxPC3

Για να ελαχιστοποιήσουμε τις διαφορές μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών, επάχθηκε σταθερή αναστολή (stable knock down) της καβεολίνης-1 σε κύτταρα BxPC-3, που φυσιολογικά εκφράζουν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης. Κατόπιν, μπορέσαμε να εκτιμήσουμε την ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης καθώς και τη χημειοευαισθησία των κυττάρων σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η μόνιμη αποσιώπηση της Cav-1 πραγματοποιήθηκε με επιμόλυνση των κυττάρων με λεντιϊό. Ήταν επίσης εφικτό να ανιχνεύσουμε τα κύτταρα που περιείχαν τον ιό λόγω της παρουσίας και ταυτόχρονης έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) (φθορίζουσα στο πράσινο κανάλι). Η έκφραση της Cav-1 αποσιωπήθηκε με short hairpin RNA (shRNA) mir GIPZ (Open Biosystems, Surrey, UK). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλακίδια κυτταροκαλλιεργείων 6 θέσεων σε μια πυκνότητα 50% και επιμολύνθηκαν με σωματίδια λεντι-ϊού, με άμεση επαφή, που διαλύθηκαν σε 1ml RPMI-1640 ελεύθερου ορού σε συγκέντρωση 1:50. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες. Το ποσοστό της διαμόλυνσης εκτιμήθηκε από τη έκφραση της GFP με μικροσκόπιο φθορισμού. Τα κύτταρα στα οποία επιτεύχθηκε μόνιμη αποσιώπηση του γονιδίου από τον ιό

επιλέχθηκαν με τη χρήση θρεπτικού υλικού που περιέχει πουρομυκίνη (Life Technologies/Thermo Fischer Scientific, Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο) σε συγκέντρωση 1.0  $\mu\text{g/ml}$  για 10 ημέρες.

Για να ομογενοποιήσουμε περαιτέρω τους κυτταρικούς πληθυσμούς, χρησιμοποιήσαμε κυτταροδιαχωριστή φθορισμού (Flow activated cell sorter, FACS) διαχωρίζοντας τα κύτταρα με βάση την έκφραση της GFP (BD FACS-Vantage) (Becton Dickinson, Oxford, England, UK). Τα κύτταρα που δημιουργήθηκαν μετά την αποσιώπηση της Cav-1 με τη χρήση του shRNA ονομάζονται BxPC3<sup>shCAV</sup>, ενώ τα κύτταρα που μολύνθηκαν με «άδειο» ιό ονομάστηκαν BxPC3<sup>mock</sup>. Αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα που θα περιγραφούν παρακάτω.

### **3.2.4 Αθανатоποίηση των ινοβλαστών του δέρματος και αποσιώπηση της Cav-1**

Για την αθανатоποίηση των ινοβλαστών, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με τον ρετροϊό pBabe hTERT (Addgene, Cambridge, USA) σε ινοβλάστες δέρματος σε 50% πυκνότητα. Μετά από 24 ώρες, το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται και τα κύτταρα αναπτύσσονται για επιπλέον 48 ώρες. Η επιλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε για 4 ημέρες με τη χρήση γενετισίνης σε συγκέντρωση 1.0  $\mu\text{g/ml}$  (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο). Οι αθανатоποιημένοι ανθρώπινοι ινοβλάστες δέρματος με hTERT, οι οποίοι ονομάζονται hhsF στο εξής, χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των περαιτέρω πειραμάτων.

Η αποσιώπηση της Cav-1 πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω. Δημιουργήθηκαν έτσι δυο ήδη hhsF: οι hhsF<sup>mock</sup> και οι hhsF<sup>shCAV</sup> με φυσιολογικά και μειωμένα επίπεδα Cav-1, αντίστοιχα.

### **3.2.5 Στύπωμα Western (Western Blot)**

Τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα έξι οπών (σε συγκέντρωση  $4 \times 10^6$  και  $6 \times 10^6$ ) ανάλογα με την κυτταρική σειρά. 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα πλύθηκαν δυο φορές με ψυχρό PBS, υποβλήθηκαν σε θρυψινοποίηση και



συλλέχθηκαν με ήπια φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε λύση των κυττάρων και επεξεργασία για την απομόνωση των πρωτεϊνών ώστε να ακολουθήσει η ανάλυση τους. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν, διαλύθηκαν σε διάλυμα RIPA (0.05 Tris HCL pH 7.7, 0.15 M NaCl, Triton X-100, 20% SDS, 0.5 M EDTA pH 8, 100 mM sodium vanadate, 50 mM NAF, 5 mM sodium iodoacetate) μέσα στο οποίο λίγο πριν τη χρήση του προστέθηκαν επιπλέον αναστολείς πρωτεϊνολυτικών (PMSF, aprotinin, sodium orthovanadate). Κατόπιν στα δείγματα προστέθηκε διάλυμα φορτώσεως (loading buffer,  $\beta$ -mercaptoethanol, Tris 0.5 M pH6.8, 0.2% bromophenol blue, 20% SDS, glycerol) και τοποθετήθηκαν σε νερό που βράζει τους 95°C για πέντε λεπτά. Στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για πέντε λεπτά στις 15.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) και τα υπερκείμενα υγρά αναλύθηκαν κάτω από αναγωγικές συνθήκες (παρουσία  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης) με ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών υπολογίστηκαν με δοκιμασία Bradford και δείγματα που περιείχαν 30  $\mu$ g πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε ηλεκτοφόρηση. Στην συνέχεια το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer, 129 mM γλυκίνη, 25 mM Tris και 20% μεθανόλη) και ακολουθήθηκε η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη immobilon PVDF (Millipore, Bedford, MA). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε με την χρήση ηλεκτρικού ρεύματος τάσης 100 V και εντάσεως 250 mA για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Πρότυπα μείγματα με προεπιλεγμένες πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (prestained SDS-page standarts, Biorad) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τα μοριακά βάρη. Τέλος οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με την χρήση των προεπιλεγμένων κάθε φορά αντισωμάτων και με την μέθοδο της ενισχυμένης χημιφωταύγειας (Enhanced chemiluminescence, ECL) (Amersham ECL or ECL Plus, GE Healthcare Life Sciences/Athal, Piscataway, NJ, USA). Με βάση αυτή τη μέθοδο οι μεμβράνες αρχικά επώαστηκαν για 24 ώρες στους 4°C σε διάλυμα TBS-T (NaCl 0.9%, Tris Cl 1 M, Triton X 100, 5% FBS) ώστε να πραγματοποιηθεί φραγμός των θέσεων που θα δέσμευαν μη ειδικά αντισώματα (non-specific binding sites). Στη συνέχεια οι μεμβράνες πλύθηκαν σε διάλυμα TBS (NaCl 0.9%, Tris Cl 1 M) και επώαστηκαν με ειδικά πρωτεύοντα αντισώματα σε συγκέντρωση που έχει προηγουμένως εξετασθεί με τιτλοδότηση. Με το πέρας της πρώτης επώασης η μεμβράνη πλύθηκε για τρεις συνεχόμενες φορές με διάλυμα TBS-T και ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο έχει συνδεθεί με υπεροξειδάση. Τέλος η μεμβράνη πλύθηκε τρεις

ακόμα φορές πριν επωαστεί με το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και τα αποτελέσματα των υπό εξέταση πρωτεϊνών γίνονται ορατά με την χρήση αυτοραδιογραφικού φιλμ. Το αντίσωμα για τη Cav-1 αγοράστηκε από τη Santa Cruz (clone N-20, sc-894, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Γερμανία) ενώ το αντίσωμα για την ακτίνη από τη Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab S.A. St. Louis, MO, USA) και για τη GAPDH από τη Biolegend.

### **3.2.6 Απομόνωση RNA και ανάλυση με RT-PCR**

Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) σύμφωνα τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ένα μικρογραμμάριο ολικού RNA από κάθε δείγμα μεταγράφηκε εκ νέου στο πρώτο κλώνο cDNA χρησιμοποιώντας το σύστημα SuperScript III One Step RT-PCR (Invitrogen, UK). Η ποσοτική RT-PCR διεξήχθη εις τριπλούν με τη χρήση SYBR Green RT-PCR Master Mix Kit και του ABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) με τους ακόλουθους εκκινητές: Cav-1 5'-CGACCCTAAACACCTCAACGA-3 '(εμπρός) και 5'-TCCCTTCTGGTCTGTCA-3 '(αντίστροφο). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη συγκριτική μέθοδο CT (κατώφλι κύκλου) που χρησιμοποιεί το ριβοσωματικό 18S ως γονίδιο αναφοράς.

### **3.2.7 Εκτίμηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού (τεχνική BrdU)**

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός εκτιμήθηκε με την τεχνική BrdU κατά την οποία μελετάτε ο ρυθμός ενσωμάτωσης της 5-βρωμο-2-δεοξουριδίνης (BrdU) στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Η BrdU είναι ένα συνθετικό ανάλογο της θυμιδίνης το οποίο ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA των κυττάρων. Εν συντομία, τις τελευταίες δυο ώρες της κυτταροκαλλιέργειας προστίθεται η BrdU στις οπές του μικροπλακιδίου και ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων που διαιρούνται. Ακολουθεί επεξεργασία και μονιμοποίηση των κυττάρων με το μονιμοποιητικό υλικό που παρέχεται από το BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (colorimetric) (ab126556), [Abcam, Cambridge, UK] επιτρέποντας έτσι τη διαπερατότητα και την ανίχνευση

του ενσωματωμένου νουκλεοτιδίου με τη βοήθεια του ειδικού πρωτογενούς αντισώματος. Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα διαρκεί μια ώρα. Κατόπιν, η μη δεσμευμένη χρωστική απομακρύνεται και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (Horse radish peroxidase, HRP), το οποίο προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα. Η υπεροξειδάση καταλύει την μετατροπή του χρωμογενούς υποστρώματος τέτρα-μέθυλο-βενζιδίνη (TMB) από ένα άχρωμο υλικό σε γαλάζιο διάλυμα (ή κίτρινο μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου διακοπής). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με την ποσότητα του BrdU που έχει ενσωματωθεί στα κύτταρα. Το χρωματισμένο προϊόν της αντίδρασης ποσοτικοποιείται με τη χρήση φωτόμετρου ορατού φάσματος κατάλληλου για χρήση μικροπλακιδίων (microplate reader, Biotek EL-311Bad Friedrichshall, Γερμανία).

### **3.2.8 Τεχνική κάλυψης (επούλωσης) του κενού διακυτταρικού χώρου**

Χρησιμοποιήσαμε την τεχνική κάλυψης (επούλωσης) του κενού διακυτταρικού χώρου (Scratch Assay) για να μελετήσουμε την ικανότητα των κυττάρων με τροποποιημένη έκφραση της Cav-1 να μεταναστεύουν *in vitro*. Η επιφάνεια μονού στρώματος κυττάρων που καλύπτει σχεδόν το 80% της οπής του πλακιδίου χαράσσεται με την άκρη αποστειρωμένου τιπ των 200  $\mu\text{L}$  ώστε να δημιουργηθεί διακυτταρικό κενό. Ακολουθεί πλύσιμο με PBS και προσθήκη φρέσκου καλλιεργητικού υλικού όπου τα κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν για 24 ως 48 ώρες. Τα κύτταρα φωτογραφίζονται με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας 10X μεγεθυντικό φακό (μικροσκόπιο AxioPlan με φακό AxioCam, Zeiss Ltd, Cambridge, UK), σε διάφορα χρονικά σημεία (δηλαδή 0, 5, 9 14 και 28 ώρες μετά την έναρξη του πειράματος. Η ανάλυση της μετανάστευσης έγινε υπολογίζοντας την κάλυψη του διακυτταρικού κενού ως αποτέλεσμα της μετανάστευσης των κυττάρων με τη βοήθεια του Image-J

### **3.2.9 Δοκιμή χημειοταξίας/μετανάστευσης**

Με τη χρήση ειδικών πολυκαρβονικών φίλτρων 24 mm Transwell® με οπές 8.0  $\mu\text{m}$  (Product #3428, Corning® Transwell®, Sigma-Aldrich, Merck/Chemilab S.A.

St. Louis, MO, USA) εκτιμήθηκε η ικανότητα των ινοβλαστών να επάγουν χημειοτακτική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων BxPC3. Η δοκιμή χημειοταξίας/ μετανάστευσης πραγματοποιήθηκε ως εξής. Την ημέρα μηδέν, το πλακίδιο 24 θέσεων εμβολιάστηκε με ινοβλάστες ( $hhsF^{mock}$  ή  $hhsF^{shCav}$ ) σε πυκνότητα  $20 \times 10^3$  κύτταρα / θέση σε 500 μl DMEM ελεύθερο ορού, και τα κύτταρα αφέθηκαν να προσαρμοστούν σε κλίβανο με 5% CO<sub>2</sub>, θερμοκρασίας 36.7°C για 48 ώρες. Στη συνέχεια το υλικό απομακρύνεται και DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS (10% DMEM) προστίθεται για 12 ώρες για να ενεργοποιήσει τους ινοβλάστες με ορό. Ακολούθως, το 10% DMEM υλικό αφαιρείται, οι ινοβλάστες πλένονται εις διπλούν με PBS και προστίθεται 500 μl DMEM εμπλουτισμένο με 1% FCS. Μετά από επώαση 12 ακόμα ωρών, προετοιμάστηκε εναιώρημα κυττάρων BxPC3 σε πυκνότητα  $60 \times 10^4$  κυττάρων/ml σε μέσο ελεύθερου ορού. Ένα διαπερατό ένθετο κυτταροκαλλιέργειας (Transwell®) τοποθετείται στις οπές που περιέχουν ινοβλάστες και 250μl διαλύματος κυττάρων BxPC3 που βρίσκονται σε διάλυμα ελεύθερου ορού προστέθηκε στο ένθετο. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν οπές που περιέχουν 1% DMEM κάτω από τα insert για να μπορεί να εκτιμηθεί η αυθόρμητη μετανάστευση των BxPC3 κάτω από αυτές τις συνθήκες ενώ ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οπές με 10% DMEM κάτω από τα ένθετα. Η επώαση (5% CO<sub>2</sub>, 36.7°C) συνεχίστηκε για 12 ώρες ακόμα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται προσεκτικά το διάλυμα από τα ένθετα, τα ένθετα αφαιρούνται από τα πλακίδια και τα κύτταρα που δεν μετανάστευσαν απομακρύνθηκαν από το εσωτερικό των ένθετων με τη βοήθεια βαμβακοφόρων στυλεών. Τα ένθετα τότε μεταφέρονται σε νέα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων όπου κάθε θέση (πηγαδάκι) περιέχει 400 μL TCA για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα στην κάτω πλευρά των transwells, όπως περιγράφεται και στη μέθοδο εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας. Τα μονιμοποιημένα ένθετα πλένονται προσεκτικά με αποσταγμένο νερό, αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και επωάζονται με σουλφοραδαμίνης B (Sulphorodamine B, SRB) όπως περιγράφεται παρακάτω. Μετά από δεύτερο πλύσιμο για να απομακρυνθεί χρωστική που δεν έχει προσδεθεί στα κύτταρα τα ένθετα μεταφέρονται σε καθαρό πλακίδιο 24 θέσεων όπου εμβαπτίζονται σε διάλυμα Tris pH 10 ώστε να εκχυλίσει η χρωστική και 200 μL του διαλύματος που προκύπτει από την εμβάπτιση αυτή μεταφέρονται σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων που χρησιμοποιείται για την τελική μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας. Η οπτική πυκνότητα (OD) μετρήθηκε με τη χρήση φωτόμετρου ορατού φάσματος κατάλληλου

για χρήση μικροπλακιδίων (Biotek EL-311 Bad Friedrichshall Γερμανία). Η χημειοταξία υπολογίστηκε ως το % OD των ένθετων σε σύγκριση με τα ένθετα που δεν περιείχαν ινοβλάστες (αρνητικός μάρτυρας). Δυο ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της χημειοταξίας.

### **3.2.10 *In vitro* κυτταροτοξική δράση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων**

Η *in vitro* κυτταροτοξική δράση των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν (5-Fu, γεμισιταβίνη, δοξορουβικίνη, επιρουμπικίνη, σισπλατίνα, οξαλιπλατίνα, δοσεταξέλη και πακλιταξέλη) μελετήθηκε με τη μέθοδο της σουλφοραδαμίνης Β (Sulphorodamine B, SRB) [114, 115]. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα της ανιονικής πρωτεΐνης SRB να προσδένεται ηλεκτροστατικά στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών κάτω από ελαφρώς όξινες συνθήκες [114]. Ως ακολούθως, η χρωστική SRB αποτελεί ένα ευαίσθητο δείκτη περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη ενός κυτταρικού πληθυσμού παρέχοντας έτσι μια ειδική τεχνική για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικής δράσης προϊόντων σε κυτταρικές καλλιέργειες.

Στην αρχή κάθε πειράματος, η κυτταρική βιωσιμότητα εξετάζεται με την μέθοδο απέκκρισης της χρωστικής κυανού του τρυπανίου (trypan blue dye exclusion method) και πάντα είναι μεγαλύτερη του 97%. Για τη μέθοδο SRB, 100 μl από τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μικροπλακίδια 96 οπών με επίπεδο πυθμένα σε συγκέντρωση 5.000 ανά οπή. Στη συνέχεια τα πλακίδια επωάζονται για 24 ώρες στους 37°C ώστε να επιτευχθεί λογαριθμική ανάπτυξη των κυττάρων, πριν την προσθήκη των υπό εξέταση προϊόντων.

Για να υπολογιστεί ο αρχικός κυτταρικός πληθυσμός [χρόνος μηδέν (Tz)], τα κύτταρα κάθε καρκινικής σειράς μονιμοποιούνται με την χρήση 50% w/v τρίχλωρο οξικού οξέως (TCA). Οι ενώσεις αραιώθηκαν στο διπλάσιο της επιθυμητής τελικής μέγιστης συγκέντρωσης δοκιμής (100 μM για όλα τα άλλα φάρμακα, αλλά για την πακλιταξέλη και τη δοσεταξέλη που οι μέγιστες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν 10 μM) με πλήρες μέσο και παρασκευάστηκαν 4 ή 5 πρόσθετες 10x αραιώσεις, ανάλογα με το φάρμακο. Στη συνέχεια 100 μl από κάθε συγκέντρωση προστίθενται στην αντίστοιχη οπή στην οποία ήδη υπάρχουν 100 μl μέσου μαζί με τα κύτταρα, καταλήγοντας έτσι στην επιθυμητή τελική συγκέντρωση για κάθε ουσία. Σαν

αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται καλλιέργεια την οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα DMSO ενώ σαν θετικός μάρτυρας καλλιέργεια στην οποία προστίθεται ανάλογη ποσότητα μέσου.

Στη συνέχεια, τα μικροπλακίδια επωάζονται για ακόμα 48 ώρες σε συγκεκριμένες συνθήκες που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Το πείραμα λήγει με την προσθήκη 50 μl TCA 50% (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 10%) ενώ ακολουθεί επώαση για τουλάχιστον μια ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθεί πλύσιμο των πιάτων με τρεχούμενο νερό για 3 φορές ενώ μετά αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. 100 μl από 0.4% SRB διαλυμένη σε 1% οξικό οξύ (acetic acid) προστίθεται σε κάθε εξεταζόμενη οπή και τα πιάτα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Μετά την προσθήκη της χρωστικής τα πιάτα ξεπλένονται με 1% οξικό οξύ έτσι ώστε να επιτευχθεί απομάκρυνση όσης βαφής δεν έχει προσδεθεί και αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια και αφού τα πιάτα έχουν στεγνώσει η προσδεμένη βαφή διαλύεται με την προσθήκη 10 mM trizma base (Sigma Aldrich, Merck, ChemiLab, St. Louis, MO, USA) και η οπτική απορρόφηση του διαλύματος μετράται σε φωτόμετρο EL-311 (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Γερμανία) στα 530 nm. Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης από τις οπές που αντικατοπτρίζουν τα κύτταρα την ώρα της προσθήκης των ουσιών (Tz), τα κύτταρα μάρτυρες (C), καθώς και τα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Ti), δύναται ο υπολογισμός της ποσοστιαίας ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί, χρησιμοποιώντας τον εξής μαθηματικό τύπο

$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$  για συγκεντρώσεις για τις οποίες  $Ti \geq Tz$

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$  για συγκεντρώσεις για τις οποίες  $Ti < Tz$ .

Εκτός από την ποσοστιαία % ανάπτυξη για κάθε ουσία που εξετάστηκε, υπολογίστηκαν τρεις ακόμα παράμετροι όπως αναφέρθηκαν παραπάνω

- Growth inhibition 50% (GI50): η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων στο 50%. Αυτή υπολογίζεται με τον τύπο  $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$

- Total growth inhibition (TGI) υπολογίζεται από τον τύπο  $T_i = T_z$  και αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και
- Lethal concentration 50% (LC50) υπολογίζεται από τον τύπο  $[(T_i - T_z)/T_z] \times 100 = -50$  και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιφέρεται θάνατος στο 50% του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων

Εάν η τιμή της παραμέτρου φαίνεται να υπερβαίνει τη μέγιστη χρησιμοποιούμενη τιμή ή να υπολείπεται της ελάχιστης χρησιμοποιούμενης, η τιμή για την παράμετρο εκφράζεται ως μεγαλύτερη ή μικρότερη από τη μέγιστη ή την ελάχιστη από τη συγκέντρωση που εξετάσθηκε.

### 3.2.11 *In vivo* μελέτες

Για τη δημιουργία ξενομοσχευμάτων παγκρεατικού καρκίνου με ανθρώπινα κύτταρα σε ποντίκια,  $5 \times 10^6$  εκθετικά πολλαπλασιαζόμενα BxPC3<sup>mock</sup> ή BxPC3<sup>shCAV</sup> καρκινικά κύτταρα ενέθηκαν υποδόρια στην μασχαλιαία περιοχή των πίσω πλευρών θηλυκών ποντικών NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD/SCID) ηλικίας 6-8 εβδομάδων (μέσου βάρους 20 γραμμαρίων) από την εγκατάσταση ζώων μας (EL 42 BIO\_BR01), σύμφωνα με τη Βρετανική πρακτική των αμφοτερόπλευρων εμφυτευμάτων. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, όλα τα ζώα φυλάσσονταν στη Ζωική Μονάδα του Τμήματος Φαρμακολογίας (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα Ελλάδα EL42-BIO\_EXP03) υπό συνθήκες ελεύθερων παθογόνων (SPF), 12 ωρών / 12 ωρών φωτός/σκοταδιού, θερμοκρασίας 21 ° C, σχετικής υγρασίας 50% και άμεσης πρόσβασης σε νερό και τρόφιμα *ad libitum*.

Για το συν-εμβολιασμό των ινοβλαστών με κύτταρα BxPC3,  $3 \times 10^5$  εκθετικά πολλαπλασιαζόμενοι hhsF<sup>mock</sup> ή hhsF<sup>shCAV</sup> ινοβλάστες συν-εμβολιάστηκαν με κύτταρα BxPC3 σε αναλογία 1:1 ή 1:3 αντίστοιχα, σε θεραπευτικό μέσο DMEM, υποδόρια στη μασχαλιαία περιοχή των οπίσθιων πλευρών των ποντικών (δύο ενέσεις ανά ποντικό όπως περιγράφηκε παραπάνω για τη δημιουργία BxPC3<sup>mock</sup> ή BxPC3<sup>shCAV</sup> ξενομοσχευμάτων). Σε αυτό το πείραμα μια ομάδα ποντικών εμφυτεύθηκαν μόνο με  $3 \times 10^5$  ινοβλάστες για να ελέγξουμε αν οι τροποποιημένοι ινοβλάστες είχαν ογκογενετικές ιδιότητες. Κάθε ομάδα αποτελούνταν από 5 ποντίκια

με αντίστοιχη ηλικία και βάρος. Στη συνέχεια τα ποντίκια παρακολούθηθηκαν για την ανάπτυξη των όγκων. Στο τέλος του πειράματος, το οποίο ποικίλει ανάλογα με τη συγκεκριμένη ομάδα (δηλ. για τη δημιουργία BxPC3<sup>mock</sup> ή BxPC3<sup>shCAV</sup> το πείραμα έληξε την ημέρα 65 μετά τον εμβολιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ για την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων από το συν-εμβολιασμό, τις ημέρες 26-28 μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων) οι ποντικοί υπέστησαν ευθανασία (ηλικία, 12-16 εβδομάδες, μέσο βάρος, 20-22 g) και οι όγκοι αφαιρέθηκαν και ζυγίστηκαν. Ο όγκος του δείγματος υπολογίστηκε σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο  $[(axb^2)/2]$ , όπου a= μήκος, b= πλάτος του όγκου όπως υπολογίστηκε με τη δαγκάνα του Vernier (οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν δυο φορές την εβδομάδα).

Τα ζώα που έλαβαν θεραπεία με γεμισταβίνη, λάμβαναν μια ενδοπεριτοναϊκή ένεση την εβδομάδα σε δόση 100mg/kg ως το τέλος του πειράματος. Η θεραπεία άρχιζε 4 ημέρες μετά την ένεση των κυττάρων. Η απώλεια βάρους, η οποία ελέγχονταν δυο φορές την εβδομάδα, νευρολογικές διαταραχές, διαταραχές συμπεριφοράς και αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες καταγράφονταν ως δείγματα τοξικότητας του φαρμάκου.

Ο χειρισμός και τα πειράματα των ζώων διεξήχθησαν σύμφωνα με τους ελληνικούς νόμους (ΠΔ 56/2013 και Εγκύκλιος 2215/117550/2013) και τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2013/63 / ΕΕ) βάσει εγκεκριμένου πρωτοκόλλου της IACUC και των ελληνικών αρχών (Αριθ. Αδείας: 5542/228006, IACUC. Καθηγητής Δρ. Ν. Πιτσίκας, Δρ. Α. Ζαχαριουδάκη, Δρ. Χ. Χαλόπτσιος και Δρ. Α. Κωνσταντινίδης).

### **3.2.12 Ανοσοϊστοχημεία**

Συνολικά 11 αρχειακά δείγματα διατηρημένα σε παραφίνη από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος ελήφθησαν από το Τμήμα Παθολογοανατομίας του The Leeds Teaching Hospitals Trust (Λιντς, Ηνωμένο Βασίλειο), και υποβλήθηκαν σε χρώση για Cav-1. Η διαφορική έκφραση του Cav-1 μεταξύ του όγκου και του στρώματος σε περιοχές χαμηλής διαφοροποίησης (ΧΔ) και καλής/μέτριας διαφοροποίησης (ΚΔ) αξιολογήθηκε από παθολογοανατόμο με ειδικευση στον καρκίνο του παγκρέατος (C.V.). Σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία



[113], η έκφραση της Cav-1 εκτιμήθηκε ως εξής: 0 = καμία χρώση, 1 = ασθενής ή/και εστιακή χρώση (<10% κυττάρων), 2 = μέτρια ή ισχυρή χρώση (10-50% των κυττάρων), 3 = μέτρια ή ισχυρή (>50% των κυττάρων)

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τους παγκρεατικούς καρκινικούς ιστούς από τα ξενομοσχεύματα πραγματοποιήθηκε σε τομές παραφίνης των 3 μm χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Cav-1. Η ανίχνευση του αντιγόνου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Η ανοσοανίχνευση ήταν δύο σταδίων (two steps IHC) και στο δεύτερο χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα σεσημασμένο με αλκαλική φωσφατάση (ALP) (Menarini Diagnostics, UK) ακολουθούμενη από 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Vector Laboratories, UK).

Για την ιστολογική αξιολόγηση, τομές χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H & E, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο). Τα δείγματα απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο AxioPlan Zeiss (Carl Zeiss Ltd, Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο) εξοπλισμένο με τη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή AxioCam.

### **3.2.13 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων**

Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία t-test κατά Student ή τη μονόδρομη ANOVA με Holm-Sidak ως post hoc δοκιμασία όπου διεξήχθησαν πολλαπλές συγκρίσεις χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, ΗΠΑ). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσα ± SD. Στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε  $p < 0.05$

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

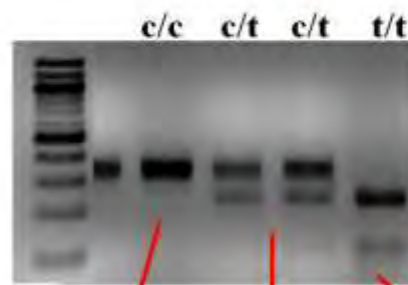
#### 4.1 Μέρος Α - Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων

111 ασθενείς έλαβαν επικουρική θεραπεία και 132 θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα κλινικό-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά φαίνονται στον πίνακα 1 και 2 αντίστοιχα. Σε 101 ασθενείς ήταν δυνατόν να εκτιμηθεί η ανταπόκριση στο τέλος της πρώτης γραμμής θεραπείας. Από τους 31 ασθενείς στους οποίους δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση της ανταπόκρισης, σε 5 έλειπαν τα δεδομένα, 16 δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθούν, 4 είχαν πρόωρο θάνατο και 6 διέκοψαν τη θεραπεία πριν την εκτίμηση.

232 ασθενείς (95%) είχαν επιτυχές RFLP αποτέλεσμα για τον ERCC1 πολυμορφισμό και 146 (60%) για τον XPD πολυμορφισμό (εικόνες A1 και A2 αντίστοιχα).

Η κατανομή των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg τόσο για το ERCC-1 ( $\chi^2=3,84$ ,  $p=0,539$ ) και το XPD 1 ( $\chi^2=3,84$ ,  $p=0,47$ ). Η συχνότητα του aac ήταν 0,61 ενώ του aat 0,39. Αντίστοιχα, η συχνότητα του Lys αλληλίου ήταν 0,54 και του Gln 0,46.

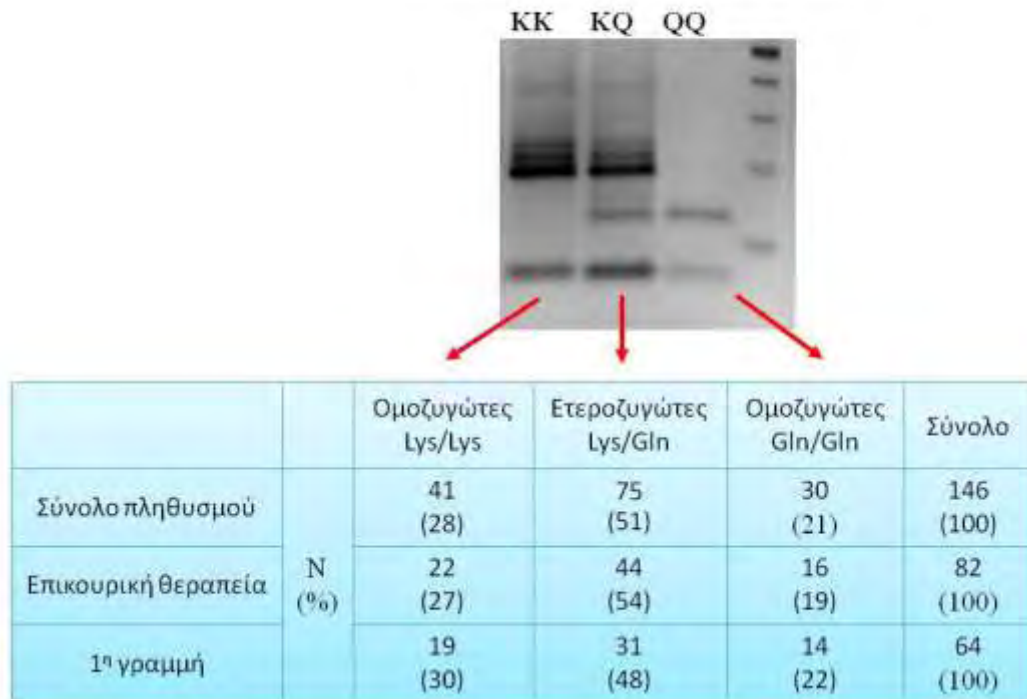
**RFLP - ERCC1 118, aac to aat**



		Ομοζυγώτες aac/aac	Ετεροζυγώτες aac/aat	Ομοζυγώτες aat/aat	Σύνολο
Σύνολο πληθυσμού		40 (17)	106 (46)	86 (37)	232 (100)
Επικουρική θεραπεία	N (%)	18 (17)	48 (45)	41 (38)	107 (100)
1 <sup>η</sup> γραμμή		22 (18)	58 (46)	45 (36)	125 (100)

**Εικόνα A1:** ERCC1 πολυμορφισμοί στις διαφορετικές ομάδες θεραπείας

**RFLP - ERCC2 (XPD) K751Q**



**Εικόνα Α2** XPD πολυμορφισμοί στις διαφορετικές ομάδες θεραπείας

**Πίνακας Α1.** Κλινικό-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών που έλαβαν επικουρική θεραπεία

Ηλικία στη διάγνωση	Διάμεση	63.9
	Min-Max	29-80
		<b>N (%)</b>
Φύλο	Γυναίκες	54 (48.6)
	Άνδρες	57 (51.4)
Αριθμός λεμφαδένων που εξετάστηκαν	Median	14
	Min-Max	0-44
pT-Στάδιο	T1-T2	3 (2.8)
	T3-T4	95 (85.6)
pN-Στάδιο	N0	38 (34.2)
	N1	38 (34.2)
	N2	23 (20.8)
	NX	1 (1)
Στάδιο Astler-Coller	A	0 (0)
	B1/B2	43 (38.8)
	C1/C2	67 (60.4)
Βαθμός Διαφοροποίησης	Καλός	11 (9.9)
	Μέτριος	77 (69.3)
	Πτωχός	17 (15.3)
	ΔΑ	6 (5.4)
Αγγειακή Διήθηση	Όχι	77 (69.3)
	Ναι	16 (14.4)
	ΔΑ	18 (16.2)
Περινευρική Διήθηση	Όχι	79 (71.1)
	Ναι	13 (11.7)
	ΝΑ	19 (17.1)
Λεμφαγγειακή Διήθηση	Όχι	71 (63.9)
	Ναι	23 (20.7)
	ΔΑ	17 (15.3)
Διάτρηση	Όχι	97 (87.3)
	Ναι	7 (6.3)
	ΔΑ	7 (6.3%)
Εντόπιση όγκου <sup>#</sup>	Αριστερά	46 (41.4)
	Δεξιά	31 (27.9)
	Ορθό	34 (30.6)
	ΔΑ	0 (0)
Είδος επικουρικής θεραπείας	Με βάση την Oxaliplatin	44 (39.6)
	5-Fu	32 (28.8)
	Με βάση την Irinotecan	35 (31.5)
ERCC-1 πολυμορφισμός	CC	18 (16.2)
	CT	48 (43.2)

	TT	41 (37)
XPD751 πολυμορφισμός	KK	22 (19.8)
	KQ	44 (39.6)
	QQ	16 (14.4)

#Αριστερή εντόπιση: Σπληνική καμπή, Κατιόν, Σιγμοειδές, ορθοσιγμοειδές; Δεξιά εντόπιση: Τυφλό, Ανιόν και εγκάρσιο κόλον. ΔΑ: Δεν Αναφέρεται

**Πίνακας Α2.** Κλινικό-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής

Ηλικία στη διάγνωση	Διάμεση	62.7
	Min-Max	29-77
		<b>N (%)</b>
Φύλο	Γυναίκες	67 (50.8)
	Άνδρες	65 (49.2)
Βαθμός Διαφοροποίησης	Καλός	9 (6.9)
	Μέτριος	89 (67.5)
	Πτωχός	24 (18.3)
	ΔΑ	10 (7.5)
Εντόπιση όγκου <sup>#</sup>	Αριστερά	55 (41.7)
	Δεξιά	43 (32.7)
	Ορθό	30 (22.8)
	ΔΑ	4 (3)
Performance Status	0	86 (65.1)
	1	22 (16.7)
	2	3 (2.3)
	ΔΑ	21 (15.9)
Προηγούμενη επικουρική θεραπεία	Ναι	57 (43.2)
	Όχι	75 (56.8)
Είδος πρώτης γραμμής θεραπείας	Με βάση την Oxaliplatin	79 (59.7)
	5-Fu	6 (4.5)
	Με βάση την Irinotecan	47 (35.7)
Ανταπόκριση στη θεραπεία	Πλήρη Ανταπόκριση	10 (10.1)
	Μερική Ανταπόκριση	33 (33.3)
	Σταθερότητα νόσου	40 (40.4)
	Πρόοδος νόσου	16 (16.8)
ERCC-1 πολυμορφισμοί	CC	22 (16.6)
	CT	58 (44)
	TT	45 (34)
XPD751 πολυμορφισμοί	KK	19 (14.4)
	KQ	31 (23.4)
	QQ	14 (10.6)

<sup>#</sup>Αριστερή εντόπιση: Σπληνική καμπή, Κατión, Σιγμοειδές, ορθοσιγμοειδές; Δεξιά εντόπιση: Τυφλό, Ανιόν και εγκάρσιο κόλον. ΔΑ: Δεν Αναφέρεται



#### 4.1.1 Εκτίμηση τοξικότητας

Η τοξικότητα από τη θεραπεία εκτιμήθηκε σε 71 ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία (64% του συνολικού πληθυσμού) (Πίνακας A3), και σε 56 ασθενείς (42%) που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατική νόσο (Πίνακας A4). Ο βαθμός τοξικότητας εκτιμήθηκε σύμφωνα με την 4<sup>η</sup> έκδοση των Κοινών Κριτηρίων. Ορολογίας για Ανεπιθύμητες Ενέργειες (CTCAE 4.0). Η ανάλυση της τοξικότητας σε σχέση με τους ERCC1 και XPD πολυμορφισμούς, έγινε τόσο στον συνολικό πληθυσμό (Πίνακες 5-8) όσο και σε επιμέρους πληθυσμούς που έλαβαν θεραπεία με οξαλιπλατίνα, ιρινοτεκάνη ή 5-Fu ξεχωριστά. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της τοξικότητας με τους πολυμορφισμούς στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία, τόσο στον συνολικό πληθυσμό όσο και στις επί μέρους ομάδες.

**Πίνακας Α3** Τοξικότητα ασθενών που έλαβαν επικουρική θεραπεία

		<b>Βαθμός τοξικότητας</b>		
		<b>0</b>	<b>1-2</b>	<b>3-4</b>
Αναιμία	N	23	48	0
	%	32.4	67.6	0
Λευκοπενία	N	26	43	2
	%	36.6	60.6	2.8
Ουδετεροπενία	N	28	32	11
	%	39.4	45.1	15.5
Θρομβοπενία	N	49	22	0
	%	69	31	0
Εμπύρετη ουδετεροπενία	N	71	0	0
	%	100	0	0
Λοίμωξη	N	65	6	0
	%	91.5	8.5	0
Εμπύρετο	N	61	10	0
	%	85.9	14.1	0
Διάρροια	N	31	34	6
	%	43.7	47.9	8.5
Ναυτία	N	33	38	0
	%	46.5	53.5	0
Έμετος	N	58	13	0
	%	81.7	18.3	0
Σύνδρομο Παλαμών-Πελμάτων	N	65	6	0
	%	91.5	8.5	0
Ξηροδερμία	N	71	0	0
	%	100	0	0
Επιπεφυκίτιδα	N	70	1	0
	%	98.6	1.4	0
Μυαλγία	N	68	3	0
	%	95.8	4.2	0
Οστικά άλγη	N	64	7	0
	%	90.1	9.9	0
Ασθένεια	N	50	21	0
	%	70.4	29.6	0
Βλεννογονίτιδα (κλινική εξέταση)	N	61	10	0
	%	85.9	14.1	0
Βλεννογονίτιδα (συμπτωματική)	N	69	2	0
	%	97.2	2.8	0
Αισθητική νευροπάθεια	N	30	37	4
	%	42.3	52.1	5.6
Κινητική νευροπάθεια	N	68	3	0
	%	95.8	4.2	0

**Πίνακας Α4** Τοξικότητα ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής

		<b>Βαθμός Τοξικότητας</b>		
		<b>0</b>	<b>1-2</b>	<b>3-4</b>
Αναιμία	N	19	37	0
	%	33.9	66.1	0
Λευκοπενία	N	29	24	3
	%	51.8	42.8	5.4
Ουδετεροπενία	N	29	25	2
	%	51.8	44.6	3.6
Θρομβοπενία	N	38	18	0
	%	67.9	32.1	0
Εμπύρετη ουδετεροπενία	N	56	0	0
	%	100	0	0
Λοίμωξη	N	54	2	0
	%	96.4	3.6	0
Εμπύρετο	N	49	7	0
	%	87.5	12.5	0
Διάρροια	N	25	22	9
	%	44.6	39.3	16.1
Ναυτία	N	31	23	2
	%	55.4	41.1	3.6
Έμετος	N	42	11	3
	%	75	19.7	5.4
Σύνδρομο Παλαμών-Πελμάτων	N	51	4	1
	%	91.1	7.2	1.8
Ξηροδερμία	N	55	1	0
	%	98.2	1.8	0
Επιπεφυκίτιδα	N	56	0	0
	%	100	0	0
Μυαλγία	N	53	3	0
	%	94.6	5.4	0
Οστικά άλγη	N	49	7	0
	%	87.5	12.5	0
Ασθένεια	N	34	22	0
	%	60.7	39.3	0
Βλεννογονίτιδα (κλινική εξέταση)	N	53	3	0
	%	94.6	5.4	0
Βλεννογονίτιδα (συμπτωματική)	N	56	0	0
	%	100	0	0
Αισθητική νευροπάθεια	N	31	25	0
	%	55.4	44.6	0
Κινητική νευροπάθεια	N	56	0	0
	%	100	0	0

**Πίνακας Α5** Τοξικότητα ασθενών που έλαβαν επικουρική θεραπεία ανάλογα με τον ERCC1 πολυμορφισμό

	ERCC1			P-value
	CC	CT	TT	
Αναιμία	0	6 (42.9)	8 (25.8)	0,386
	1	8 (57.1)	20 (64.5)	
	2		3 (9.7)	
Λευκοπενία	0	4 (28.6)	11 (35.5)	0,841
	1	6 (42.9)	12 (38.7)	
	2	3 (21.4)	7 (22.6)	
	3	1 (7.1)	1 (3.2)	
Ουδετεροπενία	0	6 (42.9)	11 (35.5)	0,943
	1	3 (21.4)	6 (19.4)	
	2	4 (28.6)	7 (22.6)	
	3	1 (7.1)	6 (19.4)	
	4	0 (0)	1 (3.2)	
Θρομβοπενία	0	9 (64.3)	23 (74.2)	0,268
	1	4 (28.6)	5 (16.1)	
	2	1 (7.1)	3 (9.7)	
Λοίμωξη	0	13 (92.9)	26 (83.9)	0,115
	2	1 (7.1)	5 (16.1)	
Εμπύρετο	0	10 (71.4)	27 (87.1)	0,131
	1	4 (28.6)	2 (6.5)	
	2		2 (6.5)	
Διάρροια	0	7 (50.0)	14 (45.2)	0,965
	1	4 (28.6)	10 (32.3)	
	2	2 (14.3)	4 (12.9)	
	3	1 (7.1)	3 (9.7)	
Ναυτία	0	4 (28.6)	14 (45.2)	0,166
	1	7 (50.0)	13 (41.9)	
	2	3 (21.4)	4 (12.9)	
Έμετος	0	10 (71.4)	26 (83.9)	0,701
	1	3 (21.4)	4 (12.9)	
	2	1 (7.1)	1 (3.2)	
Δυσκοιλιότητα	0	10 (71.4)	20 (64.5)	0,493
	1	1 (7.1)	8 (25.8)	
	2	3 (21.4)	3 (9.7)	
Σύνδρομο Παλαμών-Πελμάτων	0	12 (85.7)	31 (100.0)	0,069
	1	2 (14.3)	0 (0)	
	2	0 (0)	0 (0)	
Επιπεφυκίτιδα	0	14 (100.0)	31 (100.0)	0,371

	1	0 (0)	0 (0)	1 (4.3)	
Μυαλγία	0	13 (92.9)	30 (96.8)	22 (95.7)	0,839
	1	1 (7.1)	1 (3.2)	1 (4.3)	
Οστικά άλγη	0	12 (85.7)	29 (93.5)	20 (87.0)	0,67
	1	2 (14.3)	1 (3.2)	2 (8.7)	
	2	0 (0)	1 (3.2)	1 (4.3)	
Ασθένεια	0	10 (71.4)	20 (64.5)	17 (73.9)	0,493
	1	1 (7.1)	8 (25.8)	4 (17.4)	
	2	3 (21.4)	3 (9.7)	2 (8.7)	
Βλεννογονίτιδα (κλινική εξέταση)	0	12 (85.7)	26 (83.9)	21 (91.3)	0,813
	1	1 (7.1)	4 (12.9)	1 (4.3)	
	2	1 (7.1)	1 (3.2)	1 (4.3)	
Βλεννογονίτιδα (συμπτωματική)	0	14 (100.0)	31 (100.0)	21 (91.3)	0,133
	1	0 (0)	0 (0)	2 (8.7)	
Αισθητική νευροπάθεια	0	7 (50.0)	14 (45.2)	8 (34.8)	0,444
	1	6 (42.9)	14 (45.2)	8 (34.8)	
	2	1 (7.1)	2 (6.5)	4 (17.4)	
	3	0 (0)	1 (3.2)	3 (13.0)	
Κινητική νευροπάθεια	0	14 (100.0)	30 (96.8)	22 (95.7)	0,744
	1	0 (0)	1 (3.2)	1 (4.3)	

**Πίνακας Α6** Τοξικότητα ασθενών που έλαβαν επικουρική θεραπεία ανάλογα με τον XPD πολυμορφισμό

	XPD			P-value	
	ΚΚ	ΚQ	QQ		
Αναιμία	0	5 (31.3)	12 (37.5)	3 (30.0)	0,807
	1	10 (62.5)	17 (53.1)	5 (50.0)	
	2	1 (6.3)	3 (9.4)	2 (20.0)	
Λευκοπενία	0	6 (37.5)	11 (34.4)	3 (30.0)	0,859
	1	7 (43.8)	14 (43.8)	4 (40.0)	
	2	3 (18.8)	5 (15.6)	3 (30.0)	
	3	0 (0)	2 (6.3)	0 (0)	
Ουδετεροπενία	0	7 (43.8)	9 (28.1)	4 (40.0)	0,521
	1	5 (31.3)	8 (25.0)	1 (10.0)	
	2	2 (12.5)	9 (28.1)	3 (30.0)	
	3	1 (6.3)	6 (18.8)	2 (20.0)	
	4	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)	
Θρομβοπενία	0	12 (75.0)	22 (68.8)	7 (70.0)	0,844
	1	3 (18.8)	7 (21.9)	3 (30.0)	
	2	1 (6.3)	3 (9.4)	0 (0)	
Λοίμωξη	0	14 (87.5)	29 (90.6)	9 (90.0)	0,945
	2	2 (12.5)	3 (9.4)	1 (10.0)	
Εμπύρετο	0	15 (93.8)	27 (84.4)	8 (80.0)	0,466
	1	0 (0)	4 (12.5)	2 (20.0)	
	2	1 (6.3)	1 (3.1)	0 (0)	
Διάρροια	0	7 (43.8)	13 (40.6)	4 (40.0)	0,51
	1	3 (18.8)	11 (34.4)	5 (50.0)	
	2	3 (18.8)	6 (18.8)	1 (10.0)	
	3	3 (18.8)	2 (6.3)	0 (0)	
Ναυτία	0	6 (37.5)	15 (46.9)	5 (50.0)	0,966
	1	8 (50.0)	13 (40.6)	4 (40.0)	
	2	2 (12.5)	4 (12.5)	1 (10.0)	
Έμετος	0	11 (68.8)	27 (84.4)	9 (90.0)	0,228
	1	4 (25.0)	5 (15.6)	0 (0)	
	2	1 (6.3)	0 (0)	1 (10.0)	
Δυσκοιλιότητα	0	11 (68.8)	21 (65.6)	7 (70.0)	0,882
	1	4 (25.0)	10 (31.3)	2 (20.0)	
	2	1 (6.3)	1 (3.1)	1 (10.0)	
Σύνδρομο Παλαμών-Πελμάτων	0	16 (100.0)	29 (90.6)	10 (100.0)	0,632
	1	0 (0)	2 (6.3)	0 (0)	
	2	0 (0)	1 (3.1)	0 (0)	

Επιπεφυκίτιδα	0	16 (100.0)	32 (100.0)	9 (90.0)	0,087
	1	0 (0)	0 (0)	1 (10.0)	
Μυαλγία	0	16 (100.0)	31 (96.9)	9 (90.0)	0,392
	1	0 (0)	1 (3.1)	1 (10.0)	
Οστικά άλγη	0	15 (93.8)	30 (93.8)	9 (90.0)	0,814
	1	1 (6.3)	1 (3.1)	1 (10.0)	
	2	0 (0)	1 (3.1)	0 (0)	
Ασθένεια	0	9 (56.3)	25 (78.1)	7 (70.0)	0,324
	1	4 (25.0)	5 (15.6)	3 (30.0)	
	2	3 (18.8)	2 (6.3)	0 (0)	
Βλεννογονίτιδα (κλινική εξέταση)	0	12 (75.0)	28 (87.5)	9 (90.0)	0,649
	1	3 (18.8)	2 (6.3)	1 (10.0)	
	2	1 (6.3)	2 (6.3)	0 (0)	
Βλεννογονίτιδα (συμπτωματική)	0	16 (100.0)	31 (96.9)	9 (90.0)	0,392
	1	0 (0)	1 (3.1)	1 (10.0)	
Αισθητική νευροπάθεια	0	9 (56.3)	12 (37.5)	3 (30.0)	0,05
	1	5 (31.3)	15 (46.9)	2 (20.0)	
	2	0 (0)	5 (15.6)	3 (30.0)	
	3	2 (12.5)	0 (0)	2 (20.0)	
Κινητική νευροπάθεια	0	15 (93.8)	32 (100.0)	8 (80.0)	0,098
	1	1 (6.3)	0 (0)	1 (10.0)	
	2	0 (0)	0 (0)	1 (10.0)	

**Πίνακας Α7** Τοξικότητα ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής ανάλογα με τον ERCC1 πολυμορφισμό

	ERCC1				P-value
	CC	CT	TT		
Αναιμία	0	6 (42.9)	8 (25.8)	8 (34.8)	0,386
	1	8 (57.1)	20 (64.5)	11 (47.8)	
	2		3 (9.7)	4 (17.4)	
Λευκοπενία	0	3 (33.3)	13 (52.0)	9 (50.0)	0,72
	1	3 (33.3)	9 (36.0)	6 (33.3)	
	2	1 (11.1)	2 (8.0)	2 (11.1)	
	3	2 (22.2)	1 (4.0)	1 (5.6)	
Ουδετεροπενία	0	4 (44.4)	14 (56.0)	7 (38.9)	0,269
	1	0 (0)	5 (20.0)	6 (33.3)	
	2	4 (44.4)	6 (24.0)	3 (16.7)	
	3	1 (11.1)	0 (0)	1 (5.6)	
	4	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	
Θρομβοπενία	0	6 (66.7)	16 (64.0)	11 (61.1)	0,919
	1	2 (22.2)	6 (24.0)	6 (33.3)	
	2	1 (11.1)	3 (12.0)	1 (5.6)	
Λοίμωξη	0	9 (100.0)	23 (92.0)	17 (100.0)	0,339
	2	0 (0)	2 (8.0)	0 (0)	
Εμπύρετο	0	7 (77.8)	22 (88.0)	15 (83.3)	0,668
	1	2 (22.2)	2 (8.0)	3 (16.7)	
	2	0 (0)	1 (4.0)	0 (0)	
Διάρροια	0	2 (22.2)	14 (56.0)	7 (38.9)	0,235
	1	1 (11.1)	5 (20.0)	5 (27.8)	
	2	3 (33.3)	4 (16.0)	1 (5.6)	
	3	3 (33.3)	2 (8.0)	4 (22.2)	
	4	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	
Ναυτία	0	4 (44.4)	12 (48.0)	14 (82.4)	0,142
	1	3 (33.3)	9 (36.0)	1 (5.9)	
	2	2 (22.2)	4 (16.0)	1 (5.9)	
	3	0 (0)	0 (0)	1 (5.9)	
Έμετος	0	4 (44.4)	21 (84.0)	12 (66.7)	0,188
	1	4 (44.4)	2 (8.0)	3 (16.7)	
	2	0 (0)	1 (4.0)	2 (11.1)	
	3	1 (11.1)	1 (4.0)	1 (5.6)	
Δυσκοιλιότητα	0	8 (88.9)	20 (80.0)	16 (94.1)	0,224
	1	1 (11.1)	5 (20.0)	0 (0)	
	2	0 (0)	0 (0)	1 (5.9)	
Σύνδρομο Παλαμών-Πελμάτων	0	7 (77.8)	24 (96.0)	16 (94.1)	0,187



	1	1 (11.1)	1 (4.0)	0 (0)	
	2	0 (0)	0 (0)	1 (5.9)	
	3	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)	
Μυαλγία	0	9 (100.0)	23 (92.0)	16 (94.1)	0,389
	1	0 (0)	2 (8.0)	0 (0)	
	2	0 (0)	0 (0)	1 (5.9)	
Οστικά άλγη	0	6 (66.7)	23 (92.0)	15 (88.2)	0,406
	1	2 (22.2)	1 (4.0)	1 (5.9)	
	2	1 (11.1)	1 (4.0)	1 (5.9)	
Ασθένεια	0	4 (44.4)	14 (56.0)	12 (66.7)	0,344
	1	1 (11.1)	7 (28.0)	3 (16.7)	
	2	4 (44.4)	4 (16.0)	3 (16.7)	
Βλεννογονίτιδα (κλινική εξέταση)	0	9 (100.0)	24 (96.0)	15 (88.2)	0,273
	1	0 (0)	0 (0)	2 (11.8)	
	2	0 (0)	1 (4.0)	0 (0)	
Αισθητική νευροπάθεια	0	7 (77.8)	11 (44.0)	10 (55.6)	0,386
	1	2 (22.2)	11 (44.0)	5 (27.8)	
	2	0 (0)	3 (12.0)	3 (16.7)	
	3	0 (0)	1 (3.2)	3 (13.0)	

**Πίνακας Α8** Τοξικότητα ασθενών που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής ανάλογα με τον XPD πολυμορφισμό

	XPD			P-value	
	ΚΚ	ΚQ	QQ		
Αναιμία	0	4 (44.4)	4 (26.7)	1 (16.7)	0,135
	1	3 (33.3)	11 (73.3)	3 (50.0)	
	2	2 (22.2)	0 (0)	2 (33.3)	
Λευκοπενία	0	5 (55.6)	8 (53.3)	3 (50.0)	0,398
	1	4 (44.4)	5 (33.3)	2 (33.3)	
	2	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	
	3	0 (0)	2 (13.3)	0 (0)	
Ουδετεροπενία	0	5 (55.6)	9 (60.0)	2 (33.3)	0,524
	1	3 (33.3)	1 (6.7)	2 (33.3)	
	2	1 (11.1)	4 (26.7)	2 (33.3)	
	3	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
	4	7 (77.8)	10 (66.7)	3 (50.0)	
Θρομβοπενία	0	1 (11.1)	3 (20.0)	2 (33.3)	0,846
	1	1 (11.1)	2 (13.3)	1 (16.7)	
	2	1 (11.1)	3 (12.0)	1 (5.6)	
Λοίμωξη	0	8 (88.9)	14 (93.3)	6 (100.0)	0,7
	2	1 (11.1)	1 (6.7)	0 (0)	
Εμπύρετο	0	8 (88.9)	12 (80.0)	6 (100.0)	0,236
	1	0 (0)	3 (20.0)	0 (0)	
	2	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)	
Διάρροια	0	4 (44.4)	8 (53.3)	3 (50.0)	0,783
	1	3 (33.3)	3 (20.0)	1 (16.7)	
	2	0 (0)	1 (6.7)	1 (16.7)	
	3	1 (11.1)	3 (20.0)	1 (16.7)	
	4	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)	
Ναυτία	0	5 (55.6)	6 (40.0)	4 (66.7)	0,849
	1	2 (22.2)	6 (40.0)	2 (33.3)	
	2	1 (11.1)	2 (13.3)	0 (0)	
	3	1 (11.1)	1 (6.7)	0 (0)	
Έμετος	0	6 (66.7)	11 (73.3)	5 (83.3)	0,27
	1	1 (11.1)	3 (20.0)	0 (0)	
	2	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	
	3	2 (22.2)	1 (6.7)	0 (0)	
Δυσκοιλιότητα	0	7 (77.8)	14 (93.3)	4 (66.7)	0,554
	1	1 (11.1)	1 (6.7)	1 (16.7)	
	2	1 (11.1)	0 (0)	1 (16.7)	
Σύνδρομο Παλαμών-Πελμάτων	0	9 (100.0)	13 (86.7)	6 (100.0)	0,71

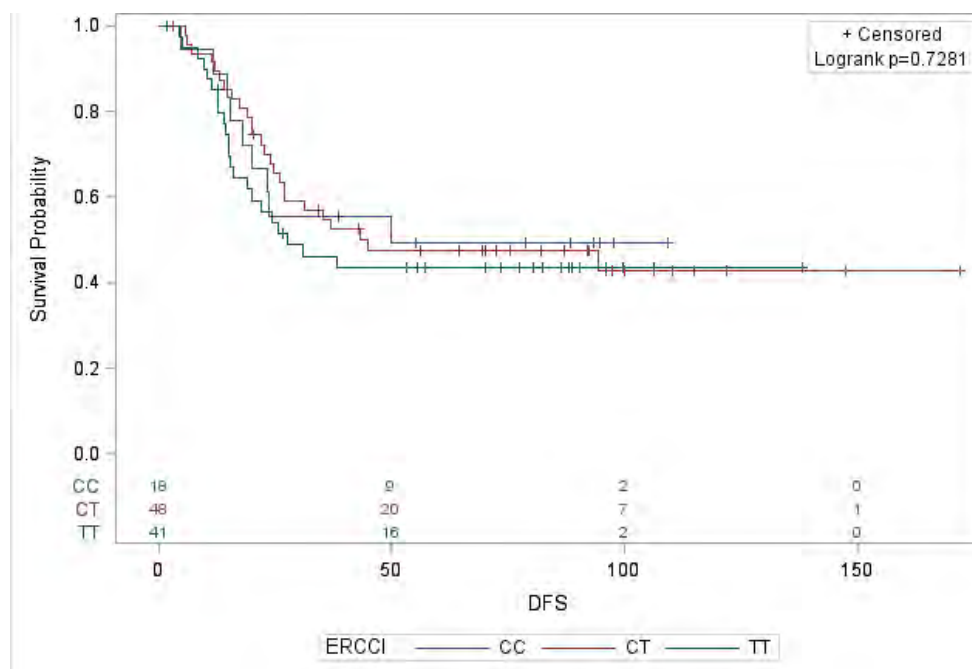
	1	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
	3	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
Μυαλγία	0	9 (100.0)	14 (93.3)	6 (100.0)	0,596
	1	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
Οστικά άλγη	0	9 (100.0)	13 (86.7)	6 (100.0)	0,71
	1	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
	2	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
Ασθένεια	0	4 (44.4)	8 (53.3)	4 (66.7)	0,387
	1	1 (11.1)	5 (33.3)	1 (16.7)	
	2	4 (44.4)	2 (13.3)	1 (16.7)	
Βλεννογονίτιδα (κλινική εξέταση)	0	9 (100.0)	13 (86.7)	6 (100.0)	0,71
	1	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
	2	0 (0)	1 (6.7)	0 (0)	
Αισθητική νευροπάθεια	0	5 (55.6)	7 (46.7)	3 (50.0)	0,686
	1	2 (22.2)	6 (40.0)	3 (50.0)	
	2	2 (22.2)	2 (13.3)	0 (0)	
	3	0 (0)	1 (3.2)	3 (13.0)	

#### 4.1.2 Συσχέτιση δεικτών επιβίωσης με τους πολυμορφισμούς σε ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία

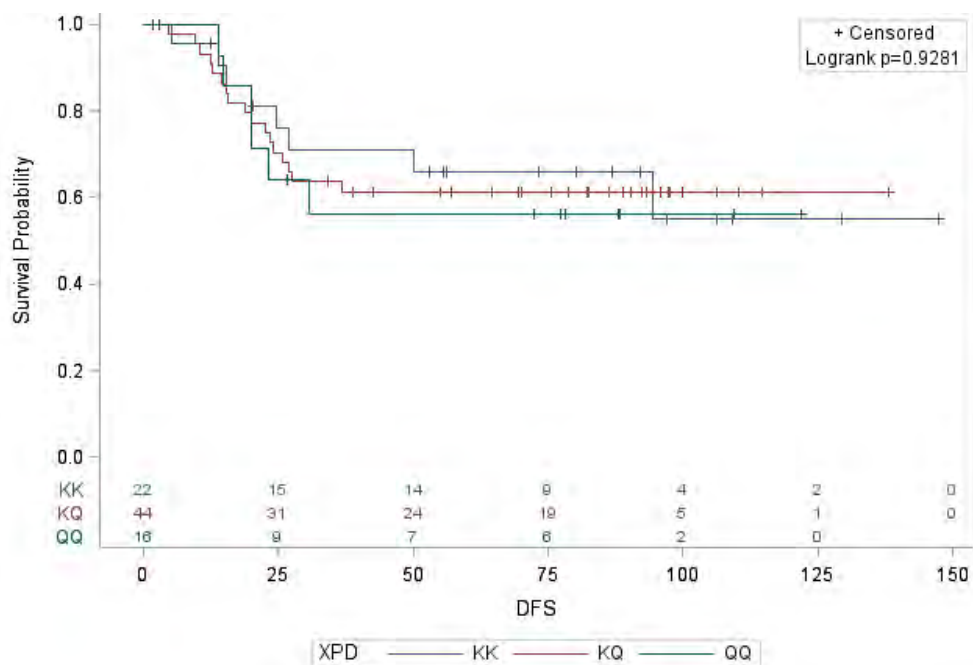
Το διάστημα ελεύθερου νόσου και η συνολική επιβίωση εκτιμήθηκε σε όλους στους ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου ή τη συνολική επιβίωση τόσο στο σύνολο του πληθυσμού όσο και στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνα ή τους άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (εικόνες A1-A4, Πίνακες A9-A12).

Η λεμφαδενική διήθηση (HR 2,45; 95% CI: 1,27-4,75;  $p=0,008$ ), το στάδιο C κατά Dukes (HR 2,43; 95% CI: 1.36-4.33;  $p=0,003$ ), η αγγειακή διήθηση (HR 2,86; 95% CI: 1.44-5.69;  $p=0,003$ ), η περινευρική διήθηση (HR 2,04; 95% CI: 0.97-4.30;  $p=0,062$ ), η θεραπεία με οξαλιπλατίνη έναντι 5-Fu (HR 0.4; 95% CI: 0.21-0.76;  $p=0,005$ ) και η θεραπεία της ιρινοτεκάνης έναντι 5-Fu (HR 0.58; 95% CI: 0.31-1.07;  $p=0,08$ ) συσχετίστηκαν με το διάστημα ελεύθερου νόσου. Κανένας από τους πολυμορφισμούς δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με αυτό το διάστημα και ως εκ τούτου δεν προχωρήσαμε σε πολυπαραγοντική ανάλυση.

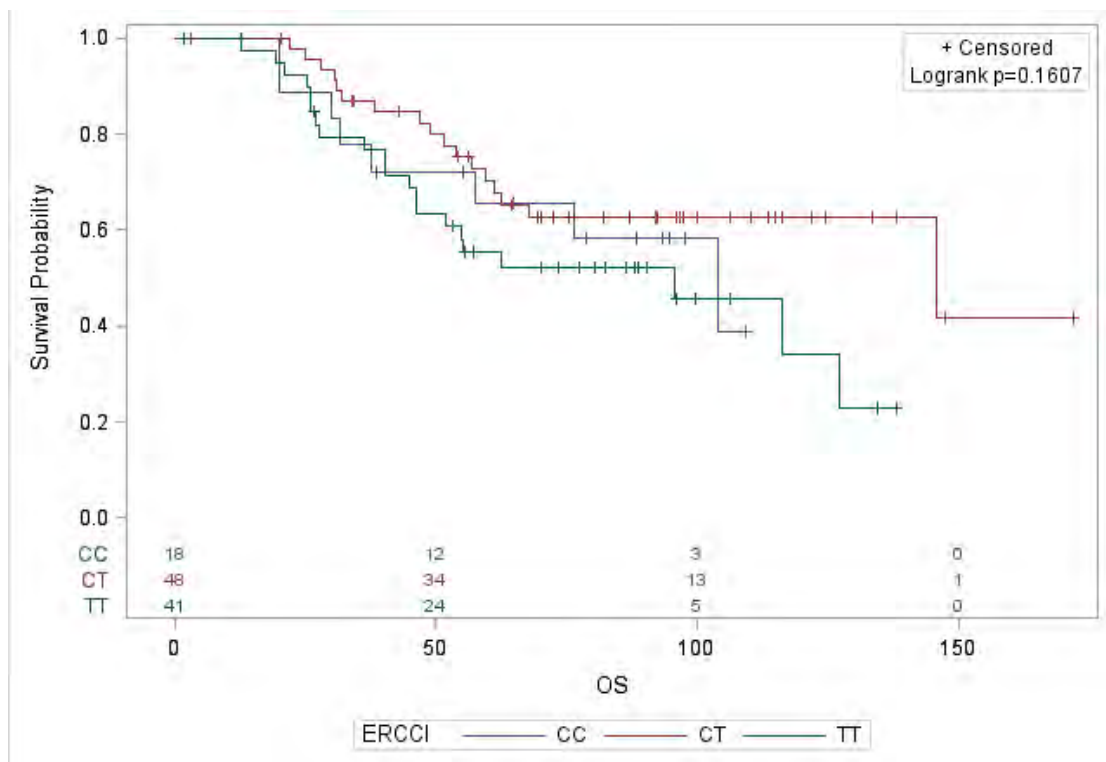
Ο πολυμορφισμός CT στο συνολικό πληθυσμό φάνηκε να έχει οριακά στατιστική σημαντικότητα ως προς την επιβίωση (CT vs. TT, HR=0,41;  $p=0,05$ ). Κανένας από τους πολυμορφισμούς δεν σχετίστηκε όμως με την επιβίωση στους ασθενείς που έλαβαν οξαλιπλατίνα. Ο πολυμορφισμός KQ στο συνολικό πληθυσμό φάνηκε να έχει οριακά στατιστική σημαντικότητα ως προς τη συνολική επιβίωση (KQ vs. QQ, HR=0,28,  $p=0,078$ ). αλλά φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικός στην πολυπαραγοντική ανάλυση ως προς την πενταετή επιβίωση, (KQ vs. QQ, HR=0.18,  $p=0,035$ ). Η λεμφαδενική διήθηση (HR 2,24; 95% CI: 1.06-4.73;  $p=0,035$ ), το στάδιο C κατά Dukes (HR 2,1; 95% CI: 1.12-4.15;  $p=0,022$ ), η αγγειακή διήθηση (HR 2,21; 95% CI: 1.02-4.80;  $p=0,046$ ), η περινευρική διήθηση (HR 2,03; 95% CI: 0.90-4.57;  $p=0,086$ ) συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση και χρησιμοποιήθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση.



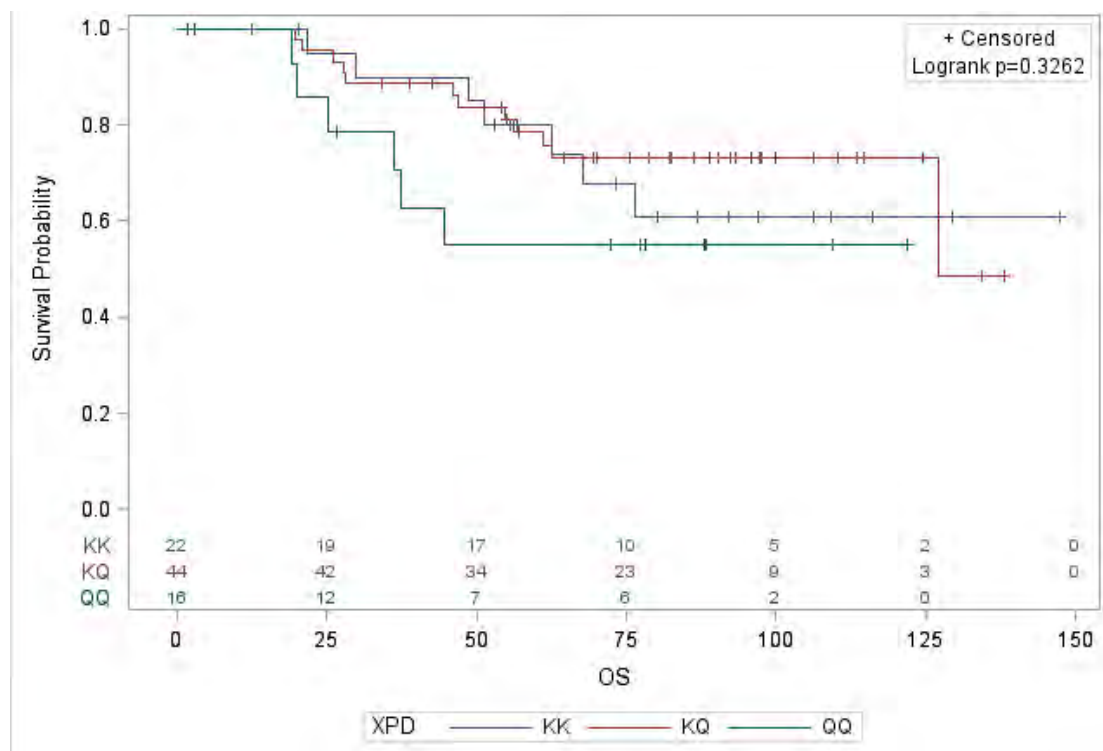
**Εικόνα A3:** Καμπύλες ελευθέρου νόσου διάστημα ανάλογα με τους ERCC1-118γονότυπους



**Εικόνα A4:** Καμπύλες για το ελευθέρου νόσου διάστημα ανάλογα με τους XPD-751 γονότυπους



**Εικόνα Α5:** Καμπύλες συνολικής επιβίωσης ανάλογα με τους ERCCI-118 γονότυπους



**Εικόνα Α6:** Καμπύλες συνολικής επιβίωσης ανάλογα με τους XPD-751 γονότυπους

**Πίνακας Α9** Μονοπαραγοντική ανάλυση για το ελεύθερου νόσου διάστημα στο σύνολο του πληθυσμού και στον πληθυσμό που έλαβε επικουρική θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη, την ιρινοτεκάνη και τη 5-Fu

		N patients	N events	HR	95% CI	p-value
<b>Σύνολο ασθενών</b>						
ERCC1						0,75
	CC vs. TT	18 vs. 41	9 vs. 22	0,81	0.38-1.75	0,6
	CT vs. TT	48 vs. 41	25 vs. 22	0,81	0.46-1.44	0,47
ERCC1 (different ref. Category)						0,75
	CT vs. CC	48 vs. 18	25 vs. 9	1	0.47-2.12	0,999
	TT vs. CC	41 vs. 18	22 vs. 9	1,23	0.57-2.66	0,6
XPD						0,9
	KK vs. QQ	22 vs. 16	8 vs. 6	0,8	0.28-2.27	0,67
	KQ vs. QQ	44 vs. 16	17 vs. 6	0,83	0.33-2.09	0,7
XPD (different ref. Category)						0,9
	KQ vs. KK	44 vs. 22	17 vs. 8	1,04	0.45-2.42	0,92
	QQ vs. KK	16 vs. 22	6 vs. 8	1,25	0.44-3.57	0,67
<b>Θεραπεία με Οξαλιπλατίνη</b>						
ERCC1						0,87
	CC vs. TT	5 vs. 19	1 vs. 7	0,65	0.10-4.12	0,65
	CT vs. TT	18 vs. 19	6 vs. 7	1,06	0.35-3.21	0,91
ERCC1 (different ref. Category)						0,87
	CT vs. CC	18 vs. 5	6 vs. 1	1,63	0.25-10.61	0,61
	TT vs. CC	19 vs. 5	7 vs. 1	1,54	0.24-9.74	0,65
XPD						0,42
	KK vs. QQ	5 vs. 11	0 vs. 4	0,2	0.01-5.11	0,33
	KQ vs. QQ	18 vs. 11	3 vs. 4	0,43	0.09-2.02	0,29
XPD (different ref. Category)						0,42
	KK vs. KQ	5 vs. 18	0 vs. 3	0,47	0.02-12.36	0,65
	QQ vs. KQ	11 vs. 18	4 vs. 3	2,31	0.49-10.81	0,29
<b>Θεραπεία με Ιρινοτεκάνη</b>						
ERCC1						0,3
	CC vs. TT	7 vs. 11	4 vs. 7	0,64	0.19-2.16	0,47
	CT vs. TT	15 vs. 11	7 vs. 7	0,43	0.15-1.24	0,12
ERCC1 (different ref. Category)						0,3
	CT vs. CC	15 vs. 7	7 vs. 4	0,68	0.20-2.29	0,53
	TT vs. CC	11 vs. 7	0 vs. 4	1,57	0.46-5.33	0,47
XPD						0,76
	KK vs. QQ	11 vs. 3	4 vs. 1	0,72	0.10-5.12	0,75
	KQ vs. QQ	15 vs. 3	8 vs. 1	1,15	0.18-7.19	0,88
XPD (different ref. Category)						0,76

	KQ vs. KK	15 vs. 11	8 vs. 4	1,58	0.47-5.29	0,46
	QQ vs. KK	3 vs. 11	1 vs. 4	1,38	0.20-9.74	0,75
<b>Θεραπεία με 5-Fu</b>						
ERCC1						0,65
	CC vs. TT	6 vs. 11	4 vs. 8	0,73	0.22-2.43	0,6
	CT vs. TT	15 vs. 11	12 vs. 8	0,65	0.26-1.61	0,35
ERCC1 (different ref. Category)						0,65
	CT vs. CC	15 vs. 6	12 vs. 4	0,9	0.29-2.78	0,85
	TT vs. CC	11 vs. 6	8 vs. 4	1,38	0.41-4.62	0,6
XPD						0,53
	KK vs. QQ	6 vs. 2	4 vs. 1	0,35	0.04-2.94	0,33
	KQ vs. QQ	11 vs. 2	6 vs. 1	0,32	0.04-2.37	0,27
XPD (different ref. Category)						0,53
	KQ vs. KK	11 vs. 6	6 vs. 4	0,92	0.23-3.70	0,9
	QQ vs. KK	2 vs. 6	1 vs. 4	2,85	0.34-23.93	0,33

---



**Πίνακας A10** Μονοπαραγοντική ανάλυση για συνολική επιβίωση στο σύνολο του πληθυσμού και στον πληθυσμό που έλαβε επικουρική θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη, την ιρινοτεκάνη και τη 5-Fu

		N patients	N events	HR	95% CI	p-value
<b>Σύνολο Ασθενών</b>						
ERCC1						0,17
	CC vs. TT	18 vs. 41	8 vs. 21	0,83	0.37-1.88	0,66
	CT vs. TT	48 vs. 41	17 vs. 21	0,54	0.28-1.04	0,064
ERCC1 (different ref. Category)						0,17
	CT vs. CC	48 vs. 18	17 vs. 8	0,65	0.28-1.51	0,31
	TT vs. CC	41 vs. 18	21 vs. 8	1,2	0.53-2.70	0,66
XPD						0,3
	KK vs. QQ	22 vs. 16	7 vs. 6	0,57	0.19-1.70	0,31
	KQ vs. QQ	44 vs. 16	12 vs. 6	0,46	0.17-1.23	0,12
XPD (different ref. Category)						0,3
	KQ vs. KK	44 vs. 22	12 vs. 7	0,81	0.32-2.05	0,65
	QQ vs. KK	16 vs. 22	6 vs. 7	1,75	0.59-5.21	0,31
<b>Θεραπεία με Οξαλιπλατίνη</b>						
ERCC1						0,95
	CC vs. TT	5 vs. 19	1 vs. 7	0,75	0.12-4.72	0,76
	CT vs. TT	18 vs. 19	6 vs. 7	0,97	0.32-2.92	0,95
ERCC1 (different ref. Category)						0,95
	CT vs. CC	18 vs. 5	6 vs. 1	1,3	0.20-8.40	0,79
	TT vs. CC	19 vs. 5	7 vs. 1	1,34	0.21-8.49	0,76
XPD						0,33
	KK vs. QQ	5 vs. 11	0 vs. 4	0,21	0.01-5.18	0,34
	KQ vs. QQ	18 vs. 11	3 vs. 4	0,36	0.08-1.66	0,19
XPD (different ref. Category)						0,33
	KK vs. KQ	5 vs. 18	0 vs. 3	0,58	0.02-15.26	0,74
	QQ vs. KQ	11 vs. 18	4 vs. 3	2,81	0.60-13.13	0,19
<b>Θεραπεία με Ιρινοτεκάνη</b>						
ERCC1						0,28
	CC vs. TT	7 vs. 11	3 vs. 6	0,54	0.14-2.12	0,38
	CT vs. TT	15 vs. 11	5 vs. 6	0,38	0.11-1.26	0,11
ERCC1 (different ref. Category)						0,28
	CT vs. CC	15 vs. 7	5 vs. 3	0,71	0.17-2.90	0,63
	TT vs. CC	11 vs. 7	6 vs. 3	1,86	0.47-7.34	0,38
XPD						0,72
	KK vs. QQ	11 vs. 3	4 vs. 1	0,78	0.11-5.79	0,81
	KQ vs. QQ	15 vs. 3	4 vs. 1	0,49	0.07-3.64	0,49
XPD (different ref. Category)						0,72
	KQ vs. KK	15 vs. 11	4 vs. 4	0,63	0.15-2.58	0,52
	QQ vs. KK	3 vs. 11	1 vs. 4	1,28	0.17-9.43	0,81
<b>Θεραπεία με 5-Fu</b>						

ERCC1						0,17
	CC vs. TT	6 vs. 11	4 vs. 8	1,19	0.35-4.01	0,78
	CT vs. TT	15 vs. 11	6 vs. 8	0,39	0.13-1.19	0,098
ERCC1 (different ref. Category)						0,17
	CT vs. CC	15 vs. 6	6 vs. 4	0,33	0.09-1.24	0,1
	TT vs. CC	11 vs. 6	8 vs. 4	0,84	0.25-2.86	0,78
XPD						0,42
	KK vs. QQ	6 vs. 2	3 vs. 1	0,32	0.04-2.83	0,31
	KQ vs. QQ	11 vs. 2	5 vs. 1	0,25	0.03-1.98	0,19
XPD (different ref. Category)						0,42
	KQ vs. KK	11 vs. 6	5 vs. 3	0,76	0.17-3.52	0,73
	QQ vs. KK	2 vs. 6	1 vs. 3	3,11	0.35-27.47	0,31

---

**Πίνακας A11** Πολυπαραγοντική COX ανάλυση για τη συνολική επιβίωση στο σύνολο των ασθενών που έλαβε επικουρική θεραπεία

<b>Parameter</b>	<b>Categories</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p-value</b>
<b>Model 1</b>					
ERCC1	CC vs. TT	0,77	0,25	2,40	0,654
	CT vs. TT	0,41	0,17	1,00	<b>0,050</b>
Στάδιο Νόσου	C1/C2 vs. B1/B2	2,33	0,89	6,06	0,084
Περινευρική διήθηση	Yes vs. No	1,00	0,33	3,08	0,997
Αγγειακή διήθηση	Yes vs. No	1,55	0,55	4,39	0,409
<b>Model 2</b>					
XPD	KK vs. QQ	0,58	0,11	2,99	0,518
	KQ vs. QQ	0,28	0,07	1,16	0,078
Στάδιο Νόσου	C1/C2 vs. B1/B2	3,46	0,90	13,37	0,072
Περινευρική διήθηση	Yes vs. No	1,27	0,27	5,91	0,760
Αγγειακή διήθηση	Yes vs. No	3,34	0,66	16,86	0,144

**Πίνακας A12** Πολυπαραγοντική COX ανάλυση για την 5-ετή επιβίωση στο σύνολο των ασθενών που έλαβε επικουρική θεραπεία

<b>Parameter</b>	<b>Categories</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p-value</b>
<b>Entire cohort</b>					
<b>Model 1</b>					
ERCC1	CC vs. TT	0,85	0,27	2,69	0,786
	CT vs. TT	0,47	0,18	1,25	0,130
Στάδιο Νόσου	C1/C2 vs. B1/B2	3,29	1,08	10,06	<b>0,037</b>
Περινευρική διήθηση	Yes vs. No	0,91	0,25	3,25	0,884
Αγγειακή διήθηση	Yes vs. No	1,62	0,47	5,55	0,446
<b>Model 2</b>					
XPD	KK vs. QQ	0,48	0,08	2,94	0,425
	KQ vs. QQ	0,18	0,04	0,88	<b>0,035</b>
Στάδιο Νόσου	C1/C2 vs. B1/B2	4,02	0,78	20,63	0,096
Περινευρική διήθηση	Yes vs. No	1,57	0,31	8,08	0,590
Αγγειακή διήθηση	Yes vs. No	4,45	0,73	27,18	0,106

#### **4.1.3 Συσχέτιση δεικτών επιβίωσης με τους πολυμορφισμούς σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής**

Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου ή τη συνολική επιβίωση τόσο στο σύνολο του πληθυσμού όσο και στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία με βάση την οξαλπλατίνα ή την ιρινοτεκάνη (Πίνακες A13-A15).

Η λειτουργική κατάσταση (performance status-PS) 1-2 (HR 2,6; 95% CI: 1.60-4.25;  $p < 0.001$ ) το ορθό ως πρωτοπαθής εστία (HR 0,6; 95% CI: 0.36-0.99;  $p = 0,046$ ) και η χορήγηση προηγούμενης επικουρικής θεραπείας (HR 0,59; 95% CI: 0.41-0.86;  $p = 0,006$ ) συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση και χρησιμοποιήθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Η επιβαρυσμένη λειτουργική κατάσταση (PS: 1-2) και η εντόπιση του όγκου στο δεξιό κόλον συσχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση στην πολυπαραγοντική ανάλυση (Πίνακας A15).

**Πίνακας A13** Μονοπαραγοντική ανάλυση για το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου στο σύνολο του πληθυσμού και στον πληθυσμό που έλαβε πρώτης γραμμής θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνα και την ιρινοτεκάνη

		N patients	N events	HR	95% CI	p-value
<b>Σύνολο Ασθενών</b>						
<b>ERCC1</b>						
	CC vs. TT	22 vs. 45	21 vs. 42	1,07	0.63-1.80	0,84 0,8
	CT vs. TT	58 vs. 45	54 vs. 42	0,93	0.62-1.39	0,71
<b>ERCC1 (different ref category)</b>						
	CT vs. CC	58 vs. 22	54 vs. 21	0,87	0.52-1.44	0,84 0,58
	TT vs. CC	45 vs. 22	42 vs. 21	0,94	0.56-1.58	0,8
<b>XPD</b>						
	KK vs. QQ	19 vs. 14	16 vs. 12	0,73	0.35-1.55	0,68 0,42
	KQ vs. QQ	31 vs. 14	28 vs. 12	0,92	0.47-1.81	0,81
<b>XPD (different ref category)</b>						
	KQ vs. KK	31 vs. 19	28 vs. 16	1,25	0.68-2.32	0,68 0,47
	QQ vs. KK	14 vs. 19	12 vs. 16	1,36	0.64-2.88	0,42
<b>Θεραπεία με Οξαλιπλατίνη</b>						
<b>ERCC1</b>						
	CC vs. TT	13 vs. 29	12 vs. 26	1,25	0.63-2.46	0,82 0,53
	CT vs. TT	34 vs. 29	32 vs. 26	1,06	0.63-1.78	0,84
<b>ERCC1 (different ref category)</b>						
	CT vs. CC	34 vs. 13	32 vs. 12	0,85	0.44-1.64	0,82 0,62
	TT vs. CC	29 vs. 13	26 vs. 12	0,8	0.41-1.59	0,53
<b>XPD</b>						
	KK vs. QQ	12 vs. 8	10 vs. 7	0,81	0.31-2.12	0,87 0,67
	KQ vs. QQ	20 vs. 8	17 vs. 7	0,79	0.33-1.91	0,61
<b>XPD (different ref category)</b>						
	KQ vs. KK	20 vs. 12	17 vs. 10	0,98	0.45-2.14	0,87 0,95
	QQ vs. KK	8 vs. 12	7 vs. 10	1,23	0.47-3.21	0,67
<b>Θεραπεία με Ιρινοτεκάνη</b>						
<b>ERCC1</b>						
	CC vs. TT	8 vs. 14	8 vs. 14	0,83	0.35-1.98	0,54 0,67

	CT vs. TT	22 vs. 14	20 vs. 14	0,67	0.33- 1.36	0,27
ERCC1 (different ref category)						0,54
	CT vs. CC	22 vs. 8	20 vs. 8	0,81	0.35- 1.86	0,62
	TT vs. CC	14 vs. 8	14 vs. 8	1,2	0.50- 2.87	0,67
XPD						0,2
	KK vs. QQ	7 vs. 5	6 vs. 4	0,44	0.11- 1.76	0,25
	KQ vs. QQ	8 vs. 5	8 vs. 4	1,22	0.35- 4.28	0,75
XPD (different ref category)						0,2
	KQ vs. KK	8 vs. 7	8 vs. 6	2,79	0.90- 8.68	0,076
	QQ vs. KK	5 vs. 7	4 vs. 6	2,28	0.57- 9.18	0,25

---

**Πίνακας A14** Μονοπαραγοντική ανάλυση για τη συνολική επιβίωση στο σύνολο του πληθυσμού και στον πληθυσμό που έλαβε πρώτης γραμμής θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη και την ιρινοτεκάνη

		N patients	N events	HR	95% CI	p-value
<b>Σύνολο Ασθενών</b>						
ERCC1						0,56
	CC vs. TT	22 vs. 45	20 vs. 41	1,12	0.65-1.91	0,68
	CT vs. TT	58 vs. 45	47 vs. 41	0,85	0.56-1.30	0,47
ERCC1 (different ref category)						0,56
	CT vs. CC	58 vs. 22	47 vs. 20	0,76	0.45-1.29	0,31
	TT vs. CC	45 vs. 22	41 vs. 20	0,89	0.52-1.53	0,68
XPD						0,25
	KK vs. QQ	19 vs. 14	15 vs. 11	0,51	0.23-1.13	0,098
	KQ vs. QQ	31 vs. 14	25 vs. 11	0,68	0.33-1.38	0,28
XPD (different ref category)						0,25
	KQ vs. KK	31 vs. 19	25 vs. 15	1,32	0.69-2.55	0,4
	QQ vs. KK	14 vs. 19	11 vs. 15	1,96	0.88-4.33	0,098
<b>Θεραπεία με Οξαλιπλατίνη</b>						
ERCC1						0,77
	CC vs. TT	13 vs. 29	11 vs. 25	1,14	0.56-2.32	0,72
	CT vs. TT	34 vs. 29	25 vs. 25	0,88	0.50-1.55	0,67
ERCC1 (different ref category)						0,77
	CT vs. CC	34 vs. 13	25 vs. 11	0,78	0.38-1.58	0,48
	TT vs. CC	29 vs. 13	25 vs. 11	0,88	0.43-1.79	0,72
XPD						0,61
	KK vs. QQ	12 vs. 8	9 vs. 6	0,61	0.21-1.75	0,35
	KQ vs. QQ	20 vs. 8	14 vs. 8	0,66	0.25-1.71	0,39
XPD (different ref category)						0,61
	KQ vs. KK	20 vs. 12	14 vs. 9	1,08	0.45-2.59	0,86
	QQ vs. KK	8 vs. 12	6 vs. 9	1,65	0.57-4.74	0,35
<b>Θεραπεία με Ιρινοτεκάνη</b>						
ERCC1						0,86
	CC vs. TT	8 vs. 14	8 vs. 14	0,87	0.35-2.14	0,76
	CT vs. TT	22 vs. 14	20 vs. 14	0,83	0.41-1.65	0,59
ERCC1 (different ref category)						0,86
	CT vs. CC	22 vs. 8	20 vs. 8	0,95	0.40-2.26	0,91
	TT vs. CC	14 vs. 8	14 vs. 8	1,15	0.47-2.84	0,76
XPD						0,15
	KK vs. QQ	7 vs. 5	6 vs. 4	0,29	0.07-1.14	0,077
	KQ vs. QQ	8 vs. 5	8 vs. 4	0,74	0.21-2.63	0,64
XPD (different ref category)						0,15
	KQ vs. KK	8 vs. 7	8 vs. 6	2,54	0.82-7.87	0,11
	QQ vs. KK	5 vs. 7	4 vs. 6	3,43	0.87-13.45	0,077



**Πίνακας A15** Πολυπαραγοντική COX ανάλυση για τη συνολική επιβίωση στο σύνολο των ασθενών που έλαβε πρώτης γραμμής θεραπεία

<b>Parameter</b>	<b>Categories</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p-value</b>
<b>Entire cohort</b>					
<b>Model 1</b>					
ERCC1	CC vs. TT	1,00	0,52	1,94	0,99
	CT vs. TT	0,75	0,47	1,21	0,24
Λειτουργική κατάσταση	1-2 vs. 0	2,59	1,50	4,46	< <b>0.001</b>
Πρωτοπαθής εστία	Αριστερό κόλον vs. Ορθό	1,42	0,79	2,54	0,24
	Δεξιό κόλον vs. Ορθό	2,41	1,34	4,36	< <b>0.001</b>
Προηγούμενη χορήγηση επικουρικής θεραπείας	Yes vs. No	0,70	0,45	1,10	0,12
<b>Model 2</b>					
XPD	KK vs. QQ	0,71	0,30	1,70	0,44
	KQ vs. QQ	0,84	0,38	1,87	0,67
Λειτουργική κατάσταση	1-2 vs. 0	3,02	1,21	7,57	<b>0,02</b>
Πρωτοπαθής εστία	Αριστερό κόλον vs. Ορθό	1,39	0,62	3,11	0,43
	Δεξιό κόλον vs. Ορθό	2,27	0,94	5,49	0,07
Προηγούμενη χορήγηση επικουρικής θεραπείας	Yes vs. No	0,68	0,32	1,44	0,32

## **4.2 Μέρος Β – Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος.**

### **4.2.1 Η ανοσοϊστοχημική εξέταση αποκάλυψε ετερογενή έκφραση της καβεολίνης-1 σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο**

Παρατηρήσαμε ετερογενή έκφραση της καβεολίνης-1 σε συνάρτηση με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα καρκινικά κύτταρα σε καλά διαφοροποιημένες (ΚΔ) περιοχές ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις, αρνητικά για καβεολίνη-1 ή εμφάνιζαν εστιακή/ασθενή έκφραση της πρωτεΐνης σε 9 από τις 11 περιπτώσεις. Αντιθέτως, το στρώμα των ΚΔ περιοχών εμφάνιζαν ισχυρή έκφραση της Cav-1 (εικόνα Β1, Πίνακας Β1). Τα καρκινικά κύτταρα σε περιοχές χαμηλής διαφοροποίησης (ΧΔ) ήταν συνήθως μετρίως ως ισχυρά θετικά σε έξι από τις επτά περιπτώσεις. Οι ινοβλάστες ήταν ασθενώς θετικοί στην πρωτεΐνη σε περιοχής ΧΔ, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου τα καρκινικά κύτταρα ήταν εντόνως θετικά (εικόνες Β1Α, Β1Γ). Φαίνεται ότι υπάρχει εικόνα αντίστροφης έκφρασης της καβεολίνης-1, με έντονη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα και ισχνή ή καθόλου έκφραση στους ινοβλάστες σχετιζόμενους με το στρώμα και αντίστροφα (Πίνακας Β1)

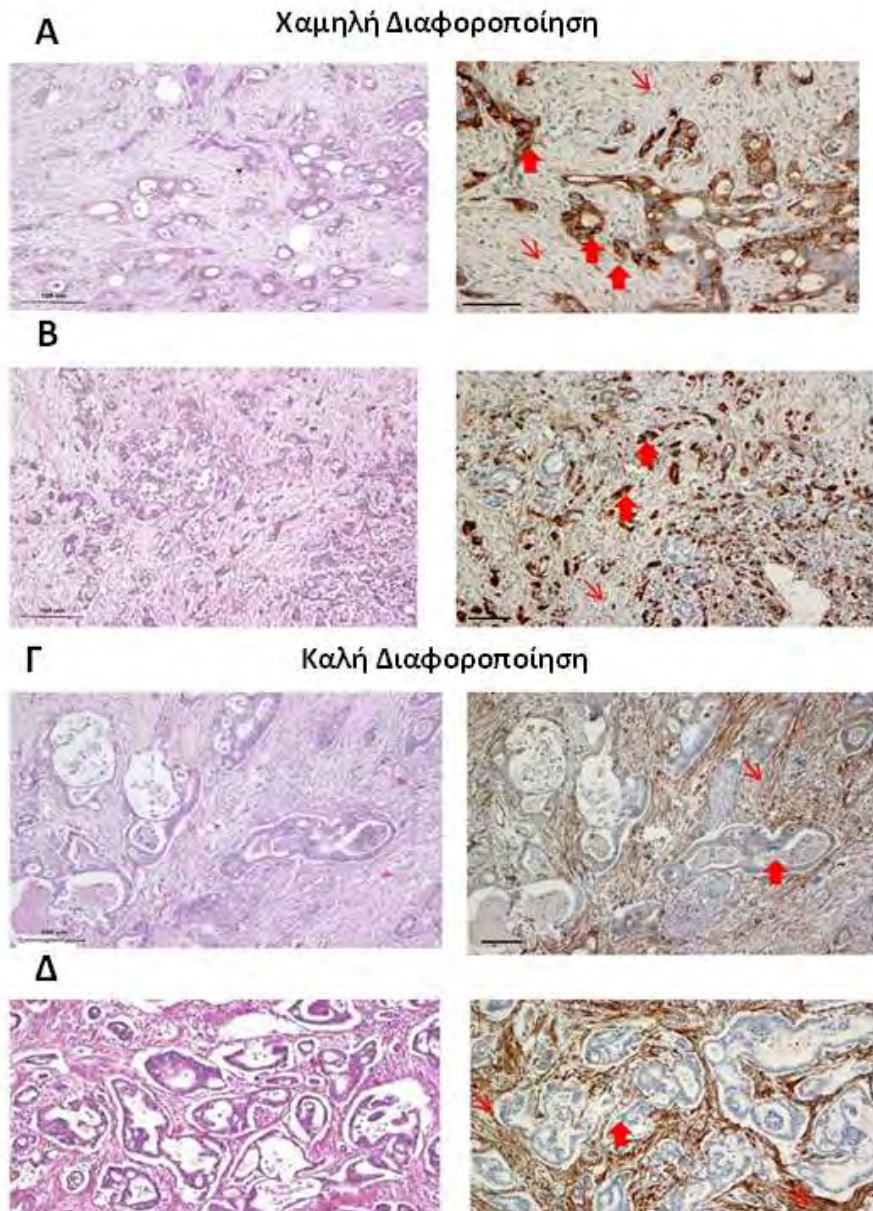
**Πίνακας Β1.** Έκφραση της καβεολίνης-1 σε αρχειακά δείγματα καρκίνου παγκρέατος

Αριθμός Περιστατικού	Χαμηλή Διαφοροποίηση Έκφραση Cav-1		Μέτρια και Καλή Διαφοροποίηση Έκφραση Cav-1	
	Καρκίνος	Στρώμα	Καρκίνος	Στρώμα
	1	3	1	1
2	2	2	0	2
3	Χωρίς περιοχές ΧΔ		2	3
4	Χωρίς περιοχές ΧΔ		2	1 (σπάνιο στρώμα)
5	Χωρίς περιοχές ΧΔ		1	3
6	1	3	0	3
7	3	2	0	1 (σπάνιο στρώμα)
8	3	1	1	3
9	2	2	1	3
10	3	1	1	3
11	Χωρίς περιοχές ΧΔ		0	3

Έκφραση της Caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα και στο στρώμα σε καλά και χαμηλά διαφοροποιημένες περιοχές παγκρεατικού καρκίνου σε 11 αρχειακά δείγματα. Για λεπτομέρειες, παρακαλούμε δείτε τα υλικά και τις μεθόδους, ανοσοϊστοχημεία.

0 = καμία χρώση, 1 = ασθενής ή/και εστιακή χρώση (<10% των κυττάρων), 2 = μέτρια ή ισχυρή χρώση(10-50% των κυττάρων), 3 = μέτρια ή ισχυρή (>50% των κυττάρων)

Cav-1: Caveolin -1 (καβεολίνη-1), ΧΔ: Χαμηλής Διαφοροποίησης



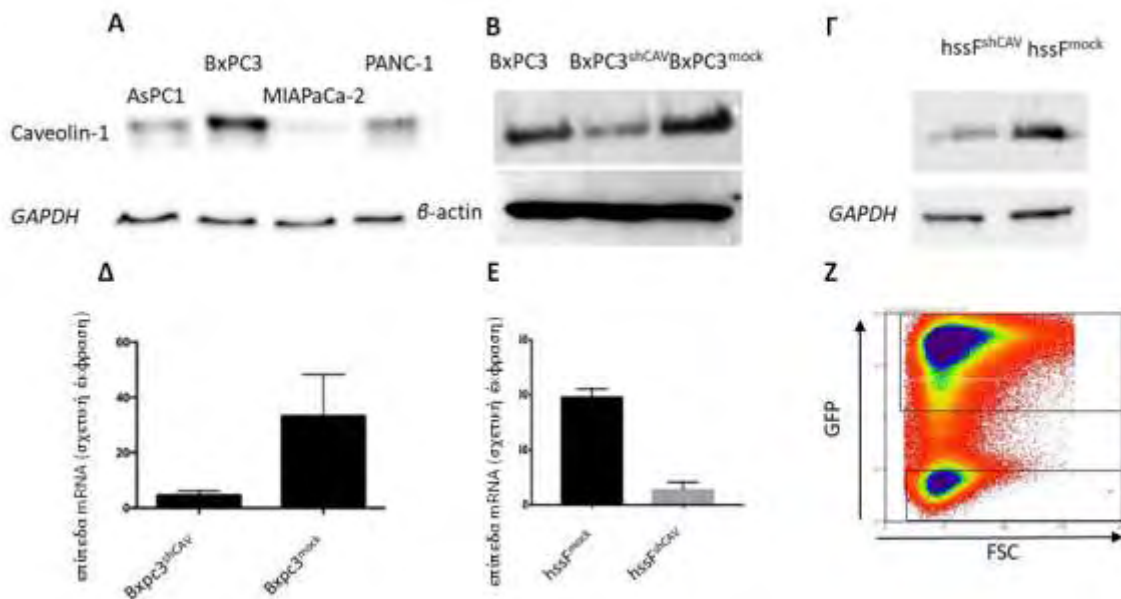
**Εικόνα Β1** (Α-Δ). Έκφραση της *Caveolin-1* σε περιπτώσεις καρκίνου παγκρέατος

Η έκφραση της Cav-1 σε περιπτώσεις παγκρεατικού καρκίνου με χαμηλή διαφοροποίηση (Α, Β) με έντονη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα (παχύ βέλος) και απουσία έκφρασης στο στρώμα (λεπτό βέλος). Σε καλά διαφοροποιημένες περιοχές (Γ, Δ) των ίδιων όγκων όπως στις εικόνες Α, Β, παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή έντονη έκφραση στο στρώμα (λεπτό βέλος) και απουσία έκφρασης στα καρκινικά κύτταρα (παχύ βέλος). Χρώση Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης (Α & Η) των συγκεκριμένων περιοχών φαίνεται στις αριστερές εικόνες

Α, Γ: Περίπτωση 1; Β, Δ: Περίπτωση 10 (Πίνακας Β1) Κλίμακα; 100μm

#### 4.2.2 Δημιουργία παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών με μειωμένη έκφραση Cav-1

Προκειμένου να επιλέξουμε την καταλληλότερη κυτταρική σειρά για την υπόθεσή μας, εξετάσαμε αρκετές παγκρεατικές κυτταρικές σειρές για την έκφραση της Cav-1 (εικόνα B2A). Βρήκαμε ότι τα κύτταρα BxPC3 εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα Cav-1 και επιλέξαμε αυτά τα κύτταρα για να συνεχιστούν τα επόμενα πειράματα. Η εισαγωγή shRNA, με τη βοήθεια λεντιϊού, στα κύτταρα BxPC3 είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της Cav-1, όπως φαίνεται στην εικόνα B2A. Η παράλληλη εισαγωγή του GFP επέτρεψε το διαχωρισμό των κυττάρων με τη μεγαλύτερη ενσωμάτωση/έκφραση του ιού και κατά συνέπεια τη μικρότερη έκφραση της Cav-1 (κύτταρα BxPC3<sup>shCAV</sup>), με τη βοήθεια του κυτταροδιαχωριστή φθορισμού (εικόνα B2C). Ως μάρτυρας, δημιουργήθηκε η κυτταρική σειρά BxPC3<sup>mock</sup> με ανεπηρέαστα επίπεδα Cav-1. Τα λεντιϊκά σωματίδια που δεν εκφράζουν κωδικοποιημένο shRNA (ψευδή) δεν αλλοίωσαν τα επίπεδα Cav-1, επιβεβαιώνοντας ότι η μειωμένη έκφραση του Cav-1 σε BxPC3<sup>shCAV</sup> οφειλόταν στην επίδραση του shRNA (Σχήμα 2A). Ινοβλάστες με αποσιωπημένη (hhsF<sup>shCAV</sup>) ή ανεπηρέαστη (hhsF<sup>mock</sup>) έκφραση της Cav-1 δημιουργήθηκαν από ινοβλάστες δέρματος που αθανατοποιήθηκαν με hTERT (εικόνα B2B).

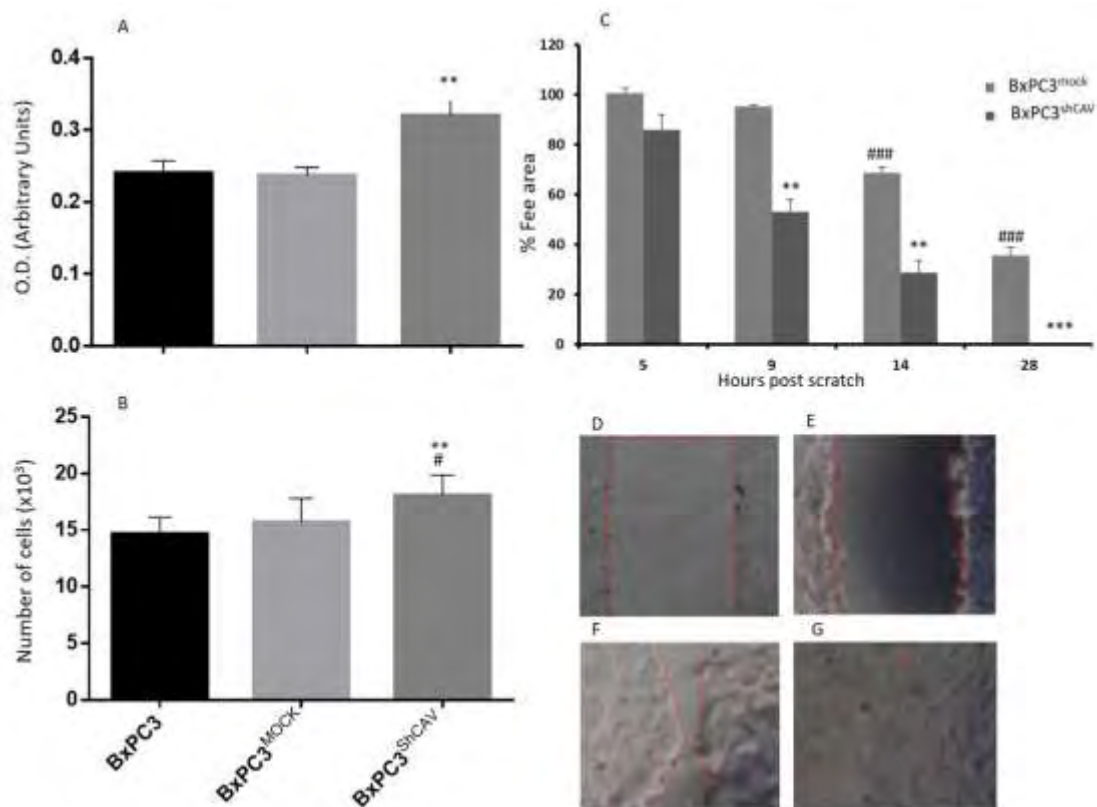


**Εικόνα B2** : Δημιουργία κυττάρων με τροποποιημένη έκφραση *caveolin-1*.

Η διαφορετική έκφραση της *caveolin-1* σε τέσσερις κυτταρικές σειρές (A). Διαφορική έκφραση των επιπέδων πρωτεΐνης και mRNA της *caveolin-1* σε κύτταρα BxPC3 (B και Δ αντίστοιχα) και σε ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος τροποποιημένα με hTERT (Γ και E αντίστοιχα). Παρουσιάζεται η στρατηγική για τον κυτταρικό διαχωρισμό που ακολουθήσαμε (Z). BxPC3<sup>shCAV</sup>: BxPC3 διαμολυσμένα με shRNA για *cav-1*, BxPC3<sup>mock</sup>. BxPC3 διαμολυσμένα με αλληλουχία που δεν εκφράζεται, hssF<sup>shCAV</sup>. hTERT ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος διαμολυσμένα με shRNA για *cav-1* και hssF<sup>mock</sup>: ινοβλάστες διαμολυσμένοι με αλληλουχία που δεν εκφράζεται. GFP: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. FSC: Forward scatter.

#### **4.2.3 Μειορρύθμιση της έκφρασης της Cav-1 έχει σαν αποτέλεσμα την οριακή αύξηση της σύνθεσης του DNA, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αυξημένη μετανάστευση / κινητικότητα των κυττάρων BxPC3**

Αρχικά ελέγξαμε αν η μειορρύθμιση της Cav-1 επηρέαζε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Με τη μέθοδο SRB και με τη μέθοδο ενσωμάτωσης του BrdU στο DNA, με αρχική πυκνότητα ενοφθαλμισμού στα 5000 κύτταρα/οπή, παρατηρήσαμε μέτρια αύξηση στη σύνθεση του DNA (εικόνα B3A) και τον πολλαπλασιασμό των BxPC3<sup>shCAV</sup> σε σύγκριση με τα BxPC3 και τα BxPC3<sup>mock</sup> (εικόνα B3B). Αυτά τα αποτελέσματα, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, αναδεικνύουν ότι η Cav-1 μπορεί να ενεργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα B3 (C-G), η μειορρύθμιση της Cav-1 σε κύτταρα BxPC3 οδήγησε σε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων BxPC3<sup>shCAV</sup> σε σύγκριση με το BxPC3<sup>mock</sup> ( $p < 0,01$ ), υποδεικνύοντας και πάλι ότι το Cav-1 μπορεί να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων.



**Εικόνα Β3.** Αποσιώπηση της *Cav-1* στα *BxPC3* έχει σαν αποτέλεσμα μέτρια αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αυξημένη μετανάστευση των κυττάρων *BxPC3*.

Κάθε κυτταρική σειρά ενοφθαλμίστηκε σε συγκέντρωση 5000 κύτταρων/οπή. Εκτιμήθηκε ο ρυθμός σύνθεσης του DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης του BrdU (A) και ο συνολικός κυτταρικός πληθυσμός με τη χρήση της μεθόδου SRB (B) μετά από επώαση για 48 ώρες. Τα ιστογράμματα παριστάνουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν

(A) \*\*P<0.001 vs. BxPC3 and BxPC3<sup>mock</sup>, one-way ANOVA, Holm-Sidak post hoc test. (B) \*\*P<0.001 vs. BxPC3 and #P<0.05 vs. BxPC3<sup>mock</sup>, one-way ANOVA, Holm-Sidak post hoc test.

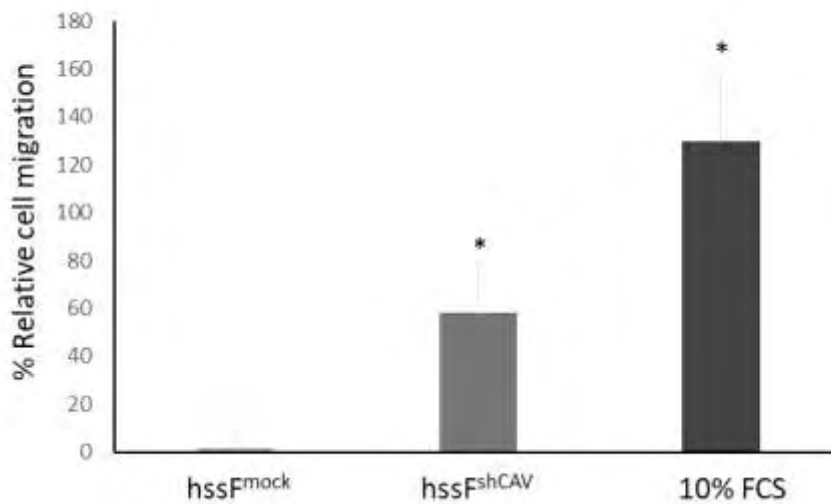
(C) % ελεύθερης περιοχής για τον προσδιορισμό της κάλυψη του διακυτταρικού κενού σε διάφορα χρονικά σημεία. Το ιστόγραμμα αντιπροσωπεύει το μέσο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. \*\*, p <0,01; \*\*\*, p <0.005; ###, p <0.005 έναντι BxPC3<sup>mock</sup> στις 5 ώρες. (D-G): Αντιπροσωπευτικές εικόνες της τεχνικής κάλυψης (επούλωσης) του κενού διακυτταρικού χώρου για BxPC3<sup>mock</sup> (D, F) ή BxPC3<sup>shCav</sup> (E, G) στο χρόνο 0 (D και F, αντίστοιχα) και 28 ώρες αργότερα (E και G, αντίστοιχα). Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει τα όρια του κυτταρικού πληθυσμού στη θέση



του διακυτταρικού κενού. Οι φωτογραφίες είναι αντιπροσωπευτικές ενός από τα δύο πειράματα.

#### **4.2.4 Μειορρύθμιση της έκφρασης της Cav-1 στους ινοβλάστες αυξάνει τη χημειοταξία και την ικανότητα των κυττάρων BxPC3 να μεταναστεύουν**

Για να καθοριστεί ο ρόλος των επιπέδων της Cav-1 στο μικροπεριβάλλον του όγκου μελετήσαμε με τη χρήση ειδικών ένθετων (Transwell®) την ικανότητα επαγωγής μετακίνησης/χημειοταξίας των κυττάρων (εικόνα B4) όπου μελετήθηκε η επίδραση των ινοβλαστών με αποσιωπημένη Cav-1 στη χημειοτακτική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων BxPC3 (με φυσιολογική έκφραση της Cav-1). Η αποσιώπηση της Cav-1 στους ινοβλάστες είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων BxPC3 ( $60\% \pm 21$ ) δια μέσου των οπών του ένθετου σε σύγκριση με τους ψευδώς μολυσμένους ινοβλάστες ( $p < 0.05$ , paired t-test). Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι η απώλεια της καβεολίνης στους ινοβλάστες μπορεί να βοηθά το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επιπλέον, καθώς τα καρκινικά κύτταρα δεν ήταν σε επαφή με τους ινοβλάστες, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη ελέγχει την έκκριση παραγόντων από τους ινοβλάστες που δρουν ως χήμειο-προσελκυστικές ουσίες και επάγουν τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων προς το περιβάλλον στρώμα.



**Εικόνα Β4** Μειορρόθμιση της *Can-1* στους ινοβλάστες καρκινικά αυξάνει τη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων

Αλλαγές στην ικανότητα επαγωγής μετακίνησης/χημειοταξίας των καρκινικών κυττάρων BxPC3 στην παρουσία των ινοβλαστών. Το ιστόγραμμα αναπαριστά την % αύξηση του πληθυσμού που μεταναστεύει σε σύγκριση με τα κύτταρα που μεταναστεύουν σε θρεπτικό υλικό DMEM 1% FCS εν τη απουσία ινοβλαστών. Στο γράφημα φαίνεται ο μέσος όρος  $\pm$  SD δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.  $p < 0.05$  vs. BxPc3<sup>mock</sup> σε t-test ανά ζεύγη.

#### 4.2.5 Η επίδραση της έκφρασης της Cav-1 στη χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων

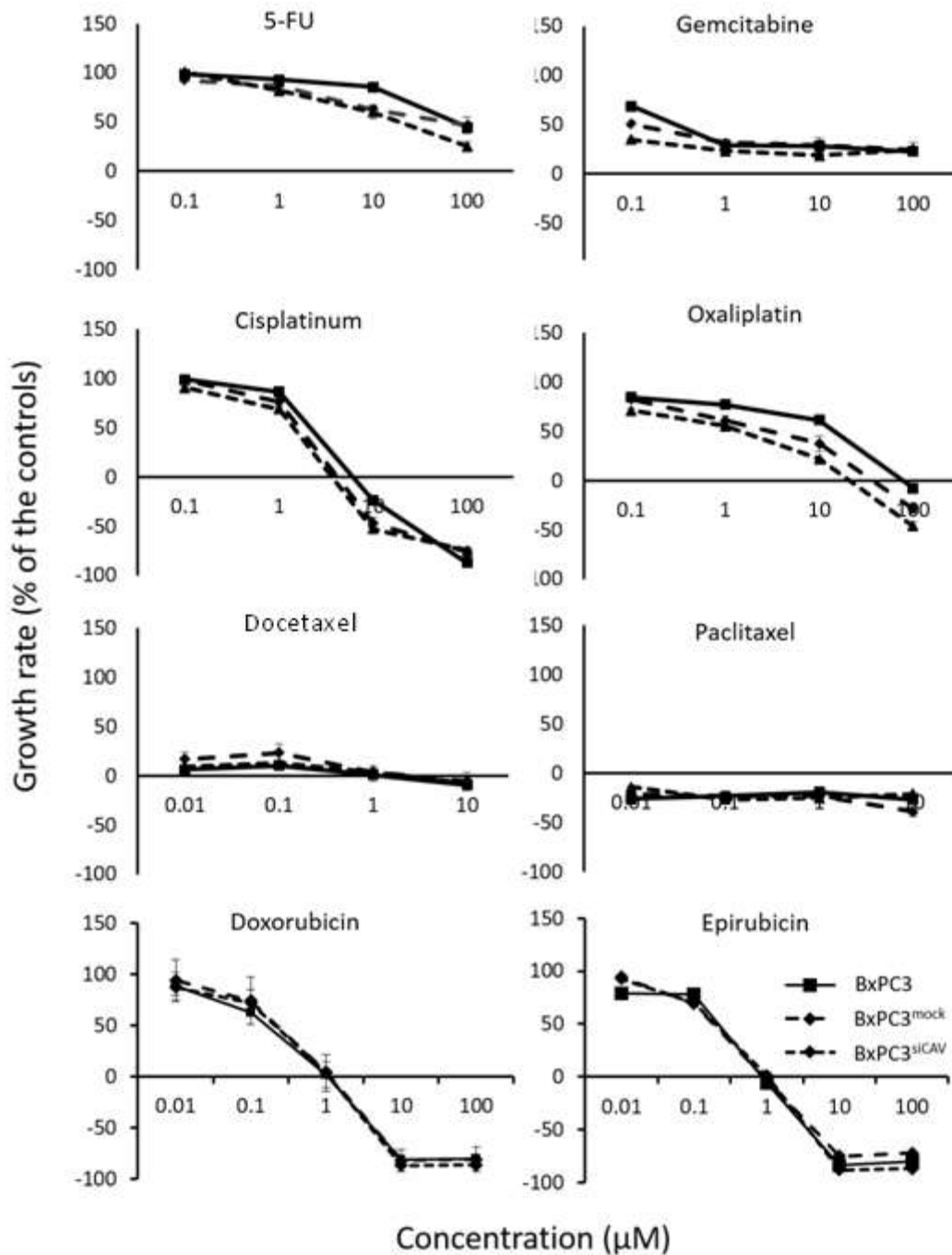
Για να μελετήσουμε την επίδραση της έκφρασης της Cav-1 στη χημειοευαισθησία των παγκρεατικών καρκινικών σειρών BxPC3, BxPC3<sup>mock</sup> και BxPC3<sup>shCAV</sup> τα κύτταρα εκτέθηκαν στους ακόλουθους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες: 5-φθοριουρακίλη, γεμισταβίνη, δοξορουμπικίνη, επιρουμπικίνη, σισπλατίνη, οξαλιπλατίνη, δοσεταξέλη και πακλιταξέλη

Φαίνεται ότι η ευαισθησία των τριών καρκινικών σειρών στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που ελέγξαμε δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα έκφρασης της Cav-1, όπως αυτό φαίνεται από τις παραμέτρους LC<sub>50</sub>, TGI και GI<sub>50</sub> που μελετήθηκαν (Πίνακας B2) και τις αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων (εικόνα B5)

**Πίνακας B2** Η επίδραση της έκφρασης της Cav-1 στην χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων

Cell lines	Parameters	5-FU	Gemcitabine	Paclitaxel	Docetaxel	Oxaliplatin	Cisplatin	Doxorubicin	Epirubicin
BxPC3	GI <sub>50</sub>	88.3	0.5	<0.01	<0.01	25.0	4.0	0.4	0.4
	TGI	>100	>100	>10	1.8	90.0	8.1	1.5	0.9
	LC <sub>50</sub>	>100	>100	>10	>10	>100	47.3	6.7	6.1
BxPC3 <sup>MOCK</sup>	GI <sub>50</sub>	83.0	0.1	<0.01	<0.01	5.2	2.9	0.3	0.3
	TGI	>100	>100	>10	4.6	61.0	6.6	1.2	1.0
	LC <sub>50</sub>	>100	>100	>10	>10	>100	10.2	6.6	6.9
BxPC3 <sup>shCAV</sup>	GI <sub>50</sub>	36.2	0.1	<0.01	<0.01	2.4	2.4	0.4	0.4
	TGI	>100	>100	>10	4.0	38.8	6.1	1.4	1.1
	LC <sub>50</sub>	>100	>100	>10	>10	>100	9.8	6.3	6.1

Εμφανίζονται οι τρεις παράμετροι GI<sub>50</sub>, TGI και LC<sub>50</sub> για τις τρεις κυτταρικές σειρές και για τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες 5-φθοριουρακίλη, γεμισταβίνη, πακλιταξέλη, δοσεταξέλη, οξαλιπλατίνη, σισπλατίνη, δοξορουμπικίνη και επιρουμπικίνη. Οι παράμετροι έχουν εκτιμηθεί με τη χρήση της μεθόδου SRB όπως περιγράφηκε στο τμήμα Υλικά και Μέθοδοι

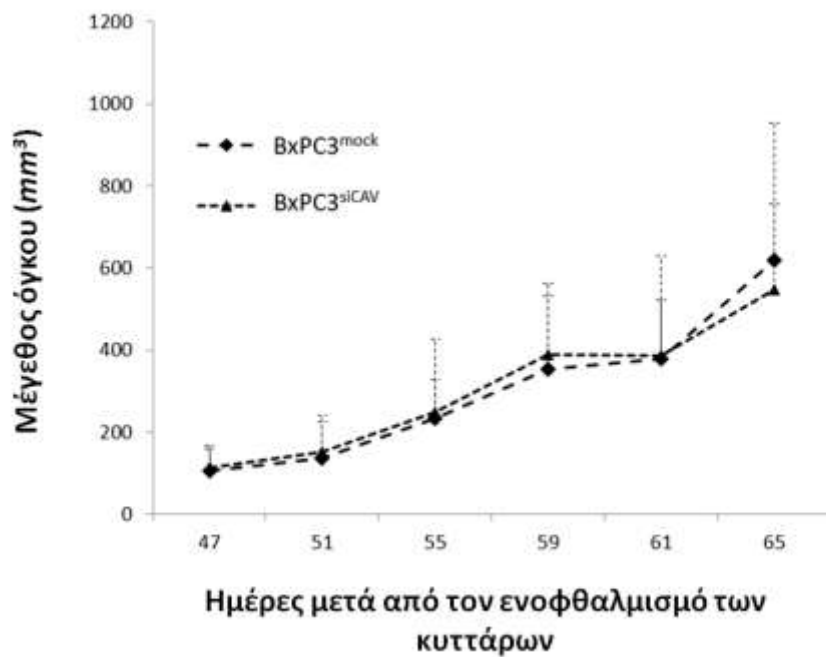


**Εικόνα Β5 :** *H Cav-1 δεν επηρεάζει τη χημειοευαισθησία των κυττάρων BxPC3*

Εμφανίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των τριών κυτταρικών σειρών που συγκαλλιεργήθηκαν για 48 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις των φαρμάκων. Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο δυο ανεξαρτήτων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν  $\pm$  SD. Αρνητικές τιμές αναπαριστούν τοξικότητα.

#### **4.2.6 Μειωμένα επίπεδα Cav-1 στο στρώμα επάγουν την ανάπτυξη των όγκων από BxPC3 σε ξενομοσχεύματα**

Στη συνέχεια μελετήσαμε εάν η έκφραση των επιπέδων της πρωτεΐνης Cav-1 μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα δημιουργίας όγκων ή και τη χημειοευαισθησία των BxPC3 σε ξενομοσχεύματα. Για το σκοπό αυτό συγκρίναμε την ικανότητα δημιουργίας όγκων και τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των δυο κυτταρικών σειρών BxPC3<sup>mock</sup> και BxPC3<sup>shCAV</sup>. Όπως φαίνεται στην εικόνα B6, τα δυο ξενομοσχεύματα από τα διαμολυσμένα κύτταρα δεν εμφανίζουν καμία διαφορά στις καμπύλες ανάπτυξης των όγκων από BxPC3<sup>mock</sup> και BxPC3<sup>shCAV</sup> κύτταρα.



**Εικόνα Β6:** Μειορρόθμιση της *Can-1* στα κύτταρα *BxPC3* δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του όγκου

Οι καμπύλες ανάπτυξης των όγκων που αναπτύχθηκαν από την υποδόρια ένεση  $5 \times 10^6$  *BxPC3*<sup>mock</sup> και *BxPC3*<sup>shCAV</sup> κυττάρων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια. Τα σημεία αναπαριστούν τη μέση τιμή του μεγέθους  $\pm$  SD.

Βασισμένοι στην *in vitro* παρατήρηση ότι τα χαμηλά επίπεδα Cav-1 στους ινοβλάστες είχαν σαν αποτέλεσμα την αυξημένη κινητικότητα/μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (εικόνα B4), μελετήσαμε την επίδραση της έκφραση της Cav-1 των ινοβλαστών στην ανάπτυξη των όγκων από κύτταρα BxPC3 σε ξενομοσχεύματα. Η εικόνα B7 αναδεικνύει ότι συν-εμβολιασμός ινοβλαστών και BxPC3 επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη όγκων με Cav-1- εξαρτώμενο τρόπο. Ενώ οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από τον συν-εμβολιασμό BxPC3 και hhsF<sup>mock</sup> (BxPC3+ hhsF<sup>mock</sup> όγκοι) εμφάνισαν ανάλογο ρυθμό ανάπτυξης με τους όγκους που δημιουργήθηκαν από BxPC3 μόνο, ο συν-εμβολιασμός BxPC3 με hhsF<sup>shCAV</sup> (BxPC3+ hhsF<sup>shCAV</sup> όγκοι) είχε σαν αποτέλεσμα την 3πλάσια αύξηση του βάρους του όγκου όταν συγκρίθηκε με τους BxPC3 και BxPC3+ hhsF<sup>mock</sup> όγκους (130mg ± 98 και 167mg ± 42 αντίστοιχα vs. 360mg ± 138 για του BxPC3+ hhsF<sup>shCav</sup> όγκους, p<0.01).

Έξι ημέρες μετά τον εμβολιασμό 3 x 10<sup>5</sup> BxPC3 κυττάρων σε NOD/SCID ποντίκια, με αναλογία καρκινικών κυττάρων : ινοβλαστών 1:1, παρατηρήσαμε τα παρακάτω: καμία ανάπτυξη όγκων σε ποντίκια που εμβολιάστηκαν μόνο με BxPC3 κύτταρα (0/10); ένας ψηλαφητός όγκος στα ποντίκια που εμβολιαστήκαν με BxPC3+ hhsF<sup>mock</sup> κύτταρα (1/10), και 3 ψηλαφητοί όγκοι σε 10 ποντίκια που εμβολιαστήκαν με BxPC3 και hhsF<sup>shCav</sup> (3/10). Μια εβδομάδα αργότερα, την ημέρα 13, η αναλογία ήταν 3/10 για τους BxPC3 και τους BxPC3+ hhsF<sup>mock</sup> όγκους σε σύγκριση με 7/10 για τους BxPC3+ hhsF<sup>shCav</sup> όγκους. Ομοίως, αυξάνοντας την πυκνότητα εμβολιασμού των καρκινικών κυττάρων σε 1x10<sup>6</sup> (αναλογία καρκινικών κυττάρων : ινοβλαστών 3:1) είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη όγκων στον ακόλουθο αριθμό ποντικιών: 0/10 για τους BxPC3, 1/10 για τους BxPC3+ hhsF<sup>mock</sup> και 7/10 για τους BxPC3+ hhsF<sup>shCav</sup> όγκους την ημέρα έξι και 5/10, 6/10 και 9/10 την ημέρα 13 αντίστοιχα.

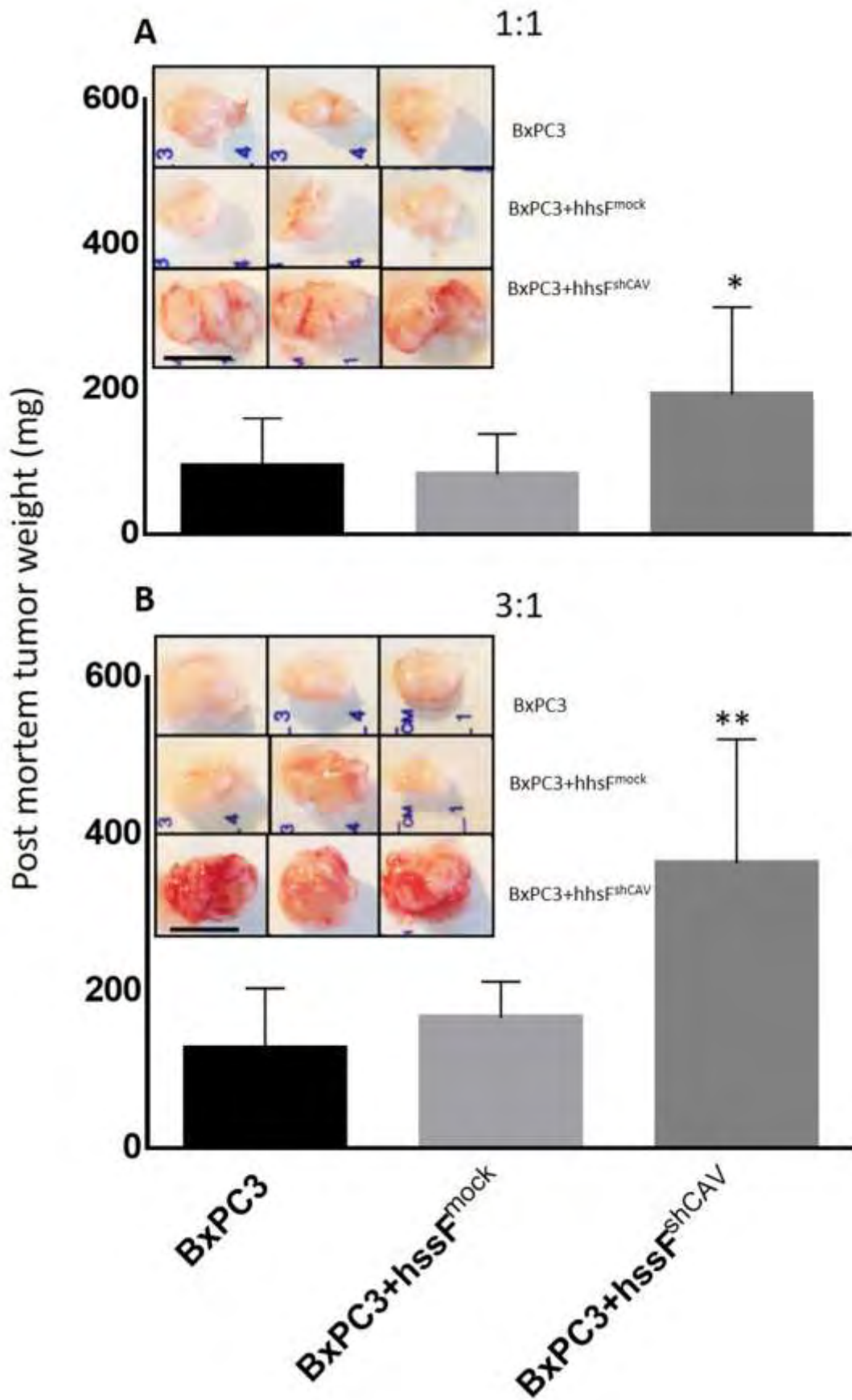
Το μετά θάνατον (post mortem) βάρος των όγκων που αναπτύχθηκαν κατά την ημέρα 28 μετά των εμβολιασμό των κυττάρων ανέδειξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στους BxPC3 όγκους που αναπτύχθηκαν με το συν-εμβολιασμό με ινοβλάστες hhsF<sup>shCav</sup> όταν συγκρίθηκαν με τους όγκους που αναπτύχθηκαν από BxPC3 κύτταρα μόνο και BxPC3+ hhsF<sup>mock</sup> και στις δυο αναλογίες καρκινικών κυττάρων : ινοβλαστών 1:1 και 3:1 (p<0,05 και 0,01, αντίστοιχα; εικόνες. B7A και B7B). Τα ποντίκια που εμβολιάστηκαν μόνο με ινοβλάστες δεν ανέπτυξαν όγκους.

Τελικά, για να μελετήσουμε την επίδραση της έκφρασης της Cav-1 στους ινοβλάστες, στη χημειοευαισθησία των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων,

χορηγήθηκε γεμισταβίνη στα πειραματικά μοντέλα ποντικών που προέκυψαν από το συν-εμβολιασμό κυττάρων. Αρχίζοντας την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων, χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά γεμισταβίνη 100mg/kg ή αντίστοιχος όγκος φυσιολογικού ορού ως μάρτυρας. Η χορήγηση επαναλήφθηκε εβδομαδιαία για τρεις εβδομάδες συνολικά, ως το τέλος του πειράματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα B8, οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από το συν-εμβολιασμό BxPC3 και  $hhsF^{shCav}$  ινοβλαστών ήταν σημαντικά πιο ανθεκτικά στη θεραπεία όταν συγκρίθηκαν με τους όγκους που αναπτύχθηκαν από το συν-εμβολιασμό  $hhsF^{mock}$  ινοβλαστών ( $p < 0.01$  vs.  $BxPC3 + hhsF^{mock} +$  γεμισταβίνη). Αυτοί οι όγκοι στην πραγματικότητα δεν έδειξαν καμία ανταπόκριση όταν συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους όγκους που δεν έλαβαν θεραπεία (δηλαδή έναντι  $BxPC3 + hhsF^{shCav}$ ).

Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι παρόλο που τα επίπεδα Cav-1 στα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να έχουν μικρή επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καμία στη χημειοευαισθησία, η έλλειψη Cav-1 στους ινοβλάστες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου μπορεί ουσιαστικά να επηρεάσει τόσο την ανάπτυξη όσο και τη χημειοευαισθησία του όγκου.

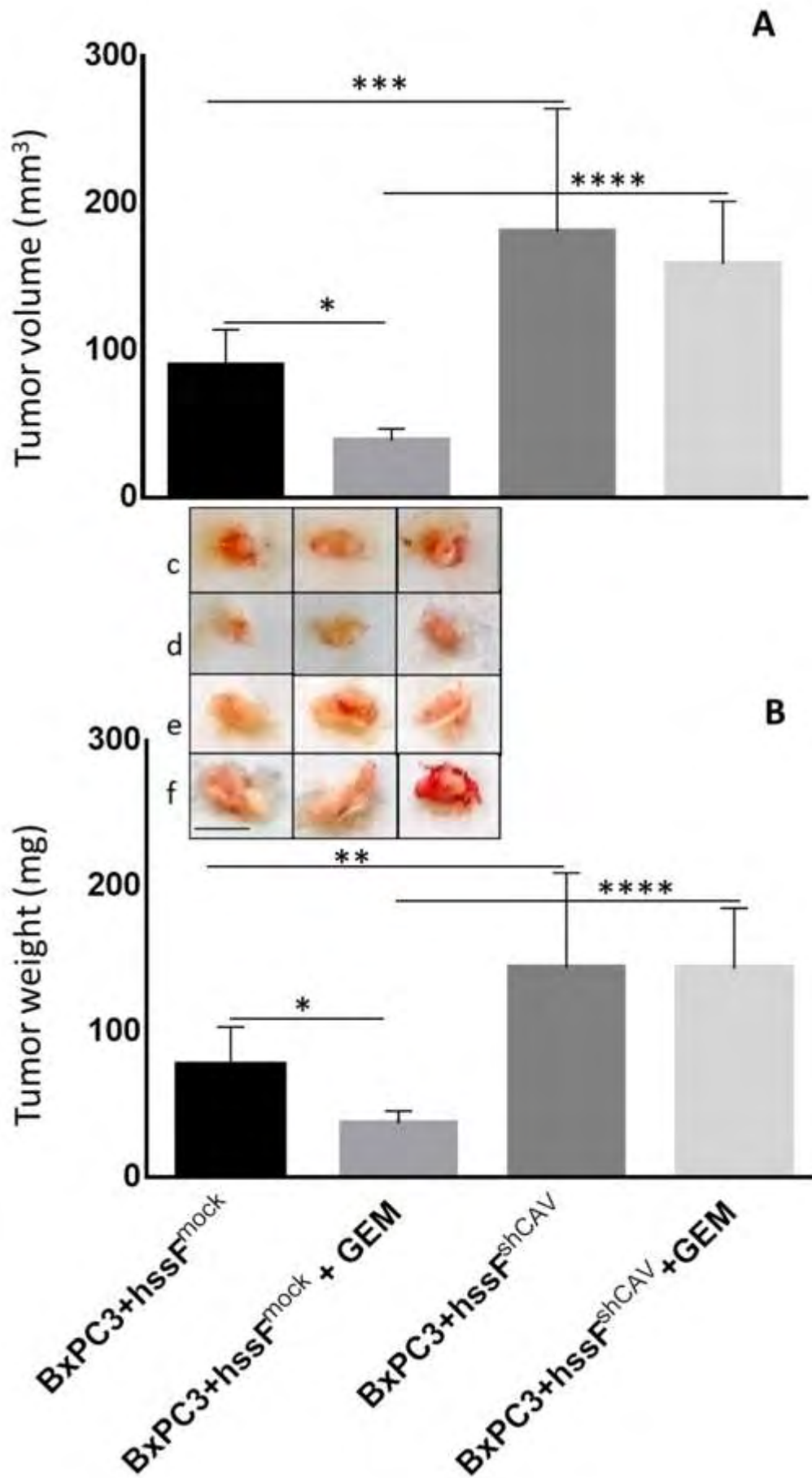




**Εικόνα Β7:** Μειορρόθμιση της *Cav-1* στους ινοβλάστες αυξάνει την ταχύτητα ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων.

Το μετά θάνατον βάρος των όγκων από κύτταρα BxPC3 μόνο ή με συν-εμβολιασμό των όγκων όλων με  $hhsF^{mock}$  ή  $hhsF^{shCAV}$  ινοβλάστες απεικονίζεται ως μέσος όρος των όλων των όγκων  $\pm$  SD σε αναλογία 1:1 ή 3:1 (BxPC3 vs.  $hhsF$ ). \*,  $p < 0,05$  vs. BxPC3 και BxPC3+ $hhsF^{mock}$  ξενομοσχεύματα; \*\*,  $p < 0,01$  vs. BxPC3 και BxPC3+ $hhsF^{mock}$ .

Οι εικόνες εμφανίζουν αντιπροσωπευτικά δείγματα όγκων τρεις ομάδες.  
Κλίμακα=1cm



**Εικόνα B8** Μειορρύθμιση της *Cav-1* στους ινοβλάστες αυξάνει την χημειοαντοχή των καρκινικών κυττάρων *BxPC3* στη γεμισταβίνη

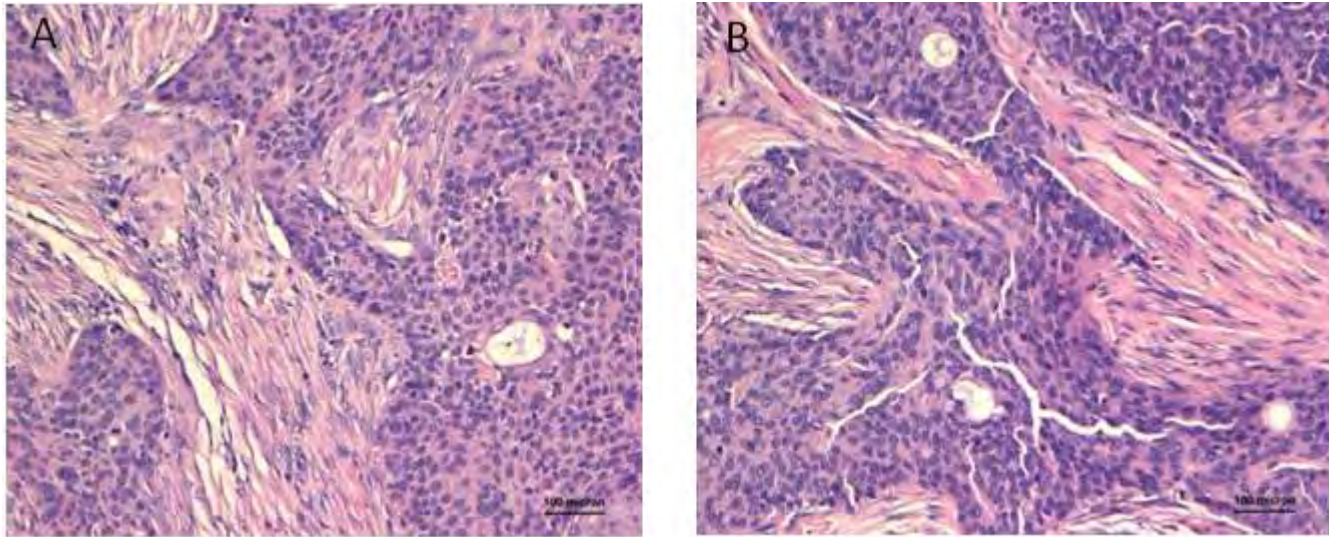
Στην εικόνα φαίνονται οι μέσες  $\pm$  SD τιμές των όγκων (A) και τα βάρη μετά θάνατον των όγκων που πρόεκυψαν από *BxPC3* μόνο ή από τον συν-εμβολιασμό είτε με  $hhsF^{mock}$  ή  $hhsF^{shCav}$  σε αναλογία 3:1 (*BxPC3* vs. *hhsF*), στους οποίους χορηγήθηκε γεμισταβίνη.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Οι εικόνες εμφανίζουν αντιπροσωπευτικούς όγκους από τις 4 ομάδες ως εξής: (c) *BxPC3* +  $hhsF^{mock}$ ; (d) *BxPC3* +  $hhsF^{mock}$  + GEM; (e) *BxPC3* +  $hhsF^{shCAV}$ ; (f) *BxPC3* +  $hhsF^{shCAV}$  + GEM. Κλίμακα = 1 cm.

GEM; γεμισταβίνη.

#### **4.2.7 Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των όγκων στα ξενομοσχεύματα δεν ανέδειξε διαφορά στην ποσότητα του στρώματος μεταξύ των όγκων**

Για να εκτιμήσουμε το ρόλο του στρώματος στο βάρος του όγκου στα ξενομοσχεύματα μελετήθηκαν οι όγκοι με ανοσοϊστοχημεία. Όπως φαίνεται στην εικόνα Β9, το ποσό του στρώματος δεν διέφερε μεταξύ των όγκων, αναδεικνύοντας ότι η διαφορά στο μέγεθος των όγκων δεν συσχετίζεται με διαφορά στην περιεκτικότητα του στρώματος.



**Εικόνα B9** H&E από ξενομοσχεύματα με BXPC3 + hhsF<sup>shCAV</sup> (A) και BXPC3 + hhsF<sup>mock</sup> (B). Ο τρόπος ανάπτυξης ήταν παρόμοιος και στις δυο ομάδες όγκων

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 5.1 Μέρος Α - Μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μόνο-νουκλεοτιδίων

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί που εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης ή στο μεταβολισμό των χημειοθεραπευτικών παραγόντων μπορεί να βοηθήσουν στην επιλογή του κατάλληλου πληθυσμού που θα ωφεληθεί από συγκεκριμένες θεραπείες μειώνοντας τη πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών [116]. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων ERCC1 και XPD, μέλη του συστήματος NER, έχουν μελετηθεί ως προβλεπτικοί δείκτες για την εκτίμηση της απάντησης και τη συσχέτιση των ανεπιθύμητων ενεργειών σε ασθενείς που έλαβαν παράγωγα της πλατίνας σαν θεραπεία για διάφορες μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του πνεύμονα, του στομάχου και των ωθηκών [117-119].

Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου που έλαβαν θεραπείες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση αυτής της νόσου. Η συχνότητα και των δύο πολυμορφισμών ήταν σε ισορροπία Hardy–Weinberg, αντίστοιχη με τη συχνότητα εμφάνισης αυτών των πολυμορφισμών σε Καυκάσιους πληθυσμούς [120]. Δε βρήκαμε δημοσιευμένες αναφορές για τη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών αυτών σε ασθενείς με ΚΠΕ στην Ελλάδα. Παρόλα αυτά, η συχνότητα των αλληλόμορφων για το ERCC1 σε ασθενείς με καρκίνο τραχήλου μήτρας ήταν αντίστοιχη με αυτή που παρατηρήσαμε στη δική μας μελέτη [121], κάτι όμως που δεν επιβεβαιώθηκε από τους Kalikaki et al σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα που έλαβαν θεραπεία με βάση την πλατίνα [122] (Πίνακας A16). Διαφορές στις μεθοδολογία θα μπορούσε να εξηγήσει τις μικρές αυτές αποκλίσεις.



**Πίνακας A16.** Συχνότητα ERCC1 αλληλόμορφων στον ελληνικό πληθυσμό

		CC	CT	TT
Μελέτες	Καρκίνος	N (%)	N (%)	N (%)
Karageorgopoulou	Τραχήλου μήτρας	6 (14)	20 (46)	17 (40)
Kalikaki	ΜΜΚΠ	81 (78)		23 (22)
Nikitas	ουροθλιακό	35 (31)	51 (45)	27 (24)
Παρούσα μελέτη	ΚΠΕ	40 (17)	106 (46)	86 (37)

Ακόμα λιγότερες είναι οι αναφορές σχετικά με τη συχνότητα του XPD 751 πολυμορφισμού στον ελληνικό πληθυσμό. Οι Fountzilias et al έδειξαν ότι η συχνότητα KK : KQ : QQ ήταν 32% : 53% : 15% αντίστοιχα, σε 34 ασθενείς με καρκίνο κεφαλής τραχήλου [123]. Οι Kalikaki et al περιέγραψαν ότι η συχνότητα του KK ήταν 30.3% και αυτή των KQ, QQ 69.7% σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα[ 124], ποσοστά ανάλογα με αυτά που και εμείς παρατηρήσαμε.

Στη μελέτη μας, χωρίσαμε τον πληθυσμό σε αυτούς που έλαβαν επικουρική θεραπεία και σε εκείνους που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατική νόσο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο ως προς την εμφάνιση παρενεργειών της θεραπείας όσο και ως προς την επιβίωση.

Όσον αφορά την ανάλυση της τοξικότητας δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών τόσο στο σύνολο του πληθυσμού όσο και σε αυτούς που έλαβαν θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη, την ιρινοτεκάνη ή την 5-φθοριουρακίλη. Ο μικρός αριθμός ασθενών ανά ομάδα πιθανόν να επηρέασε τα αποτελέσματα. Ανάλογες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών όμως, δεν κατάφεραν να αναδείξουν συσχέτιση των πολυμορφισμών του ERCC1 με την τοξικότητα από την οξαλιπλατίνη [125-132]. Εντούτοις, οι Cortejoso et al. έδειξαν ότι οι C/T, T/T γονότυποι σχετίζεται με μείωση της συχνότητας ουδετεροπενίας σε ασθενείς με ΚΠΕ που έλαβαν οξαλιπλατίνη [133]. Ο CC γονότυπος έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση των επιπέδων mRNA του

γονιδίου ERCC1 και συνεπώς μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη επιδιόρθωση βλαβών του DNA και σαν συνέπεια την αύξηση της τοξικότητας. Οι συγκεκριμένοι γονότυποι έχουν συσχετιστεί με πρόωμη εμφάνιση βαθμού I χρόνιας περιφερικής νευροπάθειας, χαρακτηριστική τοξικότητα της οξαλιπλατίνης [134], αποτελέσματα όμως που δεν έχουν επιβεβαιωθεί στην πλειονότητα των αναφορών και σε σχετική μετανάλυση [135]. Εντούτοις, στη συγκεκριμένη μετανάλυση, ο T/T γονότυπος συσχετίστηκε με μειωμένη συχνότητα αιματολογικής τοξικότητας σε Ασιάτες ασθενείς.

Λιγότερες μελέτες έχουν αναλύσει τη συσχέτιση των XPD πολυμορφισμών με την εμφάνιση τοξικότητας σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο που έλαβαν οξαλιπλατίνη. Οι Boige et al σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη έδειξαν ότι ο ERCC2-K751Q πολυμορφισμός σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την εμφάνιση βαθμού 3 και 4 αιματολογικής τοξικότητας ( $p=0,01$ ) [131]. Ο ίδιος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη τοξικότητας σε ασθενείς που έλαβαν 5-Fu σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία ως νέο-επικουρική θεραπεία για καρκίνο του ορθού αλλά δεν συσχετίστηκε με τη λήψη οξαλιπλατίνης [136]. Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση των XPD πολυμορφισμών με την τοξικότητα [130, 137].

Ο XPD-751 πολυμορφισμός έχει μελετηθεί και ως προς τη θεραπευτική απάντηση στην ιρινοτεκάνη [138, 139]. Ενώ οι Artac et al δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση, οι Braun et al σε ανάλυση από τη FOCUS μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, παρουσίασαν ότι το XPD C αλληλίο σχετίστηκε με την εμφάνιση διάρροιας από την ιρινοτεκάνη αλλά το αποτέλεσμα αυτό αντιμετωπίστηκε με σκεπτικισμό από τους ερευνητές, καθώς το συγκεκριμένο γονίδιο δεν ενέχεται στο μεταβολισμό του φαρμάκου [139]. Η ίδια συσχέτιση περιγράφηκε και από τους Cortejoso et al σε μονοπαραγοντική ανάλυση [133]. Μια πιθανή εξήγηση ίσως να αποτελεί τα γεγονότα ότι το XPD να συμμετέχει σε μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA από αναστολείς τοποϊσομεράσης I, κάτι το οποίο έχει περιγραφεί και για το ERCC1 [140]. Στη δικιά μας μελέτη δε βρέθηκε συσχέτιση της εμφάνισης της τοξικότητας με τους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν.

Στο σύνολο του πληθυσμού που έλαβε επικουρική θεραπεία ο πολυμορφισμός ERCC1-118 CT φάνηκε να σχετίζεται οριακά με βελτιωμένη συνολική επιβίωση ( $p=0,05$ ). Επίσης, ο πολυμορφισμός XPD-751 KQ σχετίστηκε με βελτιωμένη

πενταετή επιβίωση ενώ έδειξε τάση να σχετιστεί και με τη συνολική επιβίωση ( $p=0,078$ , 95% CI 0,07-1,16). Τα αποτελέσματα αυτά όμως θα πρέπει να εκτιμηθούν με προσοχή καθώς ο συγκεκριμένος πληθυσμός έλαβε θεραπεία με διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (οξαλιπλατίνη, ιρινοτεκάνη ή 5-φθοριοουρακίλη) ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των πολυμορφισμών με την αποτελεσματικότητα στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη ή άλλο θεραπευτικό παράγοντα ξεχωριστά. Οι Li et al περιέγραψαν ότι ERCC1-118 CC πολυμορφισμός σχετίζεται με καλύτερη συνολική επιβίωση (HR=0.20, 95% CI=0.10-0.79) σε ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία με οξαλιπλατίνη [141]. Οι ERCC1-118 και XPD-751 πολυμορφισμοί όμως δεν σχετίστηκαν με το διάστημα ελεύθερου νόσου σε αντίστοιχους Καυκάσιους πληθυσμούς [142, 143]. Εντούτοις, οι πολυμορφισμοί ERCC1-118 TT και XPD-751K/K συσχετίστηκαν με αυξημένη συχνότητα τοπικής υποτροπής σε Ασιάτες ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία με 5-φθοριοουρακίλη και λευκοβορίνη [144]. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι υπάρχει μικρός αριθμός σχετικών μελετών σε ασθενείς με ΚΠΕ που έλαβαν επικουρική θεραπεία και φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στην ανταπόκριση και στη συχνότητα των πολυμορφισμών ανάλογα με τη καταγωγή του πληθυσμού.

Ο προγνωστικός ρόλος των γενετικών πολυμορφισμών ERCC1-118 και XPD-751 σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου που έλαβαν οξαλιπλατίνη έχει αναλυθεί σε αρκετές μελέτες, με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα. Οι σχετικές μεταanalύσεις [135, 145, 146] επιβεβαιώνουν το προγνωστικό ρόλο των πολυμορφισμών αυτών. Οι Ma et al σε μεταanάλυση του 2015 περιέγραψαν ότι η παρουσία των TT+CT πολυμορφισμών του ERCC1-118 γονιδίου είχαν δυσμενή επίδραση στο διάστημα ελεύθερου προόδου νόσου (HR: 1.21  $p<0,001$ ) και στη συνολική επιβίωση (HR: 1.17  $p<0,001$ ) αλλά δεν σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την αντικειμενική ανταπόκριση, συγκρινόμενο με το CC πολυμορφισμό [145]. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε προγενέστερη μεταanάλυση. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι οι αναλυτές περιέγραψαν διαφορές μεταξύ Ασιατικού και Καυκάσιου πληθυσμού. Έτσι, ενώ στους Ασιάτες το T αλληλίο σχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση, στους Καυκάσιους σχετίστηκε με ευνοϊκή, παρά το μικρότερο δείγμα του συγκεκριμένου πληθυσμού. Αυτές οι διαφορές μπορεί να επηρεάζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων σε

πληθυσμούς με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο και αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και του περιβάλλοντος σε πληθυσμούς με διαφορετικό τρόπο ζωής.

Η αντικατάσταση της κυτιδίνης από θυμίνη (C→T) προτείνεται ότι επιβραδύνει τη μεταγραφή του mRNA και κατά συνέπεια τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ERCC1 [147]. Συνώνυμα κωδικόνια, όπως αυτό, έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την κινητική της μετάφρασης, με τα σπάνια χρησιμοποιούμενα κωδικόνια να οδηγούν σε βραδύτερη μετάφραση. Με τον τρόπο αυτό, οι μεταβολές εντός του κωδικονίου μπορεί να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το ριβόσωμα και τελικά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Η λειτουργική συνάφεια των συνώνυμων SNPs έχει τεκμηριωθεί και σε πιο πρόσφατη μελέτη για το multidrug resistance 1 (MDR1) γονίδιο, στην οποία τα λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενα κωδικόνια συνδέθηκαν με μια λειτουργικά και δομικά διαφορετική πρωτεΐνη [148]. Εικάζεται ότι ο πολυμορφισμός 118 του ERCC1 γονιδίου μπορεί με παρόμοιο τρόπο να επηρεάσει τη λειτουργία του ERCC1 πέραν του επιπέδου της έκφρασης του mRNA.

Σε πρόσφατες μελέτες δεν έχει παρατηρηθεί συσχέτιση των πολυμορφισμών με τα επίπεδα του mRNA και της ERCC1 πρωτεΐνης [149-152] αλλά ούτε και συσχέτιση της έκφρασης του mRNA με αυτή της πρωτεΐνης [150]. Οι Deloia et al ανέλυσαν την κλινική έκβαση ασθενών με καρκίνο ωοθηκών που έλαβαν θεραπεία με βάση την πλατίνη, ως προς την έκφραση των πολυμορφισμών ή του mRNA και της πρωτεΐνης και έδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση του ERCC1 mRNA προέβλεπε καλύτερη συνολική επιβίωση και διάστημα ελευθέρου νόσου, αλλά οι πολυμορφισμοί δεν σχετίστηκαν με την κλινική έκβαση [150]. Οι Smith et al σε αντίστοιχο πληθυσμό έδειξαν ότι τόσο ο γονότυπος ERCC1 CC όσο και τα αυξημένα επίπεδα mRNA προέβλεπαν δυσμενή πρόγνωση ενώ το αποτέλεσμα ήταν ακόμα πιο εμφανές όταν οι δυο αυτοί παράγοντες συνυπήρχαν σε ασθενείς που έλαβαν μόνο πλατίνη χωρίς πακλιταξέλη [152]. Οι Qi et al παρατήρησαν ότι σε ασθενείς με καρκίνο στομάχου που έλαβαν θεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη, αυξημένα επίπεδα mRNA ή/και πρωτεΐνης προέβλεπαν χαμηλότερη ανταπόκριση και επιβίωση από τη θεραπεία αλλά όχι ο πολυμορφισμός του γονιδίου [149]. Είναι επομένως εύλογο να αναρωτηθεί κανείς αν η έκφραση του mRNA ή της πρωτεΐνης είναι σημαντικότερος προβλεπτικός παράγοντας από τον πολυμορφισμό τον ίδιο.

Η βιβλιογραφία παρουσιάζει αντικρουόμενα αποτελέσματα και ως προς τον προγνωστικό ρόλο των επιπέδων έκφρασης του ERCC1 mRNA και της πρωτεΐνης σε διάφορες μορφές καρκίνου. Υψηλά επίπεδα ERCC1 προτείνεται ότι επιδιορθώνουν τις βλάβες που υφίσταται το DNA από πλατινούχες ενώσεις. Κατά συνέπεια ασθενείς που εκφράζουν υψηλά επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή του mRNA αναμένεται να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία και να έχουν χειρότερη επιβίωση. Πράγματι, υψηλά επίπεδα ERCC1 mRNA έχουν συσχετιστεί με μικρότερο χρόνο ως την αποτυχία της θεραπείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο γαστρεντερικού [153], με χειρότερη επιβίωση σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο στομάχου [154], σε ασθενείς που έλαβαν επικουρική θεραπεία για καρκίνο ωοθηκών [155] ή σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου [156]. Υπάρχουν όμως μελέτες που δεν επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση του mRNA με την απάντηση στη θεραπεία ή τη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα [157]. Διαφορετικές τεχνικές στον προσδιορισμό του mRNA ή ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των πολυμορφισμών ίσως να επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Οι DeLoia et al όμως έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA του ERCC1 συσχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης ERCC1 ενώ δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων πρωτεΐνης ERCC1 και τα αποτελέσματα των ασθενών [150]. Η σχέση μεταξύ των επιπέδων mRNA και των κλινικών αποτελεσμάτων θα μπορούσε να εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος ενώ μια εναλλακτική εξήγηση μπορεί να αποτελεί ότι τα επίπεδα του mRNA του ERCC1 να είναι έμμεσος δείκτης κάποιας άλλης κυτταρικής διαδικασίας. Για παράδειγμα, τα επίπεδα mRNA του ERCC1 μπορεί να ρυθμίζονται τουλάχιστον εν μέρει από το γονίδιο RAS [158], η ενεργοποίηση του οποίου συνδέεται με επιθετική συμπεριφορά και αντίσταση στην πλατίνα σε διάφορες μορφές καρκίνου. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι αυξημένα επίπεδα του ERCC1 mRNA, να είναι απλά ένας υποκατάστατος δείκτης για την ενεργοποίηση του RAS στους όγκους.

Το XPD-751 Gln αλληλίο (KQ ή QQ πολυμορφισμός) έχει συσχετιστεί με μη στατιστικά σημαντική μειωμένη αντικειμενική απάντηση σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου που έλαβαν οξαλιπλατίνα, σύμφωνα με τη μετανάλυση των Qian et al [146]. Το διάστημα ελεύθερου προόδου νόσου (HR: 2,1. 95%; CI: 1.65-2.67;) και η συνολική επιβίωση (HR:3,18. 95%CI: 1.57-6.47 ) φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία του Gln αλληλίου (KQ ή QQ πολυμορφισμός). Η επίδραση αυτή

ήταν πιο έντονη στους Ασιάτες σε σύγκριση με τους Καυκάσιους. Μάλιστα, ο γονότυπος Gln/Gln σχετίστηκε με χειρότερη συνολική επιβίωση στο Καυκάσιους (HR=3,09. 95%CI: 1.57-6.08) αλλά με βελτιωμένη στους Ασιάτες ασθενείς (HR=0,51. 95%CI:0.33-0.80).

Προοπτικές μελέτες έχουν εξετάσει το ρόλο της επιλογής ασθενών βάσει των γενετικών χαρακτηριστικών τους όσον αφορά πολυμορφισμούς συγκεκριμένων γονιδίων. Οι Kim et al [159] έδειξαν στατιστικά σημαντικότερη ανταπόκριση στην οξαλιπλατίνη στην προκαθορισμένη ομάδα που αναμενόταν να έχει ευαισθησία με βάσει τα γονίδια XPD- 751, GSTP- 105 και XRCC- 1. Σε ανάλογη μελέτη από τους Abad et al, που διερευνήθηκε ο ρόλος των πολυμορφισμών ERCC1-118 και TYMS-30 untranslated region (UTR) στην επιλογή της κατάλληλης πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, δεν επιτεύχθηκε η ανάδειξη του οφέλους επιβίωσης, που ήταν τα πρωτεύον καταληκτικό σημείο της μελέτης [160]. Παρόλα αυτά η προκαθορισμένη γενετικά ομάδα TYMS-30UTR ins/del or del/del; ERCC1-118T/T), είχε καλύτερα αποτελέσματα ως προς την R0 εκτομή, τη συνολική ανταπόκριση και ευνοϊκότερο προφίλ τοξικότητας. Σε μια άλλη μελέτη φάσης II με το συνδυασμό FOLFOX με Bevasizumab δεν βρέθηκε συσχέτιση των πολυμορφισμών με τοξικότητα ή αποτελεσματικότητα [137].

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε ένα ικανό αριθμό ασθενών που έλαβαν εγκεκριμένη θεραπεία είτε ως επικουρική ή ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Στο πληθυσμό που αναλύσαμε δεν εμφανίστηκε διαφορά ως προς την επιβίωση ή την τοξικότητα. Η ετερογένεια στη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών και το σχετικά μικρό δείγμα των ασθενών μπορούν να αναφερθούν ως αδυναμίες της μελέτης. Επί πλέον, η ανάλυση του XPD πολυμορφισμού ήταν επιτυχής μόνο στο 60% των περιστατικών λόγω τεχνικών προβλημάτων με αποτέλεσμα να μειώνεται η στατιστική ισχύ του δείγματος. Εντούτοις, αντίστοιχες μελέτες έχουν αναλύσει πληθυσμούς που έλαβαν διαφορετική θεραπεία με αντίστοιχο αριθμό ασθενών.

## 5.2 Μέρος Β – Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος

Ο καρκίνος του παγκρέατος παραμένει ένας από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους με μικρή βελτίωση στις καμπύλες επιβίωσης τις τελευταίες δεκαετίες. Η επιθετική βιολογική συμπεριφορά καθώς και η αντοχή στη θεραπεία συντελούν στη δυσμενή πρόγνωση. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και στο μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη και στη χημειοευαισθησία της νόσου .

Η Καβεολίνη-1 (Cav-1) είναι μια πρωτεΐνη-ικρίωμα στην κυτταρική μεμβράνη και ένα από τα κύρια συστατικά των κυτταρικών σπηλαίων, τα οποία είναι αναπόσπαστες διαμεμβρανικές μικροδομές. Αποτελούνται από χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια και ως εκ τούτου ονομάζονται “λιπιδικές σχεδίες”. Ως μέρος των δομών αυτών, η Cav-1 ενέχεται σε μια σειρά βιολογικών διεργασιών καθώς και στην κυτταρική μεταμόρφωση, ογκογένεση και μετάσταση [161]. Η Cav-1 φαίνεται να έχει διττό ρόλο στη βιολογία του καρκίνου [162]. Η έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα έχει συσχετιστεί με έναν επιθετικό φαινότυπο και δυσμενή πρόγνωση σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού[95-97, 99, 163]. Επίσης, έχει άμεσα συσχετιστεί με τη δυνατότητα μετάστασης του καρκίνου του παγκρέατος μέσω της ρύθμισης της επιθήλιο προς μεσεγγυματικής μετατροπής (Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT), φαινόμενο που άμεσα σχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό και τη χημειοαντοχή των καρκινικών κυττάρων [164, 165]. Παρόλα αυτά, αντίθετα αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί [101], με την απώλεια της Cav-1 στο στρώμα να συσχετίζεται με δυσμενή κλινική έκβαση σε διάφορους καρκίνους [70, 102-106]

Στη παρούσα μελέτη, έχουμε αναδείξει πώς η έκφραση της Cav-1 στα καρκινικά κύτταρα και τους ινοβλάστες, που αποτελούν κύριο συστατικό του περιβάλλοντος στρώματος, επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη χημειοαντοχή του όγκου. Αρχικά παρατηρήσαμε την αντίστροφη συσχέτιση στην έκφραση της Cav-1 μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ινοβλαστών του στρώματος. Σε περιοχές καλής διαφοροποίησης, οι ινοβλάστες εμφάνιζαν έντονα θετική χρώση για Cav-1 ενώ τα καρκινικά κύτταρα ήταν αρνητικά ή είχαν ασθενή χρώση. Σε απόλυτη αντίθεση, σε περιοχές χαμηλής διαφοροποίησης, τα καρκινικά κύτταρα εμφάνιζαν έντονη

χρώση για τη Cav-1 και περιβάλλονταν από ινοβλάστες με χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που συσχετίζουν την έκφραση της Cav-1 στα καρκινικά κύτταρα με χαμηλή διαφοροποίηση [100, 113]. Εντούτοις, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που παρουσιάζει την αντίστροφη έκφραση της Cav-1 μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ινοβλαστών στον καρκίνο του παγκρέατος. Τα αποτελέσματα μας είναι σε ακολουθία με προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο, όπου η διαφορετική έκφραση της Cav-1 ανάμεσα στο στρώμα και τα καρκινικά κύτταρα [166]. Οι Alshenawy et al ανέφεραν ότι η υπέρ-έκφραση της Cav-1 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε με δυσμενή προγνωστικά χαρακτηριστικά, ενώ η αυξημένη έκφραση στο στρώμα συσχετίστηκε με μικρούς, μη μεταστατικούς όγκους και επομένως με καλύτερη πρόγνωση. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της παρατήρησης δεν είναι ευκρινής αλλά οι περιοχικές διαφορές στην οξυγόνωση μπορούν να εξηγήσουν την ετερογένεια του όγκου [167, 168].

Για να ερευνήσουμε αν η διαφορετική έκφραση της Cav-1 στα καρκινικά κύτταρα και το περιβάλλον στρώμα επηρεάζει τη βιολογία του όγκου, μελετήσαμε την επίδραση της μειωμένης έκφραση της Cav-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη χημειοευαισθησία σε μια κυτταρική σειρά ανθρώπινου παγκρεατικού καρκινικού με υψηλή έκφραση Cav-1. Ελέγξαμε τέσσερις κοινώς χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές ανθρώπινου παγκρεατικού καρκίνου δηλ. BxPC3 (με μέτρια έως φτωχή διαφοροποίηση) [169], AsPC1, PANC-1 και MIAPaCa-2 (και οι τρεις χαμηλής διαφοροποίησης) για την έκφραση της Cav-1 (εικόνα B1A). Στο εργαστήριό μας τα BxPC3 κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα Cav-1, με τα MIAPaCa-2 να εμφανίζουν ελάχιστη έκφραση της πρωτεΐνης. Εντούτοις, πρέπει να επισημάνουμε ότι τα δεδομένα από προηγούμενες μελέτες σχετικά με την έκφραση του Cav-1 στα κύτταρα MIAPaCa-2 είναι αντικρουόμενα με τους Salem et al να περιγράφουν χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης, σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα [112], ενώ οι Chatterjee et al περιέγραψαν υψηλά επίπεδα Cav-1 στα ίδια κύτταρα [100]. Σε μελέτες που συνέκριναν αυτές τις κυτταρικές σειρές ως προς την ογκογονικότητα τους σε ποντίκια (μελέτες ξενομοσχευμάτων), αναφέρεται ότι τα κύτταρα BxPC3 μπορεί να είναι πιο επιθετικά σε σύγκριση με τα PANC1, AsPC1 και MIAPaCa-2 [169]. Έτσι αποφασίσαμε να προχωρήσουμε τη μελέτη μας με την κυτταρική σειρά των BxPC3.



Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση της Cav-1 αύξησε οριακά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση του DNA, προτείνοντας ότι η Cav-1 έχει ογκοκατασταλτική δράση ως ένα βαθμό. Εν τούτοις, η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη μετανάστευση των BxPC3 καρκινικών κυττάρων κατά την τεχνική επούλωσης του κενού διακυτταρικού χώρου. Ωστόσο, πρέπει να επισημάνουμε ότι αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα αποτελέσματα αυτά, όσον αφορά τη μετανάστευση και τη διήθηση των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων, συμφωνούν με αυτά που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες [112, 163, 165]. Η μελέτη των Han et al ανέφεραν ότι η αποσιώπηση της Cav-1 επάγει τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών εξωκυττάρου χώρου 2 και 9 [(Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) και 9 (MMP9)][163], υποστηρίζοντας έτσι τον ανασταλτικό χαρακτήρα της Cav-1 στην μετανάστευση και διήθηση των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Αυτές οι παρατηρήσεις όμως δεν επιβεβαιώθηκαν από τους Chatterjee et al [100] οι οποίοι παρουσίασαν αντίθετα αποτελέσματα, υποστηρίζοντας ότι υπερέκφραση της Cav-1 μπορεί να δράσει σαν επαγωγικός παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η χρησιμοποίηση διαφορετικών κυτταρικών καρκινικών σειρών ή μεθόδων να υπέρ- ή υπό-εκφράσουν τη Cav-1 καθώς και να εκτιμήσουν τη διήθηση και τη μετανάστευση των κυττάρων μπορούν δυνητικά να εξηγήσουν τις διαφορές ανάμεσα στις μελέτες.

Η έκφραση της Cav-1 στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα έχει συσχετιστεί με μειωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία [170], ενώ η χημειοευαισθησία διατηρείται μέσω της αναστολής της EMT [112]. Στη μελέτη μας δοκιμάσαμε *in vitro* μια πληθώρα χημειοθεραπευτικών παραγόντων που συχνά χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παγκρέατος. Δείξαμε ότι χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης δεν επηρέασε την *in vitro* χημειοευαισθησία των BxPC3 καρκινικών κυττάρων για όλους του παράγοντες που ελέγξαμε. Τέλος για να διαλευκάνουμε το ρόλο της Cav-1 στην ογκογενετική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, εκτελέσαμε *in vivo* πειράματα με τον εμβολιασμό SCID ποντικών με BxPC3<sup>mock</sup> και BxPC3<sup>shCAV</sup> κυττάρων. Το πείραμα αυτό έδειξε καθαρά ότι η έκφραση της Cav-1 στα καρκινικά κύτταρα δεν διαδραματίζει κανένα ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων.

Η ανάπτυξη του καρκίνου περιλαμβάνει το μικροπεριβάλλον του όγκου που περιέχει ινοβλάστες, μακροφάγα και διάφορα άλλα κύτταρα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον καρκίνο (Cancer Associated Fibroblasts - CAFs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την ανάπτυξη του καρκίνου.

Η έλλειψη της Cav-1 έχει προταθεί να είναι ένα από τα χαρακτηριστικά των (cancer associated fibroblasts - CAFs) [171, 172] έχειδειχθεί ότι τα στρωματικά κύτταρα του καρκίνου του παγκρέατος εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Cav-1 [96], και σε μια σειρά 45 ασθενών βρέθηκε ότι τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης συσχετίζεται με το στάδιο TNM, υπεραύξηση Her-2/neu και τη συνολική επιβίωση [104].

Στη συνέχεια ερευνήσαμε εάν διαφορές στην έκφραση της Cav-1 στο μικροπεριβάλλον του όγκου είχε άμεση επίδραση στο φαινότυπο των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Συγκρινόμενα με κύτταρα μάρτυρες, οι ινοβλάστες δέρματος τροποποιημένοι να εκφράσουν χαμηλότερα επίπεδα Cav-1 κατάφεραν να επάγουν αυξημένη διήθηση των καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Εφόσον οι δυο κυτταρικοί πληθυσμοί δεν ήταν σε άμεση επαφή, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αυξημένη διήθηση των καρκινικών κυττάρων οφείλεται σε χημειοτακτικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τους ινοβλάστες. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει παρατηρηθεί σε καρκίνο μαστού [173], αλλά από όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη αναφορά που τεκμηριώνει ότι η αποσιώπηση της Cav-1 στους ινοβλάστες μπορεί άμεσα να ρυθμίσει τη διηθητική ικανότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων με παρακρινή δράση. Σε υποστήριξη αυτής της παρατήρησης, έχει προταθεί ότι οι ινοβλάστες σχετιζόμενοι με καρκίνο (CAFs) με μειωμένη έκφραση Cav-1 υποστηρίζουν θρεπτικά τα καρκινικά κύτταρα με το αντίστροφο φαινόμενο του Warburg [174].

Στη συνέχεια μελετήσαμε την *in vivo* επίδραση της αποσιώπησης της Cav-1 στους ινοβλάστες. Από αυτά τα πειράματα έγινε εμφανές ότι τα καρκινικά κύτταρα απέκτησαν πλεονέκτημα για την ανάπτυξη τους όταν συν-εμβολιάστηκαν με ινοβλάστες με μειωμένη έκφραση Cav-1. Πράγματι, παρατηρήθηκε σχεδόν τριπλάσια αύξηση του βάρους των όγκων που αναπτύχθηκαν από τον συν-εμβολιασμό ινοβλαστών με αποσιωπημένη Cav-1 και BxPC3 σε σύγκριση με όγκους που προήλθαν από BxPC3 και hhsF<sup>mock</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά αντιστάθμισαν την ανάγκη διεξαγωγής πειραμάτων συν-καλλιέργειας *in vitro*. Παρόμοια αποτελέσματα

έχουν αναφερθεί από τους Carozza et al σε ένα μοντέλο μελανώματος ποντικού κατά την οποία η μειορρύθμιση της Cav-1 στους CAFs επάγει την ανάπτυξη κυττάρων μελανώματος από παρακρινή δράση του μονοπατιού Sonic Hedgehog [175]. Ομοίως, οι Bonucelli et al ανέφεραν ότι οι ινοβλάστες με αποσιωπημένη Cav-1 επάγουν την ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων από καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB231 [173].

Από τη στιγμή που είχαμε εμφανή απόδειξη ότι η μειωμένη έκφραση της Cav-1 στους ινοβλάστες παρείχε όφελος για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων *in vivo*, διερευνήσαμε εάν η απουσία Cav-1 από τους ινοβλάστες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου σχετίζεται με την ανάπτυξη χημειοαντοχής. Μπορέσαμε να δείξουμε ότι η μειορρύθμιση της Cav-1 στους ινοβλάστες του στρώματος προκάλεσαν χημειοαντοχή όταν στα ποντίκια χορηγήθηκε γεμισιταβίνη. Πράγματι, οι όγκοι που προέκυψαν από τον εμβολιασμό ινοβλαστών με αποσιωπημένη Cav-1 και BxPC3 αγρίου τύπου δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με γεμισιταβίνη. Αυτό το αποτέλεσμα για πρώτη φορά παρουσιάζει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της Cav-1 στο στρώμα και τη χημειοαντοχή στη γεμισιταβίνη που αποτελεί βασική θεραπεία για τον καρκίνο του παγκρέατος. Σε συμφωνία με την αρχική μας κλινική παρατήρηση, θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι οι ινοβλάστες  $hhsF^{shCAV}$  αντιπροσωπεύουν το στρώμα στην φτωχά διαφοροποιημένη περιοχή του καρκίνου του παγκρέατος και οι ινοβλάστες με μειωμένη έκφραση του Cav-1 παρέχουν κέρδος επιβίωσης και χημειοαντοχή στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα.

Το στρώμα θεωρείται για αρκετό καιρό ως δυνητικός φραγμός στη διάχυση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στους όγκους. Ήταν λογικό να εφαρμοσθούν διάφορες στρατηγικές για εξάλειψη του στρώματος για τη βελτίωση της ανταπόκρισης στη θεραπεία [83]. Αυτή η πρακτική όμως δε μεταφράστηκε σε επιτυχείς κλινικές δοκιμές. Αντιθέτως, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η εξάλειψη του στρώματος μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη του όγκου και επομένως να οδηγεί σε δυσμενέστερη πρόγνωση [176, 177]. Επιπλέον, πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι οι CAFs οδηγούν τη σάρωση της γεμισιταβίνης από τον καρκινικό ιστό με αποτέλεσμα μειωμένη συγκέντρωση του φαρμάκου ή και των μεταβολιτών του να είναι διαθέσιμα για τα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η ενδοκυττάρια παγίδευση του φαρμάκου στους ινοβλάστες αποτελεί ένα ακόμα μηχανισμό αποτυχίας της θεραπείας στον καρκίνο του παγκρέατος [178]. Μέθοδοι να αποκαταστήσουν την έκφραση της

Cav-1 στο στρώμα [179] με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας στη χημειοθεραπεία, μπορεί να αποτελούν άλλες θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παγκρέατος.

Παρά τους περιορισμούς της μελέτης μας, όπως ότι οι ινοβλάστες είναι από δέρμα και όχι CAFs και τη χρησιμοποίηση μίας κυτταρικής σειράς, τα αποτελέσματα στηρίζουν την υπόθεση ότι τα επίπεδα έκφρασης της Cav-1 στο στρώμα μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη αντοχής στη χημειοθεραπεία. Παρ' όλα αυτά, μοντέλα ξενομοσχεύματος με τη χρήση ινοβλαστών που δεν σχετίζονται με όγκο έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη μελέτη της αντίστασης σε χημειοθεραπεία [180].

## **6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Στο πρώτο μέρος της διατριβής οι πολυμορφισμοί των επιδιορθωτικών γονιδίων του DNA, ERCC-1 και XPD-751, που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη δεν βρέθηκαν να σχετίζονται με την εμφάνιση τοξικότητας ή καλύτερης αποτελεσματικότητας στους ασθενείς που έλαβαν οξαλιπλατίνα. Ο πολυμορφισμός XPD-751KQ ωστόσο φαίνεται να συνδέεται με καλύτερη πενταετή επιβίωση στο σύνολο των ασθενών που έλαβαν επικουρική θεραπεία αλλά το αποτέλεσμα αυτό θα πρέπει να εκτιμηθεί με προσοχή και η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών που λαμβάνει συγκεκριμένη μορφή θεραπείας.

Στο δεύτερο τμήμα της διατριβής τα αποτελέσματα της μελέτης, ιδιαίτερα σε ζωικό πρότυπο ανθρώπινου καρκίνου του παγκρέατος, έδειξαν ότι είναι η έκφραση της καβεολίνης-1 στο στρώμα και όχι στα καρκινικά κύτταρα αυτή που μπορεί να επιδράσει στην ανάπτυξη του όγκου και στην χημειοαντοχή στον παγκρεατικό καρκίνο. Με βάση τα αποτελέσματα από τη μελέτη αυτή, πιθανή τροποποίηση στην έκφραση της Cav-1 στο στρώμα θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτικό τρόπο για τη θεραπεία ενός από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους παγκοσμίως.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
3. Cheng N, Chytil A, Shyr Y et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1521-1533.
4. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 150845.
5. Yaacoub K, Pedeux R, Tarte K, Guillaudeux T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Lett* 2016; 378: 150-159.
6. Sartorius UA, Krammer PH. Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer* 2002; 97: 584-592.
7. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 611-622.
8. Gunes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 2013; 152: 390-393.
9. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-651.
10. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1924-1934.
11. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010; 70: 5649-5669.
12. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
13. Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7.
14. Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol* 2010; 6: 127-148.
15. WHO. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organisation;. 2008.
16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7-30.
17. [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer\\_statistics](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer_statistics).
18. Miller KD, Siegel RL, Lin CC et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 271-289.
19. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 353-358.
20. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2101-2114 e2105.
21. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.
22. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7: 2828-2835.
23. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi64-72.
24. Weiser MR, Jarnagin WR, Saltz LB. Colorectal cancer patients with oligometastatic liver disease: what is the optimal approach? *Oncology (Williston Park)* 2013; 27: 1074-1078.
25. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P et al. European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Ann Oncol* 2016; 27: 725-731.

26. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 Suppl 5: v56-68.
27. Andre T, de Gramont A, Vernerey D et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4176-4187.
28. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2198-2204.
29. Haller DG, Tabernero J, Maroun J et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1465-1471.
30. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016; 27: 1386-1422.
31. Oettle H, Post S, Neuhaus P et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297: 267-277.
32. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010; 304: 1073-1081.
33. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-2413.
34. Ciliberto D, Botta C, Correale P et al. Role of gemcitabine-based combination therapy in the management of advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer* 2013; 49: 593-603.
35. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966.
36. Conroy T, Desseigne F, Ychou M et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; 364: 1817-1825.
37. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013; 369: 1691-1703.
38. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 714-726.
39. Fujita K. Cytochrome P450 and anticancer drugs. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 23-37.
40. Pan ST, Li ZL, He ZX et al. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016; 43: 723-737.
41. Vallbohmer D, Yang DY, Kuramochi H et al. DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2007; 31: 413-418.
42. Jones PM, George AM. Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013; 48: 39-50.
43. Soekmadji C, Nelson CC. The Emerging Role of Extracellular Vesicle-Mediated Drug Resistance in Cancers: Implications in Advanced Prostate Cancer. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 454837.
44. Soekmadji C, Russell PJ, Nelson CC. Exosomes in prostate cancer: putting together the pieces of a puzzle. *Cancers (Basel)* 2013; 5: 1522-1544.
45. Federici C, Petrucci F, Caimi S et al. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. *PLoS One* 2014; 9: e88193.



46. Seebacher NA, Lane DJ, Jansson PJ, Richardson DR. Glucose Modulation Induces Lysosome Formation and Increases Lysosomotropic Drug Sequestration via the P-Glycoprotein Drug Transporter. *J Biol Chem* 2016; 291: 3796-3820.
47. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
48. Ando T, Ishiguro H, Kuwabara Y et al. Relationship between expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes and 5-fluorouracil sensitivity in esophageal carcinoma cell lines. *Dis Esophagus* 2008; 21: 15-20.
49. Yasumatsu R, Nakashima T, Uryu H et al. Correlations between thymidylate synthase expression and chemosensitivity to 5-fluorouracil, cell proliferation and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Chemotherapy* 2009; 55: 36-41.
50. Okumura K, Mekata E, Shiomi H et al. Expression level of thymidylate synthase mRNA reflects 5-fluorouracil sensitivity with low dose and long duration in primary colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 587-594.
51. Palmberg C, Koivisto P, Hyytinen E et al. Androgen receptor gene amplification in a recurrent prostate cancer after monotherapy with the nonsteroidal potent antiandrogen Casodex (bicalutamide) with a subsequent favorable response to maximal androgen blockade. *Eur Urol* 1997; 31: 216-219.
52. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352: 786-792.
53. Bouwman P, Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 587-598.
54. Ganesan A, Spivak G, Hanawalt PC. Transcription-coupled DNA repair in prokaryotes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 110: 25-40.
55. Altaha R, Liang X, Yu JJ, Reed E. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med* 2004; 14: 959-970.
56. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1291-1295.
57. Olausson KA, Dunant A, Fouret P et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-991.
58. Lin K, Ye D, Xie X. Protein expression levels of excision repair cross-complementation group 1 and xeroderma pigmentosum D correlate with response to platinum-based chemotherapy in the patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18: 1007-1012.
59. Fu X, Hu J, Han HY et al. High expression of XPA confers poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma patients treated with platinum-based chemoradiotherapy. *Oncotarget* 2015; 6: 28478-28490.
60. Vaezi A, Wang X, Buch S et al. XPF expression correlates with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5513-5522.
61. Wang JY, Edelman W. Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. *Cancer Cell* 2006; 9: 417-418.
62. Pani E, Stojic L, El-Shemerly M et al. Mismatch repair status and the response of human cells to cisplatin. *Cell Cycle* 2007; 6: 1796-1802.
63. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007; 447: 941-950.
64. Weeden CE, Asselin-Labat ML. Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. *Biochim Biophys Acta* 2018; 1864: 89-101.
65. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 22-33.
66. Bowden NA. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett* 2014; 346: 163-171.

67. Kuper J, Braun C, Elias A et al. In TFIIH, XPD helicase is exclusively devoted to DNA repair. *PLoS Biol* 2014; 12: e1001954.
68. Fuss JO, Tainer JA. XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair (Amst)* 2011; 10: 697-713.
69. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8: 98-101.
70. Mao Y, Keller ET, Garfield DH et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2013; 32: 303-315.
71. Hwang RF, Moore T, Arumugam T et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 2008; 68: 918-926.
72. Lonardo E, Frias-Aldeguer J, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness. *Cell Cycle* 2012; 11: 1282-1290.
73. Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA et al. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 2010; 177: 2585-2596.
74. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332-337.
75. Di Paolo A, Bocci G. Drug distribution in tumors: mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification. *Curr Oncol Rep* 2007; 9: 109-114.
76. Stohrer M, Boucher Y, Stangassinger M, Jain RK. Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res* 2000; 60: 4251-4255.
77. DuFort CC, DelGiorno KE, Carlson MA et al. Interstitial Pressure in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Dominated by a Gel-Fluid Phase. *Biophys J* 2016; 110: 2106-2119.
78. Sun CC, Qu XJ, Gao ZH. Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2014; 25: 1107-1121.
79. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresh DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 2015; 25: 234-240.
80. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M et al. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm* 2011; 8: 2039-2049.
81. Straussman R, Morikawa T, Shee K et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012; 487: 500-504.
82. Neesse A, Michl P, Frese KK et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 2011; 60: 861-868.
83. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009; 324: 1457-1461.
84. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1: 445-458.
85. Lamaze C, Tardif N, Dewulf M et al. The caveolae dress code: structure and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2017; 47: 117-125.
86. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC et al. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992; 68: 673-682.
87. Scherer PE, Okamoto T, Chun M et al. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 131-135.
88. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T et al. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996; 271: 2255-2261.
89. Sowa G, Xie L, Xu L, Sessa WC. Serine 23 and 36 phosphorylation of caveolin-2 is differentially regulated by targeting to lipid raft/caveolae and in mitotic endothelial cells. *Biochemistry* 2008; 47: 101-111.

90. Chang WJ, Rothberg KG, Kamen BA, Anderson RG. Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J Cell Biol* 1992; 118: 63-69.
91. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7289-7304.
92. Sowa G, Pypaert M, Fulton D, Sessa WC. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6511-6516.
93. Gupta R, Toufaily C, Annabi B. Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer. *Biochimie* 2014; 107 Pt B: 188-202.
94. Glenney JR, Jr., Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10517-10521.
95. Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K et al. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 87: 1140-1144.
96. Tanase CP, Dima S, Mihai M et al. Caveolin-1 overexpression correlates with tumour progression markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Mol Histol* 2009; 40: 23-29.
97. Nam KH, Lee BL, Park JH et al. Caveolin 1 expression correlates with poor prognosis and focal adhesion kinase expression in gastric cancer. *Pathobiology* 2013; 80: 87-94.
98. Han F, Zhang J, Shao J, Yi X. Caveolin-1 promotes an invasive phenotype and predicts poor prognosis in large cell lung carcinoma. *Pathol Res Pract* 2014; 210: 514-520.
99. Ando T, Ishiguro H, Kimura M et al. The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 18: 601-609.
100. Chatterjee M, Ben-Josef E, Thomas DG et al. Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. *Sci Rep* 2015; 5: 10867.
101. Ye Y, Miao SH, Lu RZ, Zhou JW. Prognostic value of caveolin-1 expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 8367-8370.
102. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F et al. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol* 2009; 174: 2023-2034.
103. Zhao Z, Han FH, Yang SB et al. Loss of stromal caveolin-1 expression in colorectal cancer predicts poor survival. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 1140-1147.
104. Shan T, Lu H, Ji H et al. Loss of stromal caveolin-1 expression: a novel tumor microenvironment biomarker that can predict poor clinical outcomes for pancreatic cancer. *PLoS One* 2014; 9: e97239.
105. Jia Y, Wang N, Wang J et al. Down-regulation of stromal caveolin-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma: a potent predictor of lymph node metastases, early tumor recurrence, and poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 329-336.
106. Zhao X, He Y, Gao J et al. Caveolin-1 expression level in cancer associated fibroblasts predicts outcome in gastric cancer. *PLoS One* 2013; 8: e59102.
107. Nakatani K, Wada T, Nakamura M et al. Expression of caveolin-1 and its correlation with cisplatin sensitivity in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 445-452.
108. Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N et al. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKCalpha phosphorylation. *Int J Cancer* 2010; 126: 426-436.
109. Wang Z, Wang N, Liu P et al. Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. *Oncotarget* 2015; 6: 37135-37150.
110. Hehlhans S, Cordes N. Caveolin-1: an essential modulator of cancer cell radio-and chemoresistance. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 521-530.

111. Hehlhans S, Eke I, Storch K et al. Caveolin-1 mediated radioresistance of 3D grown pancreatic cancer cells. *Radiother Oncol* 2009; 92: 362-370.
112. Salem AF, Bonuccelli G, Bevilacqua G et al. Caveolin-1 promotes pancreatic cancer cell differentiation and restores membranous E-cadherin via suppression of the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2011; 10: 3692-3700.
113. Witkiewicz AK, Nguyen KH, Dasgupta A et al. Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle* 2008; 7: 3021-3025.
114. Tsimplouli C, Demetzos C, Hadzopoulou-Cladaras M et al. In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. *Eur J Nutr* 2012; 51: 181-190.
115. Dimas K, Demetzos C, Vaos B et al. Cytotoxic and antiproliferative effects of heptaacetyltiliroside on human leukemic cell lines. *Leuk Res* 1999; 23: 1021-1033.
116. Watson RG, McLeod HL. Pharmacogenomic contribution to drug response. *Cancer J* 2011; 17: 80-88.
117. Cheng J, Ha M, Wang Y et al. A C118T polymorphism of ERCC1 and response to cisplatin chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 231-238.
118. Bradbury PA, Kulke MH, Heist RS et al. Cisplatin pharmacogenetics, DNA repair polymorphisms, and esophageal cancer outcomes. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 613-625.
119. Krivak TC, Darcy KM, Tian C et al. Relationship between ERCC1 polymorphisms, disease progression, and survival in the Gynecologic Oncology Group Phase III Trial of intraperitoneal versus intravenous cisplatin and paclitaxel for stage III epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3598-3606.
120. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2008; 8: 278-288.
121. Karageorgopoulou S, Kostakis ID, Gazouli M et al. Prognostic and predictive factors in patients with metastatic or recurrent cervical cancer treated with platinum-based chemotherapy. *BMC Cancer* 2017; 17: 451.
122. Kalikaki A, Voutsina A, Koutsopoulos A et al. ERCC1 SNPs as Potential Predictive Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated With Platinum-Based Chemotherapy. *Cancer Invest* 2015; 33: 107-113.
123. Fountzilas G, Kalogera-Fountzila A, Lambaki S et al. MMP9 but Not EGFR, MET, ERCC1, P16, and P-53 Is Associated with Response to Concomitant Radiotherapy, Cetuximab, and Weekly Cisplatin in Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer. *J Oncol* 2009; 2009: 305908.
124. Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H et al. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10: 118-123.
125. Chua W, Goldstein D, Lee CK et al. Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 998-1004.
126. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F et al. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 58-66.
127. Chen YC, Tzeng CH, Chen PM et al. Influence of GSTP1 I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101: 530-535.
128. Chang PM, Tzeng CH, Chen PM et al. ERCC1 codon 118 C-->T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 278-283.

129. Pare L, Marcuello E, Altes A et al. Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer* 2008; 99: 1050-1055.
130. Ruzzo A, Graziano F, Galli F et al. Genetic markers for toxicity of adjuvant oxaliplatin and fluoropyrimidines in the phase III TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. *Sci Rep* 2014; 4: 6828.
131. Boige V, Mendiboure J, Pignon JP et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFC2000-05. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2556-2564.
132. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1247-1254.
133. Cortejoso L, Garcia MI, Garcia-Alfonso P et al. Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71: 1463-1472.
134. Inada M, Sato M, Morita S et al. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2010; 48: 729-734.
135. Qian YY, Liu XY, Wu Q et al. The ERCC1 C118T polymorphism predicts clinical outcomes of colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy: a meta-analysis based on 22 studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 8383-8390.
136. Duldulao MP, Lee W, Nelson RA et al. Gene polymorphisms predict toxicity to neoadjuvant therapy in patients with rectal cancer. *Cancer* 2013; 119: 1106-1112.
137. Nishina T, Takano Y, Denda T et al. A phase II clinical study of mFOLFOX6 plus bevacizumab as first-line therapy for Japanese advanced/recurrent colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43: 1080-1086.
138. Artac M, Bozcuk H, Pehlivan S et al. The value of XPD and XRCC1 genotype polymorphisms to predict clinical outcome in metastatic colorectal carcinoma patients with irinotecan-based regimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 803-809.
139. Braun MS, Richman SD, Thompson L et al. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5519-5528.
140. Zhang YW, Regairaz M, Seiler JA et al. Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 3607-3620.
141. Li HY, Ge X, Huang GM et al. GSTP1, ERCC1 and ERCC2 polymorphisms, expression and clinical outcome of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3465-3469.
142. Zaanen A, Dalban C, Emile JF et al. ERCC1, XRCC1 and GSTP1 Single Nucleotide Polymorphisms and Survival of Patients with Colon Cancer Receiving Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *J Cancer* 2014; 5: 425-432.
143. Farina Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Lemmens VE et al. Pharmacogenetics of oxaliplatin as adjuvant treatment in colon carcinoma: are single nucleotide polymorphisms in GSTP1, ERCC1, and ERCC2 good predictive markers? *Mol Diagn Ther* 2011; 15: 277-283.
144. Huang MY, Wang JY, Huang ML et al. Polymorphisms in XPD and ERCC1 Associated with Colorectal Cancer Outcome. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 4121-4134.
145. Ma SC, Zhao Y, Zhang T et al. Association between the ERCC1 rs11615 polymorphism and clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastrointestinal cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2015; 8: 641-648.

146. Qian YY, Liu XY, Pei D et al. The XPD Lys751Gln polymorphism has predictive value in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy: a systemic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 9699-9706.
147. Yu JJ, Mu C, Lee KB et al. A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res* 1997; 382: 13-20.
148. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-528.
149. Qi YJ, Cui S, Yang YZ et al. Excision repair cross-complementation group 1 codon 118 polymorphism, micro ribonucleic acid and protein expression, clinical outcome of the advanced gastric cancer response to first-line FOLFOX-4 in Qinghai-Tibetan plateau population. *J Cancer Res Ther* 2013; 9: 410-415.
150. Deloia JA, Bhagwat NR, Darcy KM et al. Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. *Gynecol Oncol* 2012; 126: 448-454.
151. Steffensen KD, Waldstrom M, Jeppesen U et al. Prediction of response to chemotherapy by ERCC1 immunohistochemistry and ERCC1 polymorphism in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18: 702-710.
152. Smith S, Su D, Rigault de la Longrais IA et al. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5172-5179.
153. Uchida K, Danenberg PV, Danenberg KD, Grem JL. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of oxaliplatin and capecitabine. *BMC Cancer* 2008; 8: 386.
154. Wei J, Zou Z, Qian X et al. ERCC1 mRNA levels and survival of advanced gastric cancer patients treated with a modified FOLFOX regimen. *Br J Cancer* 2008; 98: 1398-1402.
155. Weberpals J, Garbuio K, O'Brien A et al. The DNA repair proteins BRCA1 and ERCC1 as predictive markers in sporadic ovarian cancer. *Int J Cancer* 2009; 124: 806-815.
156. Kassem AB, Salem SE, Abdelrahim ME et al. ERCC1 and ERCC2 as predictive biomarkers to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer patients from Egypt. *Exp Mol Pathol* 2017; 102: 78-85.
157. Booton R, Ward T, Ashcroft L et al. ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 902-906.
158. Youn CK, Kim MH, Cho HJ et al. Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res* 2004; 64: 4849-4857.
159. Kim DY, Paek TY, Oh SY et al. Pretreatment selection of regimen according to genetic analysis improves the efficacy of chemotherapy in the first line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2014; 109: 250-254.
160. Abad A, Martinez-Balibrea E, Vieitez JM et al. Genotype-based selection of treatment for patients with advanced colorectal cancer (SETICC): a pharmacogenetic-based randomized phase II trial. *Ann Oncol* 2017.
161. Chen T, Liu L, Xu HX et al. Significance of caveolin-1 regulators in pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 4501-4507.
162. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 715-735.
163. Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010; 159: 443-450.
164. Huang C, Qiu Z, Wang L et al. A novel FoxM1-caveolin signaling pathway promotes pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2012; 72: 655-665.

165. Lin M, DiVito MM, Merajver SD et al. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1. *Mol Cancer* 2005; 4: 21.
166. Alshenawy HA, Ali MA. Differential caveolin-1 expression in colon carcinoma and its relation to E-cadherin-beta-catenin complex. *Ann Diagn Pathol* 2013; 17: 476-482.
167. Erkan M, Kurtoglu M, Kleeff J. The role of hypoxia in pancreatic cancer: a potential therapeutic target? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 10: 301-316.
168. Verbeke C. Morphological heterogeneity in ductal adenocarcinoma of the pancreas - Does it matter? *Pancreatol* 2016; 16: 295-301.
169. Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2010; 39: 425-435.
170. Cordes N, Frick S, Brunner TB et al. Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene* 2007; 26: 6851-6862.
171. Di Vizio D, Morello M, Sotgia F et al. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. *Cell Cycle* 2009; 8: 2420-2424.
172. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Whitaker-Menezes D et al. Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle* 2010; 9: 2423-2433.
173. Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R et al. The reverse Warburg effect: glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle* 2010; 9: 1960-1971.
174. Pavlides S, Tsirigos A, Vera I et al. Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the "reverse Warburg effect": a transcriptional informatics analysis with validation. *Cell Cycle* 2010; 9: 2201-2219.
175. Capozza F, Trimmer C, Castello-Cros R et al. Genetic ablation of Cav1 differentially affects melanoma tumor growth and metastasis in mice: role of Cav1 in Shh heterotypic signaling and transendothelial migration. *Cancer Res* 2012; 72: 2262-2274.
176. Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 2014; 25: 719-734.
177. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014; 25: 735-747.
178. Hessmann E, Patzak MS, Klein L et al. Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* 2017.
179. Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P et al. Metronomic ceramide analogs inhibit angiogenesis in pancreatic cancer through up-regulation of caveolin-1 and thrombospondin-1 and down-regulation of cyclin D1. *Neoplasia* 2012; 14: 833-845.
180. Ma Y, Lin Z, Fallon JK et al. New mouse xenograft model modulated by tumor-associated fibroblasts for human multi-drug resistance in cancer. *Oncol Rep* 2015; 34: 2699-2705.