



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Ανίχνευση του μεταλλαγμένου γονιδίου KRAS σε κυκλοφορούν
ελεύθερο DNA πλάσματος και του μεταγράφου του σε αιμοπετάλια
ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και μελέτη της κλινικής
τους χρησιμότητας στην παρακολούθηση της νόσου».**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΑΡΚΑΒΕΛΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Ανίχνευση του μεταλλαγμένου γονιδίου KRAS σε κυκλοφορούν
ελεύθερο DNA πλάσματος και του μεταγράφου του σε αιμοπετάλια
ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και μελέτη της κλινικής
τους χρησιμότητας στην παρακολούθηση της νόσου».**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΑΡΚΑΒΕΛΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Ζαρκαβέλη Γεωργίου: 7-4-2015

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 777^α/19-5-2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας

Μέλη

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας

Μαγκλάρα Αγγελική, Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-6-2015

«Ανίχνευση μεταλλαγμένου γονιδίου KRAS σε κυκλοφορούν ελεύθερο DNA πλάσματος και του μεταγράφου του σε αιμοπετάλια ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και μελέτη της κλινικής τους χρησιμότητας στην παρακολούθηση της νόσου»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 895^α/19-6-2019

Μήτσης Μιχαήλ	Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παυλίδης Νικόλαος	ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πενθερουδάκης Γεώργιος	Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσέκερης Περικλής	Καθηγητής Ακτινοθεραπείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαγκλάρα Αγγελική	Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μάουρι Ντάβιντε	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-7-2019

Ιωάννινα 15-7-2019

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Ιατρικής, της Σχολής των Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μεταξύ Μαΐου 2015 και Ιουνίου 2019. Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου μετά από ενημέρωσή τους και συγκατάθεση. Μέσα από αυτές τις σελίδες θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης και κατ' επέκταση της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ογκολογίας κύριο Γεώργιο Πενθερουδάκη , ο οποίος ως επιβλέπων αλλά και ως δάσκαλος στην ογκολογία , μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη διατριβή αυτή αλλά και να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες σε νέα επιστημονικά πεδία και κυρίως στον τομέα της έρευνας.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ χρωστώ στον κύριο Νικόλαο Παυλίδη , Ομότιμο καθηγητή Ογκολογίας ,δίπλα στον οποίο έκανα τα πρώτα βήματά μου στην Παθολογική Ογκολογία και ο οποίος υπήρξε ο αρχικός καθοδηγητής μου.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Αγγελική Μαγκλάρια για την καθοριστική συμβολή της σε όλη τη διαδικασία και την καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Η παρουσία της αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση και την εκπόνηση της διατριβής στην κατά το δυνατόν άρτια μορφή της.

Στην κυρία Μυρτώ Καστρισίου , ιατρό και υποψήφια διδάκτορα Κλινικής Χημείας για την πολύτιμη συνεργασία που αναπτύξαμε , τη βοήθειά της και τη συμπαράστασή της σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της διατριβής.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τον κύριο Καμπλέτσα Ελευθέριο , τον κύριο Πετράκη Δημήτριο , την κυρία Κωσταδήμα Λήδα , τον κύριο Μάουρι Ντάβιντε , ογκολόγους, συναδέλφους και συνεργάτες στην καθημερινότητά μου αλλά και τις κυρίες Τσελίκου Ευαγγελία , μοριακό βιολόγο, και Μάντζιου Αθανασία , νοσηλεύτρια, για τη συνολική συμβολή τους στην προσπάθειά μου. Το σύνολο των εργαζομένων της ογκολογικής κλινικής έχει συμβάλλει με τον τρόπο του σε κάποιο στάδιο της διαδικασίας αυτής.

Πάνω από όλους , θέλω να ευχαριστήσω τον Κώστα και τη Γωγώ.

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων.....	3
Γενικό Μέρος.....	9
1.Εισαγωγή.....	11
2.Επιδημιολογία και πρόληψη του κολοορθικού καρκίνου.....	13
3.Διάγνωση και Σταδιοποίηση κολοορθικού καρκίνου.....	15
4.Μεταστατικός καρκίνος παχέος εντέρου.....	19
5.Επιλογή κατάλληλης θεραπείας για το μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο.....	21
6.Βιοδείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	25
6.1.RAS μεταλλάξεις.....	26
6.2.BRAF μεταλλάξεις.....	30
6.3.Έλεγχος μικροδορυφορικής αστάθειας- MSI.....	32
6.4.Πρόσθετοι Βιοδείκτες.....	33
7.Ο ρόλος των βιοδεικτών στη θεραπευτική του κολοορθικού καρκίνου.....	37
8.Η θεωρία της αντίστασης στη θεραπεία.....	39
9.Η υγρή βιοψία.....	43
9.1. Circulating Tumor DNA (ctDNA) –Κυκλοφορούν καρκινικό DNA.....	45
9.2. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells – CTCs).....	47
9.3. Αιμοπετάλια.....	48
10. Μέθοδοι προσδιορισμού κυκλοφορούντος καρκινικού DNA.....	51
11.Οι κλινικές εφαρμογές του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	53
11.1.Πρώιμη διάγνωση.....	53
11.2.Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος και ανταπόκριση στη θεραπεία.....	54

11.3.Επιλογή θεραπείας και ανίχνευση αντίστασης στη θεραπεία.....	56
12.Σκοπός της διατριβής.....	61
Ειδικό Μέρος.....	63
13.Ερευνητικοί στόχοι.....	65
14.Ερευνητικό πρωτόκολλο.....	67
15.Μεθοδολογία.....	69
<i>15.1.Έλεγχος των μεταλλάξεων στον ιστό του όγκου και στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με τεχνική αλληλούχισης επόμενης γενιάς -Next Generation Sequencing (NGS).....</i>	<i>69</i>
<i>15.2.Έλεγχος των μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με τεχνική ψηφιακής PCR BEAMing.....</i>	<i>72</i>
<i>15.3.Ανίχνευση του μεταγράφου του μεταλλαγμένου RAS γονιδίου σε αιμοπετάλια ασθενών.....</i>	<i>75</i>
16.Αποτελέσματα.....	79
<i>16.1.Αποτελέσματα εφαρμογής μεθόδου αλληλούχισης επόμενης γενιάς στον ιστό των ασθενών και μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς και ψηφιακής PCR BEAMing στο πλάσμα του περιφερικού αίματος.....</i>	<i>79</i>
<i>16.2.Αποτελέσματα ανίχνευσης του μεταγράφου του μεταλλαγμένου RAS γονιδίου στα αιμοπετάλια ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο.....</i>	<i>103</i>
17.Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	105
18. Αποτελέσματα ερευνητικών στόχων.	115
19.Συμπεράσματα.....	117
Περίληψη.....	121
Abstract.....	123

Εικόνες

Εικόνα 1. Επίπτωση νεοπλασμάτων και οι θάνατοι εξ αυτών παγκοσμίως το 2018.....	13
Εικόνα 2. Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	16
Εικόνα 3. Θεραπευτικός αλγόριθμος για την αντιμετώπιση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου και οι αντίστοιχες θεραπευτικές επιλογές.....	23
Εικόνα 4. Σύνοψη των σηματοδοτικών μονοπατιών των RASπρωτεϊνών και τα βιολογικά αποτελέσματα της δράσης τους.....	27
Εικόνα 5. Το μοντέλο της καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	28
Εικόνα 6. Αναστολή του BRAF στο σηματοδοτικό μονοπάτι , σε νεοπλάσματα που φέρουν μετάλλαξη BRAF.....	32
Εικόνα 7. Η συχνότητα των μεταλλάξεων στον κολοορθικό καρκίνο.....	34
Εικόνα 8. Οι μηχανισμοί δράσης των αντι-EGFR στοχευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	40
Εικόνα 9. Μηχανισμοί αντίστασης στη χορήγηση αντι-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων μέσω γενετικών τροποποιήσεων.....	41
Εικόνα 10. Εναλλακτικές ενεργοποιημένες οδοί που οδηγούν στην αντίσταση στα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα.....	42
Εικόνα 11. Ποσοστά ανίχνευσης κυκλοφορούντος καρκινικού DNA σε ασθενείς με μεταστατικά νεοπλάσματα.....	45
Εικόνα 12. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν διάφορα τμήματα DNA στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος με διάφορους μηχανισμούς.....	47
Εικόνα 13. Σύγκριση διαθέσιμων πλατφορμών για τον προσδιορισμό του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA.....	52
Εικόνα 14. Η τεχνική EXBP-RT με τον ειδικό primer και probe για την επιλεκτική ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου.....	77
Εικόνα 15. Η τροποποιημένη τεχνική EXBP-RT με την εφαρμογή LNA-blocker.....	77

Εικόνα 16. Τα αποτελέσματα των πειραματικών προσπαθειών ανίχνευσης RAS μεταλλαγμένων γονιδίων.....	104
---	------------

Πίνακες

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών και των όγκων τους.....	82
--	-----------

Πίνακας 2. Προφίλ μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου με βάση τα αποτελέσματα NGS στον ιστό των ασθενών ομάδας A και με βάση την εντόπιση του όγκου.....	87
--	-----------

Πίνακας 3. Προφίλ μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου με βάση τα αποτελέσματα NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος για τους ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες και με βάση την εντόπιση του όγκου.....	88
--	-----------

Πίνακας 4. Σύγκριση μεταλλάξεων με την τεχνική NGS στον ιστό και το πλάσμα του περιφερικού αίματος κατά τη διάγνωση.....	89
---	-----------

Πίνακας 5. Κατάσταση μεταλλάξεων κατά την πρόοδο νόσου με βάση τα αποτελέσματα NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος.....	90
---	-----------

Πίνακας 6. Σύγκριση των μεταλλάξεων με την τεχνική NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος μεταξύ της στιγμής της διάγνωσης και της πρόοδου της νόσου.....	91
--	-----------

Πίνακας 7. Κατάσταση των μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου με την τεχνική BEAMing στους ασθενείς της ομάδας B και με βάση την εντόπιση του όγκου.....	95
---	-----------

Πίνακας 8. Μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση της νόσου και με τις τρεις τεχνικές για τους ασθενείς της ομάδας AB (T-NGS, L-NGS και BEAMing).....	98
---	-----------

Πίνακας 9. Μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση της νόσου και με τις τρεις τεχνικές για τους ασθενείς της ομάδας AB (T-NGS, L-NGS και BEAMing) με βάση την εντόπιση του όγκου.....	99
--	-----------

Πίνακας 10. Σύγκριση των μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου μεταξύ ιστού και πλάσματος περιφερικού αίματος με τεχνική NGS.....	100
---	------------

Πίνακας 11. Σύγκριση μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου στο πλάσμα του περιφερικού αίματος μεταξύ μεθόδου NGS και BEAMing.....	100
---	------------

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1. Kaplan-Meier για το TTP με βάση την εντόπιση του όγκου στους ασθενείς της ομάδας A.....	86
---	-----------

Διάγραμμα 2. Σύγκριση των μεταλλάξεων ανά ασθενή ανιχνεύσιμες στον ιστό και το πλάσμα κατά τη διάγνωση	92
---	-----------

Διάγραμμα 3. Γραφήματα της κατάστασης των μεταλλάξεων με NGS έλεγχο στον ιστό κατά τη διάγνωση, NGS στο πλάσμα κατά τη διάγνωση και κατά την πρόοδο νόσου.....	93
---	-----------

Διάγραμμα 4. Σύγκριση των μεταλλάξεων ανά ασθενή όπως ανιχνεύθηκαν με NGS στο πλάσμα κατά τη διάγνωση και κατά την πρόοδο νόσου.....	94
---	-----------

Διάγραμμα 5. Σύγκριση των μεταλλάξεων ανά ασθενή όπως ανιχνεύθηκαν με NGS στον έλεγχο ιστό, στο πλάσμα του περιφερικού αίματος και με BEAMing στη διάγνωση.....	101
--	------------

Διάγραμμα 6. Γραφήματα των μεταλλάξεων όπως ανιχνεύθηκαν με NGS στον ιστό, στο πλάσμα του περιφερικού αίματος και με BEAMing στη διάγνωση.....	102
---	------------

Βιβλιογραφικές αναφορές.....	125
-------------------------------------	------------

Γενικό Μέρος

1. Εισαγωγή.

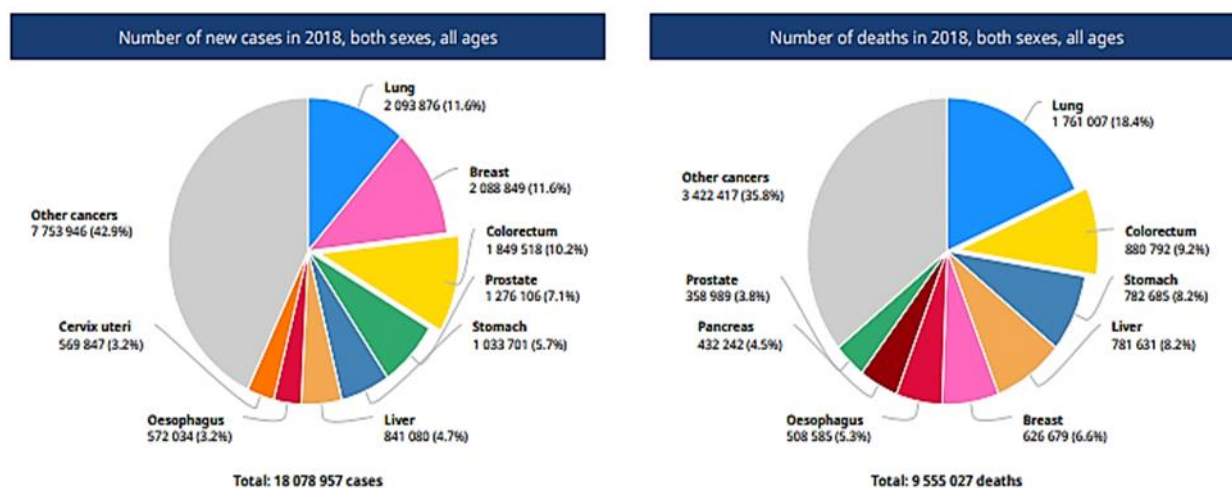
Ο κολοορθικός καρκίνος αποτελεί ένα από τα συχνότερα νεοπλάσματα. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αυξητική τάση στην επίπτωσή του στις νεότερες ηλικίες, ενώ αξιοσημείωτη είναι η συσχέτισή του με συγκεκριμένα κληρονομικά σύνδρομα. Η πρόοδος της επιστήμης έχει οδηγήσει στην έγκαιρη διάγνωση και τη ριζική αντιμετώπιση των ασθενών με υψηλά ποσοστά επιβίωσης, ακόμη και ίασης(1). Για τους ασθενείς, οι οποίοι διαγιγνώσκονται με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, η επιβίωση φθάνει σήμερα και ξεπερνά τους τριάντα μήνες και τούτο λόγω της εξέλιξης, που σημειώθηκε τα τελευταία είκοσι χρόνια, στη θεραπευτική με την εισαγωγή συνδυασμού κυτταροτοξικών χημειοθεραπειών αλλά και στοχευτικών θεραπειών(2).

Η διάγνωση της μεταστατικής νόσου απαιτεί τη λήψη ιστικής βιοψίας και την επακόλουθη επεξεργασία του ιστού για τον καθορισμό συγκεκριμένων βιοδεικτών και τη διερεύνηση ύπαρξης ή απουσίας μεταλλάξεων, που καθορίζουν τελικά και το είδος της θεραπείας που θα εφαρμοστεί. Στην πορεία της νόσου οι ασθενείς εμφανίζουν αντίσταση στην εκάστοτε εφαρμοζόμενη θεραπεία με κλινική και απεικονιστική πρόοδο νόσου. Τότε κρίνεται επιβεβλημένη η αλλαγή της θεραπείας και η χορήγηση άλλου θεραπευτικού σχήματος. Η αντίσταση αυτή σχετίζεται με αλλαγές που συμβαίνουν στον όγκο υπό την επίδραση των θεραπειών σε μοριακό επίπεδο. Το μοριακό υπόβαθρο της νόσου εξετάζεται κατά τη διερεύνηση των βιοδεικτών στη διάγνωση, αλλά δε διερευνάται τις χρονικές στιγμές της επιδείνωσης επιτρέποντας έτσι την ύπαρξη ενός κενού στην κατανόηση των μοριακών γεγονότων και την επίδραση που έχουν στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας και την κλινική πορεία των ασθενών(2).

Η υγρή βιοψία αποτελεί μία ελκυστική μέθοδο για την αποτύπωση της γενετικής υπογραφής του όγκου, τόσο κατά τη διάγνωση όσο και κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης και διαχείρισης των ασθενών. Επιτρέπει την παροχή μοριακής πληροφορίας σε συνθήκες πραγματικού χρόνου χωρίς να είναι απαραίτητη η υποβολή των ασθενών σε επαναληπτικές παρεμβατικές βιοψίες. Αποτελεί αντικείμενο μελέτης και έχει αρχίσει να διαφαίνεται η θέση που κατακτά στην κατανόηση αλλά και τη διαχείριση των ογκολογικών ασθενών μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο(2)(3).

2. Επιδημιολογία και πρόληψη του κολοορθικού καρκίνου.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας για τον πληθυσμό παγκοσμίως. Με βάση τα πιο πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με την επίπτωση των νεοπλασμάτων, ο κολοορθικός καρκίνος κατατάσσεται τρίτος σε σειρά επίπτωσης με υπολογισμένες 1.849.518 νέες περιπτώσεις το έτος 2018 με 880.792 εξ αυτών να είναι μοιραίες(4)(**Εικόνα 1**). Διαχρονικά παρατηρείται μία αυξητική τάση στις νεότερες ηλικίες τόσο στην επίπτωση όσο και στη θνησιμότητα της νόσου. Τούτο πιθανώς να σχετίζεται με την αλλαγή στον τρόπο ζωής, την εντατικοποιημένη αστικοποίηση και την συνεπακόλουθη αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες(5)(6).



Εικόνα 1. Επίπτωση νεοπλασμάτων και οι θάνατοι εξ αυτών παγκοσμίως το 2018.

Global Cancer Observatory. Available from: <https://gco.iarc.fr>

Σαφείς οδηγίες, που να αφορούν την έγκαιρη διάγνωση, βασισμένες στην πρόληψη μέσω μεθόδων πρώιμης ανίχνευσης έχουν ήδη διατυπωθεί, χωρίς όμως να υπάρχει ένα σαφώς εφαρμοζόμενο εθνικό σχέδιο στρατηγικής, το οποίο να εφαρμόζεται για την πρόληψη του κολοορθικού καρκίνου στο γενικό πληθυσμό παρά τους εκάστοτε προγραμματισμούς(7). Εξαιρουμένων των περιπτώσεων κληρονομικών συνδρόμων, όπου η κατάλληλη γενετική καθοδήγηση αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη διαχείριση των ασθενών, οι επαγγελματίες υγείας καλούνται να ασκήσουν συμβουλευτική στο

γενικό πληθυσμό με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση της νόσου κυρίως με ενδοσκόπηση κατώτερου πεπτικού και τη συνεπακόλουθη αντιμετώπισή της σε πρώιμο στάδιο(8)(9).

Σε κάθε περίπτωση , για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου ενοχοποιούνται σε ποσοστό 20% κληρονομικοί προδιαθεσικοί παράγοντες(10)(11). Το σύνδρομο Lynch, το οποίο ενοχοποιείται για τον κληρονομικό, μη πολυποδιαστικό καρκίνο του παχέος εντέρου, αλλά και το σύνδρομο FAP , της κληρονομικής πολυποδίασης του παχέος εντέρου, αποτελούν σαφώς διαπιστωμένες και κατανοητές κληρονομικές καταστάσεις(12)(13). Πέρα από αυτές , πλήθος άλλων υποκείμενων κληρονομούμενων γενετικών διαταραχών δύνανται να προκαλέσουν κολοορθικό καρκίνο με αποτέλεσμα η διερεύνηση του οικογενειακού ιστορικού αλλά και ο γενετικός έλεγχος να κρίνονται πλέον επιβεβλημένα βήματα σε κάθε νέα περίπτωση κολοορθικού καρκίνου(14)(15).

Εκτός από τις περιπτώσεις οικογενούς προδιάθεσης κι άλλοι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νόσου. Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (νόσος Crohn, ελκώδης κολίτις) , το κάπνισμα , το αλκοόλ, η κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος , το μεταβολικό σύνδρομο και ο σακχαρώδης διαβήτης συγκαταλέγονται στον κατάλογο πιθανών προδιαθέσεων για τον καρκίνο του παχέος εντέρου(16). Υπάρχουν όμως και δεδομένα που αφορούν την πιθανή προστατευτική δράση που μπορεί να έχουν συγκεκριμένες διατροφικές συνήθειες, όπως η κατανάλωση γαλακτοκομικών αλλά και η φαρμακευτική πρόληψη(17). Η χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης ημερησίως για μια δεκαετία τουλάχιστο , έχει συσχετιστεί θετικά με μειωμένη επίπτωση καρκίνου του εντέρου(18)(19).

3. Διάγνωση και Σταδιοποίηση κολορρθικού καρκίνου.

Η διάγνωση τίθεται με την παθολογοανατομική εξέταση δείγματος ιστού, το οποίο λαμβάνεται ενδοσκοπικά , χειρουργικά, αλλά και με νεότερες λιγότερο παρεμβατικές μεθόδους όπως η παρακέντηση βλάβης – βιοψία μέσω βελόνης (2). Το αδενοκαρκίνωμα είναι στην πλειονότητα των περιπτώσεων ο ιστολογικός τύπος που ταυτοποιείται, ενώ σε ποσοστό μικρότερο του 10% η ιστολογική εξέταση μπορεί να αναδείξει νευροενδοκρινικό όγκο, πλακώδες καρκίνωμα, αδеноπλακώδες και αδιαφοροποίητο καρκίνωμα (20) . Για την ακριβή σταδιοποίηση της νόσου είναι απαραίτητο να υποβληθεί ο ασθενής σε απεικονιστικές εξετάσεις για να αποκλειστεί η εκτεταμένη μεταστατική νόσος (2) .

Ο ασθενής είναι δυνατό να υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή της κακοήθειας ή σε βιοψία προσβάσιμης βλάβης με γενναία λήψη ιστού και με βάση τα απεικονιστικά αποτελέσματα ακολουθεί η σταδιοποίηση (**Εικόνα 2**). Σε περίπτωση χειρουργικής εκτομής, η έκταση της διήθησης από τον όγκο τοπικά στο όργανο περιλαμβάνει τέσσερις κατηγορίες (T1-T4). Οι ανευρεθέντες λεμφαδένες με βάση τον αριθμό τους ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες (N0-N2). Η διαπίστωση απομακρυσμένων μεταστάσεων ορίζεται ως M1 νόσος, ενώ η απουσία τους ως M0. Η χρήση του συστήματος σταδιοποίησης TNM καθορίζει και την περαιτέρω θεραπευτική στρατηγική που θα εφαρμοστεί στον ασθενή (21).

American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging Classification for Colon Cancer 8th ed., 2017)

Table 1. Definitions for T, N, M

T	Primary Tumor	M	Distant Metastasis
TX	Primary tumor cannot be assessed	M0	No distant metastasis by imaging, etc.; no evidence of tumor in distant sites or organs
T0	No evidence of primary tumor	M1	Metastasis to one or more distant sites or organs or peritoneal metastasis is identified
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intramucosal carcinoma (involvement of lamina propria with no extension through muscularis mucosae)	M1a	Metastasis to one site or organ is identified without peritoneal metastasis
T1	Tumor invades the submucosa (through the muscularis mucosa but not into the muscularis propria)	M1b	Metastasis to two or more sites or organs is identified without peritoneal metastasis
T2	Tumor invades the muscularis propria	M1c	Metastasis to the peritoneal surface is identified alone or with other site or organ metastases
T3	Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues		
T4	Tumor invades* the visceral peritoneum or invades or adheres** to adjacent organ or structure		
T4a	Tumor invades* through the visceral peritoneum (including gross perforation of the bowel through tumor and continuous invasion of tumor through areas of inflammation to the surface of the visceral peritoneum)		
T4b	Tumor directly invades* or adheres** to adjacent organs or structures		
N	Regional Lymph Nodes		
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		
N0	No regional lymph node metastasis		
N1	One to three regional lymph nodes are positive (tumor in lymph nodes measuring ≥ 0.2 mm), or any number of tumor deposits are present and all identifiable lymph nodes are negative		* Direct invasion in T4 includes invasion of other organs or other segments of the colorectum as a result of direct extension through the serosa, as confirmed on microscopic examination (for example, invasion of the sigmoid colon by a carcinoma of the cecum) or, for cancers in a retroperitoneal or subperitoneal location, direct invasion of other organs or structures by virtue of extension beyond the muscularis propria (i.e., respectively, a tumor on the posterior wall of the descending colon invading the left kidney or lateral abdominal wall; or a mid or distal rectal cancer with invasion of prostate, seminal vesicles, cervix, or vagina).
N1a	One regional lymph node is positive		** Tumor that is adherent to other organs or structures, grossly, is classified cT4b. However, if no tumor is present in the adhesion, microscopically, the classification should be pT1-4a depending on the anatomical depth of wall invasion. The V and L classification should be used to identify the presence or absence of vascular or lymphatic invasion whereas the PN prognostic factor should be used for perineural invasion.
N1b	Two or three regional lymph nodes are positive		
N1c	No regional lymph nodes are positive, but there are tumor deposits in the subserosa, mesentery, or nonperitonealized pericolonic, or perirectal/mesorectal tissues		
N2	Four or more regional lymph nodes are positive		
N2a	Four to six regional lymph nodes are positive		
N2b	Seven or more regional lymph nodes are positive		

Εικόνα 2. Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Venook AP et al. NCCN Guidelines Version 2.2019 Colon Cancer Continue NCCN Guidelines PanelDisclosure 2019 .

Στο υποθετικό σενάριο όπου η νόσος είναι εντοπισμένη στο παχύ έντερο και όπου δε διαπιστώνονται απομακρυσμένες μεταστάσεις, το ιατρικό ερώτημα που προκύπτει αφορά τη χορήγηση ή μη επικουρικής χημειοθεραπείας . Στο στάδιο I του καρκίνου του παχέος εντέρου η παρακολούθηση του ασθενή χωρίς την εφαρμογή επικουρικής χημειοθεραπείας είναι η συνιστώμενη τακτική . Στο στάδιο II , αναλόγως της ύπαρξης ή όχι μικροδορυφορικής αστάθειας (MMR deficiency- Microsatellite High tumor) και αφού ληφθούν υπόψη συγκεκριμένοι παράγοντες κινδύνου, καθορίζεται το αν ένας ασθενής κρίνεται ότι ανήκει στην ομάδα υψηλού κινδύνου και χρήζει επικουρικής χημειοθεραπείας, ενώ για την κατηγορία χαμηλού κινδύνου η παρακολούθηση είναι η θεραπευτική στρατηγική εκλογής(22)(23)(24). Για τους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με νόσο σταδίου III η χρήση επικουρικής χημειοθεραπείας για χρονικό διάστημα τριών

έως έξι μηνών κρίνεται επιβεβλημένη, εφόσον δε συντρέχουν απαγορευτικοί λόγοι για την εφαρμογή της και δεν υπάρχουν αντενδείξεις(21)(22).

4. Μεταστατικός καρκίνος παχέος εντέρου.

Για τους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με νόσο σταδίου IV, ήτοι εμφανίζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις, σκοπός είναι η επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης και η διασφάλιση όσο το δυνατόν καλύτερης ποιότητας ζωής (quality of life) με την εφαρμογή χημειοθεραπείας. Μεταξύ των ασθενών που πάσχουν από μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, ιδιαίτερη κατηγορία αποτελούν οι έχοντες oligometastatic νόσο (25). Σε αυτή την κατηγορία των ασθενών σκοπός είναι η εφαρμογή χημειοθεραπείας με σκοπό τη μετατροπή της νόσου σε δυνητικά χειρουργήσιμη, ώστε τελικά να εξαιρεθεί πλήρως μαζί με τις απομακρυσμένες εντοπίσεις στον ίδιο ή σε διαφορετικούς χειρουργικούς χρόνους (26). Η τακτική αυτή αποσκοπεί στη βελτίωση τόσο του διαστήματος που ασθενής παραμένει χωρίς πρόοδο νόσου (PFS- Progression Free Survival) όσο και της συνολικής επιβίωσης (OS- Overall Survival) (27).

Τα τελευταία χρόνια η συνολική επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου έχει εμφανίσει σημαντική βελτίωση φτάνοντας ή και ξεπερνώντας ακόμη και τους 30 μήνες μέσης συνολικής επιβίωσης. Το χρονικό διάστημα αυτό έχει ουσιαστικά διπλασιαστεί κατά την τελευταία εικοσαετία. Μεταξύ των λόγων που έχουν οδηγήσει στη βελτίωση αυτή, σημαντική θέση κατέχει η στενότερη παρακολούθηση και η βελτίωση των μεθόδων ανίχνευσης πιθανής υποτροπής μετά την αφαίρεση πρώιμου καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι ασθενείς υποβάλλονται σε απεικονιστικές και αιματολογικές εξετάσεις σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα με τελικό αποτέλεσμα την πιο έγκαιρη διάγνωση υποτροπής και συνεπώς τη ριζική της αντιμετώπιση (2). Ένας επιπλέον σημαντικός λόγος, όπως ήδη προαναφέρθηκε, είναι και η εφαρμογή της μεθόδου της μεταστασεκτομής ή και η κατάλυση- καυτηριασμός των μεταστατικών εναποθέσεων, καθιστώντας τον ασθενή ουσιαστικά ελεύθερο νόσου, συμβάλλοντας έτσι στη βελτίωση της μέσης συνολικής επιβίωσης των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (28).

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στη θεραπευτική του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελεί τον πιο σημαντικό λόγο βελτίωσης του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών. Η εφαρμογή στην καθημερινή πρακτική νέων κυτατροτοξικών παραγόντων, αλλά και η χρήση στοχευτικών παραγόντων, μετά την εφαρμογή κατάλληλων βιοδεικτών, οδήγησαν σε θεαματικά αποτελέσματα κατά τη

διαχείριση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Η πληθώρα των θεραπευτικών επιλογών σε συνδυασμό με την εξατομικευμένη αντιμετώπιση αλλά και η διαδοχή των θεραπειών αυτών κατά τη συνολική διαχείριση του ασθενούς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση της μέσης συνολικής επιβίωσης των ασθενών(2).

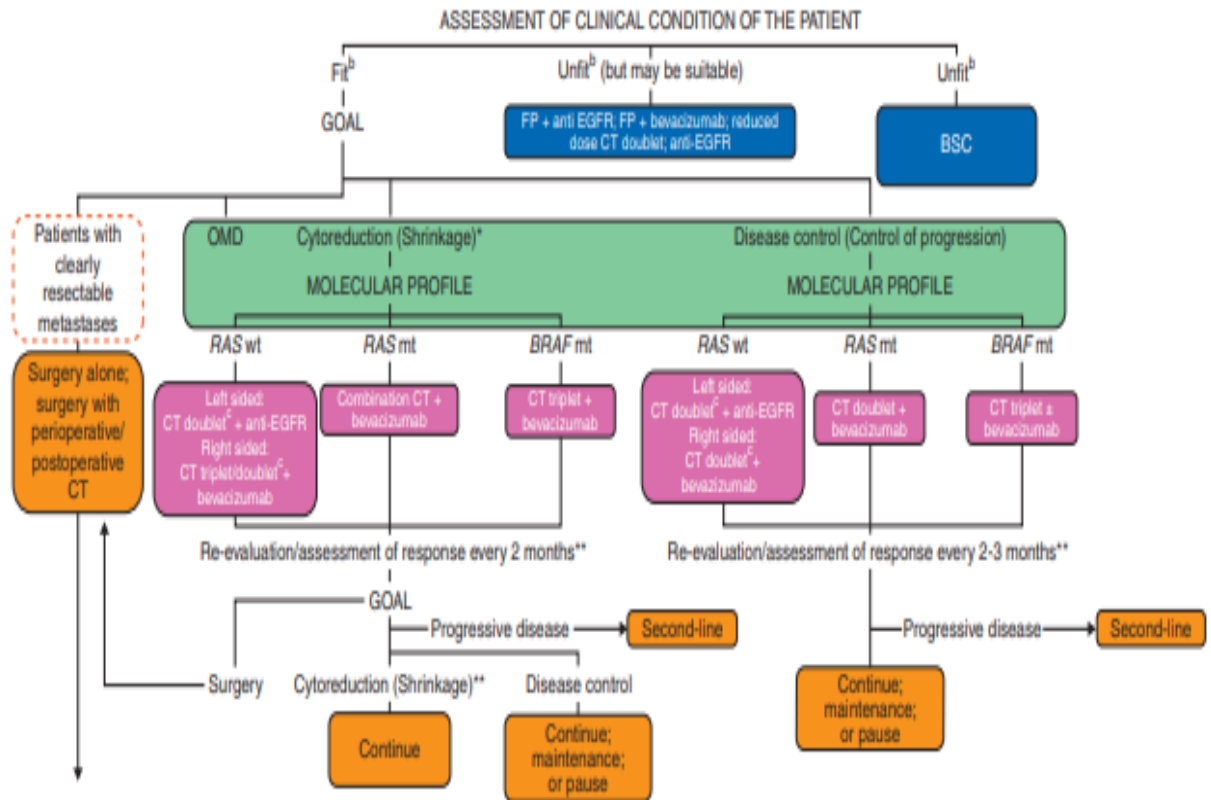
5. Επιλογή κατάλληλης θεραπείας για το μεταστατικό κολορρθικό καρκίνο.

Η αντιμετώπιση του μεταστατικού κολορρθικού καρκίνου στηρίζεται στη χρήση κυτταροτοξικών αλλά και βιολογικών παραγόντων-στοχευτικών θεραπειών. Τα κλασσικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται είτε μόνα τους ή σε συνδυασμούς, συμπεριλαμβάνουν τη 5-φθοριουρακίλη (5 Fluorouracil), την οξαλιπλατίνη (oxaliplatin), την ιρινοτεκάνη (irinotecan), την καπεσιταβίνη (capecitabine) και την τριφλουριδίνη-τιπιρακίλη (trifluridinetipiracil). Οι βιολογικές θεραπείες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπεριλαμβάνουν τους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab), ziv-aflibercept, ραμουσιρουμάμπη (ramucirumab) και ρεγκοραφενίμπη (regorafenib) (2)(21). Τα τελευταία χρόνια με την πρόοδο στη μοριακή ανάλυση των κακοηθειών, η ανοσοθεραπεία εισήχθη ως επιλογή σε πολλά διαφορετικά νεοπλάσματα μεταξύ των οποίων και ο μεταστατικός κολορρθικός καρκίνος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα nivolumab και pembrolizumab, αντι-PD1 (αντι-Programmed Death) αντισώματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις κολορρθικού καρκίνου με μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite instability, MSI high, deficient MMR)(29)(30). Τέλος, αναλόγως των αποτελεσμάτων του μοριακού ελέγχου που γίνεται στον ιστό του ασθενούς, εξετάζοντας την ύπαρξη ή όχι μεταλλάξεων στα γονίδια *KRAS*, *NRAS* και *BRAF*, αποφασίζεται η προσθήκη ή μη anti-EGFR αντισωμάτων cetuximab και panitumumab(31)(32)(33).

Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας είναι ο στόχος της θεραπείας, δηλαδή εάν χρειάζεται επιθετική αντιμετώπιση ή παρηγορητική θεραπεία με σκοπό την επιμήκυνση της ζωής του ασθενούς. Ένας δεύτερος παράγοντας, που καθορίζει τη θεραπεία που θα χορηγηθεί, είναι η χρονική στιγμή που λαμβάνεται η απόφαση για τη θεραπευτική επιλογή, εάν δηλαδή πρόκειται για την πρώτη γραμμή της θεραπείας ή για μεταγενέστερη γραμμή θεραπευτικής παρέμβασης. Από τους σημαντικότερους παράγοντες είναι φυσικά το μοριακό προφίλ, το οποίο έχει ο όγκος, και το είδος των μεταλλάξεων, που αυτός φέρει, όπως προκύπτει από τον μοριακό έλεγχο, που έχει γίνει στον αρχειακό ιστό. Δεν πρέπει να παραλείψουμε το προφίλ της τοξικότητας, που έχουν τα διάφορα φάρμακα και

λαμβάνοντας υπόψη τόσο την έκταση της νόσου όσο και τη γενική κατάσταση του ασθενούς γίνεται και η αντίστοιχη επιλογή(2).

Συνεκτιμώντας όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες, επιλέγεται τελικά το ιδανικότερο για τον ασθενή θεραπευτικό σχήμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η θεραπευτική αντιμετώπιση ενός ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου είναι μία συνεχής διαδικασία, κατά την οποία γίνεται η εναλλαγή των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών με βάση την ανταπόκριση του ασθενούς και την τοξικότητα, που η καθεμία μπορεί να εμφανίσει. Καμία θεραπεία δεν είναι ανεξάρτητη από την προηγούμενη, που έχει χορηγηθεί και πρέπει να υπάρχει ένα σχέδιο πρόβλεψης για τα πιθανά σενάρια εξέλιξης του ασθενούς. Σαν αρχική θεραπευτική επιλογή για ασθενή με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου ο οποίος βρίσκεται σε καλή γενική κατάσταση προτείνεται η χορήγηση FOLFOX(oxaliplatin, fluorouracil, leucovorin), FOLFIRI(irinotecan, fluorouracil, leucovorin), 5FU/LV(fluorouracil, leucovorin), capecitabine, CAPEOX(capecitabine, oxaliplatin) ή FOLFOXIRI(irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, leucovorin) με την ταυτόχρονη χορήγηση ή μη στοχευτικής θεραπείας(2)(21).**(Εικόνα 3)**



Εικόνα 3. Θεραπευτικός αλγόριθμος για την αντιμετώπιση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου και οι αντίστοιχες θεραπευτικές επιλογές. Yoshino T et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS; Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-abstract/29/1/44/4634047>

6. Βιοδείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναλόγως της πληροφορίας που αυτοί προσφέρουν. Μπορεί να είναι προγνωστικοί, παρέχοντας πληροφορία σχετικά με την τελική έκβαση, που θα έχει ο ασθενής, ανεξαρτήτως της εφαρμογής θεραπείας, ή προβλεπτικοί, που παρέχουν πληροφορία για την αποτελεσματικότητα μιας θεραπείας και τις επιπτώσεις της με την εφαρμογή της στο θεραπευτικό χειρισμό του ασθενούς. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η χρήση των βιοδεικτών στις περιπτώσεις των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου καθορίζει και την επακόλουθη θεραπευτική επιλογή. Στην ιδεατή περίπτωση ένας βιοδείκτης θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για προγνωστικούς ή μόνο για προβλεπτικούς σκοπούς, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου ένας βιοδείκτης μπορεί να παρέχει τόσο προγνωστική όσο και προβλεπτική πληροφορία (34)(35). Για παράδειγμα, στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση του υποδοχέα 2 του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*HER2*) παρέχει προγνωστική πληροφορία αλλά και προβλεπτική σχετικά με την απάντηση του ασθενούς στη χορήγηση τραστουζουμάμπης (*trastuzumab*)(36).

Όσον αφορά το μεταστατικό κολορρθικό καρκίνο η αναζήτηση των βιοδεικτών στο βιοπτικό υλικό κρίνεται απαραίτητη πριν από την έναρξη των θεραπευτικών χειρισμών. Το υλικό, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση των βιοδεικτών, συνήθως, είναι το αρχειακό υλικό από το αρχικό χειρουργείο, στο οποίο υπεβλήθη ο ασθενής, ή το υλικό από την ενδοσκόπηση που οδήγησε αρχικά στη διάγνωση. Στην πλειοψηφία των ασθενών υπάρχει τέτοιο διαθέσιμο βιοπτικό υλικό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Παρ' όλα αυτά, στο 20% περίπου των ασθενών δεν υπάρχει αρχειακό υλικό διαθέσιμο και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται υλικό που έχει ληφθεί από μεταστατική εστία ή νέο υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο,(2).

Ο παθολογοανατόμος παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των βιοδεικτών, ο οποίος μπορεί να γίνει σε πιστοποιημένο εργαστήριο. Από τον ενδεδειγμένο έλεγχο του δείγματος του ιστού θα πρέπει να επιλεγεί το πιο κατάλληλο τμήμα, στο οποίο θα εμπεριέχεται ικανός αριθμός νεοπλασματικών κυττάρων για να γίνει σε αυτό, με αξιοπιστία, η ανάλυση των βιοδεικτών. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία κατά την ανίχνευση *KRAS* και *NRAS* μεταλλάξεων, διότι μικρό ποσό νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα(37). Πριν από την απομόνωση του DNA ο κατάλληλος έλεγχος με χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης οδηγεί στην επιλογή του

τμήματος του ιστού που είναι και το πιο αντιπροσωπευτικό για τον όγκο. Εάν στο ιστικό δείγμα εμπεριέχονται λιγότερα από 30% νεοπλασματικά κύτταρα, ενέχεται ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, ενώ το δείγμα δύναται να αξιολογηθεί, εφόσον εμπεριέχει ένα ποσοστό της τάξης του 50% νεοπλασματικών κυττάρων (38)(39).

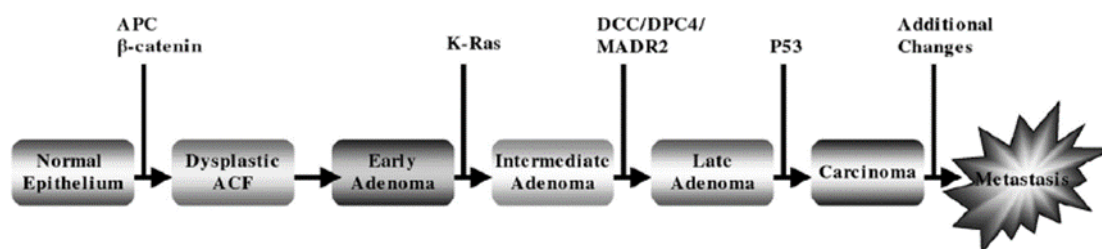
Το ζήτημα της συμφωνίας των αποτελεσμάτων του ελέγχου των βιοδεικτών μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστάσεων έχει διερευνηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία (2)(40). Υπάρχουν μελέτες που καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα είναι ταυτόσημα σε πολύ υψηλά ποσοστά, ενώ στον αντίποδα υπάρχουν και βιβλιογραφικές αναφορές ασυμφωνίας που αγγίζουν και το 30% (2) (40). Εφ' όσον, όμως, ληφθούν υπόψη οι τεχνικές, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτές τις μελέτες, όσο και το πλήθος των δειγμάτων, που κάθε φορά εξετάστηκε σε αυτές, τότε το ποσοστό ασυμφωνίας κατά τον έλεγχο των βιοδεικτών μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας κυμαίνεται περίπου στο 5% (40). Τα δεδομένα αυτά συγκλείουν στην άποψη ότι, για τον έλεγχο των βιοδεικτών, τόσο ο αρχειακός ιστός από τον όγκο, όσο και υλικό από μεταστατική εστία, μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο τους. Σε κάθε ασθενή με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου είναι απαραίτητο να γίνεται έλεγχος μεταλλάξεων των *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* γονιδίων καθώς και έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας.

6.1. RASμεταλλάξεις.

Οι μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό, που επηρεάζουν τη λειτουργία ή την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, θεωρούνται οι κύριες αιτίες καρκινογένεσης ((2). Μια οικογένεια γονιδίων τα οποία ανευρίσκονται πολύ συχνά μεταλλαγμένα στις ανθρώπινες νεοπλασίες είναι τα *RAS* ογκογονίδια. Η επίπτωση της μετάλλαξης τους αφορά περίπου το ένα τρίτο των νεοπλασμάτων(41) . Η ακριβής θέση της μετάλλαξης είναι διαφορετική μεταξύ των νεοπλασμάτων. Τα κυτταρικά ομόλογα των ιικών Harvey και Kirsten transforming ras αλληλουχιών ανακαλύφθηκαν στο γονιδίωμα αρουραίων το 1981(41). Τα ογκογονίδια ονομάστηκαν αντίστοιχα *HRAS* και *KRAS*. Τα τρία λειτουργικά ογκογονίδια της οικογένειας *RAS*, *KRAS*, *NRAS* και *HRAS* κωδικοποιούν παρόμοιες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 21KDa.

κυτταρική επιβίωση. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer. 2003;3(6):459–65.

Οι *RAS* μεταλλάξεις φαίνεται ότι είναι πρώιμα γεγονότα στη διαδικασία της καρκινογένεσης (43). *KRAS* και *NRAS* μεταλλάξεις έχουν ανευρεθεί και σε προκαρκινωματώδεις βλάβες του παχέος εντέρου, του παγκρέατος, του πνεύμονα αλλά και του δέρματος (41) (43) (44). Η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου θεωρείται ότι περνά από τρία διαδοχικά στάδια. Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αδενώματος-πολύποδα στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Σε κάποιες περιπτώσεις αυτή η πρώτη βλάβη αυξάνει σε μέγεθος και με την εξέλιξή της εμφανίζεται και κακοήθης ιστός σε αυτή σηματοδοτώντας το δεύτερο εξελικτικό στάδιο. Στο τρίτο στάδιο υπάρχει διηθητικός καρκίνος (**Εικόνα 5**). Σε όλα τα προαναφερθέντα στάδια έχουν ανιχνευθεί μεταλλαγμένα *RAS* γονίδια υποστηρίζοντας την πρώιμη θέση τους στην καρκινογένεση(43)(44).



Εικόνα 5. Το μοντέλο της καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η εξέλιξη από το φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο σε καρκίνο με την επίδραση των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στην πορεία αυτή.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell . 1990 Jun 1 [61(5):759–67.

Οι μεταλλάξεις των *RAS* ογκογονιδίων ανιχνεύονται σε ποσοστό 30-40% των ασθενών (47)(48). Αναδρομικές αναλύσεις, που αξιολογούν τη δραστηριότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (anti-EGFR αντισώματα cetuximab και panitumumab) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ασθενείς με μεταλλάξεις στο εξόνιο 2 του *KRAS* (κωδικόνια 12,13) δεν έχουν όφελος από τη χορήγηση των αντισωμάτων αυτών (45). Επιπρόσθετα, νεότερες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, πέραν των προαναφερθέντων μεταλλάξεων, επιπρόσθετες μεταλλάξεις στα εξόνια 3, 4 του *KRAS*, αλλά και μεταλλάξεις στα εξόνια 2,3,4 του *NRAS*, είναι ενδεικτικές αντίστασης στη θεραπεία με

τα μονοκλωνικά αντισώματα cetuximab και panitumumab (46). Στην περίπτωση δε , που συνδυαστούν με χημειοθεραπεία βασισμένη στην οξαλιπλατίνη όχι μόνο δεν προσφέρουν όφελος αλλά μπορεί να είναι και επιζήμια για τον ασθενή, εφόσον αυτός φέρει κάποια από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις.

Η μελέτη PRIME, στην οποία οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν panitumumab και FOLFOX, έναντι FOLFOX ως μονοθεραπεία, δημοσίευσε δεδομένα όπου ένα ποσοστό 17% των ασθενών, που είχαν θεωρηθεί, αρχικά, ως μη φέροντες μεταλλάξεις *RAS* (*RAS* wild type) είχαν τελικά κάποια μετάλλαξη *RAS* στον όγκο (33). Αυτοί οι ασθενείς όχι μόνο δεν είχαν βελτίωση με τη χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος, αλλά κατέληξαν να έχουν και χειρότερο Progression Free Survival (PFS) και Overall Survival (OS) σε σχέση με τους ασθενείς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία, αν και το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Σε αντίθεση με τα δεδομένα αυτά, ασθενείς οι οποίοι δεν έφεραν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *RAS* (*RAS* wildtype) στον όγκο είχαν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα με τη χορήγηση του anti-EGFR μονοκλωνικού αντισώματος (33). Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τη μελέτη PEAK, στην οποία αξιολογήθηκε η δραστηριότητα του panitumumab έναντι του αντιαγγειογενετικού bevacizumab (47)

Τα αποτελέσματα για το panitumumab βρίσκονται σε συμφωνία με τα δημοσιευθέντα αποτελέσματα για το έτερο μονοκλωνικό αντίσωμα cetuximab. Στους πληθυσμούς της μελέτης CRYSTAL (49) και OPUS (50), η εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική BEAMing-digital PCR χρησιμοποιήθηκε αναδρομικά για την ταυτοποίηση *RAS* μεταλλάξεων. Η CRYSTAL μελέτησε το συνδυασμό FOLFIRI με cetuximab έναντι του FOLFIRI και η OPUS αξιολόγησε το συνδυασμό FOLFOX με cetuximab έναντι του FOLFOX. Η χρήση της τεχνικής BEAMing-digital PCR είχε ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό 15% των ασθενών της μελέτης CRYSTAL και ένα ποσοστό 30% της μελέτης OPUS, που θεωρούταν αρχικά ως wildtype, να φέρουν τελικά ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *RAS*. Αυτοί οι ασθενείς δεν είχαν όφελος από τη χορήγηση cetuximab, εν αντιθέσει με τους ασθενείς, οι οποίοι δεν είχαν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις και ως εκ τούτου έλαβαν όφελος από τη χορήγηση του μονοκλωνικού anti-EGFR αντισώματος (49)(50).

Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τη μελέτη FIRE -3 όπου αξιολογήθηκε η προσθήκη cetuximab ή bevacizumab σε κυτταροτοξική χημειοθεραπεία (31). Η οριστική επιβεβαίωση προέκυψε μέσω συστηματικής μετα-ανάλυσης εννέα μελετών,

όπου διαπιστώθηκε ότι, οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι δεν είχαν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις των ογκογονιδίων *RAS* είχαν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα με την προσθήκη μονοκλωνικών anti-EGFR αντισωμάτων (31).

Συμπερασματικά, τα στοιχεία αθροιστικά παρέχουν πειστικές αποδείξεις ότι οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι φέρουν κάποια ενεργοποιητική μετάλλαξη των ογκογονιδίων *RAS* δεν έχουν όφελος από τη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι ενεργοποιητικές *RAS* μεταλλάξεις αποτελούν ένα αρνητικό προβλεπτικό βιοδείκτη για τη χορήγηση anti-EGFR στοχευτικής θεραπείας. Συνεπώς οι στοχευτικοί anti-EGFR παράγοντες cetuximab και panitumumab θα πρέπει να χορηγούνται μόνο σε περιπτώσεις μη μεταλλαγμένων *RAS* ογκογονιδίων (*RAS* wild type). Ως εκ τούτου, ο έλεγχος *RAS* μεταλλάξεων, δεδομένου του εξαιρετικού οφέλους που έχει ο ασθενής από την προσθήκη anti-EGFR cetuximab και panitumumab, πρέπει να γίνεται σε κάθε ασθενή με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου κατά τη διάγνωση και πριν από την έναρξη της θεραπείας και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει τα εξόνια 2,3,4 του *KRAS* (codons 12,13,59,61,117,146) και τα εξόνια 2,3,4 του *NRAS* (codons 12,13,59,61,117) με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ογκολογίας (ESMO-European Society for Medical Oncology) και της Αμερικάνικης Επιτροπής Ογκολογίας (ASCO-American Society of Clinical Oncology) (2) (21).

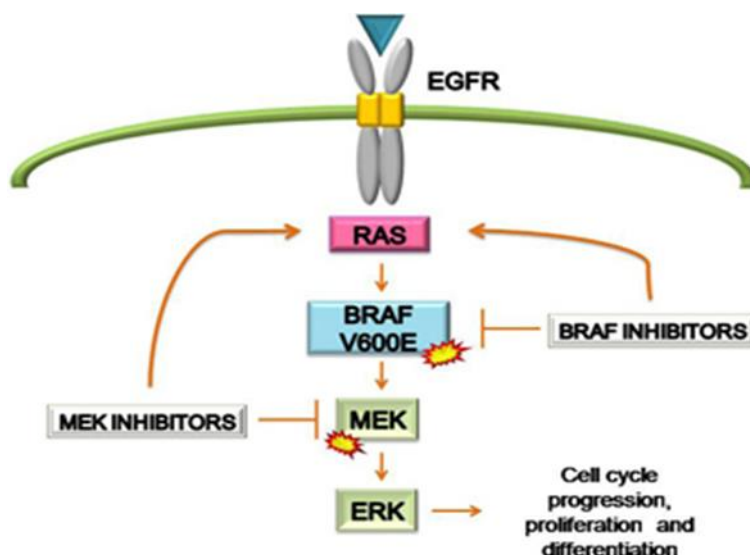
6.2. BRAF μεταλλάξεις

Το πρωτοογκογονίδιο *BRAF* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF η οποία έχει δράση πρωτεϊνικής κινάσης και συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK. Συγκεκριμένα, έχει ρυθμιστικό ρόλο στο προαναφερθέν μονοπάτι, και ως εκ τούτου συμβάλλει στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση.(2)(51) Οι μεταλλάξεις του *BRAF* βρίσκονται σε ένα ποσοστό 8-12% των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου και είναι σχεδόν πάντα αμοιβαία αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις των *RAS* ογκογονιδίων (51). Σχεδόν πάντα ανιχνεύεται η *BRAFV600E* μετάλλαξη η οποία έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση νεοπλασμάτων μεταξύ των οποίων και ο κολοορθικός καρκίνος (2). Αναδρομικές αναλύσεις, που έχουν γίνει διεθνώς, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις του *BRAF* αφορούν κυρίως περιπτώσεις καρκίνου που εντοπίζεται στο δεξί κόλον, με βλεννώδη διαφοροποίηση και με μεγάλη πιθανότητα περιτοναϊκών μεταστάσεων, ενώ συχνά οι *BRAF*

μεταλλαγμένοι καρκίνοι του παχέος εντέρου εκφράζουν και μικροδορυφορική αστάθεια (MSIhigh -MMR deficient) (51)(52). Οι μεταλλάξεις του BRAF αποτελούν ένα σημαντικό αρνητικό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του παχέος εντέρου(2)(52). Η μέση επιβίωση των ασθενών με *BRAF* μεταλλάξεις στον όγκο κυμαίνεται περί τους 10,4 μήνες, εν αντιθέσει με τους μη μεταλλαγμένους όγκους, όπου η μέση επιβίωση των ασθενών ξεπερνά τους 30 μήνες (52)(53).

Όσον αφορά τον προβλεπτικό της ρόλο ως βιοδείκτη, η *BRAF* μετάλλαξη στον καρκίνο του παχέος εντέρου σχετίζεται με αντίσταση στη θεραπεία με μονοκλωνικά anti-EGFR αντισώματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μεταανάλυσεων η χορήγηση μονοκλωνικών anti-EGFR αντισωμάτων είναι πιο αποτελεσματική στους ασθενείς που δεν φέρουν *BRAF* μετάλλαξη(54). Νεότερα δεδομένα, όμως, από τη μελέτη FIRE -3 (55) αλλά και από μικρότερες, φάσης 2 μελέτες (56) , καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη anti-EGFR μπορεί να προσφέρει αρκετά στην ανταπόκριση των ασθενών με *BRAF* μεταλλαγμένους όγκους του παχέος εντέρου . Σύμφωνα με την πληροφορία αυτή , στις περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη μία δραστική μείωση του φορτίου της νόσου μπορεί να χρησιμοποιηθεί anti -EGFR στοχευτική θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό BRAF μεταλλαγμένο καρκίνο του παχέος εντέρου(55)(56).

Επιπρόσθετα , η στόχευση της μετάλλαξης με θεραπευτικά μόρια ειδικά για τη *BRAF* μετάλλαξη αποτέλεσε και αποτελεί πεδίο ερευνών με προσφάτως θετικά αποτελέσματα (57) (58) **(Εικόνα 6)**. Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, και μετά από την αποτυχία μίας ή δύο γραμμών θεραπείας, εξετάσθηκε η χορήγηση BRAF αναστολεών εφόσον ο μοριακός έλεγχος των όγκων ήταν θετικός για τη BRAFμετάλλαξη (57),(58). Παρά τα αρχικά απογοητευτικά αποτελέσματα, προσφάτως δόθηκαν στη δημοσιότητα τα πρώτα θετικά ευρήματα από τις μελέτες BEACON (57) και SWOG (58) , όπου ο συνδυασμός anti-EGFR και *BRAF* αναστολέα κατέληξε σε υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης των *BRAF* μεταλλαγμένων όγκων (57)(58).



Εικόνα 6. Αναστολή του BRAF στο σηματοδοτικό μονοπάτι , σε νεοπλάσματα που φέρουν μετάλλαξη BRAF. Herr R et al , Oncogene ,volume 37, pages1576–1593 (2018)

Συνεπώς, ο έλεγχος για μετάλλαξη του *BRAF* αποτελεί ένα σημαντικό αρνητικό προγνωστικό βιοδείκτη, αφού με τα μέχρι τώρα δεδομένα η πρόγνωση των ασθενών αυτών παραμένει απογοητευτική. Σε αυτές τις περιπτώσεις η θεραπευτική στρατηγική ίσως χρήζει να είναι εξαρχής επιθετική και ως εκ τούτου ο έλεγχος για τη μετάλλαξη πρέπει να γίνεται κατά τη διάγνωση και προ της έναρξης της θεραπείας. Η πληροφορία μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τον αποκλεισμό συνδρόμου Lynch, ενώ παράλληλα παίζει ρόλο στην επιλογή ή μη προσθήκης στοχευτικής anti-EGFR θεραπείας στον ασθενή (59).

6.3. Έλεγχος μικροδορυφορικής αστάθειας- MSI

Οι όγκοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μικροδορυφορική αστάθεια, παρουσιάζουν μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (microsatellites), οι οποίες φαίνεται να αποτελούν πρώιμο γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης και ανευρίσκονται σε ποσοστό 4%-8% των κολοορθικών καρκίνων (2),(60). Πρόκειται κυρίως για ασθενείς νεότερους σε ηλικία, με δεξιά εντόπιση του όγκου, ο οποίος μπορεί να έχει βλεννώδη διαφοροποίηση ή να είναι πτωχά διαφοροποιημένος και συχνά είναι μεταστατικός στη διάγνωση. Πιο συχνά εμφανίζεται σε ασθενείς γυναικείου φύλου και υπάρχει συσχέτιση με την ύπαρξη *BRAF* μετάλλαξης (60) . Οι

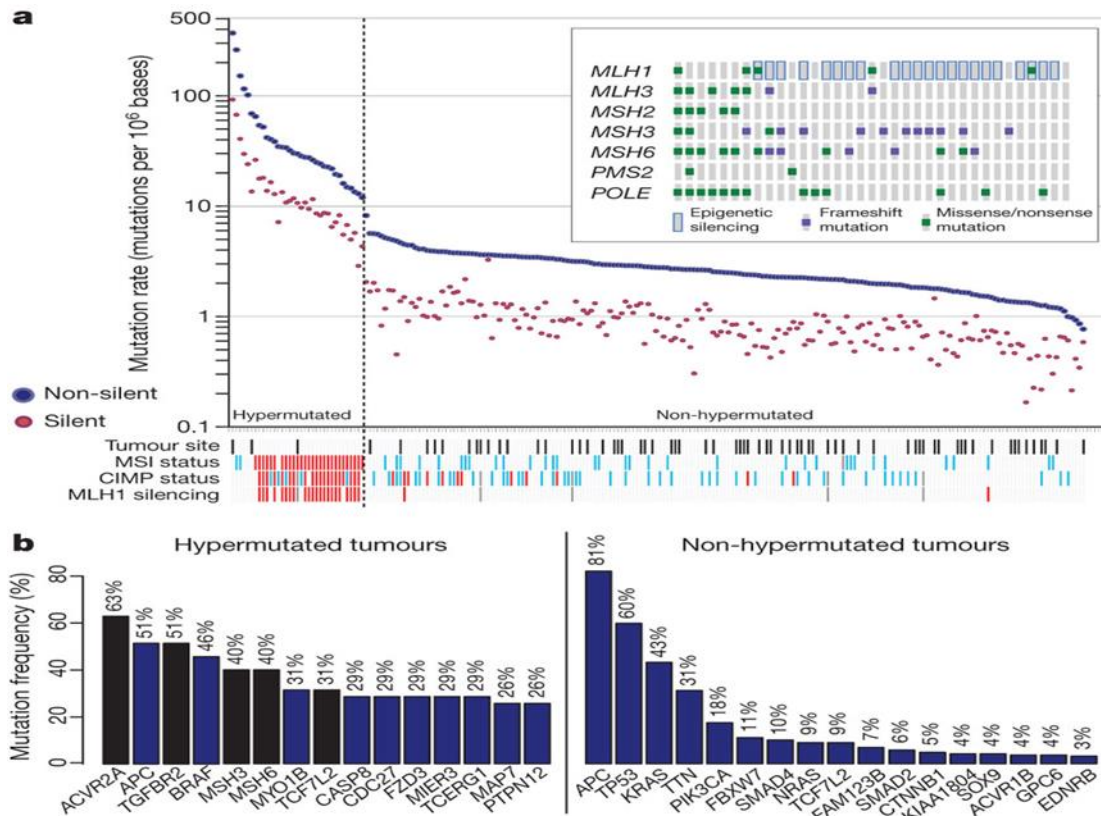
σποραδικές περιπτώσεις κολοορθικού καρκίνου, που έχουν μικροδορυφορική αστάθεια, έχουν συνήθως *BRAF* μετάλλαξη (60).

Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας στα πρώιμα στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελεί θετικό προγνωστικό δείκτη, οι ασθενείς έχουν καλύτερη πρόγνωση και είναι πιθανό να μη χρειαστούν χημειοθεραπεία, εάν ο όγκος τους έχει μικροδορυφορική αστάθεια (1),(2). Εν αντιθέσει, σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, η ύπαρξη μικροδορυφορική αστάθειας αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα και οι ασθενείς, που συνήθως έχουν περιτοναϊκή διασπορά της νόσου έχουν και πτωχό προσδόκιμο (61),(62).

Με την εφαρμογή της ανοσοθεραπείας σε ένα ευρύ φάσμα κακοηθειών, τα τελευταία χρόνια, η μικροδορυφορική αστάθεια απέκτησε και σημαντικό προβλεπτικό ρόλο. Η ύπαρξή της έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση νεοαντιγόνων στο μικροπεριβάλλον του όγκου με αποτέλεσμα οι όγκοι να έχουν ανταπόκριση στη χορήγηση ανοσοθεραπείας (30). Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου σε μεταγενέστερες γραμμές χημειοθεραπείας και εφόσον ο όγκος εμφανίζει μικροδορυφορική αστάθεια είναι δόκιμη επιλογή η χορήγηση ανοσοθεραπείας. Συνεπώς, η μικροδορυφορική αστάθεια αποτελεί ένα βιοδείκτη, που χρήζει εξέτασης στους ασθενείς με μεταστατικό και μη καρκίνο του παχέος εντέρου, τόσο για τον προβλεπτικό όσο και για τον προγνωστικό της ρόλο (30).

6.4. Πρόσθετοι Βιοδείκτες

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου θεωρείται μία νόσος με γενετικό, κυρίως, υπόβαθρο, όπου διαδοχικές γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις οδηγούν τελικά στην καρκινογένεση. Η μοριακή υπογραφή των κολοορθικών καρκίνων έχει μελετηθεί και σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, εκτός από τις μεταλλάξεις των γονιδίων *RAS* και *BRAF* αλλά και την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας, πλήθος άλλων γονιδίων έχουν ανευρεθεί μεταλλαγμένα στους όγκους του παχέος εντέρου, όπως τα *APC*, *TP53*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *CTNNB1*, *SMAD2*, *SOX9* (63) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Η συχνότητα των μεταλλάξεων στον κολοορθικό καρκίνο. Τα γονίδια APC, TP53 και KRAS είναι τα συχνότερα μεταλλαγμένα αλλά στους υπερ-μεταλλαγμένους κολοορθικούς καρκίνους οι μεταλλάξεις του BRAF είναι πιο συχνές.

The Cancer Genome Atlas Network Nature 487, 330-337 (2012)

Στη σύγχρονη βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος βιοδεικτών, οι οποίοι φαίνεται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, είτε λόγω της προγνωστικής αξίας που έχουν ή λόγω της προβλεπτικής τους αξίας για την εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών. Οι τρεις προαναφερθέντες βιοδείκτες (RAS, BRAF, MSI) χρήζουν ελέγχου σε κάθε ασθενή, ο οποίος διαγιγνώσκεται με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο, αλλά το τελικό θεραπευτικό αποτέλεσμα και η εξέλιξη του ασθενούς στην πορεία της νόσου φαίνεται ότι επηρεάζεται και από άλλα μοριακά γεγονότα. Είναι σύνηθες, στην περίπτωση χορήγησης μιας αρχικής θεραπευτικής επιλογής, να εμφανίζεται τελικά αντίσταση εκ μέρους του όγκου καταλήγοντας έτσι σε αποτυχία του σχήματος. Επιπλέον, βιοδείκτες που θα μπορούσαν να εξετασθούν στην περίπτωση μεταστατικού κολοορθικού καρκίνου αλλά δεν αξιολογούνται στην καθημερινή κλινική πρακτική αποτελούν οι εξής.

- Ανίχνευση της μετάλλαξης *PIK3CA* στο εξώνιο 20.

- Απώλεια του *PTEN*.
- Αξιολόγηση των επιπέδων των συνδετών του EGFR επιεγκουλίνη, αμφιεγκουλίνη και TGF- α .
- Αξιολόγηση των επιπέδων της πρωτεΐνης EGFR.
- Αξιολόγηση της ενίσχυσης της έκφρασης του EGFR, του αριθμού των αντιγράφων του και μεταλλάξεων στο εξωτερικό τμήμα του.
- Αξιολόγηση των μεταλλάξεων του HER2 ή της υπερέκφρασής του.
- Αξιολόγηση υπερέκφρασης του HER3 και του υποδοχέα του *MET*.

7. Ο ρόλος των βιοδεικτών στη θεραπευτική του κολορρθικού καρκίνου.

Συνεκτιμώντας τις παραπάνω παθολογονατομικές πληροφορίες αλλά και τις μοριακές αναλύσεις μετά τον έλεγχο των βιοδεικτών και αφού ο ασθενής έχει πλήρως σταδιοποιηθεί, με απεικονιστικές μεθόδους ή/και ενδοσκοπήσεις, όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο, γίνεται η έναρξη της χορήγησης του χημειοθεραπευτικού σχήματος. Σαν κατευθυντήρια οδηγία, ένας ασθενής με μη μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου που χρήζει επικουρικής θεραπείας, λαμβάνει έξι μήνες συνδυασμού φθοριουρακίλης και οξαλιπλατίνης ή μονοθεραπεία με φθοριουρακίλη χωρίς την προσθήκη στοχευτικής θεραπείας, με δόκιμη να θεωρείται πλέον και η χορήγηση συνδυασμού φθοριουρακίλης και οξαλιπλατίνης για τρεις μήνες σε ασθενείς ομάδας χαμηλού κινδύνου (2)(21).

Σε περίπτωση που ο ασθενής διαγνωσθεί με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου τότε είναι επιβεβλημένη, όπως εξάλλου προαναφέρθηκε, η εξέταση του βιοπτικού υλικού για τον καθορισμό των μεταλλάξεων *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* και μικροδορυφορικής αστάθειας MSI. Βάσει των αποτελεσμάτων του μοριακού ελέγχου, της θέσης του όγκου στο δεξί ή αριστερό κόλον και συνεκτιμώντας το φορτίο της νόσου καθορίζεται και η θεραπευτική στρατηγική (64). Η θέση της πρωτοπαθούς εστίας στο παχύ έντερο έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία τα τελευταία χρόνια στη θεραπευτική των ασθενών. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα νέο βιοδείκτη με προγνωστική αλλά και προβλεπτική σημασία. Η ανάλυση υποομάδων ασθενών από τις μεγάλες μελέτες φάσεως III, που διερεύνησαν τη χορήγηση anti-EGFR αντισωμάτων έναντι της αντιαγγειογένεσης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι όγκοι που εντοπίζονται στο αριστερό κόλον έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χορήγηση anti-EGFR στοχευτικής θεραπείας, ενώ αντίθετα οι ασθενείς με εντόπιση του όγκου στο δεξί κόλον ωφελούνται από τη χορήγηση στοχευτικών αντιαγγειογενετικών θεραπειών(31). Η πρόγνωση των ασθενών με εντοπίσεις του όγκου αριστερά επίσης φαίνεται καλύτερη σε σχέση με τους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με μεταστατικό κολορρθικό καρκίνο με εντόπιση στο δεξί κόλον(65).

Οι ασθενείς οι οποίοι δεν φέρουν μεταλλάξεις των *KRAS* και *NRAS* (all *RAS* wild type) λαμβάνουν συνδυασμό χημειοθεραπείας με anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα ενώ οι ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις στα ογκογονίδια αυτά λαμβάνουν συνδυασμό

κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας με αντιαγγειογενετικό παράγοντα. Η ένταση του χημειοθεραπευτικού σχήματος το οποίο θα χρησιμοποιηθεί και οι συνδυασμοί εξαρτώνται και από τον πρωτεύοντα σκοπό της παρέμβασης. Σε περιπτώσεις που ο σκοπός είναι η παράταση της επιβίωσης, λιγότερο επιβαρυντικά σχήματα επιλέγονται, ενώ στις περιπτώσεις όπου στόχος είναι η γρήγορη κυτταρομείωση ή και η μετατροπή μιας αρχικά ανεγχείρητης νόσου σε χειρουργήσιμη, επιλέγονται πιο τοξικοί συνδυασμοί (π.χ. τριπλέτα FOLFIRINOX)(2)(64).

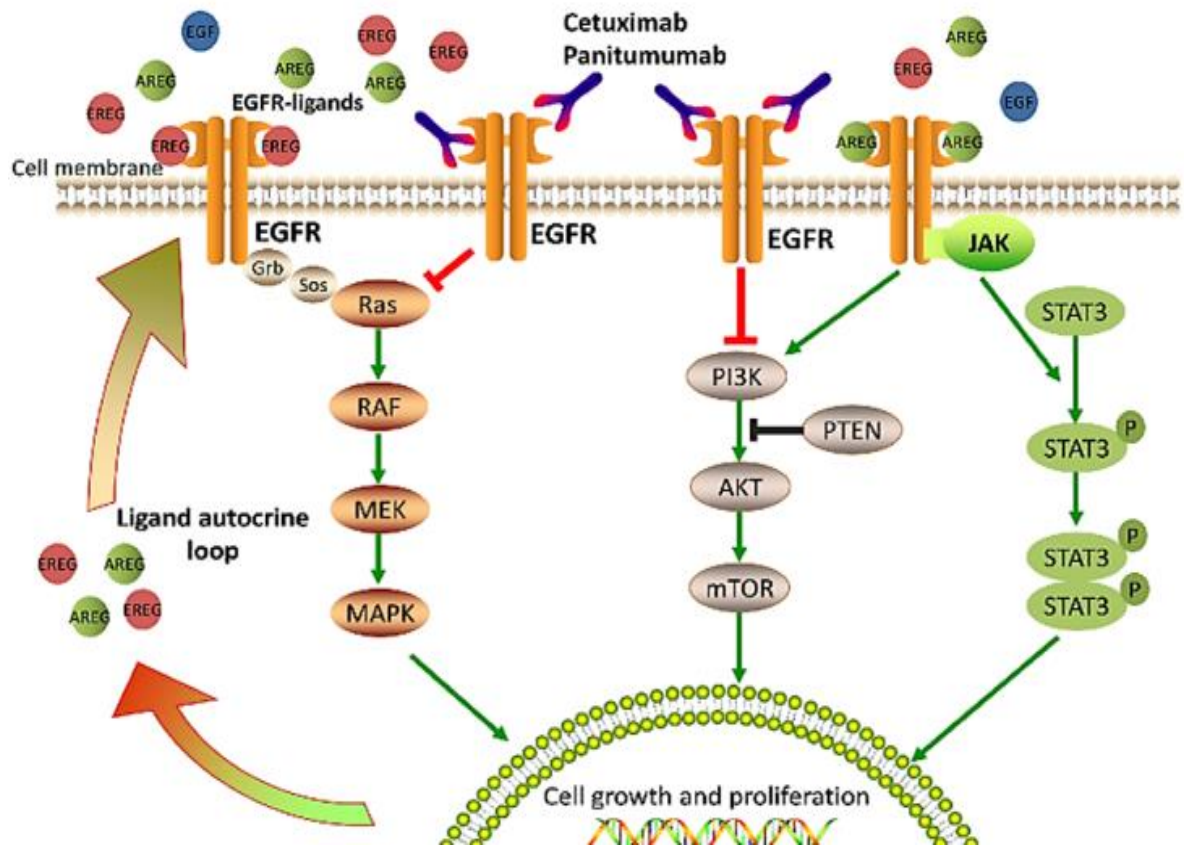
Οι ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο *BRAF* δεν απαντούν στη χορήγηση anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων και ως εκ τούτου είναι υποψήφιοι για τη χορήγηση αντιαγγειογενετικής θεραπείας σε συνδυασμό με την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία (2)(21). Μόνη εξαίρεση, σύμφωνα με τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα αποτελεί και στην περίπτωση αυτή η ανάγκη για γρήγορη κυτταρομείωση ή για ριζική χειρουργική εξαίρεση σε δεύτερο χρόνο όπου επιλέγεται η χορήγηση anti-EGFR αντισώματος σε συνδυασμό με κυτταροτοξική χημειοθεραπεία (55).

Μετά την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής για τους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, ανά τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται εργαστηριακός έλεγχος και απεικονιστικός έλεγχος για τη διαπίστωση του θεραπευτικού αποτελέσματος. Ο ασθενής συνεχίζει τη χημειοθεραπεία και μετά το τέλος της πρώτης γραμμής μπορεί να τεθεί σε παρακολούθηση ή σε θεραπεία συντήρησης με φθοριοπυριμιδίνη με ή χωρίς μπεβασιζουμάμπη ως αντιαγγειογενετικό. Εάν οποιαδήποτε χρονική στιγμή διαπιστωθεί κλινικοεργαστηριακή επιδείνωση της νόσου τότε ο ασθενής τίθεται σε χημειοθεραπευτικό σχήμα δεύτερης ή περαιτέρω γραμμής (64).

8. Η θεωρία της αντίστασης στη θεραπεία.

Οι ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία με σκοπό τη συρρίκνωση της νόσου και την επακόλουθη παράταση του προσδόκιμου επιβίωσής τους, όπως ήδη προαναφέρθηκε. Σε τακτά χρονικά διαστήματα υποβάλλονται σε απεικονιστικές εξετάσεις, με σκοπό την πιστοποίηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία ή την πιθανή πρόοδο νόσου, γεγονός που θα σηματοδοτήσει την ανάγκη για τον καθορισμό νέας θεραπευτικής στρατηγικής. Όπως ήδη εκτενώς αναλύθηκε η θεραπεία καθορίζεται λαμβάνοντας υπόψη το μοριακό προφίλ του όγκου όπως αυτό αναδεικνύεται μέσω των βιοδεικτών που έχουν ελεγχθεί. Είναι αναμενόμενο πως κάποια χρονική στιγμή κατά την παρακολούθηση των ασθενών και την υποβολή τους σε χημειοθεραπεία θα εμφανιστεί πρόοδος της νόσου, ήτοι κλινική και απεικονιστική επιδείνωση.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία παρουσιάζονται τα τελευταία χρόνια, η επιδείνωση που εμφανίζει ο κάθε ασθενής στη λαμβανόμενη χημειοθεραπεία είναι το αποτέλεσμα μιας υποκείμενης βιολογικής διαδικασίας σε γενετικό επίπεδο(66). Πιο συγκεκριμένα και ειδικά για τους ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν μεταλλάξεις των *RAS* ογκογονιδίων και οι οποίοι λαμβάνουν μονοκλωνικό anti-EGFR αντίσωμα ως μέρος της θεραπείας τους έχει περιγραφεί το φαινόμενο της αντίστασης στους anti-EGFR παράγοντες λόγω της εμφάνισης μεταλλάξεων κατά την εξέλιξη της νόσου αλλά και λόγω της γενετικής ετερογένειας που έχει ο όγκος όπου υπό φυσιολογικές συνθήκες η απουσία *RAS*μετάλλαξης συνεπάγεται και αποτελεσματικότητα των αντι-EGFR παραγόντων (67) (**Εικόνα 8**).

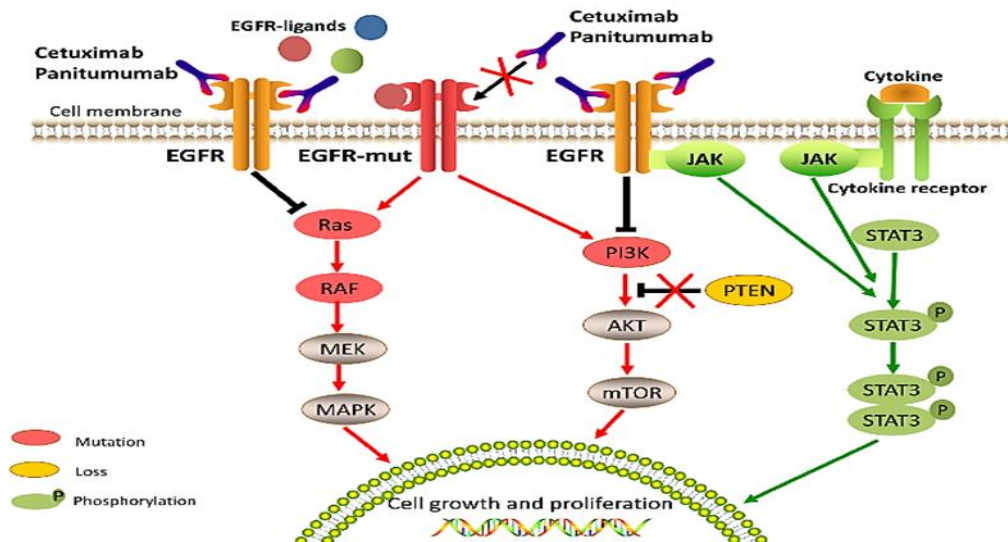


Εικόνα 8. Οι μηχανισμοί δράσης των αντι-EGFR στοχευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι συνδέτες του EGFR συνδέονται στο εξωκυττάριο τμήμα του και ενεργοποιούν σηματοδοτικές οδούς για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα εμποδίζουν τη σύνδεση αυτή. Zhao et al. Oncotarget. 2017 Jan 17;8(3):3980–4000.

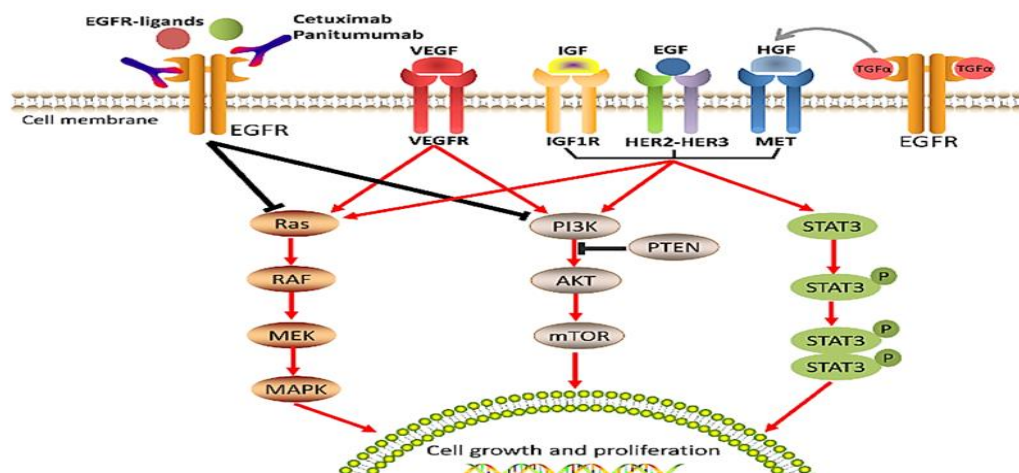
Το γονιδίωμα των όγκων και ιδιαίτερα των μεταστατικών είναι εξαιρετικά ετερογενές. Ένας όγκος ο οποίος ανιχνεύεται με τις σύγχρονες απεικονιστικές μεθόδους απαρτίζεται από εκατομμύρια κύτταρα. Σε μία μόνο καρκινική εστία υπάρχουν εκατοντάδες χιλιάδες κύτταρα τα οποία μπορεί να είναι ήδη ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία που πρόκειται να χορηγηθεί. Η μοριακή υπογραφή του όγκου είναι ετερογενής και αυτή η ετερογένεια αφορά τη γενετική διάσταση που μπορεί να παρατηρηθεί μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστατικών εστιών αλλά και διαφορετικά σημεία της ίδιας της πρωτοπαθούς εστίας. Η καθιερωμένη πρακτική της ιστοικής βιοψίας είναι σε θέση να παρέχει το γενετικό υπόβαθρο του όγκου στη συγκεκριμένη και μόνο λήψη, χωρίς να έχει τη δυνατότητα παροχής πληροφορίας για το γονιδιακό προφίλ των μεταστατικών εστιών (68).

Παράλληλα, πρόσφατη έρευνα φέρνει στο φως τη θεωρία της επίκτητης - δευτερογενούς μετάλλαξης του όγκου η οποία δεν ανιχνεύεται στην αρχή, κατά τη διάγνωση του ασθενούς με την λήψη βιοψίας. Σύμφωνα με τα ερευνητικά δεδομένα η εμφάνιση νέων μεταλλάξεων στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR και συγκεκριμένα η μετάλλαξη S492R, ανευρίσκεται σε ασθενείς οι οποίοι ανταποκρίνονται στην αρχική χορήγηση anti-EGFR αλλά στη συνέχεια επιδεινώνονται ενώ συνεχίζουν να λαμβάνουν anti-EGFR στοχευτική θεραπεία(69). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και στις περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι εμφανίζουν *KRAS* μεταλλάξεις οι οποίες δεν ήταν ανιχνεύσιμες κατά τη διάγνωση και αποτελούν νέο εύρημα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα. Αναδρομικές μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις αυτές του *KRAS* πιθανώς προϋπάρχουν σε μη ανιχνεύσιμα με τις διαθέσιμες τεχνικές επίπεδα και οι οποίες ανιχνεύονται τελικώς όταν ο ασθενής εμφανίσει αντίσταση στη θεραπεία και πρόοδο νόσου(70).

Συμπερασματικά, τόσο η εμφάνιση επίκτητων μεταλλάξεων στον όγκο οι οποίες δεν προϋπάρχουν, αλλά και η ενίσχυση μεταλλάξεων που δεν ήταν ανιχνεύσιμες εξαρχής διαμορφώνουν ένα εξαιρετικά ετερογενές πεδίο όσον αφορά τη βιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου (Εικόνες 9,10).



Εικόνα 9. Μηχανισμοί αντίστασης στη χορήγηση αντι-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων μέσω γενετικών τροποποιήσεων και μεταλλάξεων γονιδίων. Μεταλλάξεις των RAS, RAF, PIK3CA, EGFR, απώλεια του PTEN και φωσφορυλίωση του STAT3 οδηγούν στην αντίσταση μέσω συνεχούς ενεργοποίησης των σηματοδοτικών οδών. Zhao et al. Oncotarget. 2017 Jan 17;8(3):3980–4000



Εικόνα 10. Εναλλακτικές ενεργοποιημένες οδοί που οδηγούν στην αντίσταση στα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα. Εναλλακτικοί αυξητικοί παράγοντες της κυτταρικής μεμβράνης συμπεριλαμβανομένων των IGF-R1, MET, HER2 και VEGFR που παρακάμπτουν τον EGFR και και επάγουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου οδηγώντας σε αντίσταση στη θεραπεία. Zhao et al. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):3980–4000

Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα είναι το ίδιο, η αποτυχία δηλαδή της anti-EGFR στοχευτικής θεραπείας η οποία οδηγεί σε κλινική και απεικονιστική πρόοδο της ασθένειας των ασθενών (71)(72). Σήμερα, για τη λήψη της θεραπευτικής επιλογής ο χρυσός κανόνας είναι η ιστοική βιοψία για τη διάγνωση και την ταυτοποίηση της νόσου χωρίς όμως να παρέχονται πληροφορίες για τη γενετική ποικιλομορφία που έχει ο όγκος αλλά ούτε για το πως αυτή εξελίσσεται χρονικά κατά τη διάρκεια χορήγησης στοχευτικής θεραπείας και δη των anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων (73). Δεν είναι δυνατή η αποτύπωση της εξελικτικής πίεσης που ασκείται στον όγκο από την ίδια τη θεραπεία που λαμβάνουν οι ασθενείς.

Εξάλλου, με τη σύγχρονη κατεύθυνση που ακολουθεί η ογκολογία ως κλάδος η αντιμετώπιση των ασθενών εξατομικευμένα φαίνεται πως θα αποτελέσει το μέλλον της θεραπευτικής. Κάθε όγκος θα αντιμετωπίζεται διαφορετικά, πέραν από την ιστολογική και κλινική εικόνα αλλά με βάση τη μοριακή υπογραφή που έχει. Σε κάθε στάδιο παρακολούθησης και αντιμετώπισης ογκολογικών ασθενών οπ έλεγχος της μοριακής υπογραφής του όγκου θα συμβάλλει καταλυτικά στην εφαρμογή της αντίστοιχης θεραπευτικής επιλογής με σκοπό να ξεπεραστεί η προαναφερθείσα γενετική ποικιλομορφία που οδηγεί τελικά στην αποτυχία των εφαρμοζόμενων στρατηγικών (74).

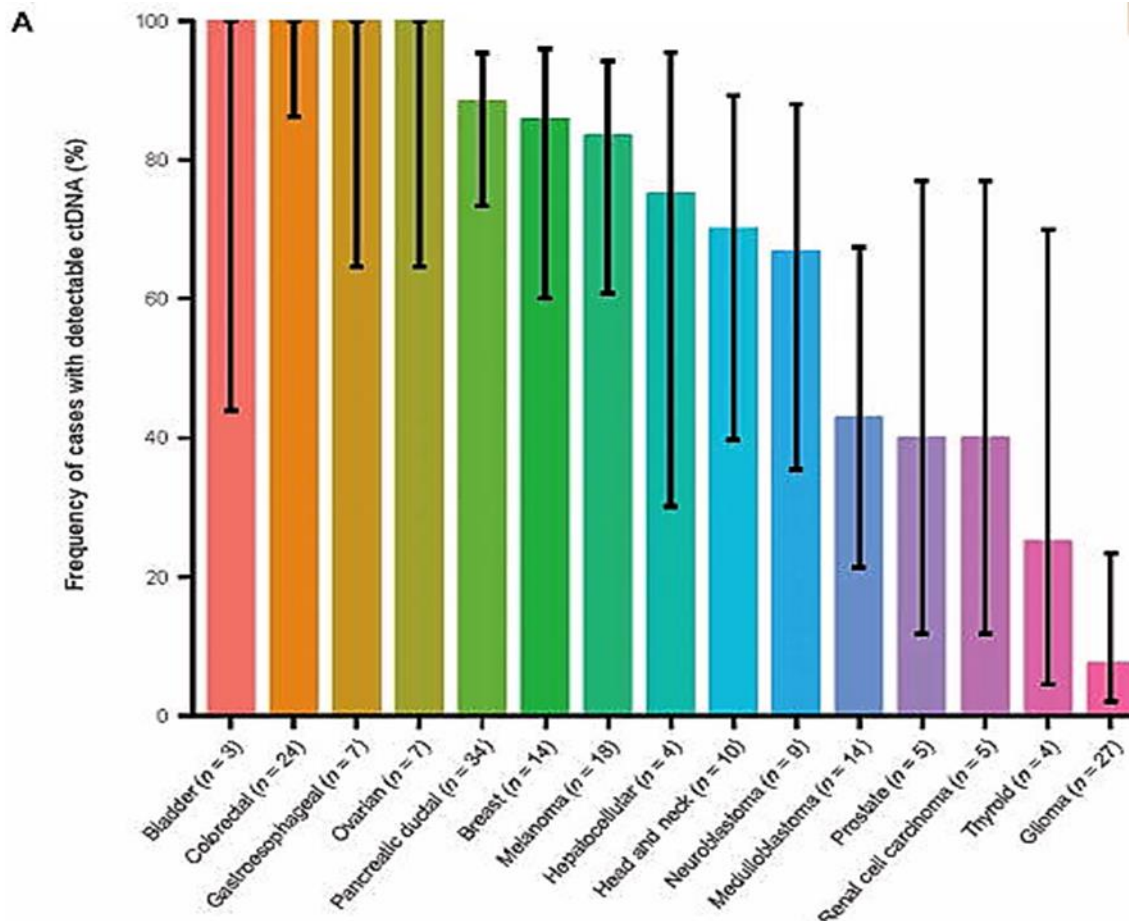
9. Η υγρή βιοψία

Η ιστοική βιοψία αποτελεί το χρυσό κανόνα για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση του καρκίνου. Παρ' όλα αυτά, η χρήση της σήμερα ενέχει πολλούς περιορισμούς. Αρχικά, οι επεμβατικές τακτικές οι οποίες πάντοτε εφαρμόζονται, ακόμη και οι ελάχιστα παρεμβατικές, ενέχουν κινδύνους για τους ασθενείς. Η αιμορραγία, η ρήξη σπλάγχνου, οι επακόλουθες λοιμώξεις, ο πόνος και το κόστος αποτελούν μερικούς μόνο από τους παράγοντες που μπορεί να την καθιστούν μια δυσάρεστη αλλά και επικίνδυνη διαδικασία για τους ασθενείς. Επίσης, δεν είναι σπάνιο το φαινόμενο της αποτυχίας λήψης επαρκούς ή αντιπροσωπευτικού δείγματος από τον όγκο με αποτέλεσμα να χρειάζεται επανάληψη της διαδικασίας. Αξιοσημείωτες είναι και οι περιπτώσεις των ασθενών, όπου η εντόπιση της νεοπλασίας την καθιστά μη προσπελάσιμη με τις διαθέσιμες τεχνικές, με αποτέλεσμα την αδυναμία λήψης βιοψίας και της επακόλουθης ταυτοποίησης της νόσου και συνεπώς της αντιμετώπισής της (75)(3).

Παράλληλα, η κλασσική βιοψία του ιστού έχει σαφείς περιορισμούς χωροχρονικά. Η ετερογένεια που χαρακτηρίζει τους όγκους δεν είναι δυνατό να αποδοθεί μέσω της κλασσικής βιοψίας η οποία αποτυπώνει τη μοριακή φύση του όγκου σε μια δεδομένη χρονική στιγμή και στο υπό εξέταση τμήμα του ιστού. Όπως αναλύθηκε ήδη, μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και των μεταστάσεων που εμφανίζονται σύγχρονα με αυτή υπάρχει γενετική ποικιλότητα. Επιπλέον, το γενετικό προφίλ του όγκου αποτελεί μία δυναμική κατάσταση στο χώρο, συνεχώς μεταβαλλόμενη, που υπόκειται στην εξελικτική πίεση που ασκείται τόσο από τους θεραπευτικούς χειρισμούς όσο και από το μικροπεριβάλλον του όγκου. Δεδομένου ότι, στη σύγχρονη ογκολογία οι στοχευτικές θεραπείες βασισμένες στο μοριακό προφίλ των όγκων αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της συνολικής θεραπευτικής των νεοπλασμάτων, είναι απαραίτητη η πληροφορία της μοριακής υπογραφής των όγκων σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την παρακολούθηση των ασθενών. Είναι εύκολα αντιληπτή η δυσκολία της συνεχούς επέμβασης στους ασθενείς για τη λήψη νέων βιοψιών κάθε φορά που κρίνεται αυτό απαραίτητο, λόγω χάρη στην περίπτωση προόδου της νόσου και ανάγκης για νέα θεραπεία (76).

Τα τελευταία χρόνια η υγρή βιοψία μελετάται εκτενώς ως πιθανή εναλλακτική της κλασσικής ιστοικής βιοψίας. Η υγρή βιοψία αποτελεί μία ελάχιστα παρεμβατική τεχνική με την οποία δίνεται η δυνατότητα απομόνωσης βιολογικού υλικού του όγκου

και συνεπώς η περαιτέρω επεξεργασία του (77). Οι προσδιορισμοί των κυκλοφορούντων καρκινικών κύτταρων (Circulating Tumor Cells-CTCs), του κυκλοφορούντος DNA του όγκου (circulating tumor DNA-ctDNA) και του γενετικού υλικού του όγκου που μπορεί να βρεθεί σε αιμοπετάλια του ασθενούς, αποτελούν τις τεχνικές που μελετώνται εκτενώς προκειμένου να εφαρμοστούν στην κλινική πρακτική (78) . Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα αποτελούν κύτταρα τα οποία, καθώς ο όγκος εξελίσσεται και αποκτά τη δυναμική της μετάστασης, αποσπώνται από τον όγκο και εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία. Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA αποτελεί γενετικό υλικό του όγκου, το οποίο μπορεί να βρεθεί στη συστηματική κυκλοφορία και να απομονωθεί (**Εικόνα 11**). Αποτελεί ένα κλάσμα του συνολικού ελεύθερου DNA το οποίο μπορεί να απομονωθεί από το περιφερικό αίμα. Τα αιμοπετάλια αποτελούν άλλη μία πιθανή πηγή απομόνωσης γενετικού υλικού των καρκινικών κυττάρων. Τα αιμοπετάλια αποτελούν δυνητικούς δέκτες του καρκινικού γενετικού υλικού όπως περιγράφεται αναλυτικά πιο κάτω (78)(79).



Εικόνα 11. Ποσοστά ανίχνευσης κυκλοφορούντος καρκινικού DNA σε ασθενείς με μεταστατικά νεοπλάσματα. Bettegowda et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. Sci Transl Med .2014 Feb 19;6(224):224ra24

Οι κυριότερες τεχνικές της υγρής βιοψίας χρησιμοποιούν το περιφερικό αίμα για την απομόνωση είτε των κυττάρων είτε του γενετικού υλικού του όγκου. Παρ'όλα αυτά, η απομόνωση ctDNA μπορεί να γίνει και από άλλα βιολογικά υγρά του σώματος όπως το πλευριτικό υγρό, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και η σίελος. Τα κόπρανα αποτελούν άλλη μία πηγή απομόνωσης γενετικού υλικού του όγκου (78).

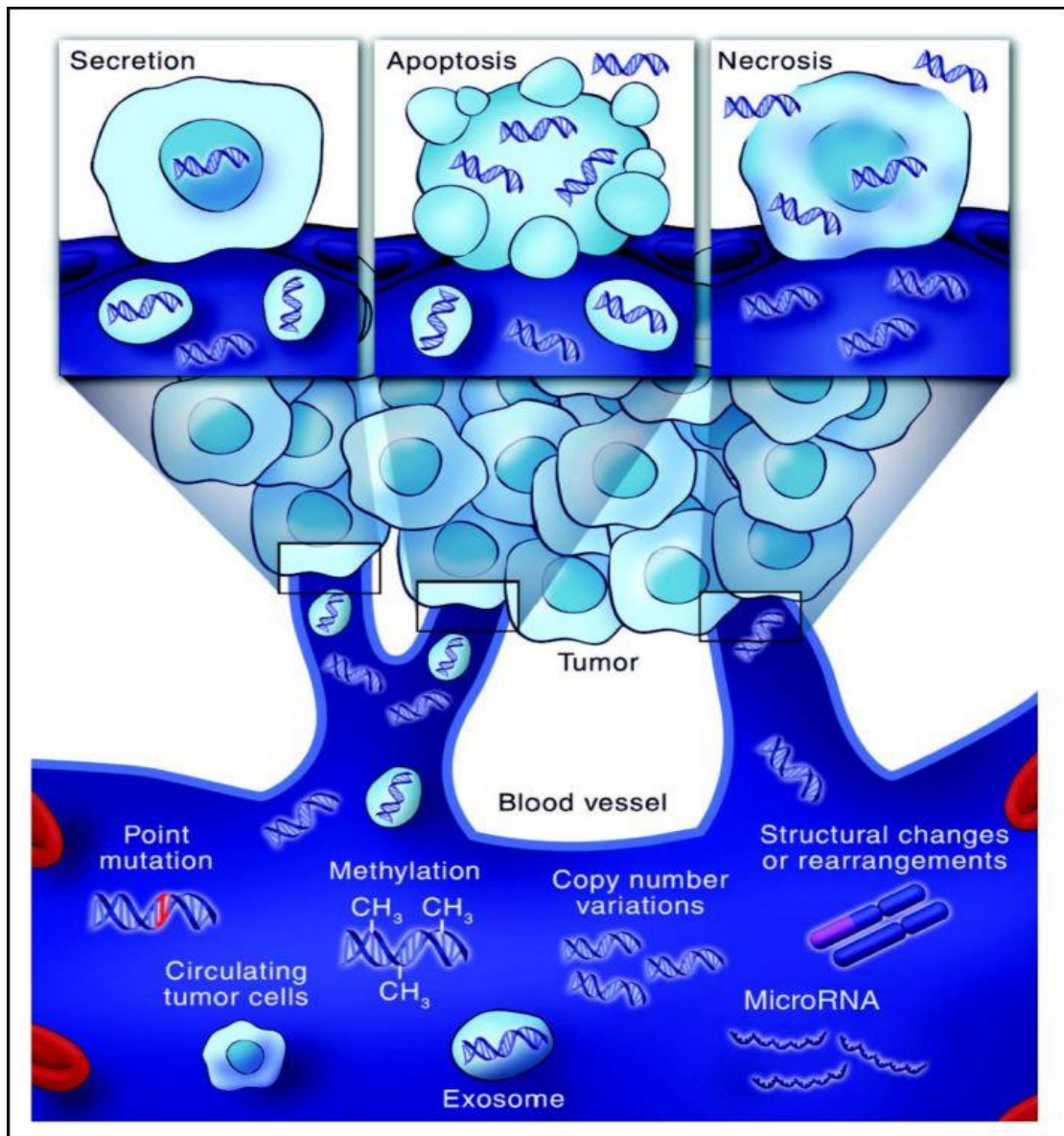
9.1. Circulating Tumor DNA (ctDNA) –Κυκλοφορούν καρκινικό DNA.

Θεμέλιος λίθος για τη μετέπειτα ανάπτυξη της τεχνικής της υγρής βιοψίας αποτελεί η ανακάλυψη ύπαρξης ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA σε υγιή άτομα από τους Mandel και Metais το 1948. Οι αναφορές τους αποτέλεσαν το έναυσμα για την μελέτη και τη δυνατότητα απομόνωσης κυκλοφορούντος καρκινικού DNA από ασθενείς με

κακοήθεια (80). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στο περιφερικό αίμα των ασθενών μπορεί να εντοπιστεί και να απομονωθεί ελεύθερο κυκλοφορούν DNA, το οποίο απελευθερώνεται από τα κύτταρα ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, αφού η άσκηση, καρδιαγγειακά συμβάματα, τραυματισμός και νεφρική δυσλειτουργία επάγουν την έκκρισή του και αύξηση των επιπέδων του στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος (69).

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA, το οποίο μπορεί να απομονωθεί από το περιφερικό αίμα των ασθενών, προέρχεται από την απελευθέρωση του από καρκινικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της απόπτωσης ή της νέκρωσής τους **(Εικόνα12)**. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα προϊόντα της κυτταρικής αποδόμησης καθαίρονται από την κυκλοφορία μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην περίπτωση των όγκων, ο υψηλός μεταβολικός ρυθμός και ο ταχύς πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων οδηγούν στη συσσώρευση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA, το οποίο δεν έχει απομακρυνθεί από τα φαγοκύτταρα (81).

Ο προσδιορισμός του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA μπορεί να βρει πολλές εφαρμογές στα νεοπλάσματα. Με την ταυτοποίηση της ύπαρξής του σηματοδοτείται η ύπαρξη νόσου μετά από ένα ριζικό χειρουργείο, σε περιπτώσεις πρώιμων όγκων (3)(81). Επίσης, μπορεί να αποκτηθεί η μοριακή υπογραφή του όγκου και με τον τρόπο αυτό να γίνει η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, βάση των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται (72)(77). Παράλληλα, δίδεται δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της ετερογένειας του όγκου διαφωτίζοντας την αντίσταση που εμφανίζουν οι όγκοι στη θεραπεία (69)(72)(77).



Εικόνα 12. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν διάφορα τμήματα DNA στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος με διάφορους μηχανισμούς. Γενετικές μεταλλάξεις σχετιζόμενες με τον καρκίνο μπορούν να ανιχνευθούν στο κυκλοφορούν καρκινικό DNA. Diaz LA et al. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. JClinOncol . 2014 Feb 20

9.2. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells – CTCs).

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, τα οποία επίσης βρίσκονται στη συστηματική κυκλοφορία, αποτελούν ελεύθερα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων. Η εμφάνισή τους στο περιφερικό αίμα είναι ανάλογη του φορτίου της νόσου των ασθενών (82). Είναι δυνατή η απομόνωσή τους σε ασθενείς με εκτεταμένη νεοπλασία, όπου και σε αυτές τις περιπτώσεις ο αριθμός τους είναι πάλι μικρός, με ταυτοποίηση ακόμη και λιγότερων

από δέκα κυττάρων σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου (79). Η απομόνωση γίνεται χρησιμοποιώντας φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους, όπως την έκφραση βιοδεικτών και κυρίως του EpCAM ή την έκφραση CD45, καθώς επίσης και βιοφυσικών χαρακτηριστικών τους, γεγονός που σε συνδυασμό με τον μικρό αριθμό τους, καθιστά δύσκολη την απομόνωσή τους (82)(79). Μέχρι σήμερα η μέθοδος CellSearch είναι η μοναδική εγκεκριμένη από τον FDA για την απομόνωση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιώντας την έκφραση του EpCAM στην επιφάνειά τους σε περιπτώσεις μεταστατικών καρκίνων του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου(83).

9.3. Αιμοπετάλια.

Μια ανερχόμενη μορφή ΥΒ η οποία μελετάται εκτενώς στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια και αποτελεί εξαιρετική πηγή απομόνωσης γενετικού υλικού του όγκου είναι τα αιμοπετάλια. Το περιφερικό αίμα περιέχει 150.000-350.000 αιμοπετάλια ανά μικρόλιτρο (84). Η απομόνωση τους είναι σχετικά εύκολη διαδικασία στα εργαστήρια. Μετά την αιμοληψία και την τοποθέτηση του αίματος σε σωληνάρια που περιέχουν EDTA, ακολουθώντας διαδοχικά βήματα φυγοκέντρωσης, τα αιμοπετάλια μπορούν να απομονωθούν από το τελικό υπερκείμενο(85) (86). Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια δεν περιέχουν πυρήνα, τα RNA μετάγραφα τους, προέρχονται, κυρίως, από τα μεγακαρυοκύτταρα κατά τη δημιουργία του αιμοπεταλίου. Τα RNA αυτά χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση των λειτουργιών τους. Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διάφορους τύπους μεμβρανικών κυστιδίων, τα οποία περιέχουν DNA, RNA και πρωτεΐνες του όγκου. Καθώς τα κυστίδια αυτά περιβάλλονται από μεμβράνη το γενετικό υλικό που περιέχουν παραμένει άθικτο αφού δεν επιδέχεται τη δράση νουκλεασών και μπορούν τελικώς να προσροφηθούν από τα αιμοπετάλια μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένα λιπίδια και συνδέτες (85). Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω διεργασιών, στα αιμοπετάλια μπορεί να ανευρεθούν τμήματα του γενετικού υλικού του όγκου με τη μορφή RNA (85).

Επιπρόσθετα, υπάρχουν ήδη αναφορές (87) για επιπλέον μηχανισμούς μεταφοράς γενετικού υλικού από τα καρκινικά κύτταρα στα αιμοπετάλια χωρίς τη διαμεσολάβηση μεμβρανικών κυστιδίων οδηγώντας έτσι στη δημιουργία tumor educated platelets (TEP's). Τα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν απευθείας

μετάγραφα από τα καρκινικά κύτταρα, όπως μετάγραφα RNA των EGFR, EML4-ALK, KRAS καθώς επίσης και κυτταροκίνες καρκινικών κυττάρων. Οι Nilsson et al. κατάφεραν να αποδείξουν ότι τα αιμοπετάλια ασθενών που έπασχαν από καρκίνο του προστάτη και γλοιώματα περιείχαν χαρακτηριστικούς RNA καρκινικούς βιοδείκτες σχετιζόμενους με τον καρκίνο του προστάτη και τα γλοιώματα αντίστοιχα, υπογραμμίζοντας έτσι τη δυνατότητα των αιμοπεταλίων να εμπεριέχουν καρκινική γενετική πληροφορία. Ως εκ τούτου, τα αιμοπετάλια φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις νεοπλασίες(87). Λόγω των ανωτέρω βιολογικών διεργασιών και σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αιμοπετάλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση των καρκινικών διεργασιών όπως για παράδειγμα το πρότυπο των μεταστάσεων δεδομένων τύπων καρκίνου.(86) Τέλος τα αιμοπετάλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για τη απομόνωση και μετέπειτα επεξεργασία γενετικού υλικού των καρκινικών κυττάρων.

10. Μέθοδοι προσδιορισμού κυκλοφορούντος καρκινικού DNA.

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA συμπεριλαμβάνονται η μέθοδος της ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (digital PCR-dPCR) και η μέθοδος αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS). Η ψηφιακή PCR έχει το πλεονέκτημα της ιδιαίτερα υψηλής ευαισθησίας στην ανίχνευση μεταλλάξεων. Η τεχνική στηρίζεται στην κλασματοποίηση του δείγματος με πολλαπλές αραιώσεις με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται μόρια-στόχοι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις προσδίδοντας έτσι στην ψηφιακή PCR εξαιρετική ευαισθησία. Για παράδειγμα, υπάρχουν αναφορές πως η ευαισθησία ανίχνευσης *KRAS* μετάλλαξης με τη μέθοδο Beaming-digital PCR, σε προχωρημένους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου κολοορθικού και παγκρεατικού καρκίνου μπορεί να φτάσει το 80% (CI 95% : 0,68-0.89), 87% (ειδικότητα CI 95%: 0,75-0,94) και υψηλή θετική και αρνητική προγνωστική αξία αντίστοιχα (88). Η χρήση της droplet digital PCR, μία επίσης ψηφιακής PCR, μπορεί να ανιχνεύσει μετάλλαξη του *KRAS* στα κόπρανα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου στο 80% των δειγμάτων που εξετάστηκαν (89). Στον αντίποδα, η μέθοδος NGS επιτρέπει την αξιολόγηση του γενωμικού υλικού συγκρίνοντας δείγματα που περιέχουν ctDNA με DNA αναφοράς από φυσιολογικά κύτταρα επιτυγχάνοντας χαρτογράφηση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα. Τούτο επιτρέπει την ταυτοποίηση του ctDNA και πιθανά οδηγεί στην ανακάλυψη νέων πιθανών μεταλλάξεων -υποψήφιων για στοχευτική θεραπεία (90).

Το 2016 ο FDA ενέκρινε τη χρήση μιας πλατφόρμας υγρής βιοψίας για την ανίχνευση ctDNA, που ονομάζεται, στους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Η δοκιμασία ονομάζεται cobas EGFR Mutation Test V2, όπου με τη χρήση allele-specific real-time PCR, γίνεται εφικτή η ποιοτική ανίχνευση προκαθορισμένων μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν απαλοιφές στο εξόνιο 19 ή αντικατάστασεις βάσεων στο εξόνιο 21 του γονιδίου του EGFR. Οι μεταλλάξεις αυτές, εφόσον ταυτοποιηθούν, αποτελούν προβλεπτικούς βιοδείκτες ανταπόκρισης στη χορήγηση στοχευτικής θεραπείας και δη αναστολέων της τυροσινικής κινάσης του EGFR(91). Στην Ευρώπη υπάρχουν πλατφόρμες υγρής βιοψίας οι οποίες έχουν λάβει έγκριση, όπως η BEAMing- digital PCR που αποτελεί συνδυασμό ψηφιακής PCR και κυτταρομετρίας ροής και η Idylla που αποτελεί real time PCR πλατφόρμα.(**Εικόνα 13**) Αυτές οι πλατφόρμες έχουν αξιολογηθεί σε

σύγκριση με την εξέταση του ιστού και έχουν δείξει υψηλή σύμπτωση των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση μεταλλάξεων(92)(93)(94).

Η χρήση τεχνικής NGS, από την άλλη πλευρά, χαρακτηρίζεται από μικρότερα ποσοστά ευαισθησίας σε σχέση με τη BEAMing αλλά επιτρέπει τη χαρτογράφηση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα (92). Η ανάγκη για τη διερεύνηση ύπαρξης μεταλλάξεων σε πολλά διαφορετικά γονίδια σε σύντομο χρόνο και με μικρό κόστος οδήγησε στη σταδιακή ανάπτυξη της τεχνικής αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Η ανάλυση όλου του γονιδιώματος, ή μόνο των κωδικοποιητικών περιοχών του, κατέστη δυνατή με την τεχνική αυτή, αλλά λόγω του υψηλού κόστους, η αλληλούχιση επόμενης γενιάς έχει βρει εφαρμογή στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αναλόγως με το αντικείμενο μελέτης (95). Στον κολορθικό καρκίνο η εφαρμογή της μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με το νόσημα με αποτέλεσμα να αποτελεί μία από τις μεθόδους για τον προσδιορισμό του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (90).

Approach	Method	Technology	LoD	Advantages	Disadvantages
Candidate-gene analysis	qPCR*	PNA clamp-PCR [†] (REF. 104)	0.1%	• Rapid • High sensitivity • Suitable for the detection of specific point mutations, copy-number variations, short indels, and gene fusions • No bioinformatic analysis • Cost-effective	• Only enables monitoring of known mutations
		LNA/DNA-PCR [†] (REF. 208)	0.1%		
		ARMS ²⁰⁹	0.05–0.1%		
		COLD-PCR [†] (REF. 210)	0.1–0.01%		
	Digital PCR	BEAMing ²¹¹	0.01%		
		ddPCR ^{212–214}	0.001%		
Deep-sequencing	NA	InPlex [§] (REFS 133,215,216)	<0.01%	• Does not require any prior knowledge of the molecular alteration	• Longer time needed to obtain, process and analyse results than that needed for candidate-gene analysis • Bioinformatic expertise required • Expensive
		Endpoint PCR [¶] (REF. 156)	<0.0001%		
		AmpliSeq ²¹⁷	>2%		
		TAm-Seq ²¹⁸	>2%		
		SAFE-Seq ²¹⁹	0.1%		
		Guardant360 digital sequencing test ¹⁹⁷	<0.1%		
		CAPP-Seq ¹³⁴	0.01%		
		iDES ²²⁰	<0.01%		
		PARE ²²¹	0.001%		
	WES (nontargeted)	NA	>1–3%		
	WGS (nontargeted)	Digital karyotyping ^{221–223}	0.001%		
		PARE ^{221,224,225}	0.001%		

Εικόνα 13. Σύγκριση διαθέσιμων πλατφορμών για τον προσδιορισμό του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA. Siravegna Get al., Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol . 2017 Sep 2 ;14(9):531–48

11. Οι κλινικές εφαρμογές του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

11.1. Πρώιμη διάγνωση.

Είναι γνωστό πως η πρώιμη διάγνωση του καρκίνου επηρεάζει τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Πολλές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της κολonosκόπησης αλλά και της ανίχνευσης αίματος στα κόπρανα, αποτελούν τακτικές screening. Παρ' όλο που οι μέθοδοι αυτές είναι αποτελεσματικές, εντούτοις ένας στους τρεις ενήλικες δεν υποβάλλεται σε προσυμπτωματικό έλεγχο λόγω χαμηλής συμμόρφωσης με τις οδηγίες, που καταγράφεται σε παγκόσμιο επίπεδο. Το κόστος, ο χρόνος που απαιτείται αλλά και η διαδικασία της ενδοσκόπησης αποτελούν σήμερα τους κυριότερους αποτρεπτικούς παράγοντες. Παράλληλα, οι δυσαναλογίες που παρατηρούνται μεταξύ κοινωνικών ομάδων στην πρόσβαση των υπηρεσιών υγείας αναπόφευκτα διαδραματίζουν και αυτές ρόλο στη χαμηλή συμμετοχή στον έλεγχο (7). Περισσότεροι από τους μισούς θανάτους που οφείλονται σε καρκίνο του παχέος εντέρου θα μπορούσαν να έχουν αποφευχθεί με τη συμμετοχή του πληθυσμού στα προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου (1).

Η χρήση της υγρής βιοψίας ως εναλλακτικής μεθόδου ως εργαλείο προσυμπτωματικού ελέγχου αποτελεί ένα νέο πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Παρ' όλα αυτά, μια σημαντική πρόκληση στο ερευνητικό αυτό πεδίο είναι τα χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντος καρκινικού DNA και κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε περιπτώσεις όπου η νόσος βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο. Έχει αποδειχθεί ότι η υγρή βιοψία αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την απομόνωση γενετικού υλικού του όγκου σε ασθενείς με μεταστατικές κακοήθειες και υπάρχουν και περιπτώσεις συγκεκριμένων όγκων όπου το ποσοστό ανίχνευσης καρκινικού DNA είναι πολύ υψηλό, φτάνοντας και το 100% στον κολορθικό καρκίνο μεταξύ των ασθενών που μελετήθηκαν (77). Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου η νόσος βρίσκεται σε προχωρότερο στάδιο το ποσοστό αυτό είναι αρκετά χαμηλότερο, ίσως και λιγότερο από το 50% (77)(3).

Επίσης, ο συνδυασμός του ctDNA με τη μέτρηση CEA (καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου) είναι ένα πιθανό εργαλείο για τη διάγνωση κολορθικού καρκίνου (77)(96). Ο συνδυασμός του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA με τους λοιπούς βιοδείκτες, που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των ασθενών και πιθανά συμβάλλουν στη

διάγνωση, έχει διερευνηθεί (96). Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA αποτελεί πιο αξιόπιστη μέθοδο για τη διάγνωση του κολοορθικού καρκίνου σε σχέση με τη χρήση των καρκινικών δεικτών οι οποίοι δεν χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη ευαισθησία. Με τη χρήση του καρκινικού DNA η πιθανότητα διαπίστωσης κακοήθειας είναι σαφώς υψηλότερη σε σχέση με τη χρήση των καρκινικών δεικτών, οι οποίοι τείνουν να είναι παθολογικά αυξημένοι σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, εν αντιθέσει με το κυκλοφορούν DNA το οποίο μπορεί να είναι ανιχνεύσιμο επί πλήρους απουσίας κλινικών, βιοχημικών και απεικονιστικών ενδείξεων νόσου (96).

Επιπρόσθετα, το μήκος των αλληλουχιών του DNA που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα έχει αξιολογηθεί στα πλαίσια της πρώιμης ανίχνευσης της νόσου. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές (97) ότι το μήκος των αλληλουχιών που προέρχονται από αποπίπτοντα ή νεκρά καρκινικά κύτταρα είναι χαρακτηριστικό και διαφέρει από το μήκος των αλληλουχιών που αντιπροσωπεύουν φυσιολογικό DNA του ατόμου. Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA έχει συνήθως μήκος 140-180 ζεύγη βάσεων με τα τμήματα του DNA που βρίσκονται να έχουν μήκος μεγαλύτερο των 300 ζευγών βάσεων να αντιστοιχούν σε κλάσματα φυσιολογικού γενετικού υλικού (97). Τέλος, η μεθυλίωση του ctDNA του όγκου έχει επίσης μελετηθεί στο πλάσμα με τη μεθυλίωση του γονιδίου *SEPT9* να σχετίζεται με την εμφάνιση νεοπλασίας στο παχύ έντερο και την εξέλιξη από αδένωμα σε δυσπλασία και τελικώς σε καρκίνωμα (98). Η χρήση μεθόδων με υψηλή ευαισθησία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στον εφαρμογή αυτή της υγρής βιοψίας. Δεδομένου ότι κυκλοφορούν καρκινικό DNA υπάρχει στη συστηματική κυκλοφορία ασθενών και με πρώιμη εμφάνιση της νόσου, με τη χρήση τεχνικών υψηλής ευαισθησίας η διάγνωση της ασθένειας σε αρχικό στάδιο ίσως γίνει εφικτή χωρίς όμως επί του παρόντος να υπάρχουν αποτελέσματα μεγάλων μελετών που να οδηγούν στην κατεύθυνση αυτή στο άμεσο μέλλον. Για την διάγνωση της κακοήθειας με τη χρήση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA χωρίς τη χρήση ιστικής βιοψίας τα δεδομένα είναι ελάχιστα με την πλειοψηφία των μελετών του ctDNA να εστιάζει στις υπόλοιπες πιθανές κλινικές εφαρμογές του (3) (77)(81) (91).

11.2. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος και ανταπόκριση στη θεραπεία.

Μία άλλη πιθανή εφαρμογή της υγρής βιοψίας είναι η ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου μετά από χειρουργείο ή από την εφαρμογή θεραπείας με σκοπό

την ίαση (3). Είναι γνωστό ότι, στις περιπτώσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου η χειρουργική θεραπεία στα πρώιμα στάδια της νόσου αποτελεί και τη θεραπεία εκλογής. Εντούτοις, δεν υπάρχουν αξιόπιστα και αποτελεσματικά μέσα για την ταυτοποίηση των ασθενών οι οποίοι χειρουργούνται, θεωρούνται ελεύθεροι νόσου, αλλά σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχει υπολειμματική νόσος η οποία θα οδηγήσει στην κλινική υποτροπή του ασθενούς. Επίσης, οι ασθενείς υψηλού κινδύνου με πρώιμο καρκίνο του παχέος εντέρου με βάση κλινικο-παθολογοανατομικά κριτήρια υποβάλλονται σε επικουρική θεραπεία μετά το χειρουργείο αδιακρίτως με αποτέλεσμα να λαμβάνουν χημειοθεραπεία και ασθενείς οι οποίοι πιθανώς δε χρήζουν.

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA αποτελεί ένα πιθανό βιοδείκτη ελάχιστης υπολειμματικής νόσου μετά το χειρουργείο και μπορεί να είναι σε θέση να διακρίνει ποιοι ασθενείς θα υποτροπιάσουν. Το καλύτερο παράδειγμα μέχρι σήμερα στην προκειμένη περίπτωση παρέρχεται από μια ομάδα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ριζικό χειρουργείο. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανίχνευσης του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA μετά το χειρουργείο και με παρακολούθηση των ασθενών για μια περίοδο 2 έως 5 έτη παρατηρήθηκε ότι σε όλους τους ασθενείς που ανιχνεύθηκαν μετεγχειρητικά επίπεδα κυκλοφορούντος καρκινικού DNA εμφάνισαν υποτροπή της νόσου ενώ όλοι οι ασθενείς με μη ανιχνεύσιμα μετεγχειρητικά επίπεδα κυκλοφορούντος καρκινικού DNA δεν υποτροπίασαν(81). Επίσης, η ανίχνευση των επιπέδων του ctDNA προηγείται της απεικονιστικής και κλινικής υποτροπής σημαντικά, με βιβλιογραφικές αναφορές(75)(76)(79)(81)(99) να περιγράφουν την ανίχνευση ctDNA δύο μήνες μετά το χειρουργείο ενώ η υποτροπή να γίνεται εμφανής οκτώ μήνες μετά τη χειρουργική εκτομή.

Η ανίχνευση DNA, το οποίο φέρει σωματικές μεταλλάξεις, είναι μια άμεση ένδειξη ότι καρκινικά κύτταρα υπάρχουν και μετά το χειρουργείο. Σε μία μελέτη 250 ασθενών με κολοορθικό καρκίνο που υπεβλήθησαν σε ριζικό χειρουργείο, η μετεγχειρητική ανίχνευση ctDNA συσχετίστηκε με χειρότερο χρονικό διάστημα χωρίς υποτροπή της νόσου και εντός ενός έτους οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA υποτροπίασαν. Στη μελέτη αυτή το κυκλοφορούν καρκινικό DNA αποδείχθηκε πιο αξιόπιστος δείκτης από τη μέτρηση του CEA(99). Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές ότι τα επίπεδα στα οποία ανιχνεύεται το κυκλοφορούν καρκινικό DNA μεταβάλλονται με τη χορήγηση της θεραπείας(72)(100). Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ctDNA σχετίζεται με το μέγεθος των βλαβών από τη νόσο, όπως αυτές διαπιστώνονται απεικονιστικά με

αξονικές τομογραφίες. Επίσης, έχει παρατηρηθεί και υποδεκαπλασιασμός των επιπέδων του ctDNA μετά τη χορήγηση ενός και μόνο κύκλου χημειοθεραπείας γεγονός που συσχετίστηκε αναλογικά και με ταυτόχρονη μείωση των βλαβών στις αξονικές τομογραφίες(81).

11.3. Επιλογή θεραπείας και ανίχνευση αντίστασης στη θεραπεία.

Η εισαγωγή των στοχευτικών θεραπειών στον καρκίνο του παχέος εντέρου κατάφερε να διευρύνει τις θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς. Η προσθήκη αντιαγγειογενετικού ή η προσθήκη anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων αποτελούν πάγια τακτική στην αντιμετώπιση του μεταστατικού κολοορθικού καρκίνου. Η χορήγηση των anti-EGFR εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι *RAS* μεταλλάξεων. Οι ασθενείς οι οποίοι δε φέρουν μεταλλαγμένα αλληλία του *RAS* είναι υποψήφιοι για τη χορήγηση των anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στον αντίποδα, 30-40% των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου φέρουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *RAS* καθιστώντας τους έτσι μια κατηγορία ασθενών οι οποίοι δε μπορούν να λάβουν anti-EGFR διότι δε θα ανταποκριθούν αλλά μπορεί και να έχουν και χειρότερα αποτελέσματα σύμφωνα με τις έως τώρα αναφορές. Η αντίσταση στη θεραπεία μπορεί να εμφανιστεί και λόγω μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια όπως τα *BRAF*, *MET* ή λόγω ενίσχυσης του *HER2*(2). Επιπρόσθετα η απάντηση στη θεραπευτική χορήγηση anti-EGFR σπάνια εμμένει πέραν των δώδεκα μηνών. Η εμφάνιση των ανωτέρω μεταλλάξεων στην πορεία της εξέλιξης της ασθένειας εντάσσεται στα πλαίσια της ετερογένειας της νόσου η οποία είναι πολύ δύσκολο χρονικά να ταυτοποιηθεί μέσω της κλασσικής βιοψίας (67).

Στις έως τώρα δημοσιευμένες μελέτες, μεταλλάξεις του *KRAS* ανιχνεύονται στο αίμα των ασθενών με *KRAS* μεταλλαγμένους όγκους με πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (77). Επίσης έχει περιγραφεί ότι *KRAS* μεταλλαγμένα αλληλία είναι ανιχνεύσιμα στο περιφερικό αίμα των ασθενών έως και δέκα μήνες πριν από την εμφάνιση της υποτροπής της νόσου μετά από ριζικό χειρουργείο (81). Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της κλωνικής εξέλιξης του όγκου αλλά και της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ανίχνευση της *RAS* μετάλλαξης ήταν εφικτή αποκλειστικά και μόνο στο περιφερικό αίμα των ασθενών και όχι στον αντίστοιχο ιστό που λήφθηκε με

βιοψία υπονοώντας τη δυνατότητα της υγρής βιοψίας να συλλάβει ακριβέστερα την κλωνική ετερογένεια του όγκου (100)(101).

Η ερευνητική δραστηριότητα που αφορά τις υγρές βιοψίες και πιο συγκεκριμένα το κυκλοφορούν καρκινικό DNA, έχει φέρει στο προσκήνιο και την πιθανότητα ύπαρξης πολλών διαφορετικών κλώνων στον αρχικό όγκο, οι οποίοι με την εξελικτική πίεση που ασκεί η στοχευτική θεραπεία μεταβάλλονται, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αντίσταση στη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, οι όγκοι που ταυτοποιούνται ως *RAS* wild type με την ιστική βιοψία πιθανόν να απαρτίζονται και από *RAS* μεταλλαγμένους κλώνους εξαρχής. Η επακόλουθη χορήγηση anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων ασκεί εξελικτική πίεση στον όγκο με καταπίεση του *RAS* wild type κλώνου και επακόλουθη επαναπληθυσμοποίηση του όγκου από *RAS* μεταλλαγμένο κλώνο ο οποίος, όπως είναι γνωστό, δεν ανταποκρίνεται στο χειρισμό με anti-EGFR. Έτσι, εμφανίζεται τελικά η αντίσταση στη θεραπεία και η πρόοδος νόσου. Αυτό το οποίο είναι αξιοσημείωτο, είναι το γεγονός ότι η μετάλλαξη αυτή, που τώρα πια αντιπροσωπεύει τον όγκο, μπορεί να εξαφανιστεί σε βάθος χρόνου με την άρση της χορήγησης του anti-EGFR. Ο όγκος αποκτά νέο βιολογικό προφίλ μετά την απομάκρυνση του anti-EGFR και πολλαπλασιάζεται εκ νέου ο κλώνος που δε φέρει μετάλλαξη στο *RAS* ογκογονίδιο. Ως εκ τούτου ο όγκος είναι και πάλι ευαίσθητος στη χορήγηση anti-EGFR (67),(100),(101). Αυτή η θεωρία έχει αναπτυχθεί βιβλιογραφικά με τις ερευνητικές ομάδες να αποτυπώνουν την κλωνική εξέλιξη του όγκου υπό την εξελικτική πίεση που «ασκεί» σε αυτόν η χημειοθεραπεία με τη χρήση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης anti-EGFR εμφανίζονται μεταλλάξεις στο περιφερικό αίμα των ασθενών, οι οποίες συνοδεύονται από πρόοδο νόσου. Με τη διακοπή της θεραπείας και αφού παρέλθει χρονικό διάστημα περίπου έξι μηνών, παρατηρείται μείωση των μεταλλάξεων στο περιφερικό αίμα και η επαναχορήγηση anti-EGFR είναι επιτυχής με εμφάνιση ύφεσης της νόσου (67)(71)(72)(73)(74)(77)(101).

Η χρήση της υγρής βιοψίας για την ανίχνευση αντίστασης στη θεραπεία έχει βρει εφαρμογή στους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (102). Η αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR μπορεί να οφείλεται στην εμφάνιση της αντίστασης T790M, η οποία σηματοδοτεί την αποτυχία της χορηγούμενης anti-EGFR θεραπείας και την πρόοδο νόσου. Η μετάλλαξη αυτή, δύναται να ανιχνευθεί με τη χρήση της υγρής βιοψίας και την ταυτοποίηση του

κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο περιφερικό αίμα των ασθενών και αποτελεί έως και σήμερα τη μοναδική ένδειξη για την οποία έχει έγκριση η υγρή βιοψία με βάση τα υψηλά ποσοστά συμφωνίας της υγρής και της ιστικής βιοψίας στην ανίχνευση της μετάλλαξης (90).

Στο πεδίο της θεραπευτικής του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου την τελευταία δεκαετία δεν υπήρξαν επαναστατικές διαφοροποιήσεις. Με τη σωστή επιλογή των ασθενών και τη χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας το προσδόκιμο επιβίωσης τους επιμηκύνεται, αλλά το εύρος των θεραπευτικών επιλογών παραμένει περιορισμένο. Με την υγρή βιοψία είναι δυνατή η επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, με βάση τη γενετική υπογραφή του όγκου όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA. Παράλληλα είναι δυνατή η παρακολούθηση της κλωνικής εξέλιξης του όγκου σε συνθήκες πραγματικού χρόνου. Επιπρόσθετα παρέχεται η δυνατότητα της γνώσης της πιθανής αντίστασης στη θεραπεία αρκετό χρονικό διάστημα πριν αυτή γίνει κλινικά και απεικονιστικά εμφανής. Οι διαδοχικές αναλύσεις του γενετικού υλικού του όγκου μπορούν να παρέχουν τη δυνατότητα ακόμη και της επαναχρησιμοποίησης θεραπείας και συγκεκριμένα των anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων στα οποία ο ασθενής πιθανώς να έχει αναπτύξει αντίσταση στο παρελθόν.

Στην πιο πρόσφατη μελέτη σχετικά με τη στρατηγική επαναχορήγησης anti-EGFR αναλύθηκαν τα μοριακά προφίλ 135 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου πριν και μετά τη χορήγηση του στοχευτικού παράγοντα. Μετά τη χορήγηση της θεραπείας οι ασθενείς είχαν RAS και EGFR μεταλλάξεις ανιχνεύσιμες οι οποίες δεν προϋπήρχαν. Με διαδοχικές μελέτες του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA, ο χρόνος που απαιτήθηκε για την εξαφάνιση των μεταλλάξεων κυμαινόταν στους 4,4 μήνες με τους συγγραφείς να οριοθετούν έτσι το «χρόνο ημίσειας ζωής» των μεταλλάξεων. Χρησιμοποιώντας το χρονικό διάστημα αυτό ως σημείο αναφοράς, η επαναχορήγηση των anti-EGFR προσέδωσε τα βέλτιστα αποτελέσματα όταν δοκιμάστηκε μετά από δύο «χρόνους ημίσειας ζωής», δηλαδή όταν η απόσταση από την τελευταία δόση του anti-EGFR ήταν οχτώ περίπου μήνες (103). Δίνεται έτσι η δυνατότητα περαιτέρω γραμμών θεραπείας για την βελτίωση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με την εισαγωγή μίας ακόμη γραμμής θεραπείας μέσω της πληροφορίας που παρέχει το κυκλοφορούν καρκινικό DNA.

Αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία λαμβάνοντας υπόψη την νέα κατεύθυνση η οποία παρατηρείται στην αντιμετώπιση των νεοπλασμάτων τα τελευταία χρόνια. Η προσπάθειες για εξατομικευμένη θεραπευτική παρέμβαση σε κάθε ασθενή σε συνδυασμό με την πρόοδο που παρατηρήθηκε σχετικά με τη γνώση για το μοριακό υπόβαθρο του καρκίνου οδήγησε αναπόφευκτα στην μοριακή κατηγοριοποίηση των νεοπλασιών. Συγκεκριμένα, με βάση τη μοριακή υπογραφή τους οι κολοορθικοί καρκίνοι δύναται πλέον να ταξινομηθούν σε πέντε μοριακούς υποτύπους με συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένη πρόγνωση σε κάθε υπότυπο (104). Οι πέντε αυτές κατηγορίες παρέχουν επί του παρόντος προγνωστικές πληροφορίες αλλά οι προσπάθειες έχουν στραφεί στην προβλεπτικό ρόλο που μπορεί να έχουν με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Ήδη υπάρχει προβλεπτική συσχέτιση του μοριακού υποτύπου που εμφανίζει μικροδορυφορική αστάθεια με αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας στην ομάδα αυτή (105)(106). Η γνώση της μοριακής υπογραφής των όγκων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των κατάλληλων στοχευτικών θεραπειών και η εφαρμογή της υγρής βιοψίας που παρέχει την υπογραφή αυτή σε πραγματικό χρόνο μπορεί να έχει μια ιδιαίτερη θέση στη διαδικασία αυτή.

12. Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνήσει την εφαρμογή της υγρής βιοψίας σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Το ευρύ φάσμα των δυνατοτήτων και των εφαρμογών που μπορεί να έχει η υγρή βιοψία την καθιστούν αναπόφευκτα ένα ελκυστικό εργαλείο στην καθημερινή κλινική πρακτική. Μέχρι σήμερα ο χρυσός κανόνας για τη διαχείριση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου είναι και παραμένει η ιστική βιοψία από προσβάσιμη βλάβη. Μετά την ιστολογική ταυτοποίηση της κακοήθειας ακολουθεί ο μοριακός έλεγχος για την ανάδειξη ύπαρξης μεταλλάξεων βιοδεικτών και συγκεκριμένα των γονιδίων *KRAS*, *NRAS* και *BRAF*. Με βάση τα αποτελέσματα των μοριακών βιοδεικτών, συνεκτιμώντας την έκταση της νόσου, την κατάσταση του ασθενούς και την εντόπιση του όγκου στο κόλον εφαρμόζεται η θεραπεία του ασθενούς.

Το σημαντικό μειονέκτημα είναι η ισχύς που έχουν οι μεταλλάξεις αυτές καθ' όλη τη διάρκεια διαχείρισης των ασθενών. Σε κάθε χρονική στιγμή που εμφανίζεται πρόοδος νόσου, τον ασθενή συνοδεύει η πληροφορία από την εξέταση του αρχαιακού ιστού και με βάση αυτή γίνεται η επιλογή των επόμενων θεραπευτικών χειρισμών. Ήδη όπως προαναφέρθηκε, είναι γνωστή η θεωρία της εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία μέσω νέων μεταλλάξεων που αποκτά ο όγκος ή λόγω της πολυκλωνικότητας του που τον καθιστά τελικώς ανθεκτικό στη θεραπεία.

Στην παρούσα διατριβή σκοπός ήταν να διερευνηθεί αρχικά η συμφωνία των αποτελεσμάτων που παρέχονται από την εξέταση του ιστού των ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο με τα αποτελέσματα της υγρής βιοψίας βασισμένης στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA του όγκου στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών. Εφαρμόζοντας έλεγχο για την ανίχνευση ενός εύρους εικοσιτριών γονιδίων στον ιστό των ασθενών λαμβάνεται η μοριακή υπογραφή του όγκου τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου. Την ίδια χρονική στιγμή με την εφαρμογή δύο διαφορετικών μεθόδων υγρής βιοψίας, αλληλούχισης επόμενης γενιάς και BEAMing, στο πλάσμα του περιφερικού αίματος για την ανίχνευση έως και πενήντα μεταλλάξεων γίνεται προσπάθεια για την απόκτηση της μοριακής υπογραφής του καρκινικού DNA. Από την εξέταση του ιστού και του καρκινικού DNA που βρίσκεται στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος των ασθενών κατά τη στιγμή της διάγνωσης διερευνάται η σύμπτωση των αποτελεσμάτων και η δυνατότητα χρήσης των υγρών βιοψιών ως

έγκυρης και ευαίσθητης μεθόδου για την μοριακή ταυτοποίηση του κολοορθικού καρκίνου.

Ακολουθώς , κατά την εμφάνιση προόδου της νόσου σκοπός ήταν να αποκτηθεί το μοριακό προφίλ που έχει αποκτήσει ο όγκος , μετά την εφαρμογή της θεραπείας και την αποτυχία αυτής, με τις μεθόδους της υγρής βιοψίας. Δεδομένης της δυσκολίας που υπάρχει στην υποβολή των ασθενών σε διαδοχικές ιστικές βιοψίες η ανίχνευση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο περιφερικό αίμα των ασθενών διερευνήθηκε ως εναλλακτική μέθοδος για την εξέταση των μεταβολών στο μοριακό υπόβαθρο των όγκων κατά την αποτυχία της θεραπείας και την αντίσταση του όγκου σε αυτή εξετάζοντας έως πενήντα γονίδια. Τέλος , σκοπός ήταν και η σύγκριση των μεταλλάξεων που διαπιστώνονται στην πρόοδο νόσου με τις μεταλλάξεις που διαπιστώνονται κατά τη διάγνωση της νόσου τόσο με την εξέταση του ιστού όσο και με τις μεθόδους της υγρής βιοψίας όπως αυτές εφαρμόστηκαν κατά τη διάγνωση των ασθενών.

Συνολικά, στόχος της μελέτης ήταν να διερευνήσει την υγρή βιοψία βασισμένη στο γενετικό υλικό του όγκου στο περιφερικό αίμα των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου σε δύο χρονικές στιγμές , τη διάγνωση και την πρώτη επιδείνωση της νόσου, να εξετάσει τη συμφωνία των μεθόδων αλλά και τη σύμπτωση των αποτελεσμάτων τους με τα αποτελέσματα από την εξέταση του ιστού των ασθενών και να συσχετίσει τα ευρήματα της υγρής βιοψίας με τα κλινικά δεδομένα των ασθενών.

Ειδικό Μέρος

13. Ερευνητικοί στόχοι

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν να διερευνήσει το ρόλο των υγρών βιοψιών στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Μέχρι σήμερα ο χρυσός κανόνας για τη θεραπευτική των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν και παραμένει η λήψη ιστικής βιοψίας και ο έλεγχος των μεταλλάξεων στον ιστό πριν την έναρξη της θεραπείας για τον ακριβή καθορισμό αυτής. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα των όγκων των ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο για ανάλυση της μοριακής τους υπογραφής με μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς αλλά και δείγματα περιφερικού αίματος για ανάλυση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA με δύο διαφορετικές τεχνικές. Εφαρμόστηκε η μέθοδος αλληλούχισης επόμενης γενιάς και η ψηφιακή PCR BEAMing τόσο στη διάγνωση της νόσου όσο και κατά την επιδείνωσή της. Με τις μεθόδους αυτές απώτεροι στόχοι ήταν:

- Αποτύπωση της μοριακής υπογραφής των ιστικών δειγμάτων με τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς για ένα εύρος 23 γονιδίων με ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο του παχέος εντέρου για τη διαπίστωση ύπαρξης ή απουσίας μεταλλάξεων πέραν των RAS και BRAF.
- Η διερεύνηση της συμφωνίας των αποτελεσμάτων της υγρής βιοψίας με τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς με τα αποτελέσματα εξέτασης του ιστού με την ίδια μέθοδο κατά τη διάγνωση των ασθενών για την αξιολόγηση της υγρής βιοψίας ως εναλλακτικής μεθόδου αποτύπωσης της μοριακής υπογραφής του όγκου.
- Έλεγχος ανίχνευσης της RAS μετάλλαξης με τη μέθοδο ψηφιακής PCR BEAMing στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών κατά τη διάγνωση, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα ποσοστά ανίχνευσης με τις συνήθεις εφαρμοζόμενες μεθόδους στην συνήθη κλινική πρακτική.
- Η διερεύνηση της συμφωνίας των αποτελεσμάτων της ψηφιακής PCR BEAMing με τα αποτελέσματα από την εξέταση του ιστού με μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς κατά τη διάγνωση των ασθενών, για την αξιολόγηση της υγρής βιοψίας με τη χρήση της BEAMing ως μεθόδου ελέγχου της RAS μετάλλαξης.
- Διερεύνηση της συμφωνίας των δύο μεθόδων υγρής βιοψίας για την ανίχνευση της RAS μετάλλαξης στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών.

- Έλεγχος ύπαρξης μεταλλάξεων ανιχνεύσιμων στο πλάσμα του περιφερικού αίματος μετά την εφαρμογή της θεραπείας πρώτης γραμμής , κατά τη χρονική στιγμή επιδείνωσης της νόσου με τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς για τον εντοπισμό διαφοροποιήσεων στη μοριακή υπογραφή του όγκου και την πιστοποίηση της κλωνικής ετερογένειας.
- Εξέταση της ύπαρξης αλλαγών στη συχνότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων μεταξύ διάγνωσης και επιδείνωσης νόσου με τις μέθοδο υγρής βιοψίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς.
- Προσπάθεια απομόνωσης του μεταλλαγμένου *RAS* αλληλομόρφου από τα αιμοπετάλια των ασθενών για την περαιτέρω αξιολόγηση της συγκεκριμένης πηγής καρκινικού γενετικού υλικού.
- Ανάλυση των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών και συσχετίσεις με τα αποτελέσματα αλλά και με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Για τη μελέτη αυτή αποφασίστηκε η συμμετοχή ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου μετά από ενυπόγραφη έντυπη συγκατάθεσή τους. Οι ασθενείς συναίνεσαν στη μελέτη των μεταλλάξεων στον ιστό που λήφθηκε κατά τη βιοψία του όγκου αλλά και σε αιμοληψίες σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και την ακόλουθη επεξεργασία των δειγμάτων αίματος για την ταυτοποίηση ύπαρξης μεταλλάξεων καθώς επίσης και στη χρήση κλινικών στοιχείων τους.

14. Ερευνητικό πρωτόκολλο

Για να μελετηθεί η μέθοδος της υγρής βιοψίας και να συγκριθεί με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εξέταση της μοριακής υπογραφής του ιστού συντάχθηκε και εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο.

Βήμα 1^ο.

Έλεγχος της μοριακής υπογραφής του όγκου των ασθενών με τη χρήση μεθόδου αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS-Next Generation Sequencing) που παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μιας σειράς μεταλλάξεων σε ένα σύνολο 23 γονιδίων με ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Βήμα 2^ο.

Λήψη περιφερικού αίματος των ασθενών σε δύο χρονικές στιγμές

- κατά τη διάγνωση της νόσου και
- κατά την πρόοδο της ασθένειας

και ακολούθως επεξεργασία του για την ανίχνευση μιας σειράς μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA στο περιφερικό αίμα με την εφαρμογή τεχνικής αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) σε ένα σύνολο πενήντα γονιδίων με ιδιαίτερη σημασία στον κολοορθικό καρκίνο.

Βήμα 3^ο.

Λήψη περιφερικού αίματος των σε μια ομάδα ασθενών κοινών με τους ασθενείς του 2^{ου} βήματος

- κατά τη διάγνωση της νόσου

με ακόλουθη επεξεργασία των δειγμάτων αυτών με την τεχνική της ψηφιακής PCR BEAMing για τον έλεγχο ύπαρξης ή απουσίας RAS μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στο περιφερικό αίμα με υψηλή ευαισθησία.

Βήμα 4°.

Λήψη περιφερικού αίματος από τους ασθενείς κατά τη διάγνωση της νόσου με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων τους για την απομόνωση του μεταλλαγμένου *RAS* μεταγράφου από τα αιμοπετάλια των ασθενών.

Βήμα 5°.

Συλλογή και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στα τέσσερα προαναφερθέντα βήματα με σκοπό την αξιολόγηση δύο διαφορετικών μορφών υγρής βιοψίας: α) του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (μέσω της χρήσης δύο διαφορετικών πλατφορμών) στο πλάσμα του περιφερικού αίματος και β) του μεταγράφου του μεταλλαγμένου *RAS* γονιδίου από τα αιμοπετάλια των ασθενών. Σύγκριση των αποτελεσμάτων από τον μοριακό έλεγχο του ιστού και τις υγρές βιοψίες και για την ανεύρεση του ποσοστού συμφωνίας των ανωτέρω μεθόδων στην ανίχνευση μεταλλάξεων στους ασθενείς και συσχέτιση με τα κλινικά δεδομένα.

15.Μεθοδολογία.

15.1. Έλεγχος των μεταλλάξεων στον ιστό του όγκου και στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με τεχνική αλληλούχισης επόμενης γενιάς -Next Generation Sequencing (NGS).

Για την απομόνωση του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA έγινε αιμοληψία στους ασθενείς κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης και κατά την χρονική στιγμή της προόδου της νόσου. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια Cell-Free DNA BCT tubes (Streck, La Vista, NE) για τη σταθεροποίηση των συνολικών ελεύθερων νουκλεϊκών οξέων. Ο διαχωρισμός του πλάσματος έγινε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων δύο φορές στις 2000 στροφές ανά λεπτό για δέκα λεπτά στους 4 βαθμούς κελσίου. Το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA απομονώθηκε από 2 ml πλάσματος με τη χρήση QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Antwerp, Belgium) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τομές σημασμένες με τις χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης από FFPE βιοψίες από όλα τα δείγματα ανασκοπήθηκαν με σκοπό να εξασφαλιστεί καρκινικό κυτταρικό περιεχόμενο >75% , όπου αυτό ήταν δυνατό και η περιοχή σημάνθηκε από παθολογοανατόμο. Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από 10 μm μη κερωσμένων περιοχών χρησιμοποιώντας QIAamp FFPE tissue ki (Qiagen, Antwerp, Belgium). Μετά την απομόνωση η συγκέντρωση όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific).

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς για τους ιστούς διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας το πάνελ Ion AmpliSeq το οποίο βασίζεται στο πάνελ Ion Ampliseq Colon and Lung Cancer Research Panel v2 με ένα επιπλέον αμπλικόνιο του MET γονιδίου (για να συμπεριληφθούν οι μεταλλάξεις του εξωνίου 14) και δύο επιπλέον αμπλικόνια των εξωνίων 2 και 3 του γονιδίου HRAS. Η ανάλυση του συντηγμένου μεταγράφου RNA διενεργήθηκε με τη χρήση Ion AmpliSeq™ RNA Fusion Lung Cancer Research Panel. (ThermoFisher Scientific). Τα γονίδια που αναλύθηκαν συμπεριλαμβάνουν τα εξής : *AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11, TP53, HRAS*. Εν συντομία , η συγκέντρωση του DNA που απομονώθηκε από του ιστούς μετρήθηκε κάνοντας χρήση του Qubit™ 2.0 Fluorometer σε συνδυασμό με Qubit™ dsDNA HS assay kit (Thermo Fischer Scientific). Μια βιβλιοθήκη

αμπλικονίων δημιουργήθηκε από 10ng συνολικού DNA από τους ιστούς ή από 6 μl από το κυκλοφορούν καρκινικό DNA με τη χρήση Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fischer Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η ενίσχυση των αμπλικονίων έγινε με Ion Ampliseq™ HiFi Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Τα αμπλικόνια αναμείχθηκαν με το αντιδραστήριο FUPA και κωδικοποιήθηκαν με τη χρήση IonCode™ Barcode Adapters 1-384 Kit (Thermo Fischer Scientific). Στη συνέχεια τα ενισχυμένα προϊόντα καθαρίστηκαν από άλλα αντιδραστήρια με τη χρήση Agencourt AMPure XP PCR purification system (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) .

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς για το κυκλοφορούν καρκινικό DNA έγινε με τη δοκιμασία (kit) Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay (Thermo Fisher Scientific). Η μέθοδος επιστρατεύει τυχαίους μοριακούς δείκτες (molecular tags) που χρησιμοποιούνται σαν μοναδικοί μοριακοί αναγνωριστές (unique molecular identifiers) για την μοναδική σήμανση κάθε μορίου πριν την ενίσχυση της βιβλιοθήκης. Με τον τρόπο αυτό τυχαία λάθη μπορούν να αναγνωριστούν και να αφαιρεθούν από τα πραγματικά μεταλλαγμένα αλληλόμορφα αυξάνοντας την ακρίβεια της μεθόδου και ελαχιστοποιώντας τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η συγκεκριμένη δοκιμασία περιλαμβάνει την ανάλυση των hotspotμεταλλάξεων γονιδίων: *AKT1, ALK, AR, ARAF, BRAF, CHEK2, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SF3B1, SMAD4, SMO*. Η μέθοδος υπολογίζει και παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων για τα εξής γονίδια *CCND1, CCND2, CCND3, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, MYC*. Επιπλέον η μέθοδος περιλαμβάνει την ανάλυση των RNA σύντηξης που περιέχουν δώδεκα γονίδια οδηγούς : *ALK, BRAF, ERG, ETV1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NTRK1, NTRK3, RET, ROS*. Η συγκέντρωση των συνολικών ελεύθερων νουκλεϊκών οξέων μετρήθηκε με Qubit™ 2.0 Fluorometer με τη χρήση Qubit™ ssDNA Assay Kit (Thermo Fischer Scientific). Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία , η αντίστροφη μεταγραφή των συνολικών ελευθέρων νουκλεϊκών οξέων έγινε με SuperScript™ VILO™ Master Mix. Τα προϊόντα ενισχύθηκαν με δύο κύκλους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την αντιγραφή κάθε τμήματος αρχικής αλυσίδας DNA σε τμήμα με τυχαίες αλληλουχίες και A/P1

προσθήκες στα 5'/3' άκρα. Ακολούθησε ένα βήμα καθαρισμού με την εφαρμογή Agencourt AMPure XP PCR purification system (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA. Στη συνέχεια δεκαοκτώ κύκλοι ενίσχυσης των σημασμένων αμπλικονίων με συγκεκριμένη κωδικοποίηση για κάθε δείγμα ήταν το βήμα που ακολούθησε με τη χρήση Tag Sequencing Barcode Set (Thermofischer Scientific) , ενώ καθαρισμός και επιλογή μεγέθους της κωδικοποιημένης βιβλιοθήκης επιτεύχθηκε με τη χρήση Agencourt AMPure XP PCR purification system. Τέλος η συγκέντρωση κάθε βιβλιοθήκης καθορίστηκε με real time PCR με τη χρήση Ion Library TaqMan® Quantitation Kit (Thermofischer Scientific).

100 pmoles του DNA ή των ctDNA βιβλιοθηκών συνδυάστηκαν ξεχωριστά και ενισχύθηκαν κλωνικά με τη χρήση Ion sphere™ particles (ISP) με PCR γαλακτώματος στο μηχάνημα Ion One Touch™ 2 με τη χρήση Ion 540™ Kit-OT2 (Thermo Fisher Scientific) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο έλεγχος ποιότητας έγινε με τη χρήση IonSphere™ QualityControlkit (ThermoFisherScientific) για να εξασφαλιστεί ότι ένα ποσοστό 10-30 % μητρών παρήχθησαν στο γαλάκτωμα της PCR. Τα θετικά δείγματα εμπλουτίστηκαν χρησιμοποιώντας Ion OneTouch™ ES instrument, τοποθετήθηκαν σε Ion 540™ Chip και η αλληλούχιση έγινε σε Ion GeneStudio™ S5 Prime System Sequencer σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η ανάλυση των δεδομένων NGS έγινε με τη χρήση λογισμικού Ion Reporter™ 5.10.1.0-Torrent Suite™ 5.10.1 software (Thermo Fisher Scientific) ακολουθούμενη από επιθεώρηση μαζί με εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό ανάλυσης [Sequence Pilot version 4.3.0 (JSI medical systems, Ettenheim, Germany)]. Η ανάλυση κάλυψης έγινε με plug-in v5.0.4.0. Τα στατιστικά που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ποιότητας κάθε βιβλιοθήκης στους κύκλους αλληλούχισης. Για τις βιβλιοθήκες από το DNA των ιστών η ανάλυση των παραλλαγών του αριθμού των αντιγράφων έγινε με τη χρήση λογισμικού Ion Reporter™ Software. Οι παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων αναφέρθηκαν με βάση τον αριθμό των αντιγράφων σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα. Το λογισμικό αναφέρει όλες τις πιθανές παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων προσδίδοντας ένα σκορ, με σκορ >10 να καταδεικνύουν υψηλής αξιοπιστίας παραλλαγές αριθμού αντιγράφων. Αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε ως οδός για την ανίχνευση ενίσχυσης αριθμού αντιγράφων. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων των συνολικών ελεύθερων νουκλεϊκών οξέων, τα RNA σύντηξης και η ανάλυση των παραλλαγών του αριθμού των αντιγράφων έγινε με τη χρήση λογισμικού

Ion Reporter με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (Oncomine TagSeq Pan-Cancer Liquid Biopsy w2.1 - Single Sample, Thermo Fisher Scientific). Η τεχνική έδωσε τη δυνατότητα παροχής ενός ποσοτικού προσδιορισμού της κάθε ανιχνεύσιμης μεταλλάξης εκφραζόμενη σε ποσοστό %.

15.2. Έλεγχος των μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με τεχνική ψηφιακής PCRBEAMing.

Για την ανίχνευση *RAS* μεταλλάξεων στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης της νόσου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BEAMing-digital PCR (OncoBEAM *RAS* CRC Kit-Sysmex).

Η συγκεκριμένη δοκιμασία προορίζεται για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13, 56, 61, 117, 146 του *KRAS* και στα κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117, 146 του *NRAS* από το πλάσμα ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο.

Κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης της νόσου, λήφθηκε αίμα από τους ασθενείς. Λήφθηκαν 10 ml αίματος σε 2 BD Vacutainer με K2 EDTA (ή σε Cell-Free DNA BCT Sterck tubes) των 10 ml . Τα δύο σωληνάρια με το περιφερικό αίμα, πλήρως γεμισμένα και μετά από άμεση ανάμειξη με ήπια αναστροφή φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η ίδια διαδικασία της αιμοληψίας εφαρμόστηκε και κατά το μέσον της πρώτης γραμμής θεραπείας αλλά και κατά την επιδείνωση της νόσου. Μετά την αιμοληψία εφαρμόστηκε φυγοκέντρηση στα 1600 (+/-150) g για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (εντός 3 ωρών από την αιμοληψία) σε φυγόκεντρο κεφαλής με καλάθια και μηδενική επιβράδυνση . Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση έγινε προσεκτική μεταφορά του πλάσματος με πιπετάρισμα και από τα δύο σωληνάρια αιμοληψίας σε ένα σωληνάριο των 15ml. Σε κάθε σωληνάριο αποφεύγονταν η λήψη υποκείμενου μέσω παραμονής 500 ml πλάσματος. Ακολουθούσε 2^η φυγοκέντρηση στα 3000 (+/-150) g με φυγόκεντρο κεφαλής σταθερής γωνίας για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο πλάσμα μεταφερόταν σε ένα νέο σωληνάριο των 150 ml χωρίς διαταραχή του ιζήματος με πιπετάρισμα κατά μήκος του τοιχώματος. Εξασφαλιζόνταν η παραμονή περίπου 300 μl, στο κάτω μέρος του σωλήνα για να αποφευχθεί η μόλυνση του πλάσματος με κύτταρα. Το πλάσμα ανακατευόταν απαλά με πιπετάρισμα. Τέλος ακολουθούσε μεταφορά 3 ml του πλάσματος σε ένα κρυογονικό

φιαλίδιο των 4 ml το οποίο τοποθετούνταν αμέσως σε όρθια θέση σε κατάψυξη στους -70 °C για αποθήκευση.

Ο έλεγχος των μεταλλάξεων στο πλάσμα έγινε με ψηφιακή PCR (OncoBEAM RAS CRC Kit-Sysmex) για την ακριβή ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Βασική αρχή της είναι η κλασματοποίηση του δείγματος με πολλαπλές αραιώσεις φτάνοντας στο ένα περίπου αντίγραφο DNA ανά κλάσμα πριν την PCR, ανιχνεύοντας στη συνέχεια και καταγράφοντας με δυαδικό τρόπο τον φθορισμό κάθε κλάσματος. Έτσι ανιχνεύονται επιτυχώς και τα μόρια-στόχοι που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (όπως μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του όγκου), προσδίδοντας στη μέθοδο πολύ υψηλή ευαισθησία και φέρνοντας την σε πρωτοποριακή θέση στο χώρο των υγρών βιοψιών.

Συγκεκριμένα στη BEAMing ψηφιακή PCR από τα αρχικά Beads (σφαιρίδια), Emulsion (γαλάκτωμα), Amplification (ενίσχυση), Magnetics (μαγνητική) η κλασματοποίηση του δείγματος στηρίζεται στη δημιουργία γαλακτώματος τύπου νερό σε έλαιο. Μέσα σε αυτό, κάθε μόριο DNA πολλαπλασιάζεται ξεχωριστά και τα χιλιάδες πανομοιότυπα αντίγραφα που προκύπτουν προσδένονται σε μαγνητικά σφαιρίδια. Τα μόρια DNA, έπειτα, υβριδοποιούνται με ειδικούς ιχνηθέτες (για το άγριου τύπου (wild-type) ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αντίστοιχα) και ακολουθεί ποιοτική ή ποσοτική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος αυτή με όριο ανίχνευσης 0,01% έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ασθενών με κολοορθικό καρκίνο για την ταυτοποίηση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (93)(94) και φέρει πιστοποίηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης (C.E.-IVD) για κλινική χρήση στον έλεγχο μεταλλαγμένων RAS στο πλάσμα ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο.

Το OncoBEAM RAS CRC Kit αποτελεί ένα έτοιμο προς χρήση, invitro προσδιορισμό ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ποιοτική ανίχνευση ενός συνόλου 34 μεταλλάξεων και διαφοροποίησης των 12 κωδικονίων των ανθρώπινων γονιδίων *KRAS* και *NRAS* χρησιμοποιώντας την τεχνολογία BEAMing. Το kit χρησιμοποιείται με ένα σύστημα οργάνων, λογισμικού και αντιδραστηρίων και αποτελείται από πολλαπλές διεργασίες ροής εργασίας. Τα κύρια βήματα της διαδικασίας περιλαμβάνουν:

- Προετοιμασία δειγμάτων για την εκχύλιση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA ελεύθερων κυττάρων από ανθρώπινο πλάσμα χρησιμοποιώντας το QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen).

- Προενίσχυση σε μια προσέγγιση multiplex PCR για τον εμπλουτισμό του DNA στόχου χρησιμοποιώντας το κύριο μείγμα Multiplex και την DNA πολυμεράση που παρέχονται με το OncoBEAM RAS CRC Kit για χρήση στο όργανο θερμικού κυκλοποιητή VeritiDx (ThermoFisher) .
- Ψηφιακή PCR με βάση γαλάκτωμα σε συνδυασμό με ειδική ενίσχυση για κάθε εξώνιο του γονιδίου σε μαγνητικά σφαιρίδια με τη χρήση OncoBEAM RAS CRC Kit και θερμικού κυκλοποιητή VeritiDx (ThermoFisher).
- Ανίχνευση μεταλλάξεων χρησιμοποιώντας ειδικούς για αλληλόμορφα ιχνηθέτες υβριδισμού, οι οποίοι είναι αντιστρόφως συμπληρωματικοί στις γνωστές αλληλουχίες μη μεταλλαγμένου τύπου. Η διαφοροποίηση των σφαιριδίων , τα οποία μεταφέρουν αντίγραφα των μεταλλαγμένων ή μη μεταλλαγμένων αλληλομόρφων πραγματοποιείται μέσω ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Η ανάλυση του αρχείου των δεδομένων κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιείται με τη χρήση του FCSExpressV5.0. Τα φύλλα περίληψης που παράγονται περιέχουν πληροφορίες ειδικές για το πρότυπο ανάλυσης σχετικά με την εγκυρότητα της μέτρησης και για τα δείγματα επίσης πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση μετάλλαξης (ανιχνεύθηκε-δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη). Ο απόλυτος αριθμός των μεταλλαγμένων σφαιριδίων πρέπει να υπερβαίνει ένα ελάχιστο επίπεδο προκειμένου να εξασφαλίζεται ότι η μέτρηση βρίσκεται εντός του αποδεκτού εύρους. Τα κριτήρια εγκυρότητας συμπεριλαμβάνουν εσωτερικό μάρτυρα για την αξιολόγηση επαρκούς συγκέντρωσης DNA του δείγματος. Οι μετρήσεις εξωτερικού μάρτυρα επιβεβαιώνουν την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της εξέτασης.

Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου έχει προσδιοριστεί με τη χρήση DNA εκχυλισμένου από το πλάσμα υγιών δοτών και έχει υπολογιστεί το όριο ανίχνευσης για κάθε εξεταζόμενη μετάλλαξη στόχο από ένα μοντέλο παλινδρόμησης probit ως η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στην οποία, με μία προκαθορισμένη πιθανότητα 95%, τα αποτελέσματα της μέτρησης δίνουν ένα αποτέλεσμα «Ανιχνεύθηκε Μετάλλαξη». Μια κλινική τιμή κατωφλιού (αριθμός μεταλλαγμένων σφαιριδίων) καθορίστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιεί τον αριθμό των αληθών αποτελεσμάτων. Δείγματα πάνω από την τιμή κατωφλιού με καθορισμένο σήμα ειδικής μετάλλαξης προσδιορίζονται ως «Ανιχνεύθηκε Μετάλλαξη». Η συγκεκριμένη δοκιμασία ψηφιακής PCR δίνει τη δυνατότητα

υπολογισμού της συχνότητας των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων με τη χρήση του λόγου RAS μεταλλαγμένα αλληλόμορφα προς το σύνολο των RAS αγρίου τύπου και RAS μεταλλαγμένων αλληλομόρφων.

15.3. Ανίχνευση του μεταγράφου του μεταλλαγμένου RAS γονιδίου σε αιμοπετάλια ασθενών.

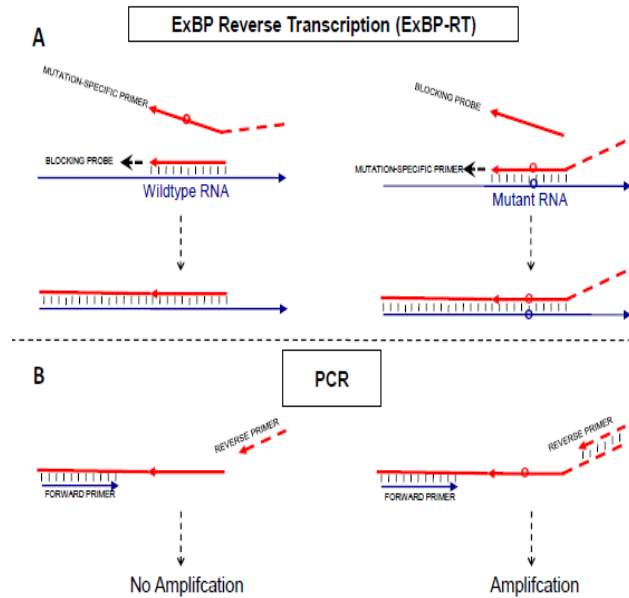
Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών για την απομόνωση των αιμοπεταλίων τα οποία λήφθηκαν με απλή αιμοληψία και συγκεκριμένα δύο δείγματα 8mlολικού αίματος σε BD Vacutainer EDTAακολουθούμενη από ήπια ανάδευση αυτών. Στη συνέχεια τα δείγματα υπέστησαν φυγοκέντρηση για είκοσι λεπτά στις 800 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στα δείγματα μετά τη φυγοκέντρηση εφαρμόστηκε πιπετάρισμα για την απομόνωση του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια χωρίς την πρόσμιξη λευκοκυττάρων. Νέα φυγοκέντρηση ήταν το επόμενο βήμα για είκοσι λεπτά στα 2200 gμε πιπετάρισμα του υπερκείμενου προσεκτικά για διαχωρισμό του πλάσματος από τα αιμοπετάλια με τοποθέτηση του πλάσματος σε ξεχωριστό σωληνάριο. Στη συνέχεια γινόταν τοποθέτηση του ιζήματος των αιμοπεταλίων σε διάλυμα RNeasy lysis buffer και μεταφορά τους σε σωληνάρια τύπου Eppendorf και αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία 4 βαθμών κελσίου πριν την οριστική κατάψυξή τους στο -80 βαθμούς κελσίου για επεξεργασία.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε RNA απομονωμένο από την καρκινική σειρά LS174T η οποία φέρει τη μετάλλαξη KRAS c.35G>A (G12D) καθώς και δείγματα ασθενών. Η τεχνική στηρίζεται στη χρήση LNA blockers και ιχνηθετών (probes) στα στάδια της αντιστροφής μεταγραφής (ReverseTranscription) και εν συνεχεία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), που μπλοκάρουν την ενίσχυση του άγριου τύπου (wild-type) KRASRNA και επιτρέπουν την επιλεκτική ανίχνευση του μεταλλαγμένου μορίου.

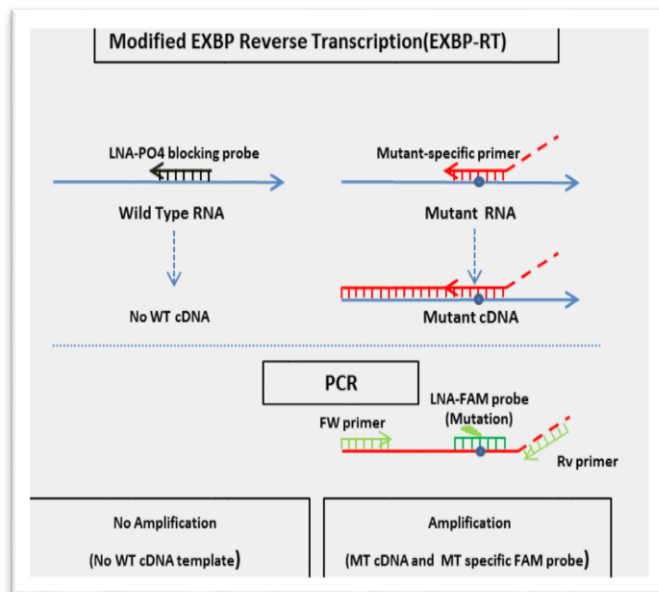
Πιο συγκεκριμένα η αντίδραση της αντιστροφής μεταγραφής περιέχει ένα εκκινητή (primer) που είναι ειδικός για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη και έναν ιχνηθέτη (probe) που είναι επεκτεινόμενος ειδικός για το άγριου τύπου μόριο και ο οποίος μπορεί να μπλοκάρει την ενίσχυση του (EXBP-RT) (107). Τόσο ο primer που είναι ειδικός για το μεταλλαγμένο μόριο όσο και ο ιχνηθέτης για το άγριου τύπου μόριο περιέχουν μια αρχική ακολουθία η οποία είναι συμπληρωματική μιας συγκεκριμένης ακολουθίας του

RNA. Οι αρχικές αυτές ακολουθίες είναι μικρές. Με τη χρήση πρωτοκόλλου hot-start στην αντίστροφη μεταγραφή με αργή επάνοδο σε ψυχρή θερμοκρασία για το βέλτιστο υβριδισμό των primers επιτυγχάνεται το σωστό priming σε σημαντικά υψηλότερες θερμοκρασίες. Το μεταλλαγμένο RNA εκλεκτικά συνδέεται με τον ειδικό primer και το τελικό cDNA που προκύπτει από τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής ανιχνεύεται από μια ειδική-μοναδική υπογραφή στο 5' άκρο του ειδικού primer. Η χρήση του επεκτεινόμενου ιχνηθέτη για το άγριου τύπου μόριο στη διαδικασία εξασφαλίζει την ορθή σύνδεση του ειδικού primer με το μεταλλαγμένο RNA μόριο μέσω της υβριδοποίησης και απόλυτης ταύτισης του ιχνηθέτη (probe) στο άγριου τύπου μόριο (107).

Με τη χρήση RNA από την καρκινική σειρά LS174T και που φέρει τη μετάλλαξη *KRAS* c.35G>A (G12D) αλλά και άγριου τύπου RNA χωρίς την αντίστροφη μετάλλαξη (HUVCEC) διεξήχθησαν τα πειράματα κατά τον ανωτέρω περιγραφέντα τύπο. Χρησιμοποιήθηκαν 250 ng συνολικού RNA ως μητρικό μόριο για τη διαδικασία της EXBP-RT. Το 1/3 του προϊόντος της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για PCR για την ενίσχυση των μεταλλαγμένων *KRAS* μορίων (Εικόνες 14,15).



Εικόνα 14. Η τεχνική EXBP-RT με τον ειδικό primer και probe για την επιλεκτική ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου Tho H. Ho et al & Jakob Stenman, Nucleic Acids Res.2015 Jan;43(1):e4.



Εικόνα 15. Η τροποποιημένη τεχνική EXBP-RT με την εφαρμογή LNA-blocker modified Tho H. Ho et al & Jakob Stenman, Nucleic Acids Research, 2015, Jan;43(1):e4.

16. Αποτελέσματα.

16.1 Αποτελέσματα εφαρμογής μεθόδου αλληλούχισης επόμενης γενιάς στον ιστό των ασθενών και μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς και ψηφιακής PCR BEAMing στο πλάσμα του περιφερικού αίματος.

Συνολικά 56 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου συμπεριελήφθησαν στην παρούσα ανάλυση. Σε 21 από αυτούς (37,5%) έγινε έλεγχος με NGS στον ιστό του όγκου και στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στη διάγνωση και τη στιγμή της πρώτης προόδου της νόσου μετά τη θεραπεία της 1^{ης} γραμμής (NGS μόνο στο πλάσμα του περιφερειακού αίματος για την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό πιθανών μεταλλάξεων (ομάδα Α).

Σε 15 ασθενείς (26,8%) η παρουσία της μετάλλαξης RAS ελέγχθηκε με το μέθοδο BEAMing στο πλάσμα του περιφερικού αίματος στη διάγνωση της νόσου (Ομάδα Β).

Στους υπόλοιπους 20 ασθενείς (39,7%) και οι δύο τεχνικές BEAMing και NGS χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου (ομάδα ΑΒ).

Σε έντεκα από τους παραπάνω ασθενείς (10 από την ομάδα Α και ένα από την ομάδα ΑΒ) διενεργήθηκε έλεγχος με NGS στην επιδείνωση της νόσου.

Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και οι συχνότητες των μεταλλάξεων περιεγράφηκαν ως τιμές με τα αντίστοιχα για το σύνολο του πληθυσμού και ανά ομάδα. Οι διαφορές μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Chi-Square του Fisher's test, όπου ήταν κατάλληλο, η μέθοδος Wilcoxon rank-sum test εφαρμόστηκε για την εξέταση διαφορών στην ηλικία, το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο CEA και τον καρκινικό δείκτη Ca 19.9 στις ομάδες που αναλύθηκαν.

Το κλινικό αποτέλεσμα παρουσιάστηκε ως χρόνος μέχρι την επιδείνωση της νόσου (Time To Progression-TTP, ο χρόνος από την έναρξη της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας μέχρι την ημερομηνία της πρώτης υποτροπής της νόσου ή θανάτου από οποιαδήποτε αιτία). Εάν το αντίστοιχο γεγονός δεν παρατηρούνταν, οι ασθενείς κρίνονταν με βάση την ημερομηνία της τελευταίας παρακολούθησής τους. Η καμπύλες επιβίωσης αποδόθηκαν γραφικά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kaplan-Meier και συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων με τη χρήση log-rank test.

Όλες οι δοκιμασίες ήταν two sided σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας άλφα 5%. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση λογισμικού SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Στον **πίνακα 1** παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων για όλους τους ασθενείς συνολικά και ανά ομάδα. Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 64 έτη (εύρος 37-87) και δεν διαφοροποιούνταν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων (Kruskal-Wallis $p=0,55$). Οι περισσότεροι ασθενείς ήταν άρρενες (60,7%) και οι μισοί από αυτούς είχαν θετικό ιστορικό καπνίσματος. Η πιο συχνή συνοσηρότητα ήταν η αρτηριακή υπέρταση σε 13 ασθενείς, ακολουθούμενη από στεφανιαία νόσο σε 17 ασθενείς. Εικοσιέξι ασθενείς (από τους 49 με διαθέσιμα στοιχεία) είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό κακοήθειας. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς είχαν μεταστατική νόσο (στάδιο IV) τη στιγμή της διάγνωσης ενώ μόνο δέκα ασθενείς (19,7%) διαγνώστηκαν με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου III. Όλοι αυτοί είχαν λάβει επικουρική χημειοθεραπεία, βασισμένη στην οξαλιπλατίνη στις περισσότερες περιπτώσεις (οκτώ ασθενείς-80%) ενώ δύο από αυτούς είχαν λάβει μονοθεραπεία με φθοριοπυριμιδίνη ως επικουρική θεραπεία. Μετάσταση σε 3 όργανα διαπιστώθηκε σε έξι ασθενείς (3 ομάδας B και 3 ομάδας AB), ενώ οι περισσότεροι ασθενείς είχαν μετάσταση σε 1 μόνο όργανο.

Είκοσι τέσσερις από τους πενήντα πέντε ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με το χημειοθεραπευτικό σχήμα πρώτης γραμμής δεν έλαβαν στοχευτική θεραπεία ενώ 18 έλαβαν χημειοθεραπεία και anti-EGFR (6 ασθενείς έλαβαν Cetuximab και 7 Panitumumab). Είκοσι ασθενείς (35,7%) είχαν αξιολόγηση της νόσου μεταξύ του 2^{ου} και 4^{ου} κύκλου της πρώτης γραμμής θεραπείας με απεικονιστικές μεθόδους (7 ομάδας AB, 10 από την ομάδα A, 3 από την ομάδα B). Αξονικές τομογραφίες έγιναν σε δεκαέξι από αυτούς (6 από την ομάδα AB, 8 από την ομάδα A και 2 από την ομάδα B), ένας ασθενής από την ομάδα A υπεβλήθη σε PET scan και ένας ασθενής από την ομάδα AB υπεβλήθη σε PET/MRI, ενώ για τους υπόλοιπους ασθενείς δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες αναφορικά με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του όγκου. Αντικειμενική (μερική) ανταπόκριση (objective response) παρατηρήθηκε σε δώδεκα ασθενείς (4 από την ομάδα AB, 7 από την ομάδα A και σε έναν από την ομάδα B), ενώ 4 ασθενείς είχαν σταθερή νόσο (stable disease) (1 από την ομάδα AB, 1 από την ομάδα A και 2 από την ομάδα B) και πρόοδος νόσου (progressive disease) διαπιστώθηκε σε 3 ασθενείς (ένας από κάθε ομάδα). Για τους υπόλοιπους ασθενείς δεν

υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για την καλύτερη ανταπόκριση κατά την πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας.

Δεδομένα σχετικά με μεταστασεκτομή ήταν διαθέσιμα για 12 ασθενείς, και 3 από αυτούς δεν υπεβλήθησαν σε μεταστασεκτομή (2 από την ομάδα B και ένας από την ομάδα A). Οχτώ ασθενείς έλαβαν θεραπεία συντήρησης μετά από την πρώτη γραμμή θεραπείας (2 από την ομάδα AB, 5 από την ομάδα A και ένας από ομάδα B).

Συνολικά, 21 ασθενείς είχαν πρόοδο νόσου μετά τη θεραπεία πρώτης γραμμής και 9 ασθενείς είχαν αποβιώσει κατά τη στιγμή της ανάλυσης δεδομένων. Από τους 21 ασθενείς με πρόοδο νόσου , εννιά είχαν πρόοδο στο ήπαρ, τέσσερις στον πνεύμονα , πέντε στο ήπαρ και στους πνεύμονες, ένας στο περιτόναιο και ένας ασθενής είχε βιοχημική πρόοδο νόσου. Για έναν ασθενή δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για το σημείο στο οποίο υπήρξε πρόοδος της νόσου.

Πίνακας. 1. Χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών και των όγκων τους.

	Σύνολο	Ομάδα AB	Ομάδα A	Ομάδα B	p-value
Μεταβλητή	(N=56)	(N=20)	(N=21)	(N=15)	
Median (min, max)					
Ηλικία(N=56)	64.0(37.0,87.0)	61.5(47.0,83.0)	60.0(37.0,80.0)	67.0(43.0,87.0)	0.55
CEA (N=34)	67.9(0.50,500001.0)	75.3(0.90,4200.0)	103.0(0.50,2710.0)	38.9(2.5,500001.0)	0.93
CA19-9 (N=33)	101.0(0.80,31600.0)	100.5(2.3,7700.0)	0,31600.0)	111.0(10.8,5179.0)	0.89
N (%)					
Ηλικία (N=56)					0.46
≤65	30(53.6)	12(60.0)	12(57.1)	6(40.0)	
>65	26(46.4)	8(40.0)	9(42.9)	9(60.0)	
Φύλο (N=56)					0.84
Female	22(39.3)	8(40.0)	9(42.9)	5(33.3)	
Male	34(60.7)	12(60.0)	12(57.1)	10(66.7)	
Κάπνισμα (N=50)					0.19
No	25(50.0)	8(44.4)	13(65.0)	4(33.3)	
Yes	25(50.0)	10(55.6)	7(35.0)	8(66.7)	
Οικογενειακό ιστορικό νεοπλασίας (N=49)					0.11
Όχι	23(46.9)	6(33.3)	13(65.0)	4(36.4)	
Ναι	26(53.1)	12(66.7)	7(35.0)	7(63.6)	
Εντόπιση όγκου (N=55)					0.88
Αριστερά	19(34.5)	7(36.8)	7(33.3)	5(33.3)	

Ορθό	11(20.0)	3(15.8)	4(19.0)	4(26.7)	
Δεξιά	14(25.5)	4(21.1)	6(28.6)	4(26.7)	
Σιγμοειδές	6(10.9)	4(21.1)	1(4.8)	1(6.7)	
Εγκάρσιο	5(9.1)	1(5.3)	3(14.3)	1(6.7)	
Εντόπιση όγκου δύο κατηγορίες (N=55)					0.93
Αριστερά	41(74.5)	15(78.9)	15(71.4)	11(73.3)	
Δεξιά	14(25.5)	4(21.1)	6(28.6)	4(26.7)	
Grade (N=45)					0.65
II	40(88.9)	14(87.5)	16(88.9)	10(90.9)	
II/III	2(4.4)	1(6.3)	0(0.0)	1(9.1)	
III	3(6.7)	1(6.3)	2(11.1)	0(0.0)	
PS (N=50)					0.94
0	39(78.0)	16(84.2)	15(71.4)	8(80.0)	
1	6(12.0)	2(10.5)	3(14.3)	1(10.0)	
2	5(10.0)	1(5.3)	3(14.3)	1(10.0)	
Στάδιο στη διάγνωση (N=56)					0.30
III	10(17.9)	2(10.0)	6(28.6)	2(13.3)	
IV	46(82.1)	18(90.0)	15(71.4)	13(86.7)	
Μεταστατικές εντοπίσεις (N=56)					0.30
Λεμφαδένες	1(1.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Λεμφαδένες , πύελος	1(1.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Ήπαρ	22(39.3)	7(35.0)	11(52.4)	4(26.7)	
Ήπαρ λεμφαδένες	5(8.9)	0(0.0)	3(14.3)	2(13.3)	
Ήπαρ, ασκίτης , πνεύμονες	1(1.8)	0(0.0)	0(0.0)	1(6.7)	
Ήπαρ , οστά	1(1.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Ήπαρ ,εγκέφαλος	1(1.8)	0(0.0)	1(4.8)	0(0.0)	
Ήπαρ , πνεύμονες	4(7.1)	1(5.0)	1(4.8)	2(13.3)	
Ήπαρ, πνεύμονες , λεμφαδένες	1(1.8)	0(0.0)	0(0.0)	1(6.7)	
Πνεύμονες	4(7.1)	1(5.0)	2(9.5)	1(6.7)	
Πνεύμονες , λεμφαδένες	1(1.8)	0(0.0)	0(0.0)	1(6.7)	
Πνεύμονες , λεμφαδένες, οστά	1(1.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Ήπαρ πνεύμονες	6(10.7)	1(5.0)	3(14.3)	2(13.3)	
Πνεύμονες , ήπαρ, λεμφαδένες	1(1.8)	0(0.0)	0(0.0)	1(6.7)	

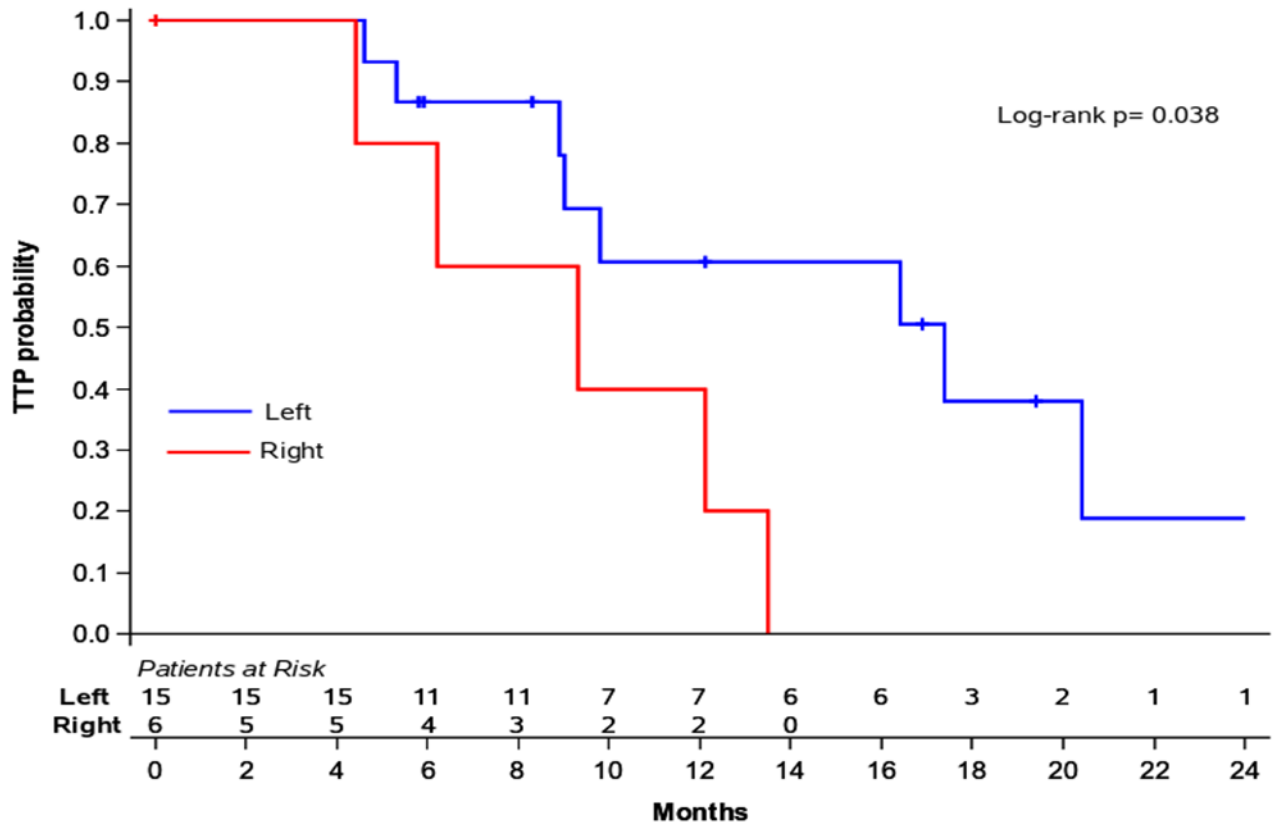
Περιτόναιο	2(3.6)	2(10.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Περιτόναιο , λεμφαδένες , ουροδόχος κύστη	1(1.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Περιτόναιο, λεμφαδένες, ήπαρ	1(1.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Περιτόναιο ,ήπαρ	2(3.6)	2(10.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Αριθμός μεταστατικών οργάνων (N=56)					0.17
1	29(51.8)	11(55.0)	13(61.9)	5(33.3)	
2	21(37.5)	6(30.0)	8(38.1)	7(46.7)	
3	6(10.7)	3(15.0)	0(0.0)	3(20.0)	
Χειρουργείο πριν τη θεραπεία (N=54)					0.99
Όχι	20(37.0)	7(36.8)	8(38.1)	5(35.7)	
Εκτομή πρωτοπαθούς εστίας	34(63.0)	12(63.2)	13(61.9)	9(64.3)	
Επικουρική χημειοθεραπεία (N=55)					0.30
Όχι	45(81.8)	18(90.0)	15(71.4)	12(85.7)	
Ναι	10(18.2)	2(10.0)	6(28.6)	2(14.3)	
Στοχευτική θεραπεία (N=55)					0.28
Bevacizumab	18(32.7)	9(47.4)	6(28.6)	3(20.0)	
Cetuximab	6(10.9)	3(15.8)	2(9.5)	1(6.7)	
Όχι	24(43.6)	7(36.8)	9(42.9)	8(53.3)	
Panitumumab	7(12.7)	0(0.0)	4(19.0)	3(20.0)	

Ανάλυση ομάδας Α (ασθενείς οι οποίοι υπεβλήθησαν σε έλεγχο με τεχνική NGS στον ιστό και στο πλάσμα του περιφερικού αίματος).

Από τους εικοσιένα ασθενείς οι οποίοι συμπεριελήφθησαν στην ομάδα Α, δεκαπέντε είχαν όγκους στο αριστερό κόλον και μόνο έξι ασθενείς (28,6%) είχαν όγκους στο δεξιό κόλον. Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 60 έτη (εύρος 37-80) , λίγο νεότερης ηλικίας σε σχέση με το συνολικό πληθυσμό των άλλων δύο ομάδων. Οι περισσότεροι ασθενείς ήταν άρρενες (57,1%) και δεν είχαν ιστορικό καπνίσματος(65%). Απεικόνιση για την αξιολόγηση της νόσου στην πρώτη γραμμή θεραπείας έγινε σε δέκα ασθενείς και τα αποτελέσματα για την καλύτερη ανταπόκριση ήταν διαθέσιμα για εννιά από αυτούς. Μεταξύ άλλων, επτά ασθενείς είχαν μερική βελτίωση (partial response) , ένας είχε σταθερή νόσο (stable disease) και ένας είχε πρόοδο νόσου μετά την πρώτη γραμμή θεραπείας και έλαβε θεραπεία δεύτερης γραμμής. Οκτώ εξ αυτών εμφάνισαν εκ νέου πρόοδο νόσου μετά τη θεραπεία δεύτερης γραμμής και έλαβαν τρίτης γραμμής θεραπεία. Πρόοδος νόσου κατά την τρίτη γραμμή θεραπείας παρατηρήθηκε σε 2 από αυτούς οι οποίοι εν συνεχεία έλαβαν τέταρτης γραμμής θεραπεία. Ένας εξ αυτών απεβίωσε κατά τη διάρκεια της τέταρτης γραμμής θεραπεία και ο έτερος αφού εμφάνισε και νέα πρόοδο νόσου, έλαβε πέμπτης γραμμής θεραπεία με τριφλουριδίνη. Αυτός ο ασθενής εμφάνισε και νέα πρόοδο νόσου και έλαβε έκτης γραμμής θεραπεία με FOLFIRINOX και Panitumumab.

Σε ένα μέσο διάστημα παρακολούθησης 19,4 μηνών (95% CI 15-23,5) συνολικά τέσσερις θάνατοι αναφέρθηκαν σε αυτή την ομάδα ασθενών. Η διαμέση συνολική επιβίωση δεν είχε επιτευχθεί (median OS) ακόμη. Η διαμέση χρονική διάρκεια μέχρι την πρόοδο της νόσου (median time to progression-medium TTP) ήταν 12,1 μήνες (95% CI 8,9-17,4). Οι ασθενείς με εντόπιση του όγκου δεξιά είχαν στατιστικά μικρότερο TTP σε σχέση με αυτούς που είχαν εντόπιση του όγκου αριστερά (medium TTP 9,3 months (95% CI 4,4-13,5) versus 17,4 (95% CI 8,9-40,2), log rank p=0,038) (διάγραμμα 1).

Διάγραμμα 1. Kaplan-Meier για το TTP με βάση την εντόπιση του όγκου στους ασθενείς της ομάδας Α. (N=21).



Κατά τη διάγνωση της νόσου τέσσερις ασθενείς (19%) είχαν wildtype όγκους (χωρίς μεταλλάξεις), δύο ασθενείς (9,5%) είχαν *BRAF* μεταλλάξεις, έντεκα είχαν *RAS* μεταλλάξεις και τέσσερις είχαν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια πέραν των *KRAS*, *NRAS* ή *BRAF* σύμφωνα με τον έλεγχο NGS στον ιστό. Σε 5 ασθενείς οι *KRAS* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στη θέση 12, σε άλλους τέσσερις στη θέση 13, ένας ασθενής είχε *NRAS* μετάλλαξη στη θέση 61 και ένας *KRAS* μετάλλαξη στη θέση 146. Είναι αξιοσημείωτο ότι επτά από τους έντεκα ασθενείς με *RAS* μεταλλάξεις είχαν επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* και δύο ασθενείς είχαν επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*, ενώ σε δύο ασθενείς μόνο *KRAS* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν κατά τη διάγνωση της νόσου με τεχνική NGS στον ιστό. Σε έναν από τους επτά ασθενείς με *RAS* και *TP53* μετάλλαξη, *FBXW7* βρέθηκε μεταλλαγμένο επίσης. Από τους δύο

ασθενείς με *BRAF* μεταλλάξεις, ένας επίσης είχε *TP53* μετάλλαξη και ο έτερος είχε μεταλλάξεις και στο *TP53* και στο *PIK3CA*. Οι μισοί από τους ασθενείς με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια πέραν των *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, ένας ασθενής είχε *PIK3CA* μετάλλαξη και ένας είχε μετάλλαξη στο γονίδιο *APC*, *FBXW7*, *PIK3CA* και *TP53*. Η μέση συχνότητα μεταλλαγμένων αλληλίων *KRAS* κατά τη διάγνωση με τη μέθοδο NGS στον ιστό ήταν 32% (13-86%). Και οι εννέα ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια (MSS) κατά τη διάγνωση σύμφωνα με τον έλεγχο NGS. και οι επτά ασθενείς με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια είχαν όγκους στο δεξιό κόλον, ενώ από τους 11 ασθενείς με μεταλλάξεις των *RAS* γονιδίων μόνο ένας είχε όγκο εντοπισμένο στο δεξί κόλον. Επιπρόσθετα και οι τέσσερις ασθενείς με όγκους χωρίς μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση (wildtype) είχαν εντοπίσεις των όγκων στο αριστερό κόλον (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Προφίλ μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου με βάση τα αποτελέσματα NGS στον ιστό των ασθενών ομάδας A(N=21) και με βάση την εντόπιση του όγκου

	Σύνολο (N=21)	Δεξί κόλον (N=6)	Αριστερό κόλον (N=15)	p-value
Μεταλλάξεις (N=21)				0.002
BRAF mut	2(9.5)	1(16.7)	1(6.7)	
Mut in other genes	4(19.0)	4(66.7)	0(0.0)	
RAS mut	11(52.4)	1(16.7)	10(66.7)	
wt	4(19.0)	0(0.0)	4(26.7)	
MSS (N=9)				
MSS	9(100.0)	2(100.0)	7(100.0)	

Ο έλεγχος της ύπαρξης ή όχι μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση με τη χρήση της τεχνικής NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος έγινε σε 17 ασθενείς (81%). Από αυτούς, 8 ασθενείς (41,7%) είχαν *RAS* μεταλλάξεις, 3 είχαν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, 2 είχαν *BRAF* μεταλλάξεις και 4 δεν είχαν ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις. Από τους δύο ασθενείς με *BRAF* μεταλλάξεις, ένας είχε επίσης μετάλλαξη ανιχνεύσιμη στο γονίδιο *TP53* και ο έτερος είχε μετάλλαξη στο γονίδιο *APC*. Από τους τρεις ασθενείς με μετάλλαξη σε

άλλα γονίδια, δύο είχαν μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53* και ένας στο *PIK3CA* με βάση τα αποτελέσματα της υγρής βιοψίας με τη μέθοδο NGS. Από τους οχτώ ασθενείς με *RAS* μεταλλάξεις, οι πέντε είχαν μεταλλάξεις στο *TP53* και *RAS* μεταλλάξεις, ένας είχε ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο *ACT*, ένας είχε μια επιπλέον μετάλλαξη στο γονίδιο *PIK3CA* και ένας ακόμη ασθενής είχε μεταλλάξεις στα *RAS*, *TP53* και *FBXW7* γονίδια. Ο **πίνακας 3** παρουσιάζει τις μεταλλάξεις των γονιδίων στη στιγμή της διάγνωσης με βάση την υγρή βιοψία με τη μέθοδο NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος για όλους τους ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες και με βάση την εντόπιση του όγκου. Από τους 17 ασθενείς που υπεβλήθησαν στον έλεγχο με τη μέθοδο του NGS στον ιστό και στο πλάσμα κατά τη διάγνωση της νόσου, οι *BRAF* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στους ίδιους δύο ασθενείς και με τις δυο μεθόδους. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ένα από αυτούς η μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53* ανιχνεύθηκε επίσης και με τις δύο μεθόδους (ιστό και πλάσμα), ενώ στον έτερο ασθενή ο έλεγχος με NGS στον ιστό ανίχνευσε επιπλέον μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53* και *PIK3CA* σε αντίθεση με τον έλεγχο στο πλάσμα που ανίχνευσε τη μετάλλαξη στο γονίδιο *APC*. Η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *RAS* ήταν ταυτόσημη μεταξύ των δύο μεθόδων (ιστός-πλάσμα) για 8 ασθενείς, ενώ σε 2 ασθενείς με μετάλλαξη *RAS* στον ιστό δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση τους κατά τον έλεγχο στο πλάσμα του περιφερικού αίματος. Σε τρεις ασθενείς βρέθηκαν άλλες μεταλλάξεις εκτός από τα γονίδια *RAS* και *BRAF* και στον ιστό και στο περιφερικό αίμα, ενώ σε έναν ασθενή μόνο ο έλεγχος στον ιστό ανίχνευσε μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53* (**πίνακας 4**).

Πίνακας 3. Προφίλ μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου με βάση τα αποτελέσματα NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος για τους ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες και με βάση την εντόπιση του όγκου.

	Σύνολο (N=17)	Δεξί κόλον (N=6)	Αριστερό κόλον (N=11)	p-value
Μεταλλάξεις (N=17)				0.036
BRAF mut	2(11.8)	1(16.7)	1(9.1)	
Mut in other genes	3(17.6)	3(50.0)	0(0.0)	
RAS mut	8(47.1)	1(16.7)	7(63.6)	
wt	4(23.5)	1(16.7)	3(27.3)	

Πίνακας 4. Σύγκριση μεταλλάξεων με την τεχνική NGS στον ιστό και το πλάσμα του περιφερικού αίματος κατά τη διάγνωση (N=17).

Μεταλλάξεις με NGS στον ιστό	Μεταλλάξεις με NGS στο πλάσμα				
	BRAF mut (N=2)	Mut in other genes (N=3)	RAS mut (N=8)	wt (N=4)	p-value
BRAF mut (N=2)	2 (11.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	<0.001
Mut in other genes (N=4)	0 (0.0)	3 (17.6)	0 (0.0)	1 (5.9)	
RAS mut (N=10)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (47.1)	2 (11.8)	
wt (N=1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.9)	

Κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου, μετά τη θεραπεία της πρώτης γραμμής, διενεργήθηκε έλεγχος στους ασθενείς με τη μέθοδο NGS στο πλάσμα περιφερικού αίματος σε 10 ασθενείς (47,6%). Δύο από αυτούς είχαν μεταλλάξεις στο *BRAF* γονίδιο, τρεις ασθενείς είχαν *RAS* μεταλλάξεις (*KRAS*), τρεις είχαν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια και σε δύο ασθενείς δεν ανευρέθηκαν μεταλλάξεις (πίνακας 5). Ένας από τους δύο ασθενείς με *BRAF* μετάλλαξη κατά την πρόοδο της νόσου είχε επίσης ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο *APC* και ο έτερος με τη *BRAF* μετάλλαξη είχε επίσης μεταλλαγμένο το *TP53* γονίδιο. Από τους τρεις ασθενείς με *RAS* μεταλλάξεις, ο ένας είχε μια δεύτερη μετάλλαξη στο *TP53*, ο ένας είχε μόνο *KRAS* μετάλλαξη ανιχνεύσιμη και ένας ακόμη είχε επιπλέον τρεις μεταλλάξεις στο *TP53* γονίδιο και μία μετάλλαξη στο *SMAD4* γονίδιο. Οι τρεις ασθενείς με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια είχαν ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις στο *TP53* (ένας ασθενής), στο *SMAD4* (ένας ασθενής) και μετάλλαξη του *TP53* με ενίσχυση του *FGFR1* (ένας ασθενής).

Η υγρή βιοψία με τη μέθοδο NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος διενεργήθηκε κατά τη διάγνωση της νόσου και κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου σε οχτώ ασθενείς. Μεταξύ αυτών οι μεταλλάξεις του *BRAF* και τις δύο χρονικές στιγμές ανιχνεύθηκαν σε δύο ασθενείς. Ένας από αυτούς είχε επίσης ανιχνεύσιμη μετάλλαξη

στο *TP53* και τις δύο χρονικές στιγμές και ο έτερος ασθενής είχε ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο *APC* και τις δύο χρονικές στιγμές. Παρομοίως μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια ανιχνεύθηκαν σε δύο ασθενείς και κατά τη διάγνωση και κατά τη πρόοδο της νόσου στο πλάσμα του περιφερικού αίματος. Εντούτοις, σε έναν από αυτούς ανιχνεύθηκε μετάλλαξη *PIK3CA* κατά τη διάγνωση ενώ κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στο *TP53*. Ο άλλος ασθενής είχε ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *TP53* κατά τη διάγνωση και κατά την πρόοδο της νόσου όπου επίσης ανιχνεύθηκε ενίσχυση του *FGFR1*. Ο ασθενής που είχε μετάλλαξη μόνο στο γονίδιο *SMAD4* κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου δεν είχε ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση (πίνακας 6).

Πίνακας 5. Κατάσταση μεταλλάξεων κατά την πρόοδο νόσου με βάση τα αποτελέσματα NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος (N=10).

	Σύνολο (N=10)	Δεξί κόλον (N=3)	Αριστερό κόλον (N=7)	p-value
Μεταλλάξεις (N=10)				0.35
BRAF mut	2(20.0)	1(33.3)	1(14.3)	
Mut in other genes	3(30.0)	2(66.7)	1(14.3)	
RAS mut	3(30.0)	0(0.0)	3(42.9)	
wt	2(20.0)	0(0.0)	2(28.6)	

Πίνακας 6. Σύγκριση των μεταλλάξεων με την τεχνική NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος μεταξύ της στιγμής της διάγνωσης και της προόδου της νόσου (N=8).

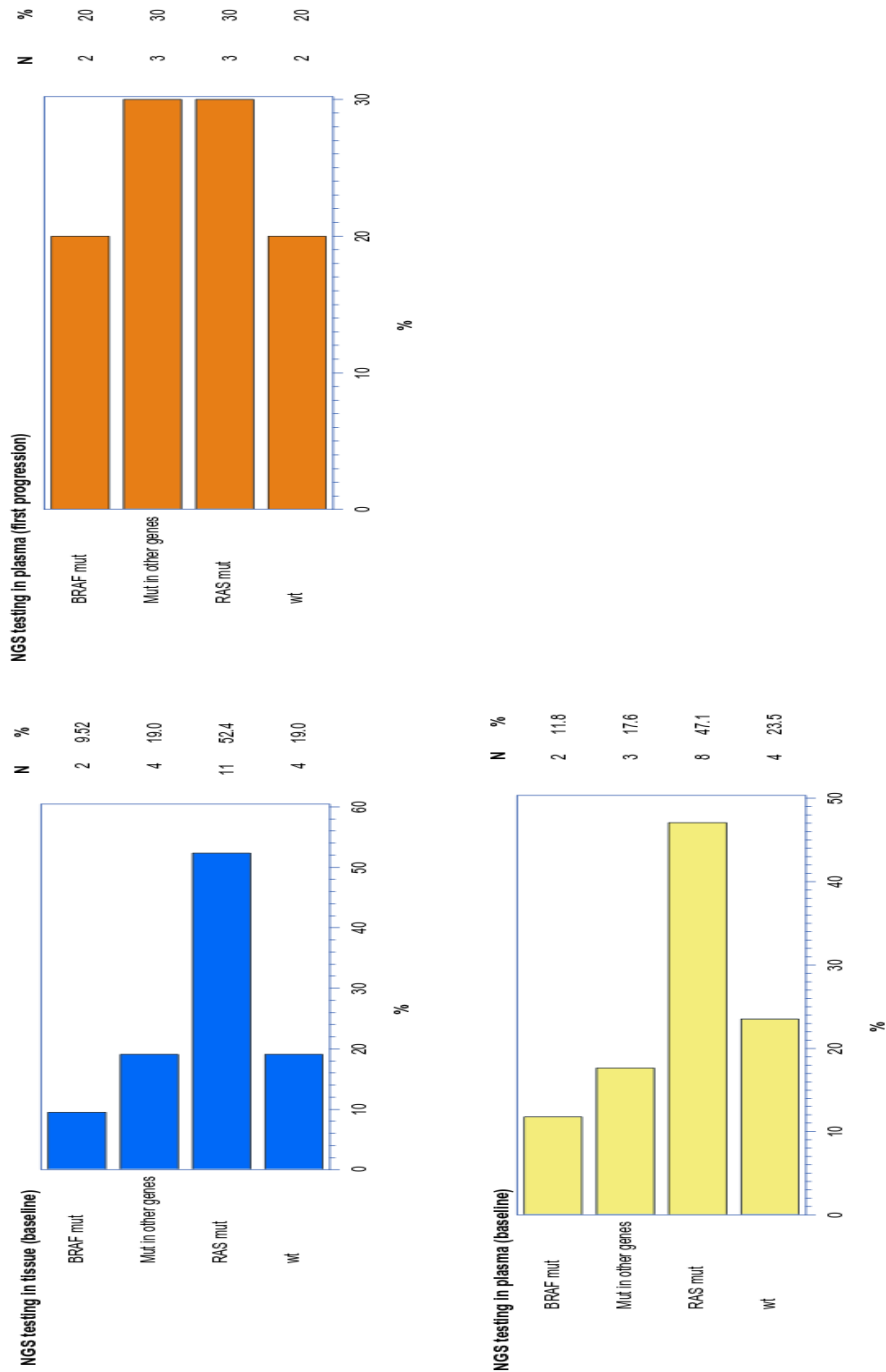
Μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση	Μεταλλάξεις κατά την πρόοδο νόσου				p-value
	BRAF mut (N=2)	Mut in other genes (N=3)	RAS mut (N=2)	wt (N=1)	
BRAF mut (N=2)	2 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.92
Mut in other genes (N=2)	0 (0.0)	2 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
RAS mut (N=3)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	1 (12.5)	
wt (N=1)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	

Το **διάγραμμα 2** παρουσιάζει τις ράβδους που αντιπροσωπεύουν τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς κατά τη διάγνωση και κατά την πρόοδο της νόσου σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου με τη μέθοδο NGS στον ιστό και στο πλάσμα του περιφερικού αίματος. Το **διάγραμμα 3** απεικονίζει τη σύγκριση των μεταλλάξεων στους ασθενείς μεταξύ της στιγμής της διάγνωσης και της προόδου της νόσου. Για τους οχτώ ασθενείς με διαθέσιμα στοιχεία και τις δύο χρονικές στιγμές, όπως απεικονίζεται στο **διάγραμμα 4**, σε τρεις ασθενείς ανιχνεύθηκαν ακριβώς οι ίδιες μεταλλάξεις και στα δύο χρονικά σημεία, ενώ η εμφάνιση νέων μεταλλάξεων κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου παρατηρήθηκε σε τέσσερις ασθενείς (δύο με *SMAD4* μετάλλαξη κατά την πρόοδο της νόσου, ένας με μετάλλαξη *TP53*, ένας με ενίσχυση *FGFR1*) ενώ εξαφάνιση μεταλλάξεων με την πάροδο του χρόνου διαπιστώθηκε σε δύο ασθενείς. Ένας από αυτούς είχε *AKT* και *KRAS* μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση ενώ καθόλου μεταλλάξεις δεν ανιχνεύθηκαν στον ασθενή αυτό κατά τη πρόοδο της νόσου, ενώ ο έτερος ασθενής είχε ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *PIK3CA* κατά τη διάγνωση η οποία εξαφανίστηκε κατά τη χρονική στιγμή της προόδου της νόσου ενώ ανιχνεύθηκε μία νεοεμφανισθείσα *TP53* μετάλλαξη. Συνολικά, μεταβολή οποιουδήποτε τύπου (εμφάνιση νέας μετάλλαξης ή εξαφάνιση ήδη υπάρχουσας) διαπιστώθηκε σε πέντε ασθενείς.

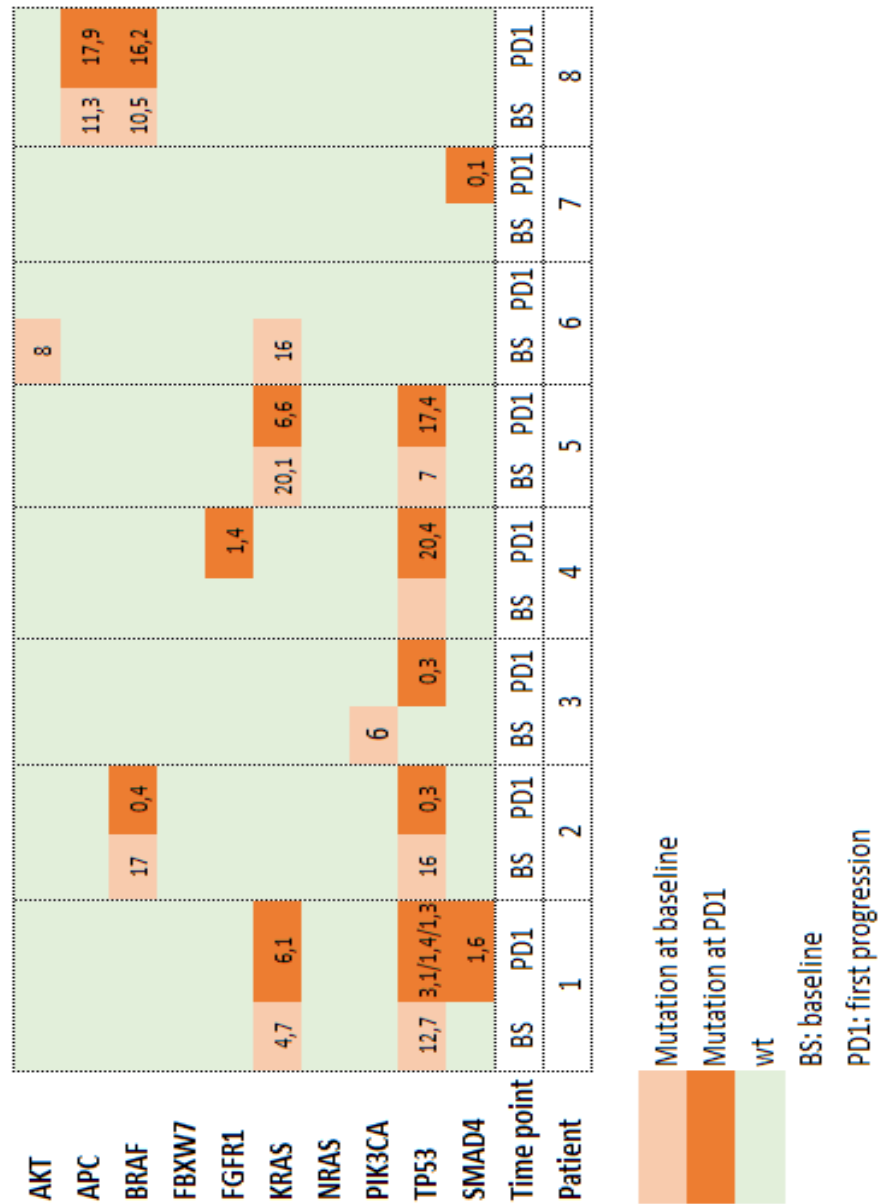
Διάγραμμα 2. Σύγκριση των μεταλλάξεων ανά ασθενή ανιχνεύσιμες στον ιστό και το πλάσμα κατά τη διάγνωση –οι αριθμοί στα κελιά αντιστοιχούν στη συχνότητα του μεταλλαγμένου .



Διάγραμμα 3. Γραφήματα της κατάστασης των μεταλλάξεων με NGS έλεγχο στον ιστό κατά τη διάγνωση(πάνω αριστερά), NGS στο πλάσμα κατά τη διάγνωση(κάτω αριστερά) και κατά την πρόοδο νόσου(πάνω δεξιά).



Διάγραμμα 4. Σύγκριση των μεταλλάξεων ανά ασθενή όπως ανιχνεύθηκαν με NGS στο πλάσμα κατά τη διάγνωση και κατά την πρόοδο νόσου-οι αριθμοί στα κελιά αντιστοιχούν στη συχνότητα του μεταλλαγμένου(%).



Ανάλυση ομάδας B (ασθενείς στους οποίους διενεργήθηκε έλεγχος με την τεχνική BEAMing για μετάλλαξη KRAS, NRAS κατά τη διάγνωση).

Από τους δεκαπέντε ασθενείς που συμπεριλαμβάνονται στην ομάδα αυτή, οι έντεκα είχαν όγκους εντοπιζόμενους στο αριστερό κόλον και μόνο τέσσερις ασθενείς είχαν όγκους με δεξιά εντόπιση στο κόλον. Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 67 έτη. Αξιολόγηση της έκτασης της νόσου κατά την πρόοδο νόσου διενεργήθηκε σε 4 ασθενείς και οι μισοί από αυτούς είχαν σταθερή νόσο, ενώ ένας ασθενής είχε μερική ανταπόκριση και ένας πρόοδο νόσου. Δύο ασθενείς εμφάνισαν πρόοδο νόσου κατά την πρώτη γραμμή θεραπείας και έλαβαν δεύτερη γραμμή θεραπείας με τριφλουριδίνη και pembrolizumab αντίστοιχα. Σε μια μέση διάρκεια παρακολούθησης 2,6 μηνών (95% CI 1,1-5,8) μόνο ένας ασθενής απεβίωσε. Η διαμέση συνολική επιβίωση και το μέσο διάστημα για την πρόοδο της νόσου δεν είχαν επιτευχθεί.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου BEAMing κατά τη διάγνωση, οκτώ ασθενείς (53,3%) είχαν μεταλλάξεις στο KRAS και 7 ασθενείς (46,7%) δεν είχαν ανιχνεύσιμη τη μετάλλαξη (πίνακας 7).

Πίνακας 7. Κατάσταση των μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου με την τεχνική BEAMing στους ασθενείς της ομάδας B και με βάση την εντόπιση του όγκου (N=15).

	Σύνολο (N=15)	Δεξί κόλον (N=4)	Αριστερό κόλον (N=11)	p-value
Μεταλλάξεις (N=15)				0.99
RAS mut	8(53.3)	2(50.0)	6(54.5)	
wt	7(46.7)	2(50.0)	5(45.5)	

Ανάλυση ομάδας AB (ασθενείς οι οποίοι υπεβλήθησαν και σε έλεγχο NGS και με τη μέθοδο BEAMing).

Δεκαπέντε από τους είκοσι ασθενείς οι οποίοι συμπεριλαμβάνονται στην ομάδα αυτή είχαν όγκους με εντόπιση στο αριστερό κόλον, ενώ τέσσερις είχαν όγκους στο δεξί κόλον και για έναν ασθενή η πληροφορία αυτή ήταν άγνωστη. Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν περίπου 62 έτη (εύρος 47-83) και περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς (60%) ήταν άρρενες. Απεικόνιση για τον έλεγχο της έκτασης της νόσου κατά την πρώτη γραμμή θεραπεία έγινε σε επτά ασθενείς και η καλύτερη ανταπόκριση ήταν διαθέσιμη σε έξι από αυτούς. Τέσσερις ασθενείς είχαν μερική ανταπόκριση της νόσου, ένας ασθενής είχε σταθερή νόσο και ένας είχε πρόοδο νόσου. Έξι ασθενείς εμφάνισαν πρόοδο νόσου μετά από την πρώτη γραμμή θεραπείας και έλαβαν θεραπεία δεύτερης γραμμής. Ένας ασθενής απεβίωσε κατά τη δεύτερη γραμμή θεραπείας ενώ ένας εμφάνισε και δεύτερη πρόοδο νόσου και λάμβανε τρίτη γραμμή θεραπείας κατά τη χρονική στιγμή της ανάλυσης δεδομένων. Σε μία μέση χρονική περίοδο παρακολούθησης 6,9 μηνών (95% CI 5,8-7,9) συνολικά αναφέρθηκαν τέσσερις θάνατοι. Η διαμέση χρονική περίοδος για την εμφάνιση προόδου νόσου ήταν 9,5 μήνες (95% CI 5,7-9,8) ενώ η μέση συνολική επιβίωση δεν είχε επιτευχθεί ακόμη.

Ο **πίνακας 8** παρουσιάζει την κατάσταση των μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση όπως αποτυπώθηκε με τη μέθοδο NGS στον ιστό (T-NGS) , με τη μέθοδο NGS στο πλάσμα του περιφερικού αίματος (L-NGS) και με τη μέθοδο BEAMing. Έντεκα από τους είκοσι ασθενείς στην ομάδα αυτή είχαν μεταλλάξεις των *RAS* γονιδίων κατά τη διάγνωση σύμφωνα με τη μέθοδο T-NGS. Δέκα από αυτούς είχαν *KRAS* μεταλλάξεις ενώ ένας είχε *NRAS* μετάλλαξη ανιχνεύσιμη. Εννέα από τους έντεκα με μεταλλάξεις *RAS* κατά τη διάγνωση , με τη μέθοδο T-NGS , είχαν επίσης μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια όπως φαίνεται στο **διάγραμμα 5**. Έλεγχος μικροδορυφορικής αστάθειας κατά τη διάγνωση της νόσου έγινε σε οκτώ ασθενείς με T-NGS και έξι από αυτούς δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια (MSS) (75%). Η μέθοδος L-NGS διενεργήθηκε σε δεκαέξι ασθενείς και *RAS* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 10 από αυτούς (62,5%) (9 ασθενείς με *KRAS* μετάλλαξη και ένας με μετάλλαξη *NRAS*). Τέσσερις από αυτούς είχαν μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια. Ο έλεγχος με τη μέθοδο BEAMing κατά τη διάγνωση διενεργήθηκε σε δεκαεννέα από τους είκοσι ασθενείς και *RAS* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε μισούς από αυτούς (9 ασθενείς). Οχτώ ασθενείς είχαν μεταλλάξεις *KRAS* και ένας είχε *NRAS* μετάλλαξη κατά τη διάγνωση με τη χρήση της μεθόδου

BEAMing. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε ένα ασθενή και οι δύο μέθοδοι BEAMing και L-NGS ανίχνευσαν *KRAS* μετάλλαξη στο κωδικόνιο 61 σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της μεθόδου T-NGS η οποία ανίχνευσε *KRAS* μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13. Ο **πίνακας 9** απεικονίζει τις μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση όπως αυτές αποτυπώθηκαν και με τις τρεις μεθόδους (T-NGS, L-NGS και BEAMing) σε σχέση με την εντόπιση του όγκου για δεκαεννέα ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες και το **διάγραμμα 6** παρουσιάζει τις ράβδους για την κατάσταση των ασθενών κατά τη διάγνωση και με τις τρεις προαναφερθείσες μεθόδους. Ο **πίνακας 10** παρουσιάζει τη σύγκριση της κατάστασης των ασθενών κατά τη διάγνωση μεταξύ των μεθόδων T-NGS και L-NGS, ενώ ο **πίνακας 11** παρουσιάζει τη σύγκριση μεταξύ των μεθόδων L-NGS και BEAMing για τους ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες (N=16 και N=15 αντίστοιχα). Τη στιγμή της προόδου της νόσου, ο έλεγχος με τη μέθοδο NGS ανέδειξε μετάλλαξη του *TP53* με συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλίου 0,2% σε έναν ασθενή, ο οποίος δεν είχε ανιχνεύσιμη μετάλλαξη κατά τη διάγνωση σύμφωνα με τη μέθοδο L-NGS.

Πίνακας 8. Μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση της νόσου και με τις τρεις τεχνικές για τους ασθενείς της ομάδας AB (T-NGS, L-NGS και BEAMing) (N=20).

Μεταλλάξεις	Σύνολο (N=20)
T-NGS (N=20)	
BRAF mut	1(5.0)
Mut in other genes	5(25.0)
RAS mut	11(55.0)
wt	3(15.0)
MSS testing (T-NGS) (N=8)	
MSI	2(25.0)
MSS	6(75.0)
L-NGS (N=16)	
BRAF mut	1(6.3)
Mut in other genes	3(18.8)
RAS mut	10(62.5)
wt	2(12.5)
BEAMing (N=19)	
RAS mut	9(47.4)
wt	10(52.6)

Πίνακας 9. Μεταλλάξεις κατά τη διάγνωση της νόσου και με τις τρεις τεχνικές για τους ασθενείς της ομάδας AB (T-NGS, L-NGS και BEAMing) με βάση την εντόπιση του όγκου.

Μεταλλάξεις	Σύνολο (N=19)	Δεξί κόλον (N=4)	Αριστερό κόλον (N=15)	p-value
T-NGS (N=19)				0.13
Mut in other genes	5(26.3)	0(0.0)	5(33.3)	
RAS mut	11(57.9)	2(50.0)	9(60.0)	
wt	3(15.8)	2(50.0)	1(6.7)	
MSS testing (T-NGS) (N=8)				0.99
MSI	2(25.0)	0(0.0)	2(33.3)	
MSS	6(75.0)	2(100.0)	4(66.7)	
L-NGS (N=15)				0.29
Mut in other genes	3(20.0)	0(0.0)	3(23.1)	
RAS mut	10(66.7)	1(50.0)	9(69.2)	
wt	2(13.3)	1(50.0)	1(7.7)	
BEAMing (N=18)				0.58
RAS mut	9(50.0)	1(25.0)	8(57.1)	
wt	9(50.0)	3(75.0)	6(42.9)	

Πίνακας 10. Σύγκριση των μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου μεταξύ ιστού και πλάσματος περιφερικού αίματος με τεχνική NGS (N=16).

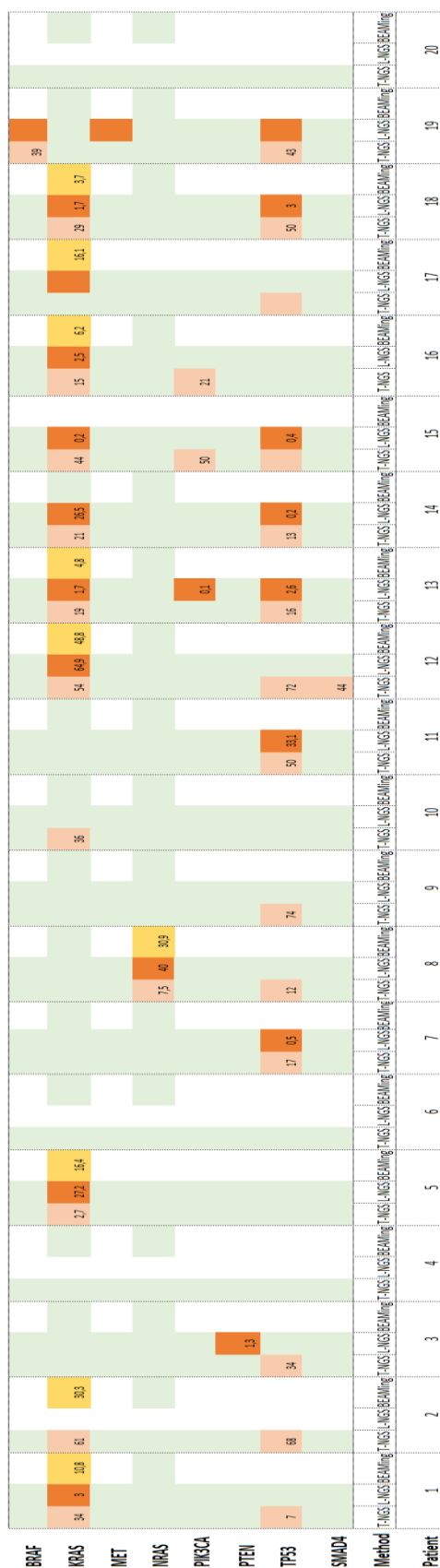
Μεταλλάξεις με T-NGS	Μεταλλάξεις με L-NGS				p-value
	BRAF mut (N=1)	Mut in other genes (N=3)	RAS mut (N=10)	wt (N=2)	
BRAF mut (N=1)	1 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	<0.001
Mut in other genes (N=5)	0 (0.0)	3 (18.8)	1 (6.3)	1 (6.3)	
RAS mut (N=10)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (56.3)	1 (6.3)	
wt (N=0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

Πίνακας 11. Σύγκριση μεταλλάξεων κατά τη διάγνωση της νόσου στο πλάσμα του περιφερικού αίματος μεταξύ μεθόδου NGS και BEAMing (N=15).

Μεταλλάξεις με L-NGS	Μεταλλάξεις με BEAMing		p-value
	RAS mut (N=8)	wt (N=7)	
BRAF mut (N=1)	0 (0.0)	1 (6.7)	0.010
Mut in other genes (N=3)	0 (0.0)	3 (20.0)	
RAS mut (N=9)	8 (53.3)	1 (6.7)	
wt (N=2)	0 (0.0)	2 (13.3)	

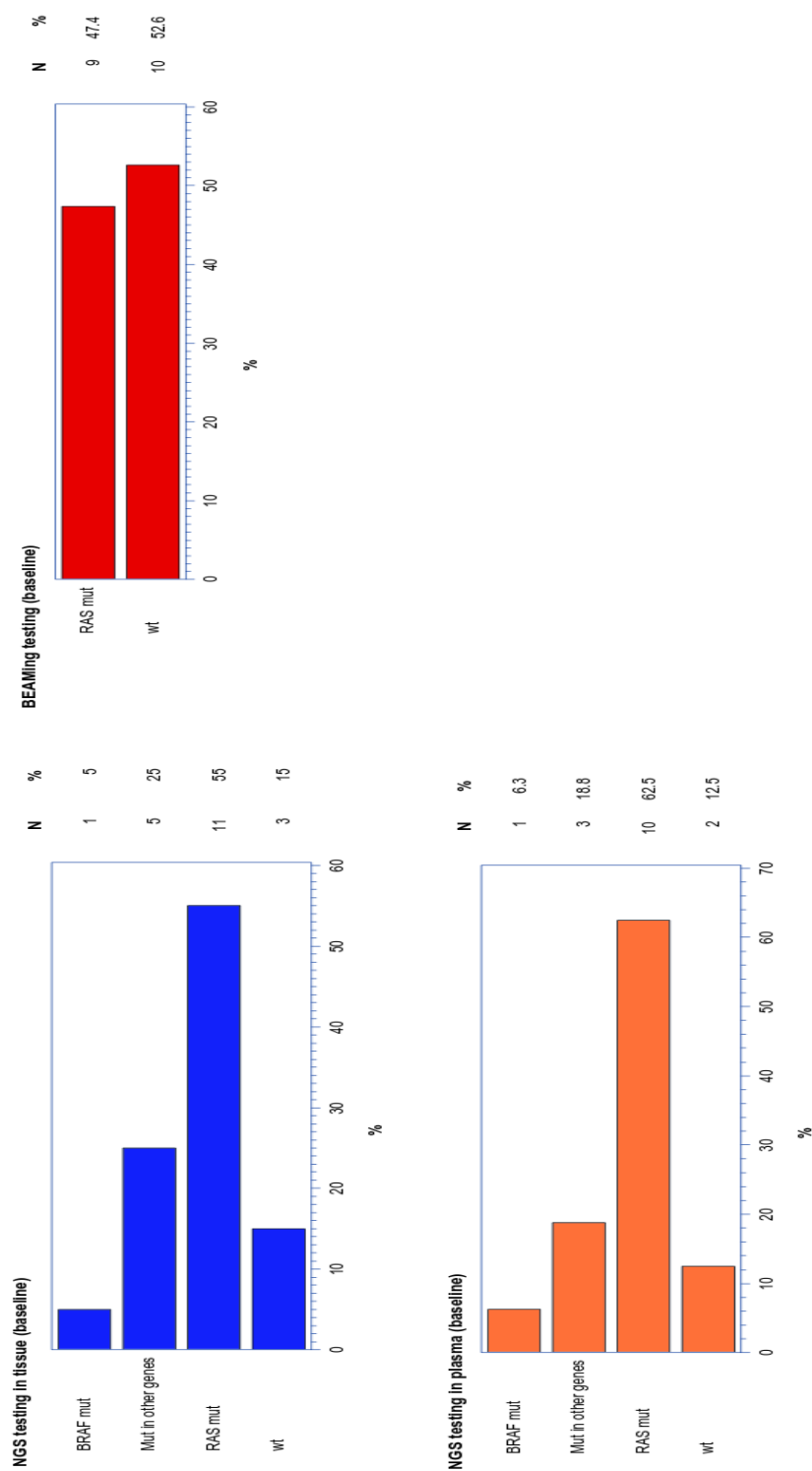
Διάγραμμα 5.

Σύγκριση των μεταλλάξεων ανά ασθενή όπως ανιχνευθήκαν με NGS στον ιστό, στο πλάσμα του περιφερικού αίματος και με BEAMing στη διάγνωση. Οι αριθμοί στα κελιά αντιστοιχούν στη συχνότητα του μεταλλαγμένου(%).



Mutation by T-NGS
 Mutation by L-NGS
 Mutation by BEAMing
 wt
 T-NGS: NGS testing in tumor tissue
 L-NGS: NGS testing in plasma

Διάγραμμα 6. Γραφήματα των μεταλλάξεων όπως ανιχνεύθηκαν με NGS στον ιστό, στο πλάσμα του περιφερικού αίματος και με BEAMing στη διάγνωση.

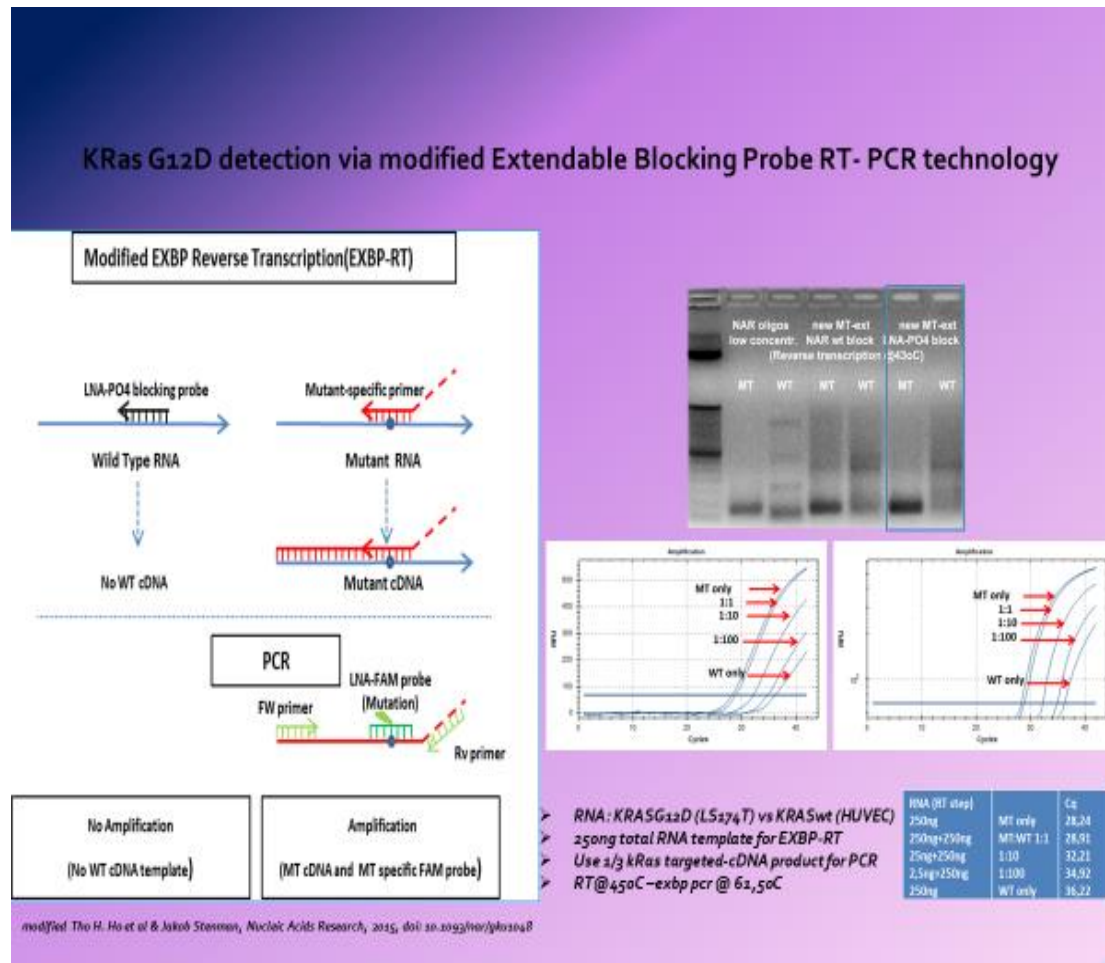


16.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης του μεταγράφου του μεταλλαγμένου RAS γονιδίου στα αιμοπετάλια ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο.

Για την ανίχνευση του μεταλλαγμένου RASγονιδίου από τα αιμοπετάλια ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο λήφθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών με απλή αιμοληψία. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση των αιμοπεταλίων από τα δείγματα αυτά και αποθήκευσή τους για περαιτέρω μελλοντική επεξεργασία.

Παράλληλα έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου απομόνωσης του μεταλλαγμένου RASγονιδίου από τα αιμοπετάλια. Για το λόγο αυτό ακολούθησε μία σειρά πειραμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση της μεθόδου με αποδεκτή ειδικότητα για την ανίχνευση των μεταλλαγμένων αλληλίων. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στη χρήση LNA blockers και ιχνηθετών (probes) στα στάδια της ανάστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription) και εν συνεχεία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), που μπλοκάρουν την ενίσχυση του άγριου τύπου (wild-type) KRAS RNA και επιτρέπουν την επιλεκτική ανίχνευση του μεταλλαγμένου μορίου.

Έγινε χρήση RNA από την καρκινική σειρά LS174T και που φέρει τη μετάλλαξη KRAS c.35G>A (G12D) αλλά και άγριου τύπου RNA χωρίς την αντίστροφη μετάλλαξη (HUVEC). Αν και τα αποτελέσματα με την πρωτοποριακή αυτή μεθοδολογία (EXBP-RT αρχικά και PCR στη συνέχεια με τη χρήση των παραγώγων) κατέληξαν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, εν τούτοις η απομόνωση μεταλλαγμένων RASDNA συνοδευόταν από την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων με αποτέλεσμα μη αποδεκτή ειδικότητα της μεθόδου. Δεδομένης της παραγωγής των μη ειδικών προϊόντων κατά τη διαδικασία αυτή, η μέθοδος δε διερευνήθηκε περαιτέρω στη μελέτη αυτή και δε χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της RAS μετάλλαξης με υγρή βιοψία από ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16. Τα αποτελέσματα των πειραματικών προσπαθειών ανίχνευσης RAS μεταλλαγμένων γονιδίων.

17. Συζήτηση αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία , αυτή είναι η πρώτη μελέτη του είδους της στα ελληνικά δεδομένα. Πρόκειται για την αξιολόγηση της υγρής βιοψίας σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο και συγκεκριμένα δύο διαφορετικών τεχνικών υγρής βιοψίας για τον προσδιορισμό κυκλοφορούντος καρκινικού DNA. Το σύνολο των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη υπεβλήθησαν σε έλεγχο ύπαρξης μεταλλάξεων στον ιστό, ο οποίος λήφθηκε με την κλασσική παρεμβατική βιοψία. Ο έλεγχος των μεταλλάξεων έγινε είτε με την εφαρμογή μεθόδου αλληλούχισης νεότερης γενεάς (NGS-Next Generation Sequencing) όπου διερευνήθηκε η ύπαρξη ή η απουσία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με τον κολοορθικό καρκίνο, είτε με την εφαρμογή PCR για τον έλεγχο *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* μεταλλάξεων, ως είθισται και με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου.

Σε μία ομάδα ασθενών έγινε έλεγχος ύπαρξης των μεταλλάξεων στο κυκλοφορούν ελεύθερο DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με την εφαρμογή μεθόδου αλληλούχισης νεότερης γενεάς (NGS-Next Generation Sequencing) τη στιγμή της διάγνωσης αλλά και κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου. Σε μια δεύτερη ομάδα, ο έλεγχος διενεργήθηκε με την εφαρμογή τόσο NGS τεχνικής όσο και της ψηφιακής PCR BEAMing η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων μεταλλάξεων τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου. Τέλος , σε μια τρίτη ομάδα ασθενών έγινε έλεγχος με τη χρήση μόνο της ψηφιακής PCR BEAMing κατά τη διάγνωση της νόσου.

Με βάση τα αποτελέσματα τα οποία ήδη παρατέθηκαν , έγινε ουσιαστικά η χρήση δύο διαφορετικών τεχνικών υγρής βιοψίας για την αποτύπωση της μοριακής υπογραφής του όγκου στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA. Και οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν διέπονται από υψηλή ευαισθησία για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών (90) (93). , Η BEAMing dPCR να χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία, με ουδό ανίχνευσης μεταλλάξεων 0,01% για την ανίχνευση συγκεκριμένης μετάλλαξης αλλά και την αλληλούχιση νεότερης γενιάς – NGS να δίνει τη δυνατότητα εξέτασης περισσότερων μεταλλάξεων ταυτόχρονα με χαμηλότερη ευαισθησία με ουδό 0,01-1% αναλόγως της πλατφόρμας που εφαρμόζεται. (100)

Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση και των δύο προαναφερθέντων τεχνικών στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών για την σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Δεδομένου ότι στο σύνολο των ασθενών είχε διενεργηθεί έλεγχος είτε με την εφαρμογή PCR στον ιστό για την ανίχνευση *RAS* και *BRAF* μεταλλάξεων είτε με την εφαρμογή αλληλούχισης νεότερης γενιάς (NGS-Next Generation Sequencing) για ένα ευρύ φάσμα γονιδίων, δόθηκε η δυνατότητα σύγκρισης μεταξύ της κλασσική ιστικής βιοψίας και της υγρής βιοψίας σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Ταυτόχρονα δόθηκε η δυνατότητα σύγκρισης των δύο μεθόδων υγρής βιοψίας (NGS και BEAMing). Οι δύο αυτές μέθοδοι ταυτοποίησης του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA έχουν μελετηθεί και έχουν συγκριθεί τόσο μεταξύ τους όσο και με την καθιερωμένη τακτική του ελέγχου του ιστού. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές και οι δύο μέθοδοι παρέχουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης του ctDNA με αξιοπιστία (90) (92) (93). Όσον αφορά τη μεταξύ τους σύγκριση, η BEAMing παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία για στην ανίχνευση των μεταλλάξεων.(94)(100)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή αναδεικνύουν υψηλή σύμπτωση ανίχνευσης των μεταλλάξεων μεταξύ του ελέγχου του ιστού και της υγρής βιοψίας με NGS στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Για την ανίχνευση των *RAS* και *RAF* μεταλλάξεων η συμφωνία αγγίζει το 94%. Κατά τη σύγκριση και των τριών τεχνικών (NGS έλεγχος ιστού, NGS έλεγχος περιφερικού αίματος και BEAMing στο περιφερικό αίμα), η συμφωνία φτάνει το 74%. Για τον έλεγχο των *RAS* μεταλλάξεων, με τις δύο τεχνικές υγρής βιοψίας, η συμφωνία αγγίζει το 93%. Οι διαφοροποιήσεις στην ανίχνευση μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν, κατά την σύγκριση των διαφορετικών τεχνικών, μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην ευαισθησία της κάθε τεχνικής. Αξίζει να σημειωθεί πως στη βιβλιογραφία, οι διαφορές που εντοπίζονται στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον ιστό με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την υγρή βιοψία, πιθανά οφείλονται και στη διαφορετική δυναμική που έχει ο κάθε καρκινικός κλώνος ,που απαρτίζει τον όγκο, να απελευθερώνει καρκινικό DNA στο περιφερικό αίμα καθώς και στην ετερογένεια του όγκου.(108)(109) Παράλληλα, σε ένα ποσοστό ασθενών έγινε έλεγχος με μέθοδο υγρής βιοψίας για την παρακολούθηση της εξέλιξης της βιολογίας της νόσου μέχρι τη στιγμή που οι ασθενείς εμφάνιζαν επιδείνωση της ασθένειας , παρέχοντας έτσι μια αντιπροσωπευτική εικόνα του

μοριακού υπόβαθρου του όγκου σε μεταγενέστερες της διάγνωσης χρονικές στιγμές. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναδεικνύουν τη διαφοροποίηση που παρατηρείται στον κολορρθικό καρκίνο σε μοριακό επίπεδο χρονικά, υπό την επίδραση της θεραπείας. Η ετερογένεια του όγκου είναι μία δυναμική κατάσταση και αποτελεί αντικείμενο έρευνας ως αιτία εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται στη βιολογική υπογραφή του νεοπλάσματος με την εμφάνιση νέων μεταλλάξεων στους ασθενείς χρονικά θεωρείται μηχανισμός αποτυχίας της εφαρμοζόμενης θεραπείας και εμφάνισης προόδου νόσου.(100)(101)(103)(109) Η αρχική ιστική βιοψία που λαμβάνεται από τον ασθενή και οι μεταλλάξεις που διαπιστώνονται από την εξέταση αυτής αποτελεί μια «φωτογραφία» του όγκου τη δεδομένη χρονική στιγμή και δεν μπορεί να είναι αντιπροσωπευτική του όγκου σε βάθος χρόνου , μετά την εφαρμογή της χημειοθεραπείας και της στοχευτικής θεραπείας.

Από το σύνολο των ασθενών οι οποίοι εντάχθηκαν στη μελέτη αυτή , η πλειοψηφία εμφάνιζε εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας στο αριστερό κόλον. Μόνο δεκατέσσερις ασθενείς από το σύνολο των πενήντα πέντε είχαν πρωτοπαθή εστία στο δεξί κόλον ενώ σαράντα ένας ασθενείς είχαν εντόπιση του όγκου στο αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου. Πρόσφατα, η διαφορά στην εντόπιση του όγκου μεταξύ αριστερού και δεξιού τμήματος του παχέος εντέρου , έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία. Σύμφωνα με τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα (αναφορά) οι ασθενείς που εμφανίζουν όγκους στο αριστερό κόλον έχουν καλύτερη συνολική επιβίωση(65). Στην παρούσα μελέτη , ο μέσος χρόνος για την επιδείνωση της νόσου στους ασθενείς ήταν όντως μεγαλύτερος σε όσους είχαν πρωτοπαθή εντόπιση του όγκου στο αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου σε σύγκριση με το συντομότερο χρόνο μέχρι την επιδείνωση που καταγράφηκε για τους ασθενείς με εντόπιση του όγκου στο δεξί κόλον.

Πρόσφατα , η εντόπιση του όγκου στο παχύ έντερο ανατομικά, απέκτησε σημασία και για την επιλογή του χημειοθεραπευτικού σχήματος και της στοχευτικής θεραπείας η οποία χορηγείται στους ασθενείς. Με βάση τα αποτελέσματα των μελετών αλλά και των μετααναλύσεων από μεγάλες μελέτες φάσης III , οι όγκοι που εντοπίζονται στο αριστερό κόλον έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (anti-EGFR) ενώ η χορήγηση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων είναι προτιμητέα στους ασθενείς με εντόπιση του όγκου στο δεξί κόλον(64). Στην παρούσα μελέτη η διαφορά στη

ανατομική εντόπιση του όγκου μεταξύ αριστερού και δεξιού τμήματος του παχέος εντέρου είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Μόνο το 25% των περιπτώσεων είχαν εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας δεξιά όμως το πλήθος των ασθενών που συμμετείχαν δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

.Στην παρούσα μελέτη , από τους σαρανταεννέα ασθενείς με διαθέσιμη την πληροφορία του ιστορικού τους , το 53, 1% ανέφεραν θετικό ιστορικό ενώ το 46, 9% αρνητικό οικογενειακό ιστορικό. Περίπου οι μισοί ασθενείς είχαν θετικό ιστορικό και αυτό το εύρημα υπογραμμίζει τη σημασία την οποία μπορεί να έχει ο προ συμπτωματικός πληθυσμιακός έλεγχος για την πρόιμη διάγνωση και αντιμετώπιση της ασθένειας αλλά και για την σωστή καθοδήγηση και εκπαίδευση των μελών της κοινωνίας για τη συμμόρφωσή τους με τα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου.

Από το σύνολο των ασθενών οι οποίοι συμμετείχαν στην έρευνα , το 17,9 % είχαν διαγνωσθεί στο παρελθόν με κολοορθικό καρκίνο σταδίου ΙΙΙ. Μετά τη θεραπευτική χειρουργική εκτομή της κακοήθειας στους ασθενείς αυτούς συνιστάται η χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας με συνδυασμό φθοριοπυριμιδίνης και οξαλιπλατίνης για χρονικό διάστημα έξι μηνών(2). Βάση του ιστορικού τους οι ασθενείς είχαν λάβει επικουρική θεραπεία βασισμένη στην οξαλιπλατίνη ή είχαν λάβει μονοθεραπεία με φθοριοπυριμιδίνη.

Από την ανασκόπηση των μεταστατικών εντοπίσεων των ασθενών είναι εμφανές ότι η πλειοψηφία είχε δευτεροπαθείς εναποθέσεις στο ήπαρ. Λεμφαδενικές μεταστάσεις, πνευμονικές , οστικές και περιτοναϊκές μεταστάσεις ακολουθούν στη σειρά συχνότητας εμφάνισής τους στους ασθενείς. Η φυσική πορεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου είναι συμβατή με την εικόνα αυτή(2)(3)(21). Η συχνότερη θέση μεταστατικών εντοπίσεων αφορά το ήπαρ και τούτο οφείλεται στην κυκλοφορία του αίματος και συγκεκριμένα στο σύστημα της πυλαίας κυκλοφορίας. Οι πνευμονικές εντοπίσεις είναι επίσης συχνές ιδίως στις περιπτώσεις που ο όγκος εντοπίζεται στο ορθό επίσης λόγω του προτύπου της αιμάτωσης μέσω των αιμορροϊδικών πλεγμάτων.

Στις περιπτώσεις όπου διαπιστώνεται ολιγομεταστατική νόσος στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου , η τακτική της μεταστασεκτομής κατά τον πρώτο χρόνο ή μεταγενέστερα μετά την εφαρμογή κυτταρομειωτικής θεραπείας αποτελεί μία επιλογή. Από το σύνολο των πενήντατεσσάρων ασθενών , εννέα ασθενείς

υπεβλήθησαν σε μεταστασεκτομή σε κάποια χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους. Αυτό που χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς είναι το υψηλό ποσοστό των ασθενών οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας αν και έπασχαν από μεταστατική νόσο. Το 63% των ασθενών είχε στο ιστορικό του χειρουργική εκτομή της πρωτοπαθούς διότι σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς οι οποίοι είχαν λάβει επικουρική θεραπεία στο παρελθόν έχοντας διαγνωσθεί αρχικά με νόσο σταδίου III ενώ παράλληλα δεν πρέπει να λησμονάται η συχνότητα της εμφάνισης συμπτωμάτων απόφραξης του παχέος εντέρου και συνοδού ειλεού που αναπόφευκτα οδηγεί τους ασθενείς σε χειρουργείο ακόμη και επί ευρημάτων μεταστατικής νόσου(21).

Στην ομάδα Α των ασθενών που διενεργήθηκε έλεγχος με την τεχνική NGS στον ιστό κατά τη διάγνωση , έλεγχος με την ίδια τεχνική στο περιφερικό αιμάτων ασθενών επίσης κατά τη διάγνωση αλλά και κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου, τα αποτελέσματα για τη συμφωνία των δύο τεχνικών είναι ενθαρρυντικά.

Η ανίχνευση της μετάλλαξης στο *BRAF* γονίδιο είναι ταυτόσημη και με τις δύο τεχνικές δεδομένου ότι ανιχνεύθηκε τόσο στον ιστό όσο και στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών. Όσον αφορά μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS* και *NRAS* , δέκα ασθενείς διαπιστώθηκαν να φέρουν μετάλλαξη στον όγκο , οχτώ εκ των οποίων είχαν την ίδια μετάλλαξη ανιχνεύσιμη στην ίδια χρονική στιγμή στο περιφερικό αίμα. Τρεις ασθενείς βρέθηκαν να έχουν επιπλέον μεταλλάξεις στο περιφερικό αίμα σε άλλα γονίδια , μη ανιχνεύσιμες κατά την επεξεργασία του ιστού. Ένας ασθενής διαπιστώθηκε να μη φέρει καμία μετάλλαξη ούτε στον ιστό , ούτε στο πλάσμα του περιφερικού αίματος. Ως εκ τούτου η συμφωνία των δύο μεθόδων στην ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου *BRAF* είναι 100% ενώ για τα γονίδια *RAS* αυτή αγγίζει το 80%.

Πρόκειται για ένα υψηλό ποσοστό συμφωνίας , ακόμη και με τον περιορισμένο αριθμό των ασθενών στην υποομάδα αυτή , γεγονός που είναι συμβατό με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα(92)(93)(94). Η υγρή βιοψία βασισμένη στην τεχνική της ανίχνευσης μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA εμφανίζει υψηλά ποσοστά συμφωνίας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον ιστό και παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και άλλων μεταλλάξεων οι οποίες δεν εντοπίζονται κατά την επεξεργασία του ιστού του όγκου. Ειδικά για τα δύο προαναφερθέντα γονίδια

BRAF και *RAS* , η πληροφορία αυτή είναι ιδιαιτέρως σημαντική διότι καθορίζει το είδος της θεραπείας στην οποία ο ασθενής πρόκειται να υποβληθεί. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα η συμφωνία στην ανίχνευση των *RAS* μεταλλάξεων μεταξύ ιστού και κυκλοφορούντος DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος μπορεί να φτάσει και να ξεπεράσει το 80% , γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Με την ταυτοποίηση της μετάλλαξης *RAS* με τη χρήση της υγρής βιοψίας στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA ουσιαστικά διαπιστώνεται η ύπαρξη νεοπλασματικού γενετικού υλικού στον ασθενή ενώ ταυτόχρονα δίδεται και η απαραίτητη πληροφορία για τη μη χορήγηση anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων στο θεραπευτικό σχήμα που πρόκειται να λάβουν οι ασθενείς.

Με τη χρήση της υγρής βιοψίας βασισμένης στο κυκλοφορούν καρκινικό DNA μπορεί κάλλιστα να επιτευχθεί η παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου βιολογικά, πώς δηλαδή μεταβάλλεται το μοριακό υπόβαθρο του όγκου μετά την εφαρμογή της θεραπείας σε μεταγενέστερες της διάγνωσης χρονικές στιγμές χωρίς να χρειάζεται εκ νέου παρεμβατική βιοψία στους ασθενείς. Από την ομάδα αυτή των ασθενών διενεργήθηκε έλεγχος με τη χρήση τεχνικής NGS στο περιφερικό αίμα κατά τη στιγμή της προόδου της νόσου σε οχτώ άτομα. Σε δύο ασθενείς ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη του γονιδίου *BRAF* ως είχε ανιχνευθεί και στη διάγνωση της νόσου , ενώ για τα γονίδια της οικογένειας *RAS* από τους τρεις ασθενείς οι οποίοι επανελέγχθηκαν και είχαν γνωστή *RAS* μετάλλαξη οι δύο βρέθηκαν να φέρουν ακόμη τη μετάλλαξη ενώ ένας ασθενής είχε απωλέσει τη μετάλλαξη αυτή. Στους υπόλοιπους ασθενείς παρατηρήθηκε είτε ανίχνευση των ίδιων μεταλλάξεων που είχαν ανιχνευθεί και κατά τη διάγνωση , είτε απώλεια προυπαρχουσών ή και εμφάνιση νέων μεταλλάξεων σε σχέση με τον έλεγχο που είχε διενεργηθεί κατά τη διάγνωση της νόσου.

Μετά την εφαρμογή του χημειοθεραπευτικού σχήματος πρώτης γραμμής και κατά την εμφάνιση προόδου νόσου το μοριακό προφίλ του όγκου μπορεί να αλλάξει. Πιο συγκεκριμένα ο ασθενής ο οποίος έφερε τη *RAS* μετάλλαξη κατά τη διάγνωση και δεν ήταν υποψήφιος για τη χορήγηση anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων πλέον, μετά τη θεραπεία πρώτης γραμμής , έχει απωλέσει τη μετάλλαξη αυτή. Ο όγκος μεταβάλλεται κλωνικά, εξελίσσεται , στο βάθος του χρόνου υπό την επίδραση της θεραπείας που εφαρμόζεται. Το σημαντικό ερώτημα που εγείρεται και χρήζει

διερεύνησης είναι κατά πόσον ασθενείς που εμπίπτουν στην κατηγορία αυτή θα μπορούσαν αν είναι τελικά υποψήφιοι για τη χορήγηση anti-EGFR στοχευτικής θεραπείας.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση των ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο, η χορήγηση των anti-EGFR αντισωμάτων καθορίζεται από την ύπαρξη ή μη της *RAS* μετάλλαξης στον ιστό, κατά τη διάγνωση της νόσου. Η ανεύρεση *RAS* μετάλλαξης στον ιστό των ασθενών κατά τη διάγνωση αποκλείει τη χορήγηση anti-EGFR στο σύνολο των γραμμών θεραπείας που θα λάβουν οι ασθενείς. Παρά ταύτα, η διαπίστωση πως η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να χαθεί χρονικά θέτει το ερώτημα αν η χορήγηση anti-EGFR θα μπορούσε να αποτελεί μέρος της θεραπείας σε μεταγενέστερες γραμμές.(103)

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η μεταβολή στα επίπεδα ανίχνευσης των μεταλλάξεων που παρατηρούνται με τη χρήση της υγρής βιοψίας βασισμένης στην τεχνική NGS στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Η τεχνική αυτή έδωσε τη δυνατότητα στην παρούσα μελέτη να υπάρξει ποσοτικοποίηση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων εκφρασμένες σε ποσοστό %. Από τους ασθενείς οι οποίοι ελέγχθηκαν με την υγρή βιοψία τόσο κατά τη διάγνωση όσο και κατά την πρόοδο νόσου, προκύπτουν μεταβολές στην ποσότητα των μεταλλαγμένων αλληλίων. Πέραν δηλαδή της εμφάνισης ή εξαφάνισης κάποιας μετάλλαξης μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών, παρατηρείται και το φαινόμενο της ποσοτικής μεταβολής αυτών υπό την επίδραση της θεραπείας. Η μεταβολή στη συχνότητα της ανίχνευσης μιας μετάλλαξης, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αντικατοπτρίζει διαφορές ως προς το φορτίο της νόσου, αποτελεί δείκτη επίδρασης της εφαρμοζόμενης θεραπείας στον όγκο αλλά μπορεί να οφείλεται και στην βιολογική υπόσταση της νόσου και στη φυσική της πορεία (71)(72)(103)(109). Η χορήγηση θεραπείας μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της συχνότητας των μεταλλάξεων και μπορεί να λειτουργήσει ως δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η συσχέτιση της ποσοτικής μεταβολής με την έκβαση των ασθενών μένει να διευκρινιστεί πλήρως σε ευρείας κλίμακας μελέτες όπως επίσης και η συσχέτιση με τη χορηγηθείσα θεραπεία.

Ένα ζήτημα που επίσης εγείρεται είναι η πιθανή ύπαρξη ενός ουδού - cutoff – για την αξιολόγηση της ποσοτικοποίησης των μεταλλάξεων καθώς η θέσπισή του θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην κλινική αντιμετώπιση των ασθενών. Με τα υπάρχοντα δεδομένα των κατευθυντηρίων οδηγιών η ανίχνευση της *RAS* μετάλλαξης

στην ιστική βιοψία αποκλείει τους ασθενείς από τη χορήγηση anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων. Επικρατεί δηλαδή ο νόμος του όλου η ουδενός. Το αν όμως, με τη χρήση της υγρής βιοψίας βρεθεί ένα ποσοτικό όριο κάτω από το οποίο οι ασθενείς θα μπορούσαν να έχουν κλινικό όφελος από τη χορήγηση anti-EGFR στοχευτικής θεραπείας μένει να διερευνηθεί για την περεταίρω εξατομίκευση των θεραπευτικών χειρισμών των ασθενών.

Στην ομάδα Β των ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος ύπαρξης *KRAS* και *NRAS* στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με την ψηφιακή PCR BEAMing για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Πρόκειται για δεκαπέντε ασθενείς από τα αποτελέσματα του ελέγχου των οποίων προέκυψε η ανίχνευση της *RAS* μετάλλαξης με την ψηφιακή PCR σε ποσοστό 53,3% των ασθενών.

Στην τρίτη ομάδα ασθενών (ΑΒ) διενεργήθηκε έλεγχος με τεχνική NGS στον ιστό των ασθενών, NGS στο περιφερικό αίμα και εφαρμόστηκε η μέθοδος BEAMing επίσης στο περιφερικό αίμα των ασθενών για να διερευνηθεί η συμφωνία και των τριών μεθόδων.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη σειρά των ασθενών, η συμφωνία στην ανίχνευση της μετάλλαξης *KRAS* και με τις τρεις μεθόδους είναι πολύ υψηλή διότι κατέστη δυνατή τόσο με τον έλεγχο του ιστού όσο και με τις δύο μεθόδους υγρής βιοψίας. Το ίδιο ακριβώς παρατηρήθηκε και για τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *NRAS* όπου υπήρξε απόλυτη ταύτιση των αποτελεσμάτων και με τις τρεις μεθόδους. Επίσης συμφωνία μεταξύ των μεθόδων καταγράφηκε και για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53* το οποίο κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην καρκινογένεση. Ακόμη μία φορά, η εφαρμογή της υγρής βιοψίας ανίχνευσε μεταλλάξεις οι οποίες δεν είχαν εντοπιστεί κατά τον έλεγχο του ιστού. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια *PIK3CA* και *PTEN* παρούσες στο κυκλοφορούν DNA και μη ανιχνεύσιμες κατά την εξέταση του ιστού παρέχοντας έτσι μια πληρέστερη εικόνα για τη μοριακή υπογραφή του όγκου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό ανίχνευσης *RAS* μετάλλαξης κατά τη διάγνωση ήταν 55% επί του συνόλου των ασθενών της υποομάδας αυτής με την εφαρμογή NGS στον ιστό, 62,5% με υγρή βιοψία βασισμένη στην τεχνική NGS και 47,4% με υγρή βιοψία με τη χρήση της ψηφιακής PCR BEAMing.

Και στην περίπτωση της προόδου της νόσου εφαρμόστηκε ξανά ο ίδιος έλεγχος με υγρή βιοψία μεθοδολογίας NGS και τα αποτελέσματα ήταν μεικτά. Φαίνεται λοιπόν,

ότι με την εφαρμογή της θεραπείας ασκείται πίεση στον όγκο , ο οποίος εξελίσσεται και με τον τρόπο αυτό αναδεικνύονται οι μεταβολές που περιεγραφήκαν. Οι *RAS* μεταλλάξεις εξαφανίζονται ή ανιχνεύονται σε μικρό ποσοστό, συνεπώς ο κλώνος των *RAS* μεταλλαγμένων καρκινικών κυττάρων μειώνεται υπό την πίεση της θεραπείας η οποία εφαρμόζεται.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ερευνήθηκε η χρήση της υγρής βιοψίας σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε έλεγχο του μοριακού προφίλ του όγκου τους με τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενεάς (NGS). Επίσης υπεβλήθησαν σε υγρές βιοψίες στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος με την μέθοδο NGS στη διάγνωση αλλά και τη χρονική στιγμή επιδείνωσης της νόσου. Παράλληλα εφαρμόστηκε η τεχνική της ψηφιακής PCR BEAMing για τον έλεγχο των *RAS* μεταλλάξεων στη διάγνωση της νόσου .

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για την υγρή βιοψία είναι ενθαρρυντικά ως μεθόδου ανίχνευσης των μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Η συνολική συμφωνία των αποτελεσμάτων της υγρής βιοψίας με NGS στο περιφερικό αίμα των ασθενών και του ελέγχου του ιστού με την ίδια τεχνική αγγίζει το 64%. Ειδικότερα δε για τα γονίδια *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* , τα οποία είναι βασικά για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής των ασθενών και ελέγχονται υποχρεωτικά σε κάθε ασθενή κατά τη διάγνωση της νόσου , το ποσοστό συμφωνίας αγγίζει το 94%. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων της ψηφιακής PCR BEAMing , που είναι εξαιρετικά ευαίσθητη για την ανίχνευση των *RAS* μεταλλάξεων και του ιστού με NGS αγγίζει το 84%. Η συνολική συμφωνία και των τριών μεθόδων για την ανίχνευση μεταλλάξεων είναι 74%,

Αξιοσημείωτη είναι και η σύμπτωση των αποτελεσμάτων και των δύο μεθόδων της υγρής βιοψίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, της αλληλούχισης επόμενης γενιάς NGS και της ψηφιακής PCR BEAMing η οποία αγγίζει το 93% για την ανίχνευση των *RAS* μεταλλάξεων σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις οι οποίες ανιχνεύθηκαν στα γονίδια της οικογένειας *RAS* είναι συμβατές με τις περιγραφόμενες στη βιβλιογραφία. Το 80% των μεταλλάξεων των *RAS* γονιδίων αφορούσαν την *KRAS* μετάλλαξη στο εξόνιο 2

(κωδικόνια 12,13) ενώ οι λοιπές αφορούσαν τα κωδικόνια 61,117,146. Οι *NRAS* μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο κωδικόνιο 13 και στο κωδικόνιο 61.

18. Αποτελέσματα ερευνητικών στόχων.

Με την ολοκλήρωση της ερευνητικής διαδικασίας και με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν καθώς επίσης και από την ανάλυση αυτών, στην παρούσα διατριβή προέκυψαν ιδιαίτερα σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με την εφαρμογή των υγρών βιοψιών που βασίζονται στο κυκλοφορούν καρκινικό DNA στο πλάσμα του περιφερικού αίματος ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο.

- Πιο συχνή εντόπιση πρωτοπαθούς εστίας των όγκων ήταν το αριστερό κόλον στο σύνολο των ασθενών ενώ πιο συχνή ήταν η ανεύρεση *BRAF* μεταλλάξεων σε ασθενείς με εντοπίσεις του όγκου στο δεξί κόλον. Οι ασθενείς με εντοπίσεις όγκου στο αριστερό κόλον είχαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέχρι να εμφανίσουν πρόοδο νόσου σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν εντοπίσεις της πρωτοπαθούς εστίας στο δεξί κόλον.
- Κατά την εξέταση των δειγμάτων βιοψίας από τους ασθενείς εφαρμόζοντας την τεχνική της αλληλούχισης της επόμενης γενιάς καλύπτοντας ένα εύρος 23 γονιδίων προκύπτει το συμπέρασμα ότι εκτός από τις έως σήμερα εξεταζόμενες *RAS* και *BRAF* μεταλλάξεις, το γενετικό υλικό των μεταστατικών κολοορθικών καρκίνων φέρει μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια όπως *TP53*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *APC* σε ποσοστό που φτάνει το 20%. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων μπορεί να δια φωτίσει τους μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο. Παράλληλα, οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να αποτελέσουν θέσεις εφαρμογής για τη χορήγηση νέων στοχευτικών μορίων.
- Με την εφαρμογή της μεθόδου αλληλούχισης επόμενης γενιάς στο πλάσμα του περιφερικού αίματος η ανίχνευση των *RAS* μεταλλάξεων εμφάνισε συμφωνία 80% με τον έλεγχο του ιστού και για τις μεταλλάξεις του *BRAF* υπήρξε απόλυτη ταύτιση. Η συνολική συμφωνία για τις *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* μεταλλάξεις διαμορφώθηκε στο 94%.
- Με τη χρήση της ψηφιακής PCR BEAMing η ανίχνευση *RAS* μεταλλάξεων ήταν εφικτή στο 47,4% των ασθενών ενώ με τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς στον ιστό ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 55% των ασθενών.
- Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του ιστού με τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων υγρής βιοψίας η συνολική συμφωνία για την ανίχνευση της *RAS* μετάλλαξης και των τριών μεθόδων αγγίζει το 74%.

- Η συμφωνία στην ανίχνευση μεταλλάξεων του *RAS* γονιδίου με τις δύο μεθόδους υγρής βιοψίας (αλληλούχιση επόμενης γενιάς και ψηφιακής PCR) είναι ιδιαίτερα υψηλή αγγίζοντας το 93%.
- Κατά τον επανέλεγχο των ασθενών με μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς στο πλάσμα του περιφερικού αίματος διαπιστώνεται αλλαγή στα γονίδια που ανιχνεύονται μεταλλαγμένα σε σχέση με τον έλεγχο που είχε διενεργηθεί κατά τη διάγνωση παρατηρώντας τόσο απώλεια προϋπαρχουσών μεταλλάξεων όσο και την εμφάνιση νέων μεταλλάξεων. Επίσης , για τις μεταλλάξεις που παραμένουν ανιχνεύσιμες παρατηρείται διαφοροποίηση στην ποσοτική ανίχνευσή τους.

Τα ευρήματα αυτά που παρουσιάστηκαν αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα αποτελούν ένα σημαντικό υποστηρικτικό στοιχείο για τη μελλοντική εφαρμογή της υγρής βιοψίας βασισμένης στην ανίχνευση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA. Δόθηκε η δυνατότητα να γίνει εφαρμογή δύο διαφορετικών μεθόδων υγρής βιοψίας με εξαιρετικά υψηλό ποσοστό συμφωνίας στην ανίχνευση της *RAS* μετάλλαξης αλλά και υψηλή σύμπτωση των αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα εξέτασης του ιστού.

Επίσης, κατέστη σαφές πως πέρα από την δυνατότητα ανίχνευσης των μεταλλάξεων δίδεται και η δυνατότητα παρακολούθησης της ποσοτικής μεταβολής των ανιχνεύσιμων μεταλλάξεων σε συνθήκες πραγματικού χρόνου και της συσχέτισης με τα κλινικοαπεικονιστικά ευρήματα των ασθενών. Τα αποτελέσματα αποτελούν μία ακόμη απόδειξη της ετερογένειας και της πολυκλωνικότητας που εμφανίζει ο όγκος και η οποία αποτελεί τη βάση της αντίστασης στις θεραπείες. Οι νεοεμφανισθείσες μεταλλάξεις σηματοδοτούν το γεγονός πως ο κλινικός ογκολόγος πιθανά βρίσκεται αντιμέτωπος με ένα εξελιγμένο και ίσως διαφορετικό υπότυπο της νόσου. Τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της εφαρμογής της υγρής βιοψίας στη διάγνωση της νόσου του μεταστατικού κολοορθικού καρκίνου, στον καθορισμό τη θεραπευτικής στρατηγικής , στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου αλλά και στη χρήση της για την παροχή πρώιμης γνώση της επικείμενης υποτροπής ή επιδείνωσης οδηγώντας στην εξατομικευμένη αντιμετώπιση των ασθενών με το ακόλουθο κλινικό όφελος.

19. Συμπεράσματα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξάγεται στο συμπέρασμα ότι η υγρή βιοψία αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο εναλλακτική της κλασσικής ιστικής βιοψίας. Με τα υψηλά ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τον έλεγχο του ιστού και από τον έλεγχο του περιφερικού αίματος, επιβεβαιώνεται η δυνατότητα και η δυναμική που αποκτά τα τελευταία χρόνια η υγρή βιοψία ως μέθοδος ελέγχου των ασθενών με νεοπλάσματα. Ήδη η χρήση της υγρής βιοψίας έχει θεσπιστεί και είναι εγκεκριμένη για τον έλεγχο των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Στον κολορθικό καρκίνο, σύμφωνα με τα όσα παρουσιάστηκαν, η υγρή βιοψία δίνει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν οι μεταλλάξεις *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* που είναι μεταλλάξεις «κλειδιά» για το συγκεκριμένο είδος όγκου. Δεδομένου ότι εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές υγρής βιοψίας και όχι μόνο μία, τα αποτελέσματα είναι συμπαγή. Το υψηλό ποσοστό συμφωνίας των δύο μεθόδων μεταξύ τους αλλά και της κάθε μίας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο του ιστού των ασθενών αποτελεί ένα ακόμη υποστηρικτικό στοιχείο υπέρ της εγκυρότητας της υγρής βιοψίας ως μεθόδου ανίχνευσης της μοριακής υπογραφής του όγκου σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου.

Παράλληλα, δόθηκε η δυνατότητα να γίνει παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου χρονικά με την εφαρμογή της υγρής βιοψίας και να παρατηρηθούν οι μεταβολές που παρουσιάζονται υπό την επίδραση της θεραπείας που εφαρμόζεται στους ασθενείς σε δύο χρονικές στιγμές. Μία κατά τη διάγνωση και μία κατά την επιδείνωση της νόσου. Και στις δύο χρονικές στιγμές διαπιστώθηκε μεταβολή στις μεταλλάξεις που ανιχνεύονται. Απώλεια των *RAS* μεταλλάξεων ή εμφάνιση νέων *RAS* μεταλλάξεων εγείρει το ερώτημα σχετικά με το σχεδιασμό και την εφαρμογή της θεραπευτικής στρατηγικής για κάθε ασθενή.

Σήμερα με βάση της κατευθυντήρες οδηγίες γίνεται έλεγχος στον ιστό των ασθενών και με τα αποτελέσματα που προκύπτουν καθορίζεται το σύνολο των θεραπευτικών επιλογών στις ακόλουθες γραμμές θεραπείας στις οποίες υποβάλλονται οι ασθενείς. Η αντίσταση στη θεραπεία και η συνοδός πρόοδος νόσου είναι τα ευρήματα τα οποία σηματοδοτούν την ανάγκη για αλλαγή θεραπεία η οποία όμως και πάλι θα βασιστεί στο αρχικό μοριακό έλεγχο του ιστού. Στη διατριβή αυτή προκύπτει πως αναμφίβολα οι *RAS* μεταλλάξεις διαφοροποιούνται στην πάροδο του χρόνου. Ασθενείς οι οποίοι

έφεραν *RAS* αλληλίου αγρίου τύπου στην αρχή και συνεπώς ήταν υποψήφιοι για τη χορήγηση anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων, εμφανίζουν *RAS* μεταλλάξεις στον επανέλεγχο με υγρή βιοψία. Το κατά πόσον οι ασθενείς αυτοί θα ωφεληθούν από τη συνέχιση της χορήγησης των anti-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων ή την επαναχορήγησή τους σε μεταγενέστερη γραμμή θεραπείας μένει να διερευνηθεί δεδομένου ότι οι anti-EGFR παράγοντες αντενδείκνυνται επί παρουσίας *RAS* μετάλλαξης.

Αξιοσημείωτη ακόμη είναι η μεταβολή η οποία παρατηρείται χρονικά στη συχνότητα ανίχνευσης των μεταλλαγμένων *RAS* αλληλίων. Αποδείχτηκε πως υπό την πίεση των θεραπευτικών χειρισμών μεταβάλλεται θετικά ή αρνητικά η ανίχνευση του ποσοστού των μεταλλάξεων. Πέραν δηλαδή της εμφάνισης ή εξαφάνισης *RAS* μετάλλαξης, παρατηρείται αλλαγή και στο ποσό ανίχνευσης αυτής. Στην προκειμένη περίπτωση προκύπτει εύλογα το ερώτημα της ύπαρξης ενός κατωφλίου (cut off level) για τη χορήγηση ή μη της anti-EGFR θεραπείας. Η σημαντική πτώση στην ανιχνεύσιμη ποσότητα των *RAS* μεταλλάξεων σε εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά και άρα η καταπίεση του συγκεκριμένου καρκινικού κλώνου ίσως δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για τη χορήγηση anti-EGFR. Μένει να διερευνηθεί εάν η ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης σε χαμηλά ποσοστά, κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο θα μπορούσε να επιτρέπει τη χορήγηση anti-EGFR στοχευτικών θεραπειών και να συνδυάζεται με κλινικό όφελος για τον ασθενή.

Ένα ακόμη πεδίο που χρήζει διερεύνησης και αποτυπώνεται στη διατριβή είναι η εμφάνιση νέων μεταλλάξεων κατά την πάροδο του χρόνου σε άλλα διαφορετικά γονίδια πέραν των *RAS* και *BRAF*. Οι μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία των ασθενών με κολοορθικό καρκίνο αποτελούν ένα άλλο πεδίο έρευνας. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη μελέτη φέρνουν στην επιφάνεια το ερώτημα της πιθανής επίδρασης των νέων αυτών μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στο κυκλοφορούν καρκινικό DNA στην έκβαση αλλά και στην περαιτέρω θεραπεία των ασθενών.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή παρουσιάστηκε ο ρόλος της υγρής βιοψίας με τη χρήση τεχνικών οι οποίες δύναται να ανιχνεύουν τη μοριακή υπογραφή του κολοορθικού καρκίνου με μεγάλη ακρίβεια. Η σύμπτωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μεταξύ του μοριακού προφίλ του ιστού και του μοριακού προφίλ του

κυκλοφορούντος καρκινικού DNA είναι ενθαρρυντική για τη μελλοντική εφαρμογή της υγρής βιοψίας στην κλινική διαχείριση του κολοορθικού καρκίνου. Ταυτόχρονα, η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου χρονικά με την ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο των αλλαγών που υφίσταται ο όγκος σε μοριακό επίπεδο υπό την επίδραση των θεραπευτικών χειρισμών διευρύνει το πεδίο εφαρμογών της υγρής βιοψίας στη θεραπευτική του κολοορθικού καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια η ογκολογία στρέφεται προς την εξαιρετικά εξατομικευμένη θεραπευτική των σθενών με την ευρεία εφαρμογή μοριακών μεθόδων τόσο στα πρώιμα όσο και στα μεταγενέστερα στάδια των νεοπλασμάτων. Η ογκολογική κοινότητα δεν αντιμετωπίζει πλέον τους όγκους όπως στο παρελθόν αλλά με βάση τη μοριακή υπογραφή που έχουν και την εφαρμογή των αντίστοιχων στοχευτικών θεραπειών. Ο κολοορθικός καρκίνος φαίνεται πως είναι μία ετερογενής νόσος, ειδικά μετά την ανάδειξη των μοριακών υποτύπων του με συγκεκριμένα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά σε κάθε υπότυπο και με κατεύθυνση την διαφορετική θεραπευτική στρατηγική για κάθε ένα από αυτούς. Την τελευταία δεκαετία δεν υπήρξε έκρηξη στην εμφάνιση νέων θεραπειών για τον κολοορθικό καρκίνο εν αντιθέσει με άλλα νεοπλάσματα όπου η πρόοδος που καταγράφηκε ήταν επαναστατική. Με το οπλοστάσιο που επί του παρόντος υπάρχει διαθέσιμο, είναι δυνατό μέσω της εφαρμογής της υγρής βιοψίας να καθορίζεται η θεραπευτική επιλογή για τον κάθε ασθενή, η θεραπευτική αλληλουχία για το σύνολο της διαχείρισης του ασθενή ενώ παράλληλα να παρέχεται η δυνατότητα τροποποίησης θεραπευτικών χειρισμών με απώτερο σκοπό το κλινικό όφελος για τους ασθενείς.

Περίληψη.

Εισαγωγή. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί ένα από τα συχνότερα νεοπλάσματα με αυξητική τάση στις νεότερες ηλικιακές ομάδες με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα. Η επιστημονική πρόοδος που έχει συντελεστεί τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών με πρώιμο κολοορθικό καρκίνο σε υψηλά ποσοστά επιβίωσης ακόμη και ίασης. Παρόλα αυτά, το 20% περίπου των ασθενών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του παχέος εντέρου εμφανίζουν μεταστατική νόσο. Για αυτούς, χρυσός κανόνας παραμένει η λήψη δείγματος ιστού για την επιβεβαίωση της νόσου και μετέπειτα ανάλυση αυτού για τον έλεγχο μεταλλάξεων *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* και μικροδορυφορικής αστάθειας για τον καθορισμό τη θεραπείας

Η υγρή βιοψία έχει εμφανιστεί τα τελευταία χρόνια σε μια ελκυστική μέθοδος για την πρόσβαση στο γενετικό υλικό των όγκων και τη χαρτογράφηση του μοριακού τους υπόβαθρου. Με τη χρήση της αποφεύγεται η παρεμβατική βιοψία και οι επακόλουθες πιθανές επιπτώσεις της. Παράλληλα, με τη χρήση της υγρής βιοψίας δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου σε συνθήκες πραγματικού χρόνου και να διαλευκανθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί που οδηγούν στην αντίσταση στη θεραπεία. Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος αποτελεί άλλο ένα πιθανό πεδίο εφαρμογής της όπως και η παρακολούθηση των ασθενών και μετά το πέρας των θεραπειών για την πρώιμη ανίχνευση πιθανής υποτροπής. Το φάσμα των κλινικών εφαρμογών της υγρής βιοψίας αποτελεί αντικείμενο εκτενούς ερευνητικής δραστηριότητας.

Σκοπός. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της κλινικής αξίας της υγρής βιοψίας σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Συγκεκριμένα διερευνήθηκε αρχικά η συμφωνία των αποτελεσμάτων που παρέχονται από την εξέταση του ιστού των ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο με τα αποτελέσματα της υγρής βιοψίας βασισμένης στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA του όγκου στο πλάσμα του περιφερικού αίματος των ασθενών. Ακολούθως, κατά την εμφάνιση προόδου της νόσου σκοπός ήταν να αποκτηθεί το μοριακό προφίλ που έχει αποκτήσει ο όγκος, μετά την εφαρμογή της θεραπείας και την αποτυχία αυτής, αλλά και η σύγκριση των μεταλλάξεων που διαπιστώνονται στην πρόοδο νόσου με τις μεταλλάξεις που διαπιστώνονται κατά τη διάγνωση της νόσου τόσο με την εξέταση του ιστού όσο και με τις μεθόδους της υγρής βιοψίας όπως αυτές εφαρμόστηκαν κατά τη διάγνωση των

ασθενών Τέλος, η συσχέτιση των κλινικών δεδομένων των ασθενών με τα ευρήματα από την εφαρμογή των υγρών βιοψιών ήταν ένα σημαντικό τμήμα του πρωταρχικού στόχου.

Μέθοδοι. Συνολικά 56 ασθενείς με διαγνωσμένο μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου μετά από ενημέρωση και συγκατάθεση συμμετείχαν στη μελέτη. Στον ιστό των ασθενών ο οποίος λήφθηκε με βιοψία κατά τη διάγνωση έγινε έλεγχος ύπαρξης μεταλλάξεων σε 23 γονίδια με τη χρήση τεχνικής αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Την ίδια στιγμή εφαρμόστηκε έλεγχος με τεχνική αλληλούχισης επόμενης γενιάς σε δείγματα αίματος των ασθενών για τον έλεγχο ύπαρξης μετάλλαξης σε ένα σύνολο γονιδίων αλλά και έλεγχος RAS μεταλλάξεων με ψηφιακή PCR BEAMing. Κατά την πρόοδο νόσου επαναλήφθηκε ο έλεγχος σε δείγματα αίματος με την τεχνική αλληλούχισης επόμενης γενιάς όπως είχε διενεργηθεί και κατά τη διάγνωση.

Αποτελέσματα. Η σύμπτωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μεταξύ του μοριακού προφίλ του ιστού και του μοριακού προφίλ του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA είναι ενθαρρυντική για τη μελλοντική εφαρμογή της υγρής βιοψίας στην κλινική διαχείριση του κολοορθικού καρκίνου. Η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου χρονικά με την ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο των αλλαγών που υφίσταται ο όγκος σε μοριακό επίπεδο υπό την επίδραση των θεραπευτικών χειρισμών διευρύνει το πεδίο εφαρμογών της υγρής βιοψίας στη θεραπευτική του κολοορθικού καρκίνου δεδομένου ότι κατά τη μελέτη αυτή διαπιστώθηκαν μεταβολές τόσο στα γονίδια που ανιχνεύθηκαν να φέρουν μεταλλάξεις, όσο και στη συχνότητα με τη οποία εμφανίζονταν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα. Τέλος, ένα ιδιαίτερο σημείο υπήρξε η υψηλή σύμπτωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση δύο διαφορετικών τεχνικών για την επεξεργασία του κυκλοφορούντος καρκινικού γενετικού υλικού ενισχύοντας έτσι ακόμη περισσότερο τη δυναμική των υγρών βιοψιών.

Abstract.

Introduction. Colorectal cancer is one of the most common neoplasms with a trend towards increased incidence among younger ages according to cancer statistics. The progress that has been made in oncology the last decade has led to a significant number of patients with early colorectal cancer having a remarkable outcome. However, 20% of colorectal cancer patients are diagnosed with metastatic disease upon presentation. With the current armory available median overall survival for these patients can reach and even exceed 30 months. Tumor tissue biopsy is the gold standard for the diagnosis and management of the patients. Tissue biomarkers, particularly *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and microsatellite instability ultimately drive the choice of therapy. The appropriate first line therapy, the timing of different therapies and their sequence are subjects of ongoing debate.

Liquid biopsies are an emerging and attractive alternative to tumor tissue biopsies. Their use spares the patient of the traumatizing tissue biopsy and its complications while providing the opportunity for real time genetic mapping of the tumor. Mechanisms that lead to resistance to therapy, minimal residual disease and appropriate follow up of the patients along with early recognition of disease relapse are some their possible clinical applications.

Aim. The aim of this thesis was to investigate the role of liquid biopsies in patients with metastatic colorectal cancer. Primary goal was to identify gene mutations in tumor tissue and in circulating tumor DNA on the same time point of disease diagnosis and investigate the correlation of tissue biopsy with liquid biopsy results regarding mutations spotted. An additional aim was to investigate the mutational landscape of the tumors upon disease progression exploring this way the molecular basis of resistance to therapy. Furthermore, we sought to perform a comparison of mutational status between the two-time points, time at diagnosis and upon disease progression, elucidating the clonal evolution of colorectal cancers. Finally, investigation of tumor mutational status in correlation with the clinical findings of the patients was a supplementary goal.

Methods. Tumor samples and peripheral blood from patients with metastatic colorectal cancer were collected, after providing written consent form. Baseline tumor tissue next generation sequencing was performed with a panel covering 23 genes. On the same

time, blood samples underwent processing and next generation sequencing with a panel covering 50 genes. In addition, BEAMing digital PCR was also applied for the investigation of *RAS* mutations in plasma at baseline. Finally, upon disease progression blood samples were once again collected and plasma NGS was performed.

Results. Next generation sequencing and BEAMing digital PCR results were highly concordant with tissue NGS results. Furthermore, the concordance between plasma NGS and plasma BEAMing was also high. These results are an additional piece of evidence in favor of liquid biopsies and their implementation in clinical practice. It was also of note that the mutational landscape of colorectal cancers evolves through time lapse with new acquired mutations being spotted upon disease progression and the loss of other ones that were present upon diagnosis. Moreover, a difference in the mutant allele frequency detected was also observed during the course of first line therapy. These results suggest that liquid biopsy needs to be widely evaluated and ultimately incorporated in clinical care of metastatic colorectal cancer patients.

Βιβλιογραφικές αναφορές.

1. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* . 2013 Oct 1 [cited 2019 May 18];24(suppl 6):vi64-vi72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078664>
2. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer special articles *Annals of Oncology*. *Ann Oncol* . 2016 [cited 2018 Oct 21];27:1386–422. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-abstract/27/8/1386/1741549>
3. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol* . 2014 Feb 20 [cited 2019 May 18];32(6):579–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449238>
4. Global Cancer Observatory . [cited 2019 May 17]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
5. Weinberg BA, Marshall JL, Salem ME. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. 2017 [cited 2019 May 17]; *Oncology* 2017 May 15;31(5):381-9. Available from: <https://www.cancernetwork.com/oncology-journal/growing-challenge-young-adults-colorectal-cancer>
6. Bailey CE, Hu C-Y, You N, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Increasing Disparities in Age-Related Incidence of Colon and Rectal Cancer in the United States, 1975-2010 HHS Public Access. *JAMA Surg* . 2015 [cited 2019 May 17];150(1):17–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666003/pdf/nihms-739899.pdf>
7. Αναστάσιος Σ, Γιάννης Κ. Εθνικά Προγράμματα Προσυμπτωματικού Ελέγχου για Ενηλίκους στην Ελλάδα. 2010;0–49.
8. Burt RW. Colorectal cancer screening. *Curr Opin Gastroenterol* . 2010 Sep [cited 2019 May 17];26(5):466–70. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664346>
9. Steffen A, Weber MF, Roder DM, Banks E. Colorectal cancer screening and subsequent incidence of colorectal cancer: results from the 45 and Up Study. *Med J Aust* . 2014 Nov 3 [cited 2019 May 17];201(9):523–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25358576>
 10. Hemminki K, Chen B. Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* . 2004 Jul [cited 2019 May 17];13(7):1253–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247139>
 11. Quintero E, Carrillo M, Leoz M-L, Cubiella J, Gargallo C, Lanás A, et al. Risk of Advanced Neoplasia in First-Degree Relatives with Colorectal Cancer: A Large Multicenter Cross-Sectional Study. Franco EL, editor. *PLOS Med* . 2016 May 3 [cited 2019 May 17];13(5):e1002008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27138769>
 12. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *N Engl J Med* . 2005 May 5 [cited 2019 May 17];352(18):1851–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15872200>
 13. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial Adenomatous Polyposis. *Am J Gastroenterol* . 2006 Feb [cited 2019 May 17];101(2):385–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16454848>
 14. Giardiello FM, Allen JJ, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol* . 2014 Aug 22 [cited 2019 May 17];109(8):1159–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070057>
 15. Hennink SD, van der Meulen-de Jong AE, Wolterbeek R, Crobach ASLP, Becx MCJM, Crobach WFSJ, et al. Randomized Comparison of Surveillance Intervals in Familial Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* . 2015 Dec 10 [cited 2019 May 17];33(35):4188–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527788>

16. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* . 2013 Jun 6 [cited 2019 May 17];24(6):1207–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563998>
17. Ralston RA, Truby H, Palermo CE, Walker KZ. Colorectal Cancer and Nonfermented Milk, Solid Cheese, and Fermented Milk Consumption: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* . 2014 Jan 5 [cited 2019 May 17];54(9):1167–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24499149>
18. Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sørensen HT. Low-Dose Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Colorectal Cancer Risk. *Ann Intern Med* . 2015 Sep 1 [cited 2019 May 17];163(5):347. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26302241>
19. Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* . 2010 Nov 20 [cited 2019 May 17];376(9754):1741–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20970847>
20. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* . 2012 Sep [cited 2019 May 17];3(3):153–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22943008>
21. Venook AP, Helen Diller Family U, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen Y-J, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines Version 2.2019 Colon Cancer Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures . 2019 [cited 2019 May 17]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf
22. Böckelman C, Engelmann BE, Kaprio T, Hansen TF, Glimelius B. Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III: A systematic review and meta-analysis of recent literature. *Acta Oncol (Madr)* . 2015 Jan 2 [cited 2019 May 17];54(1):5–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430983>

23. André T, de Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, 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 Dec 10 [cited 2019 May 17];33(35):4176–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527776>
24. Lee J, Chu E. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer: The debate goes on. *J Oncol Pract*. 2017 Apr; 13(4):245–246
25. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne C-H, Pozzo C, Poston G, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer* . 2006 Sep [cited 2019 May 17];42(14):2212–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904315>
26. Wurster EF, Tenckhoff S, Probst P, Jensen K, Dölger E, Knebel P, et al. A systematic review and meta-analysis of the utility of repeated versus single hepatic resection for colorectal cancer liver metastases. *HPB* . 2017 Jun [cited 2019 May 17];19(6):491–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28347640>
27. Choti MA, Sitzmann J V., Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsri R, Schulick RD, et al. Trends in Long-Term Survival Following Liver Resection for Hepatic Colorectal Metastases. *Ann Surg* . 2002 Jun [cited 2019 May 17];235(6):759–66. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref>
28. Park J, Chen Y-J, Lu W-P, Fong Y. The evolution of liver-directed treatments for hepatic colorectal metastases. *Oncology (Williston Park)* . 2014 Nov [cited 2019 May 17];28(11):991–1003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403632>
29. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* . 2017 Sep [cited 2019 May 17];18(9):1182–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28734759>

30. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* . 2015 Jun 25 [cited 2019 May 17];372(26):2509–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26028255>
31. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* . 2014 Sep [cited 2019 May 17];15(10):1065–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088940>
32. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H-J, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With *KRAS* Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA* . 2017 Jun 20 [cited 2019 May 17];317(23):2392. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28632865>
33. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol* . 2010 Nov 1 [cited 2019 May 17];28(31):4697–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921465>
34. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFR-Mediated Reactivation of MAPK Signaling Contributes to Insensitivity of *BRAF* -Mutant Colorectal Cancers to RAF Inhibition with Vemurafenib. *Cancer Discov* . 2012 Mar [cited 2019 May 17];2(3):227–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22448344>
35. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* . 2011 Jun 18 [cited 2019 May

- 17];377(9783):2103–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641636>
36. Swain SM, Baselga J, Kim S-B, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* . 2015 Feb 19 [cited 2019 May 17];372(8):724–34. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1413513>
 37. van Krieken JHJM, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* . 2008 Nov 18 [cited 2019 May 17];453(5):417–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802721>
 38. Dijkstra JR, Heideman DAM, Meijer GA, Boers JE, ‘t Hart NA, Diebold J, et al. KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance. *Virchows Arch* . 2013 Jan 15 [cited 2019 May 17];462(1):39–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242173>
 39. Tol J, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Nagtegaal ID, Punt CJA, Van Krieken JHJM, et al. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med* . 2010 Aug [cited 2019 May 17];14(8):2122–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453520>
 40. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* . 2011 Mar 1 [cited 2019 May 17];104(6):1020–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364579>
 41. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* . 2003 Jun [cited 2019 May 17];3(6):459–65. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc1097>
 42. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* . 2003 Jan [cited 2019 May 17];3(1):11–22. Available from:

- <http://www.nature.com/articles/nrc969>
43. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Duldulao M, Patel S, Sanchez J, et al. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* . 2012 Sep 25 [cited 2019 May 17];13(10):12153–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202889>
 44. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* . 1990 Jun 1 [cited 2019 May 17];61(5):759–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735>
 45. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* . 2009 Apr 2 [cited 2019 May 17];360(14):1408–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339720>
 46. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* . 2013 Sep 12 [cited 2019 May 17];369(11):1023–34. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1305275>
 47. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon J-L, Hecht JR, et al. PEAK: A Randomized, Multicenter Phase II Study of Panitumumab Plus Modified Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (mFOLFOX6) or Bevacizumab Plus mFOLFOX6 in Patients With Previously Untreated, Unresectable, Wild-Type KRAS Exon 2 Metastatic Colo. *J Clin Oncol* . 2014 Jul 20 [cited 2019 May 17];32(21):2240–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687833>
 48. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* . 2015 Dec 15 [cited 2019 May 17];21(24):5469–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26341920>
 49. Van Cutsem E, Lenz H-J, Köhne C-H, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et

- al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* . 2015 Mar 1 [cited 2019 May 17];33(7):692–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605843>
50. Bokemeyer C, Köhne C-H, Ciardiello F, Lenz H-J, Heinemann V, Klinkhardt U, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* . 2015 Jul [cited 2019 May 17];51(10):1243–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25937522>
 51. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJA. *BRAF* Mutation in Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* . 2009 Jul 2 [cited 2019 May 17];361(1):98–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571295>
 52. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* . 2011 Oct 15 [cited 2019 May 17];117(20):4623–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21456008>
 53. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor *KRAS* and *BRAF* Mutation Status. *J Clin Oncol* . 2011 May 20 [cited 2019 May 17];29(15):2011–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502544>
 54. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: A meta-analysis. *Eur J Cancer* . 2015 Mar [cited 2019 May 17];51(5):587–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673558>
 55. Stintzing S, Miller-Phillips L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, et al. Impact of BRAF and RAS mutations on first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab: analysis of the FIRE-3 (AIO KRK-0306) study. *Eur J Cancer* . 2017 Jul [cited 2019 May

- 17];79:50–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28463756>
56. Geissler M, Riera-Knorrenschild J, Tannapfel A, Greeve J, Florschütz A, Wessendorf S, et al. mFOLFOXIRI + panitumumab versus FOLFOXIRI as first-line treatment in patients with RAS wild- type metastatic colorectal cancer m(CRC): A randomized phase II VOLFI trial of the AIO (AIO- KRK0109). *J Clin Oncol* . 2018 May 20 [cited 2019 May 17];36(15_suppl):3509–3509. Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.3509
 57. Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle P-J, Elez E, et al. Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With *BRAF* V600E–Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. *J Clin Oncol* . 2019 Mar 20 [cited 2019 May 17];JCO.18.02459. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30892987>
 58. Kopetz S, McDonough SL, Morris VK, Lenz H-J, Magliocco AM, Atreya CE, et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in *BRAF* -mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *J Clin Oncol* . 2017 Feb 21 [cited 2019 May 17];35(4_suppl):520–520. Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2017.35.4_suppl.520
 59. Hendriks YMC, de Jong AE, Morreau H, Tops CMJ, Vasen HF, Wijnen JT, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin* . [cited 2019 May 17];56(4):213–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870997>
 60. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. *Clin Cancer Res* . 2014 Oct 15 [cited 2019 May 17];20(20):5322–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139339>
 61. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA Mismatch Repair Status and Colon Cancer Recurrence and Survival in

- Clinical Trials of 5-Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* . 2011 Jun 8 [cited 2019 May 17];103(11):863–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21597022>
62. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol* . 2014 May [cited 2019 May 17];25(5):1032–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24585723>
 63. Network TCGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* . 2012 Jul 19 [cited 2019 May 20];487(7407):330–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11252>
 64. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu R-H, et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. [cited 2018 Oct 21]; Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-abstract/29/1/44/4634047>
 65. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer* . 2017 Jan [cited 2019 May 18];70:87–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095980491632490X>
 66. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, et al. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* . 2017 Jan 17 [cited 2019 May 22];8(3):3980–4000. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14012>
 67. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol* . 2015 Apr 1 [cited 2019 May 18];26(4):731–6. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdv005>
 68. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, Villalva C, Collin C, Ferru A, et al. Effect of

- low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* . 2013 May 1 [cited 2019 May 18];24(5):1267–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293113>
69. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* . 2012 Jun 28 [cited 2019 May 18];486(7404):537–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722843>
 70. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, et al. Increased Detection Sensitivity for KRAS Mutations Enhances the Prediction of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Resistance in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* . 2011 Jul 15 [cited 2019 May 18];17(14):4901–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632860>
 71. Misale S, Arena S, Lamba S, Siravegna G, Lallo A, Hobor S, et al. Blockade of EGFR and MEK Intercepts Heterogeneous Mechanisms of Acquired Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer. *Sci Transl Med* . 2014 Feb 19 [cited 2019 May 18];6(224):224ra26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553387>
 72. Toledo RA, Cubillo A, Vega E, Garralda E, Alvarez R, de la Varga LU, et al. Clinical validation of prospective liquid biopsy monitoring in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI-cetuximab. *Oncotarget* . 2017 May 23 [cited 2019 May 18];8(21):35289–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27852040>
 73. Santini D, Vincenzi B, Addeo R, Garufi C, Masi G, Scartozzi M, et al. Cetuximab rechallenge in metastatic colorectal cancer patients: how to come away from acquired resistance? *Ann Oncol* . 2012 Sep 1 [cited 2019 May 18];23(9):2313–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396447>
 74. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol* . 2014 Sep

- [cited 2019 May 18];25(9):1729–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25009010>
75. Wills B, Gorse E, Lee V. Role of liquid biopsies in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* . 2018 Nov 1 [cited 2019 May 18];42(6):593–600. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147027218300710>
 76. Rothé F, Laes J-F, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol* . 2014 Oct 1 [cited 2019 May 18];25(10):1959–65. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu288>
 77. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* . 2014 Feb 19 [cited 2019 May 18];6(224):224ra24–224ra24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553385>
 78. Nordgård O, Tjensvoll K, Gilje B, Søreide K. Circulating tumour cells and DNA as liquid biopsies in gastrointestinal cancer. *Br J Surg* . 2018 Jan [cited 2019 May 18];105(2):e110–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29341153>
 79. Tan CRC, Zhou L, El-Deiry WS. Circulating Tumor Cells Versus Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Pros and Cons. *Curr Colorectal Cancer Rep* . 2016 Jun 7 [cited 2019 May 18];12(3):151–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516729>
 80. MANDEL P, METAIS P. *C R Seances Soc Biol Fil* . 1948 Feb [cited 2019 May 18];142(3–4):241–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018>
 81. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* . 2008 Sep [cited 2019 May 18];14(9):985–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670422>

82. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* . 2016 Mar 8 [cited 2019 May 18];35(10):1216–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26050619>
83. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol* . 2016 Mar 1 [cited 2019 May 18];10(3):395–407. Available from:
84. George JN. Platelets. *Lancet (London, England)* . 2000 Apr 29 [cited 2019 May 18];355(9214):1531–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801186>
85. Braicu C, Tomuleasa C, Monroig P, Cucuianu A, Berindan-Neagoe I, Calin GA. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death Differ* . 2015 Jan 19 [cited 2019 May 18];22(1):34–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236394>
86. Jonas R, Nilsson A, Balaj L, Hulleman E, Van Rijn S, Michiel D, et al. Brief report Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. 2011 [cited 2019 May 18]; Available from: www.bloodjournal.org
87. In 't Veld SGJG, Wurdinger T. Tumor-educated platelets. *Blood* . 2019 Mar 4 [cited 2019 May 18];blood-2018-12-852830. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30833413>
88. Janku F, Angenendt P, Tsimberidou AM, Fu S, Naing A, Falchook GS, et al. Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget* . 2015 May 20 [cited 2019 May 18];6(14):12809–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25980577>
89. Olmedillas-López S, Lévano-Linares DC, Alexandre CLA, Vega-Clemente L, Sánchez EL, Villagrasa A, et al. Detection of KRAS G12D in colorectal cancer stool by droplet digital PCR. *World J Gastroenterol* . 2017 Oct 21 [cited 2019 May 18];23(39):7087–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29093617>
90. Zill OA, Mortimer S, Banks KC, Nagy RJ, Chudova D, Jackson C, et al. Somatic

- genomic landscape of over 15,000 patients with advanced-stage cancer from clinical next-generation sequencing analysis of circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* . 2016 Jun 20 [cited 2019 May 18];34(18_suppl):LBA11501 Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.34.18_suppl.LBA11501
91. FDA Approves First Blood Test to Detect EGFR mutations associated with NSCLC | ESMO . [cited 2019 May 18]. Available from: <https://www.esmo.org/Oncology-News/FDA-Approves-First-Blood-Test-to-Detect-EGFR-mutations-associated-with-NSCLC>
 92. Colling R, Wang LM, Soilleux E. Validating a fully automated real-time PCR-based system for use in the molecular diagnostic analysis of colorectal carcinoma: a comparison with NGS and IHC. *J Clin Pathol* . 2017 Jul [cited 2019 May 18];70(7):610–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28292978>
 93. García-Foncillas J, Alba E, Aranda E, Díaz-Rubio E, Ló Pez-Ló Pez R, Tabernero J, et al. Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. [cited 2019 May 18]; Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/b5ad/aeb2917826042df37ee43fb45a6fc6a2ffc7.pdf>
 94. Vivancos A, Aranda E, Benavides M, Elez E, Gomez A, Toledano M, et al. Evaluation of the sensitivity of RAS mutation detection of the Idylla platform in comparison to the OncoBEAM RAS CRC assay. *J Clin Oncol* . 2018 Feb 26 [cited 2019 May 18];36(4_suppl):592–592. Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.592
 95. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May 17;17(6):333-51
 96. Yang Y-C, Wang D, Jin L, Yao H-W, Zhang J-H, Wang J, et al. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients. *Biosci Rep* . 2018 Aug 31 [cited 2019 May 18];38(4):BSR20180322. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29914973>
 97. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker

- analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* . 2014 Jul 1 [cited 2019 May 18];8(5):927–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789114000416>
98. Wang Y, Chen P-M, Liu R-B. Advance in plasma SEPT9 gene methylation assay for colorectal cancer early detection. *World J Gastrointest Oncol* . 2018 Jan 15 [cited 2019 May 18];10(1):15–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29375744>
 99. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* . 2016 [cited 2019 May 18];8(346):346ra92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384348>
 100. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* . 2017 Sep 2 [cited 2019 May 18];14(9):531–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28252003>
 101. Mohan S, Heitzer E, Ulz P, Lafer I, Lax S, Auer M, et al. Changes in Colorectal Carcinoma Genomes under Anti-EGFR Therapy Identified by Whole-Genome Plasma DNA Sequencing. Horwitz MS, editor. *PLoS Genet* . 2014 Mar 27 [cited 2019 May 18];10(3):e1004271. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004271>
 102. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC: Circulating-Free Tumor DNA as a Surrogate for Determination of EGFR Status. *J Thorac Oncol* . 2014 Sep [cited 2019 May 18];9(9):1345–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122430>
 103. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, Liu X, Clifton KK et al., Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol*. 2019 Feb 1;30(2):243-249. doi: 10.1093/annonc/mdy509.

104. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* . 2015 Nov 12 [cited 2019 May 18];21(11):1350–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.3967>
- 105 Okita A, Takahashi S, Ouchi K, Inoue M, Watanabe M, Endo M, et al. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* . 2018 Apr 10 [cited 2019 May 18];9(27):18698–711. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29721154>
106. Mooi JK, Wirapati P, Asher R, Lee CK, Savas PS, Price TJ, et al. The prognostic impact of Consensus Molecular Subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann Oncol* . 2018 Sep 21 [cited 2019 May 18];29(11):2240–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30247524>
- 107 Ho TH, Dang KX, Lintula S, Hotakainen K, Feng L, Olkkonen VM, et al. Extendable blocking probe in reverse transcription for analysis of RNA variants with superior selectivity. *Nucleic Acids Res* . 2015 Jan [cited 2019 May 18];43(1):e4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378315>
- 108 Shu Y, Wu X, Tong X, Wang X, Chang Z et al., Circulating Tumor DNA Mutation Profiling by Targeted Next Generation Sequencing Provides Guidance for Personalized Treatments in Multiple Cancer Types, *Nature Scientific Reports* **volume** 7, Article number: 583 (2017)
- 109 Vidal J Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017 Jun 1;28(6):1325-1332.

