



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ Π.Γ.Ν.Ι.
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**Διερεύνηση επαγωγής του ανοσολογικού κυτταρικού
θανάτου (ICD) από στοχευτικά και κυτταροτοξικά
αντινεοπλασματικά φάρμακα σε συμπαγείς όγκους και in
vivo μελέτη βιοδεικτών ICD σε ασθενείς.**

ΙΩΑΝΝΑ ΓΑΖΟΥΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ –ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ Π.Γ.Ν.Ι.
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**Διερεύνηση επαγωγής του ανοσολογικού κυτταρικού
θανάτου (ICD) από στοχευτικά και κυτταροτοξικά
αντινεοπλασματικά φάρμακα σε συμπαγείς όγκους και in
vivo μελέτη βιοδεικτών ICD σε ασθενείς.**

ΙΩΑΝΝΑ ΓΑΖΟΥΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ –ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γαζούλη Ιωάννας: 20-03-2019

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 895α/19-06-2019

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Περικλής Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-09-2019

«Διερεύνηση επαγωγής του ανοσολογικού κυτταρικού θανάτου (ICD) από στοχευτικά και κυτταροτοξικά αντινεοπλασματικά φάρμακα σε συμπαγείς όγκους και in vivo μελέτη βιοδεικτών ICD σε ασθενείς»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1001α/29-3-2022

Επιβλέπων:

Μάουρι Ντάβιντε, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Περικλής Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1121α/26-09-2024

1. Μάουρι Ντάβιντε, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Παππάς Περικλής, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κατσάνος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τιμοθεάδου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
7. Λιανός Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 1-11-2024

Ιωάννινα 12-05-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κοντισιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



*Στη μνήμη της αγαπημένης μου γιαγιάς,
Δήμητρας*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διενεργήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, με την υποστήριξη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας και του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το διάστημα 06/2019-06/2024.

Η ενεργός συμμετοχή στην ερευνητική διαδικασία, αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό βήμα στην σταδιοδρομία κάθε νέου Παθολόγου-Ογκολόγου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο και το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, μέσα στο πλαίσιο της λειτουργίας των οποίων, μου δόθηκε η δυνατότητα εκπόνησης της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Είθε το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων να συνεχίσει να είναι αρωγός των νέων επιστημόνων και ιατρών, στο δρόμο της έρευνας και της επιστημονικής προόδου, με την ίδια υποδειγματική συνέπεια και φροντίδα, της οποίας έτυχα και εγώ ως διδακτορική φοιτήτρια.

Η Εταιρεία Παθολόγων Ογκολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ) αποτελεί έναν πολύτιμο επιστημονικό θεσμό, που παρέχει συστηματικά εκπαίδευση αλλά και οικονομική βοήθεια στους νέους ερευνητές Ογκολόγους. Ευχαριστώ την ΕΟΠΕ για την ευγενική χορήγηση υποτροφίας ερευνητικού προγράμματος, η οποία υπήρξε ιδιαίτερα σημαντική για το παρόν πόνημα.

Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές μου ευχαριστίες...

Στον εμπνευστή και αρχικό επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Καθηγητή Ογκολογίας κ. Γεώργιο Πενθερουδάκη, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον και ευρύ θέμα, που άπτεται τόσο του ρόλου της ανοσο-επιτήρησης και ανοσοδιαφυγής στον καρκίνο όσο και των κλινικών εφαρμογών των βιοδεικτών στην επιλογή θεραπείας. Ο κ. Πενθερουδάκης υπήρξε για εμένα πρότυπο κλινικού ιατρού και ερευνητή, κατά τη διάρκεια της άσκησης μου στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ για την συνεχή, πολύτιμη διδασκαλία και καθοδήγηση του κατά τη διαμόρφωσή μου ως Ογκολόγου και ερευνήτριας.

Στον τελικό επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Καθηγητή Ογκολογίας κ. Davide Mauri, υπό την επίβλεψη του οποίου κατέστη δυνατή η ολοκλήρωσή της. Ευχαριστώ τον κ. Mauri για την υποστήριξη, τη διορατικότητα και τις καίριες συμβουλές και παρατηρήσεις του κατά την εκπόνηση της διατριβής μου, όπως και για την συμμετοχή και τη συμπερίληψη μου στην συγγραφική και ερευνητική δραστηριότητα της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής.

Στην κ. Άννα Γούσια, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, χωρίς την ανεκτίμητη αρωγή της οποίας η εκπόνηση του ερευνητικού μέρους της παρούσας εργασίας δε θα είχε καταστεί δυνατή. Η κ. Γούσια έλαβε ενεργό ρόλο στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα παρείχε την πολύτιμη συμβουλευτική της για την επεξεργασία τους.

Στον Καθηγητή Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Περικλή Παππά, ο οποίος υπήρξε μαζί με τον κ. Πενθερουδάκη εμπνευστής του θέματος της διατριβής αυτής. Ο κ. Παππός εκτός από επιβλέπων Καθηγητής, στάθηκε στο πλάι μου ως υπομονετικός δάσκαλος κατά τη διάρκεια εκπόνησης του εργαστηριακού μέρους της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την τις γνώσεις και δεξιότητες που μου μετέδωσε, το εκπαιδευτικό του πνεύμα και το συνεργατικό του χαρακτήρα.

Στον κ. Redi Bumci, για την συμμετοχή του στο κοπιώδες έργο της παθολογοανατομικής μελέτης των εξεταζόμενων δειγμάτων, και για την άψογη συνεργασία μας σε όλα τα θέματα της παρούσας διατριβής.

Στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, και ιδιαίτερα στην Άντα και στην Υπατία, για την εργασία τους στην τεχνική επεξεργασία των δειγμάτων των κύβων παραφίνης.

Στην κ.Γεωργία Κόλιου για την επιμέλεια της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και την άριστη συνεργασία μας.

Στην ομάδα του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη φιλοξενία, τις συμβουλές και τη συνεργασία μας όσο ήμουν εκεί, με διδάσκοντες, υποψήφιους διδάκτορες και φοιτητές. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Γεώργιο Ντούλα, για την εκπαίδευση και την πρακτική βοήθεια που ανιδιοτελώς μου προσέφερε, κατά τη διάρκεια εκπόνησης των εργαστηριακών πειραμάτων.

Στους επιμελητές μου, στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, κ.κ. Αλεξάνδρα Παπαδάκη, Γεώργιο Ζαρκαβέλη, Λήδα Κωσταδήμα, Δημήτριο Πετράκη και Ελευθέριο Καμπλέτσα, για την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια της άσκησής μου στην ειδικότητα της Ογκολογίας, την ενθάρρυνση και τη συνεργατικότητα τους που μου επέτρεψαν να συνεχίσω την διδακτορική μου διατριβή. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Παπαδάκη, που γενναιόδωρα μου παρείχε υλικό της προσωπικής της διδακτορικής διατριβής όπως και σχετικές πηγές βιβλιογραφικών αναφορών. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Ζαρκαβέλη, για τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις και τη συνεχή του παρότρυνση να συνεχίσω, όταν οι δυσκολίες και τα πρακτικά εμπόδια με κατέβαλαν, τόσο στην εκπόνηση της διατριβής, όσο και στην ιατρική μου εκπαίδευση ως ειδικευόμενη Ογκολόγου.

Στους συνειδικευόμενους μου, Στεφανία Γκούρα, Παναγιώτη Ντέλλα, Λεωνίδα Μαυροειδή, Μαριάννα Αμυλίδη, Αθανάσιο Παλιούρα, Ιωάννα Μουζάκη, Άρη Γογάδη και Νάντια Τορουνίδου, χωρίς την στήριξη, την αλληλεγγύη και τη συνεργασία των οποίων δε θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω το παρόν πόνημα. Εύχομαι από καρδιάς να προοδεύουν επιστημονικά και προσωπικά.

Στην κ. Ελευθερία Τζαμάκου, και στο νοσηλευτικό προσωπικό της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, για τη συνεργασία μας κατά την άσκησή μου και τη συμμετοχή τους στη φροντίδα των ασθενών.

Στην κ. Μαρίνα Τσίτσε, υπεύθυνη αρχείου ασθενών, για τη σημαντικότερη βοήθεια της στην ανεύρεση των φακέλων και όλων των σχετικών πληροφοριών.

Στην κ. Δήμητρα Σταμούλη, για την διεκπεραίωση όλων των γραμματειακών διαδικασιών που αφορούν την παρούσα διατριβή.

Στην Αμαλία, την Τάσια και την Έλενα, για όλη τη συνεργασία μας και τη βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Στους ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στην παρούσα ανάλυση και στις οικογένειες τους.

Στην Ά Ογκολογική Κλινική του νοσοκομείου Metropolitan, και στο Διευθυντή μου κ. Δημήτριο Μπαφαλούκο, για την κατανόηση, την υποστήριξη και την ενθάρρυνση τους, που ευόδωσαν την ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Στον Καθηγητή Ογκολογίας, κ. Αλέξιο Ματίκα, για τις συμβουλές, την εκπαίδευση και την έμπνευση που μου προσφέρει όλα τα χρόνια της πολύτιμης για εμένα φιλίας μας.

Στους γονείς μου, Πέτρο και Άννα, που υπήρξαν οι πιο συναρπαστικοί μου δάσκαλοι, και μου μετέδωσαν τον παιδικό ενθουσιασμό και τη βαθιά αγάπη τους για τη γνώση.

Στον αδελφό μου, Γιάννη, διδάκτορα της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών, που με στηρίζει ηθικά και επιστημονικά, όταν το έχω περισσότερο ανάγκη.

Στου φίλους μου, που με περιβάλλουν με τη στοργή και την αγάπη τους, και με εμψυχώνουν σε κάθε δύσκολη στιγμή. Ιδιαίτερα, στις Ιωάννα Δικαίου, Σταυρούλα Μανωλοπούλου και Αφροδίτη Ηλιοπούλου.

Σε όλους τους συναδέλφους που με τιμούν καθημερινά με την εμπιστοσύνη τους.

Σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Και σε εσένα, Νίκο, αγάπη μου.

Σ' ευχαριστώ για όσα είσαι, για όσα κάνεις.

Πρόλογος

Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην εξέλιξη της νεοπλασματικής νόσου έχει αναδειχθεί σε ιδιαίτερα εκτεταμένο πεδίο ιατρικής έρευνας, κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Φαίνεται πως, η διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο τόσο για την επιβίωση όσο και την διασπορά των νεοπλασματικών κυττάρων στον οργανισμό του ξενιστή. Είναι επίσης, καλά τεκμηριωμένη γνώση, ότι τα καρκινικά κύτταρα, επικοινωνούν με αυτά του ανοσοποιητικού του ξενιστή, τόσο μεσω της έκκρισης χημικών ουσιών, όσο και μέσω επιφανειακών υποδοχέων, που μεσολαβούν άμεση σύνδεση και αλληλεπίδραση, κύτταρο με κύτταρο.

Αυτές οι ανακαλύψεις, σε συνδυασμό με την τεχνολογία παραγωγής εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων, οδήγησαν στην ανάπτυξη αποτελεσματικής ανοσοθεραπείας. Μπορούμε πλέον να στοχεύσουμε τους υποδοχείς των κυττάρων του ανοσοποιητικού του ξενιστή, ενισχύοντας την εγγενή, κυτταροτοξική, αντικαρκινική δράση τους.

Σε ποιους ασθενείς ενδείκνυται, ωστόσο, η ανοσοθεραπεία; Ποιοι είναι οι βιοδείκτες που σηματοδοτούν το πιθανό όφελος από τη χορήγησή της;

Ειδικά στον καρκίνο του παχέος εντέρου, νεόπλασμα που προσβάλλει σημαντικό μέρος του πληθυσμού, ακόμα και σε μικρότερες από το αναμενόμενο ηλικίες, φαίνεται ότι, η γενετική πολυμορφία που χαρακτηρίζει μια ομάδα καρκινωμάτων, και έχει τις ρίζες της σε ελλαττωματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού των νεοπλασματικών κυττάρων, αποτελεί το κύριο έρισμα της ανοσοθεραπείας.

Τι γίνεται όμως με το καρκινικό κύτταρο που διαθέτει άρτιους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, και καταφέρνει να μιμείται αποτελεσματικά την συμβατική επαναληψιμότητα των φυσιολογικών γονιδίων και πρωτεϊνών; Είναι αόρατο στο ανοσοποιητικό και κατ'επέκταση ανθεκτικό στη φαρμακευτική ενίσχυσή του;

Υπάρχουν ενδείξεις πως, συγκεκριμένοι θεραπευτικοί παράγοντες, είναι σε θέση να πυροδοτήσουν ένα ιδιαίτερο μοτίβο προγραμματισμένου θανάτου των καρκινικών κυττάρων. Καθώς εισέρχονται σε διαδικασία απόπτωσης, τα καρκινικά κύτταρα, εκπέμπουν μια συγκεκριμένη, χωροχρονική αλληλουχία σημάτων, που προσελκύει τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα τελευταία, ως ενορχυστρωτές της κυτταρικής ανοσίας, απομονώνουν πρωτεΐνες-σημαίες των καρκινικών κυττάρων, και εκπαιδεύουν τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα στην ανίχνευσή και τη θανάτωσή τους. Επομένως, η χορήγηση τέτοιων, έμμεσα ανοσοενισχυτικών φαρμάκων, μπορεί να προετοιμάσει το έδαφος για τη χορήγηση της ανοσοθεραπείας.

Δοκιμάσαμε να μελετήσουμε τα πρωτεϊνικά μοτίβα αυτού του ιδιαίτερου ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου σε κυτταρικές καλλιέργειες, εκμεταλλευόμενοι εργαστηριακές τεχνικές απόμόνωσης πρωτεϊνών, καθώς και την κυτταρομετρία ροής, χωρίς να μπορέσουμε να οδηγηθούμε σε σαφή συμπεράσματα.

Τελικά, στραφήκαμε στην τεκμηριωμένη μέθοδο καταμέτρησης των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων σε δείγματα ιστού ασθενών, αποσκοπώντας να έχουμε αποτελέσματα τόσο απτά, όσο και σημαντικά. Πράγματι, ακόμα και η ενεργοποίηση του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, ως απώτερο στόχο δεν έχει παρά την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων του ξενιστή, ενάντια στο καρκινικό κύτταρο.

Παρά το μικρό αριθμό ασθενών και την αναδρομική έρευνα σε περιστατικά αρχείου, που αναντίρρητα περιορίζουν τη δυνατότητα μας να εκμαιεύσουμε ασφαλή συμπεράσματα από τα ευρήματά μας, η παρούσα εργασία εμπεριέχει μια, σημαντική κατά τη γνώμη μας καινοτομία: Θελήσαμε να διερευνήσουμε την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού του ξενιστή, όπως αυτή εκφράζεται από τις σχετικές συγκεντρώσεις των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, στην περιοχή του καρκίνου, τόσο στην πρωτοπαθή εστία, όσο και στις μεταστάσεις.

Οι μεταβολές της τοπικής ανοσοδιέγερσης από την πρωτοπαθή στις δευτεροπαθείς εστίες, έχει μελετηθεί, ελάχιστα στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Καθώς, κατά την ανάπτυξη μεταστατικής νόσου μεσολαβεί ενδιάμεση χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, θεωρούμε σημαντική τη διερεύνηση του πώς η θεραπεία αυτή μπορεί να επηρεάζει το ανοσοποιητικό του ξενιστή, παράλληλα με την εξέλιξη της νόσου. Ακόμα περισσότερο, θεωρούμε ότι η διακύμανση της ενεργότητας του ανοσοποιητικού κατά την κλινική πορεία του ασθενούς, ενδέχεται να σχετίζεται με την επιβίωση.

Στην παρούσα εργασία, διενεργείται μια συστηματική προσπάθεια διερεύνησης των ως ανωτέρω περιγραφόμενων προβληματισμών και ερωτημάτων μας. Ελπίζουμε, τα μικρού βεληνεκούς ευρήματά μας, να αποτελέσουν εφαλτήριο για μελλοντικές, προοπτικές, μελέτες, σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο, με σκοπό τη μεγιστοποίηση του οφέλους των ασθενών, από τις σύγχρονες θεραπευτικές στρατηγικές.



Relativity, lithograph, M.C. Escher, 1953.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	- 2 -
Πρόλογος	- 5 -
Εισαγωγή.....	- 11 -
1. Κολοορθικός καρκίνος (καρκίνος του παχέος εντέρου).....	- 11 -
1.1. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	- 11 -
1.2. Παράγοντες κινδύνου	- 12 -
1.3. Σταδιοποίηση.....	- 16 -
1.4. Στοιχεία Ιστολογίας.....	- 18 -
1.5. Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες	- 20 -
1.6. Έλεγχος της Μικροδορυφορικής αστάθειας	- 21 -
1.7. Μοριακοί υπότυποι κολο-ορθικού καρκίνου	- 23 -
1.8. Συστηματική θεραπεία και σχετικοί χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες	- 24 -
1.10 Επιπρόσθετο σχόλιο για την επικουρική χημειοθεραπεία στον πρώιμο κολο-ορθικό καρκίνο ...	- 38 -
1.11 Συμπεράσματα.....	- 39 -
2. Ανοσογονικός κυτταρικός Θάνατος (Immunogenic Cell Death-ICD).....	- 40 -
2.1 Ορισμός.....	- 40 -
2.2 Κύρια μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο (Damage Associated Molecular Patterns-DAMPs)	- 40 -
2.3 Επιπρόσθετα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ICD.....	- 42 -
2.4 In vivo screening για επαγωγείς ICD-Μέθοδοι εμβολιασμού	- 43 -
2.5 Επαγωγείς ICD.....	- 44 -
2.6 Συμπεράσματα.....	- 45 -
3. Επαγωγή ICD και άλλες ανοσοτροποποιητικές δράσεις των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου	- 46 -
3.1 Κυτταροτοξικοί παράγοντες-Οξαλιπλάτινα.....	- 46 -
3.2 Τα Anti-EGFR αντισώματα ως επαγωγείς ICD.....	- 47 -
3.3 Άλλες ανοσοτροποποιητικές δράσεις των αντι-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	- 48 -
3.4 Συμπεράσματα.....	- 49 -
4. Ανασκόπηση της αξιολόγησης του φαινομένου του ICD	- 50 -
4.1 Ανίχνευση ICD σχετιζόμενων DAMPs και συσχέτισή τους με κλινικά δεδομένα.....	- 50 -
4.2 Αξιολόγηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου προς ανεύρεση ενδείξεων ανοσολογικής διέγερσης-	- 55 -

4.3 Συμπεράσματα.....	- 56 -
5. Η κυτταρική σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.....	- 57 -
5.1 Λεμφοκύτταρα διηθούντα τους όγκους, Tumor Infiltrating lymphocytes (TILs)	- 57 -
5.2 Κατηγορίες TILs και οι λειτουργίες τους.....	- 58 -
5.3 Αξιολόγηση των TILs στην κλινική έρευνα.....	- 65 -
5.4 Μεθοδολογία Καταμέτρησης TILs	- 69 -
5.5 Συμπεράσματα.....	- 72 -
6.Τα TILs ως βιοδείκτης	- 73 -
6.1 Αξιολόγηση TILs σε μεταστατικές εστίες.	- 73 -
6.2 Η κλινική σημασία των TILs για τον κολο-ορθικό καρκίνο και ο ρόλος του Immunoscore	- 75 -
6.3 Δεδομένα προοπτικών μελετών	- 79 -
6.4 Συμπεράσματα.....	- 82 -
Εικόνες και Πίνακες Γενικού Μέρους	- 84 -
Επιστημονικό υπόβαθρο και σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας.....	- 104 -
1. Επιστημονικό υπόβαθρο	- 104 -
2. Σκοπός της μελέτης.....	- 106 -
2.1.Βασικός Σκοπός της μελέτης.....	- 106 -
2.2. Επιμέρους στόχοι.....	- 106 -
Μεθοδολογία.....	- 108 -
1.Επιλογή ασθενών.....	- 108 -
1.1 Κριτήρια επιλογής.....	- 108 -
1.2 Καταγραφή δεδομένων ασθενών.....	- 109 -
1.3 Ανευρεθέντα περιστατικά	- 110 -
2. Διερεύνηση τοπικής ανοσοδιέγερσης.....	- 110 -
2.1 Μελέτη κυτταρικών πληθυσμών ανοσοποιητικού	- 110 -
2.2 Καταμέτρηση TILs και συγκριτική μελέτη σε ζεύγη βιοψιών.....	- 111 -
2.3 Χρησιμοποιούμενα αντισώματα	- 111 -
2.4 Ανοσοϊστοχημική μελέτη	- 112 -
2.5 Καταμέτρηση λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με ανοσοϊστοχημικούς δείκτες	- 113 -
2.6 Υπολογισμός εμβαδού αξιολόγησης κυττάρων	- 113 -
2.7 Εκτίμηση αριθμού ανοσοκυττάρων.....	- 114 -
3. Στατιστική ανάλυση	- 115 -

Αποτελέσματα	- 116 -
1. Περιγραφικό μέρος.....	- 116 -
2. Ερευνητικό Μέρος	- 125 -
2.1 Αποτελέσματα Στατιστικής Επεξεργασίας.....	- 125 -
2.2 Πίνακες.....	- 127 -
2.3 Γραφήματα.....	134
Συζήτηση	149
Κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	149
Αξιολόγηση τοπικής λεμφοκυτταρικής διήθησης	152
Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις ασθενών	160
Περιορισμοί της παρούσας ερευνητικής εργασίας.....	163
Συμπεράσματα.....	165
Επίμετρο 1.....	167
Επίμετρο 2.....	169
In vitro διερεύνηση της επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου	169
Κυτταροκαλλιέργεια	169
Κυτταρομετρία ροής, FACS	173
Ανίχνευση καλρεκτιουλίνης με τη μέθοδο Western blot.....	177
Συμπεράσματα εργαστηριακών πειραμάτων	180
Περίληψη	181
Abstract	182
Βιβλιογραφία	183

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

1. Κολοορθικός καρκίνος (καρκίνος του παχέος εντέρου)

1.1.Επιδημιολογικά δεδομένα

Ο κολοορθικός καρκίνος, δηλαδή η κακοήθης νεοπλασία που αναπτύσσεται στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου ή του ορθού, αποτελεί την τρίτη κατά σειρά πιο συχνή κακοήγη νεοπλασία και τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) [1]. Κατά το έτος 2020, περισσότερες από 1.9 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 930.000 θάνατοι από καρκίνο παχέος εντέρου σημειώθηκαν παγκοσμίως[1]. Η υψηλότερη επίπτωση παρατηρείται στην Ευρώπη, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, ενώ τα υψηλότερα ποσοστά θνητότητας καταγράφονται στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης. Εκτιμάται ότι το έτος 2040 η επίπτωση του κολοορθικού καρκίνου θα αυξηθεί κατά 63%, φτάνοντας τις 3.2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ανά έτος, ενώ οι θάνατοι θα αυξηθούν σε 1.6 εκατομμύρια ετησίως [1-4] (βλ. εικόνες 1.1.1 και 1.1.2).

Η πιθανότητα ανάπτυξης κολοορθικού καρκίνου είναι 1:23 για τους άνδρες και 1:26 για τις γυναίκες. Η ετήσια εκτιμώμενη επίπτωση παγκοσμίως για άνδρες και γυναίκες είναι από 42 ως 70 νέες περιπτώσεις και 26-39 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού αντίστοιχα [1-4].

Ο κολο-ορθικός καρκίνος που εντοπίζεται στο ορθό (ως και 12-16cm από την ορθοπρωκτική συμβολή) αποτελεί ως και το 3.8% των κακοήθων νεοπλασμάτων που διαγνώστηκαν το 2020, παγκοσμίως, με 732.000 καταγεγραμμένες περιπτώσεις, ενώ ο καρκίνος του κόλου πλην του τμήματος του ορθού, αποτελεί το 10% των κακοηθειών που διαγνώστηκαν το 2020, με πάνω από 1.900.000 καταγεγραμμένα περιστατικά[6].

Η συχνότητα της διάγνωσης αυξάνεται με την ηλικία, με 34 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού σε ασθενείς άνω των 45, και 68 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού σε ασθενείς άνω των 55 ετών, σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία του CDC [2]. Ωστόσο, η επίπτωση του καρκίνου παχέος εντέρου έχει ανοδική τάση ιδιαίτερα σε νεότερους ασθενείς, με ρυθμό αύξησης ως 2% ετησίως. Βάσει αυτού, εκτιμάται ότι το 2030, οι επίπτωση του καρκίνου παχέος εντέρου θα αυξηθεί κατά 90-124% σε νέους ενήλικες από 20-34 ετών, και κατά 27.7-46% σε ενήλικες από 35-49 ετών, χωρίς να είναι γνωστοί οι υποκείμενοι αιτιολογικοί παράγοντες [5-7].

Αντίθετα, στον πληθυσμό από 65 ετών και άνω, η ανάπτυξη διηθητικού κολο-ορθικού καρκίνου, παρουσιάζει πτωτική τάση, ενδεικτικά 3.3% μεταξύ των ετών 2011 και 2016, με παράλληλη ετήσια μείωση κατά 3% για τη θνητότητα της νόσου στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα. Αξιοσημείωτο είναι δε, ότι οι ασθενείς μεταξύ 50 και 65 ετών παρουσιάζουν τα τελευταία έτη ετήσια μείωση της θνητότητας της νόσου κατά 0.6% ετησίως, ενώ στους νεότερους ασθενείς αυξάνεται, με ρυθμό 1.3% ετησίως η επίπτωση της θνητότητας [5-7].

Η μείωση της επίπτωσης της διηθητικής νόσου και των θανάτων που οφείλονται σε αυτήν στις μεγαλύτερες ηλικίες θα μπορούσε να αποδοθεί στην ευρεία εφαρμογή της προληπτικής κολονοσκόπησης από την ηλικία των 50 ετών και άνω, η οποία παρέχει τη δυνατότητα πρόωμης απομάκρυνσης των δυσπλαστικών αδενωμάτων που αποτελούν και τη βασική προκαρκινωματώδη αλλοίωση. Με βάση την ανοδική τάση του κολο-ορθικού καρκίνου

στις νεότερες ηλικίες, η επίσημη σύσταση έναρξης προληπτικής κολονοσκόπησης έχει μειωθεί από τα 50 στα 45 έτη [5-7].

1.2. Παράγοντες κινδύνου

1.2.1 Γενετικοί παράγοντες

Το ποσοστό των καρκίνων του παχέος εντέρου που σχετίζονται με κληρονομική προδιάθεση υπολογίζεται σε 20%, ενώ η συγγένεια με άτομα διαγνωσθέντα με καρκίνο ή αδενώματα του παχέος εντέρου έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου [8,9]. Σε πολυκεντρική μελέτη 8,498 ασθενών που υποβλήθηκαν σε προσυμπτωματικό έλεγχο για καρκίνο παχέος εντέρου, μεταξύ 2006-2012, διαπιστώθηκε ότι άτομα με δύο πάσχοντες από καρκίνο παχέος εντέρου στην οικογένεια τους, είχαν σχεδόν διπλάσια πιθανότητα από το γενικό πληθυσμό να νοσήσουν, ανεξαρτήτως φύλου και ηλικίας [10].

Γενετικά σύνδρομα που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου, περιλαμβάνουν το σύνδρομο Lynch (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer- HNPCC), την οικογενή πολυποδίαση του παχέος εντέρου (FAP, Familial Adenomatous Polyposis) και άλλα, όπως η νεανική πολυποδίαση, το σύνδρομο Peutz-Jeghers, Cowden, Turcot και Gardner [11-23]. (Βλ. Πίνακα 1.2.1.1).

1.2.1.1 Σύνδρομο Lynch

Το κληρονομούμενο σύνδρομο Lynch (Lynch Syndrome, LS), γνωστό στη βιβλιογραφία και ως κληρονομούμενος μη πολυποδιαστικός καρκίνος παχέος εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer-HNPCC), ευθύνεται για 2-4% των περιπτώσεων κολο-ορθικού καρκίνου, ενώ οι ασθενείς έχουν αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο ωοθηκών, ενδομητρίου και στομάχου [11].

Το σύνδρομο Lynch σχετίζεται με υποκείμενη δυσλειτουργία των γονιδίων επιδιόρθωσης ζευγών βάσεων του DNA, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 (mismatch repair genes), που φυσιολογικά αφαιρούν τα μη συμβατά νουκλεοτίδια σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα των βάσεων, ώστε να συμπληρωθούν τα σωστά. Έλλειψη ή και απουσία έκφρασης 1 ή και παραπάνω από τα γονίδια αυτά, οδηγούν σε συσώρευση μεταλλαγών, με αποτέλεσμα κρίσιμες μεταλλάξεις που προδιαθέτουν σε καρκινογένεση. Παράλληλα, το DNA του κυττάρου παρουσιάζει το μοριακό χαρακτηριστικό της μικροδορυφορικής αστάθειας, δηλαδή διαφοροποίηση της δομής επαναλαμβανόμενων μοτίβων DNA αλληλουχιών, που χαρακτηρίζονται ως μικροδορυφόροι, και φυσιολογικά έχουν μια σταθερή δομή [11].

Εναλλακτικά, μεταλλάξεις (deletions) στο γονίδιο EPCAM, οδηγούν σε υπερμεθυλίωση του επαγωγέα του γονιδίου MSH2, με αποτέλεσμα αποσιώπηση της έκφρασής του και φαινότυπο απώλειας της επιδιορθωτικής πρωτεΐνης MSH2, μηχανισμός που εντοπίζεται ως και σε 25% των περιπτώσεων απώλειας της MSH2 πρωτεΐνης [12,13]. Έτερη επιγενετική παραλλαγή που ενδέχεται να οδηγήσει σε φαινότυπο LS, χωρίς μετάλλαξη στα εμπλεκόμενα επιδιορθωτικά γονίδια, μπορεί να προέλθει από μετάλλαξη του ογκογονιδίου BRAF (BRAF V600E), με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση του επαγωγέα του επιδιορθωτικού γονιδίου MLH1, που κατ' ανάλογο τρόπο οδηγεί σε απώλεια της έκφρασής του. Μετάλλαξη του BRAF V600E, εντοπίζεται σε άνω των 2/3 των περιπτώσεων απώλειας του MLH1 επιδιορθωτικού ενζύμου, από ανασκόπηση των σχετικών μελετών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [15].

Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες, φορείς του LS, οφείλουν να υποβάλλονται σε ολική κολονοσκόπηση από τα 20 ή 25 έτη, ή από ηλικία 2-5 έτη μικρότερη από τον νεότερο διαγνωσθέντα συγγενή, λαμβάνοντας υπόψιν το πλέον πρώιμο ενδεχόμενο. Ειδικά για μεταλλάξεις των PMS2, MSH6 γονιδίων, ο έλεγχος μπορεί να ξεκινά στα 30 έτη, ή από ηλικία 2-5 έτη μικρότερη από τον νεότερο διαγνωσθέντα συγγενή, επίσης λαμβάνοντας υπόψιν το πλέον πρώιμο ενδεχόμενο [15].

1.2.1.2 Οικογενής Αδενοματώδης Πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP)

Η οικογενής αδενοματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP) οφείλεται σε μεταλλαγή του γονιδίου APC (Adenomatous Polyposis Coli), που οδηγεί σε ανάπτυξη πολλαπλών πολυπόδων κατά μήκος του παχέος εντέρου, με αποτέλεσμα πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου 100% σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών [15-17]. Οι πάσχοντες, μπορεί να προσβληθούν επίσης από καρκίνο του ανώτερου πεπτικού, του παγκρέατος, του θυρεοειδούς, ήπατος και χοληφόρων και οστεώματα, δερμοειδείς κύστες, δεσμοειδείς όγκους και όγκους κεντρικού νευρικού συστήματος [15-17].

Ο υποκείμενος μηχανισμός αφορά σε απώλεια της πρωτεΐνης APC (γενετικός τόπος γονιδίου 5q21), που λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της β-κατενίνης, καθώς μεσολαβεί την σήμανση της με ουβικουΐτίνη, ώστε να καταστραφεί από το πρωτεόσωμα. Η ελεύθερη β-κατενίνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων των γονιδίων που κινητοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα απεριόριστες κυτταρικές διαιρέσεις όταν υπολειτουργεί η APC [15-17].

Έτερη γονιδιακή μετάλλαξη, που μπορεί να οδηγεί σε φαινότυπο FAP, αν και με μικρότερο αριθμό αδενωμάτων, αφορά στην επιδιορθωτική πρωτεΐνη *MUTYH*. Η φυσιολογική πρωτεΐνη, είναι μια γλυκοζυλάση, η οποία δρα ως επιδιορθωτικό ένζυμο με μηχανισμό εκτομής λανθασμένης βάσης (base excision repair) [17].

Λόγω των χαρακτηριστικά πολυάριθμων πολυπόδων, που διακρίνουν την FAP, συνίσταται έλεγχος του γονιδίου APC, σε ασθενείς με 10-20 ή περισσότερα αδενώματα παχέος εντέρου, ανεξαρτήτως οικογενειακού ιστορικού (ncscn org, 536). Ενδεικτικά, σε ασθενείς με πάνω από 10, 20 και 100 αδενώματα, ο κίνδυνος ανεύρεσης μετάλλαξης του γονιδίου APC υπολογίζεται σε 5%, 10% και 56%, αντίστοιχα [17]. Για τις μεταλλάξεις του γονιδίου *MUTYH*, η συχνότητα κυμαίνεται σε 4%-7%, για ασθενείς με πάνω από 10 αδενώματα [17].

Οι φορείς των υπεύθυνων γονιδίων της FAP, πρέπει να ξεκινούν ετήσιο έλεγχο με κολονοσκόπηση από την ηλικία των 10 ως 15 ετών. Συνίσταται επίσης προληπτική πλήρης κολεκτομή, είτε με διατήρηση του σφιγκτήρα είτε με μόνιμη ειλεοστομία, το συντομότερο δυνατό από τη λήψη θετικού γονιδιακού ελέγχου για το εν λόγω σύνδρομο [15-17].

1.2.1.3 Σύνδρομο αμαρτωματώδους πολυποδίασης

Σύνδρομο αμαρτωματώδους πολυποδίασης, συνδέονται επίσης με προδιάθεση σε καρκίνο παχέος εντέρου. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η νεανική πολυποδίαση (Juvenile Polyposis, με μεταλλάξεις στα γονίδια BMPR1A και SMAD4, το σύνδρομο Peutz-Jeghers (μεταλλάξεις του STK11/LKB1), και τα σύνδρομα αμαρτωμάτων με διαταραχές του γονιδίου PTEN (Cowden Syndrome) ενέχουν κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου 39%-68%, 39%-57% και 18%, αντιστοίχως[18-21].

Η νεανική πολυποδίαση, αποτελεί αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο, με ανάπτυξη πολλαπλών αμαρτωματωδών πολυπόδων σε παχύ έντερο και ορθό, που συχνά εκδηλώνεται από την παιδική ηλικία. Η πιο συχνή εντόπιση των πολυπόδων, είναι η ορθοσιγμοειδική συμβολή, ενώ οι περισσότεροι εκ των ασθενών αναζητούν ιατρική βοήθεια λόγω αναιμίας. Οι πολύποδες χαρακτηρίζονται από εξωφυτική ανάπτυξη και έντονη φλεγμονώδη διήθηση [18-21].

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers (μεταλλάξεις του STK11/LKB1), κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη θηλωδών, αμαρτωματωδών πολυπόδων, των οποίων η σύσταση περιέχει λείες μυϊκές, φλεγμονώδη στοιχεία και ίνωση, οι οποίοι ενδέχεται να αιμορραγούν. Φαινοτυπικό χαρακτηριστικό αποτελούν τα μελανά στίγματα στα χείλη, τον στοματικό βλεννογόνο, και τα δάκτυλα χειρών και ποδών. Ο κίνδυνος για καρκίνο παχέος εντέρου, συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, του παγκρέατος, του λεπτού εντέρου και του πνεύμονα. Η κολονοσκόπηση, συνίσταται να ξεκινά από τα 18 έτη [18-21].

Το σύνδρομο Cowden, που χαρακτηρίζεται από διαταραχές του γονιδίου PTEN, εκδηλώνεται με την ανάπτυξη αμαρτωματωδών, φλεγμονωδών, υπερπλαστικών και αδеноματωδών πολυπόδων, κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, τόσο στο κατώτερο, όσο και στο ανώτερο πεπτικό. Οι ασθενείς συνίσταται να ελέγχονται προληπτικά με κολονοσκόπηση[15, 18-21].

1.2.1.4 Σύνδρομο Li-Fraumeni

Το σπάνιο αυτό σύνδρομο, χαρακτηρίζεται από απώλεια της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης TP53, με επακόλουθη αυξημένη προδιάθεση για κολο-ορθικό καρκίνο (αθροιστική δια βίου πιθανότητα σχεδόν 100%), όγκους των επινεφριδίων, του εγκεφάλου, του παγκρέατος, σάρκωμα Ewing και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία[22,23].

Συνολικά, τα γενετικά σύνδρομα είναι σπάνια, με επίπτωση από 1 ως 6 περιπτώσεις ανά 1 εκατομμύριο πληθυσμού, με πιο συχνό το σύνδρομο Lynch, με επίπτωση 3-5 περιπτώσεις ανά 1 εκατομμύριο πληθυσμού. Ωστόσο, αντιπροσωπεύουν ως και το 10% των ασθενών που εμφανίζουν κολο-ορθικό καρκίνο πριν την ηλικία των 50 ετών [15, 22, 23].

1.2.3 Μη γενετικοί παράγοντες

Χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής όπως ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος, έλλειψη σωματικής δραστηριότητας, το κάπνισμα και η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, και χαμηλή πρόσληψη φυτικών ινών, σχετίζονται σε μέτριο βαθμό με ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου, αυξάνοντας των κίνδυνο κατά 5-10% [24]. Οι ενεργοί καπνιστές, φαίνεται να έχουν αυξημένη πιθανότητα για κολο-ορθικό καρκίνο κατά 10% σε σχέση με τους μη καπνιστές, ενώ για τον καρκίνο του ορθού, η αύξηση του κινδύνου εκτιμάται σε 24% από προοπτικές μελέτες [25]. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II και το μεταβολικό σύνδρομο έχουν επίσης φανεί να προδιαθέτουν θετικά σε ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, αυξάνοντας τον κίνδυνο προσβολής από τη νόσο κατά 14-40% [26] και κατά 18-70% [27].

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, έχει βρεθεί να σχετίζεται με τριπλάσια επίπτωση κολοορθικού καρκίνου στους πάσχοντες, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό[14]. Σε προοπτική μελέτη 19.486 ασθενών με ΙΦΝΕ (60.3% αυτών με νόσο Crohn), 37 από αυτούς ανέπτυξαν κολοορθικό καρκίνο εντός της επόμενης εικοσαετίας, με 13 εξ αυτών εντός της πρώτης δεκαετίας από τη διάγνωση. Ο κίνδυνος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό ήταν διπλάσιος, ενώ ήταν επταπλάσιος για τους ασθενείς με προσβολή τμήματος μεγαλύτερου του 50% του παχέος εντέρου, ή με διάρκεια νόσου μεγαλύτερη των 10 ετών. Χαρακτηριστικά, η λήψη θειοπουρινικών αναλόγων, φάνηκε να προστατεύει από την ανάπτυξη του καρκίνου παχέος εντέρου κατά 72% [28].

Σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ελκώδης κολίτιδα, Crohn) συνίσταται η έναρξη κολονοσκόπησης 8 έτη κατόπιν της έναρξης των συμπτωμάτων [15].

1.3. Σταδιοποίηση

Σύμφωνα με την 8^η έκδοση του εγχειριδίου σταδιοποίησης AJCC (American Joint Committee on Cancer), η διαμόρφωση της τοπικής επέκτασης της νόσου, διαμορφώνεται ως εξής [29]:

- T1: όγκοι που διηθούν τον υποβλεννογόνιο στοιβάδα
- T2: όγκοι που διαπερνούν την υποβλεννογόνιο και εκτείνονται στην ίδια μυϊκή στοιβάδα
- T3: Όγκοι που διαπερνούν εξ ολοκλήρου την ίδια μυϊκή στοιβάδα
- T4a: Όγκοι που διηθούν το σπλαγχνικό πέταλο του περιτοναίου
- T4b: όγκοι που διηθούν άλλα όργανα ή ανατομικές δομές ή και εφάπτονται σε αυτά

Η σταδιοποίηση των λεμφαδένων έχει ως εξής [29]:

N1a: 1 διηθημένος λεμφαδένας

N1b: 2 ή 3 διηθημένοι λεμφαδένες

N1c: Δορυφόρες οζιδιακές αλλοιώσεις, δηλαδή ομάδες κυττάρων (tumor deposits) στον υπο-ορογόνο, το μεσεντέριο, ή σε μη ενδοπεριτοναϊκούς περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς, χωρίς λεμφαδενικές δευτεροπαθείς εντοπίσεις.

N2a: 4 ως 6 διηθημένοι λεμφαδένες

N2b: 7 ή περισσότεροι διηθημένοι λεμφαδένες

Έκταση νόσου T4, δηλαδή όγκοι που διηθούν εξ ολοκλήρου το τοίχωμα του εντέρου εκτεινόμενοι τουλάχιστον ως το σπλαγχνικό περιτόναιο, ακόμα και με αρνητικούς λεμφαδένες, συσχετίζονται επιδημιολογικά με χαμηλότερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με T1,2 επέκταση της νόσου και 1 τουλάχιστον διηθημένο λεμφαδένα [30-32].

Επίσης, σε ανάλυση 109,953 ασθενών από τη βάση δεδομένων SEER, στο διάστημα μεταξύ 1992-2004, το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης (προσαρμοσμένο για την ηλικία), ήταν 79.6% για ασθενείς με όγκους T4a, N0 και 58.4% για ασθενείς με στάδιο νόσου T4bN0 [33].

Σε κάθε στάδιο T, όσο υψηλότερος ο βαθμός λεμφαδενικής διήθησης, τόσο πτωχότερη η πρόγνωση της νόσου.

Η μεταστατική νόσος ταξινομείται περαιτέρω ως εξής[29]:

M1a: Μονήρης μετάσταση σε άλλο όργανο ή απομακρυσμένο, μη επιχώριο λεμφαδένα

M1b: Περισσότερες από 1 δευτεροπαθείς εντοπίσεις, χωρίς περιτοναϊκή καρκινωμάτωση

M1c: περιτοναϊκή καρκινωμάτωση με ή χωρίς αιματογενείς μεταστάσεις σε άλλα σπλαγχνικά όργανα.

Ειδικά οι ασθενείς με καρκινωμάτωση περιτοναίου έχουν μικρότερη συνολική επιβίωση και συντομότερο διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου, σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς περιτοναϊκή διασπορά [34].

Τα στάδια με βάση το σύστημα TNM, είναι τα κάτωθι[20]:

Stage I: T1, T2 N0 M0

Stage IIA: T3 N0 M0

Stage IIB: T4a N0 M0

Stage IIC: T4b N0 M0

Stage IIIA: T1-T2 N1/N1c M0, T1 N2a M0

Stage IIIB: T3-T4a N1/N1c M0, T2-T3 N2a M0, T1-T2 N2b M0

Stage IIIC: T4a N2a M0, T3-T4a N2b M0, T4b N1-N2 M0,

Stage IVA: Any T Any N M1a

Stage IVB: Any T Any N M1b

Stage IVC: Any T Any N M1c

Εν περιλήψει, το στάδιο II σηματοδοτείται από την εξ ολοκλήρου διήθηση της μυϊκής στοιβάδας ή και ολόκληρου του εντερικού τοιχώματος χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, το στάδιο III από την ύπαρξη δορυφόρων οζιδίων ή λεμφαδενικής διήθησης και το στάδιο IV από την ύπαρξη τουλάχιστον 1 δευτεροπαθούς εντόπισης η οποία μπορεί να αφορά άλλο όργανο ή μη επιχώριο λεμφαδένα, καθώς και καρκινωματώδη ασκитική συλλογή.

1.4. Στοιχεία Ιστολογίας

1.4.1 Γενικά στοιχεία Παθολογικής Ανατομικής

Η πλειοψηφία των κολο-ορθικών καρκινωμάτων (>90%) αφορά σε αδενοκαρκινώματα που αναπτύσσονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του παχέος εντέρου [35]. Πλέον σπάνιοι ιστολογικοί τύποι περιλαμβάνουν νευροενδοκρινή, πλακώδη, αδеноπλακώδη, εκ ακτρακτόμορφων κυττάρων και αδιαφοροποίητα καρκινώματα [36].

Τυπικά, το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από αδενικούς σχηματισμούς, των οποίων η έκταση καθορίζει και το βαθμό διαφοροποίησης της νόσου (tumor grading). Ύπαρξη αδενίων σε >95% της έκτασης του καρκινώματος σηματοδοτεί τα καλώς διαφοροποιημένα καρκινώματα, ενώ αδένια σε 50-95% του νεοπλάσματος χαρακτηρίζουν την ενδιάμεση διαφοροποίηση. Στα χαμηλής/πτωχής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα κυριαρχεί το συμπαγές στοιχείο, με σχηματισμό αδενίων σε λιγότερο από 50% της έκτασης του νεοπλάσματος [36-38].

Στην καθ' ημέρα πράξη, 70% των αδενοκαρκινωμάτων παχέος εντέρου είναι μέσης διαφοροποίησης, 10% καλής διαφοροποίησης και 20% χαμηλής διαφοροποίησης [27-29]. Αν και η αξιολόγηση αυτή ενέχει υποκειμενικές διαφοροποιήσεις, η χαμηλή διαφοροποίηση του αδενοκαρκινώματος θεωρείται αρνητικός προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει για τα αδενοκαρκινώματα που φέρουν το χαρακτηριστικό της μικροδορυφορικής αστάθειας, και πτωχής πρόγνωσης όσον αφορά την επιβίωση του ασθενούς [36-38].

Σημαντικά ιστολογικό χαρακτηριστικό του διηθητικού αδενοκαρκινώματος, αποτελεί η δεσμοπλασία ή δεσμοπλαστική αντίδραση, που έγκειται στην ανάπτυξη ίνωσης γύρω από τα κύτταρα του νεοπλάσματος. Επίσης, μπορεί να συνυπάρχει κυτταρική νέκρωση στο εσωτερικό των αυλών των αδενίων, που μάλιστα θεωρείται τυπικό χαρακτηριστικό των αδενοκαρκινωμάτων με προέλευση από το παχύ έντερο [36].

1.4.2 Υπότυποι αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου

Σημαντικοί ιστολογικοί υπότυποι αδενοκαρκινώματος, είναι οι κάτωθι [35-38]:

-βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα (mucinous adenocarcinoma): Αδενοκαρκίνωμα με ύπαρξη εξωκυττάριας βλέννης σε άνω του 50% της έκτασης της νόσου[36, 39-41]. Νεοπλάσματα με ύπαρξη εξωκυττάριας βλέννης σε 10-50% του παρασκευάσματος, χαρακτηρίζονται συνήθως ως αδενοκαρκινώματα με βλεννώδη διαφοροποίηση. Τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα, συνήθως έχουν ευμεγέθεις αδενικές δομές με λίμνες εξωκυττάριας βλέννης, ενώ μπορεί να συνυπάρχουν κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cells) με παρουσία ενδοκυττάριας βλέννης. Πολλά βλεννώδη καρκινώματα αναπτύσσονται σε έδαφος συνδρόμου κληρονομικού, μη πολυποδιασικού καρκίνου παχέος εντέρου (HNPCC, Lynch syndrome) οπότε μπορεί να φέρουν το χαρακτηριστικό της μικροδορυφορικής αστάθειας, το οποίο είναι θετικός προγνωστικός παράγοντας [39-41]. Αντίθετα, τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, τείνουν να έχουν πιο επιθετική συμπεριφορά, ιδίως σε πιο προχωρημένο στάδιο [36]. (Βλ. Εικ 1.4.2.1).

-αδενοκαρκινώματα εκ κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου: Τα καρκινώματα αυτά αντιπροσωπεύουν λιγότερο από 1% των κολο-ορθικών καρκινωμάτων, και χαρακτηρίζονται από παρουσία signet ring cells σε >50% της έκτασης της νόσου (κύτταρα με ενδοκυττάρια βλέννη και έκκεντρα παρεκτοπισμένο πυρήνα). Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διηθούν ιστικές δομές ή να βρίσκονται εν μέσω λιμνών εξωκυττάριας βλέννης. Εξ ορισμού, τα

καρκινώματα αυτά είναι πτωχά διαφοροποιημένα, ωστόσο η συμπεριφορά τους είναι λιγότερο επιθετική αν φέρουν μικροδορυφορική αστάθεια [35,40,42,43]. (Βλ. Εικ. 1.4.2.2).

- μυελοειδές αδενοκαρκίνωμα (medullary carcinoma): Ο συγκεκριμένος υπότυπος χαρακτηρίζεται από φύλλα επιθηλιοειδών νεοπλασματικών κυττάρων με μεγάλους πυρήνες με κυστίδια και εμφανή πυρήνια, με ευμέγεθες κυτταρόπλασμα. Παρά τη χαμηλή διαφοροποίησή του έχει συνήθως καλή πρόγνωση, ενώ συχνά σχετίζεται με μικροδορυφορική αστάθεια. Υπάρχει επίσης έντονη παρουσία διηθούντων λεμφοκυττάρων. Είναι σπάνιος τύπος, καθώς αναγνωρίζεται σε 5-8 περιπτώσεις ανά 10.000 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου [44, 45]. (Βλ. Εικ. 1.4.2.3).

1.4.3 Συμπληρωματικά στοιχεία παθολογοανατομικής έκθεσης

Εκτός από την ιστολογικό τύπο, στην παθολογοανατομική εξέταση συμπεριλαμβάνονται:

-όρια του όγκου: Το περιφερικό όριο (circumferential resection margin, CRM), αντιπροσωπεύει την ελάχιστη απόσταση μεταξύ του περικολικού ιστού που δεν καλύπτεται από ορογόνο χιτώνα και του βαθύτερου ορίου κάθετης διήθησης του νεοπλάσματος. Διήθηση του CRM από το νεόπλασμα σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο τοπικής υποτροπής (38% έναντι 10% για αρνητικό CRM) εξαιρεθέντων καρκινωμάτων του ορθού, καθώς και υψηλότερη πιθανότητα θανάτου από τη νόσο [29, 46].

- Περινευριδιακή διήθηση: Η περινευριδιακή διήθηση (Perineural Infiltration, PNI) έχει σχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση σε πολλές μελέτες, και υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής μετά από εξαίρεση πρώιμο κολο-ορθικού καρκίνου. Σε πολυπαραγοντική ανάλυση ασθενών με σταδίου II εξαιρεθέν αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, η πενταετής ελεύθερη νόσου επιβίωση ήταν 29% στους ασθενείς με PNI, έναντι 82% σε ασθενείς χωρίς διήθηση των νεύρων του εντερικού τοιχώματος. Ανάλογη βαρύτητα έχει η ύπαρξη της και σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες, ενώ αυξάνει τον κίνδυνο συστηματικής υποτροπής της εξαιρεθείσας νόσου και μειώνοντας το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των ασθενών [47,48].

- Tumor budding: Με τον όρο αυτό αποδίδεται η παρουσία μονήρους κυττάρου ή μιας ομάδας ως 4 κυττάρων στο άκρο ανάπτυξης ενός διηθητικού καρκινώματος. Χαρακτηρίζεται ως χαμηλό αν εντοπίζονται ως 4 περιοχές budding, ενδιάμεσο όταν υπάρχουν 5-9 περιοχές και υψηλό από 10 και παραπάνω περιοχές. Φαίνεται ότι η σχετιζόμενη με τη νόσο επιβίωση, στον εξαιρεθέντα κολο-ορθικό καρκίνο σταδίου II, σχετίζεται με το βαθμό του tumor budding, καθώς είναι 89% για το χαμηλό βαθμό TB, 73% για το ενδιάμεσο και 52% για το υψηλό TB, ενώ αποτελεί ένδειξη του ότι ο ασθενής χρήζει επικουρικής χημειοθεραπείας. Το TB είναι επίσης ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το PFS και το OS, σε ασθενείς με εξαιρεθέντα κολο-ορθικό καρκίνο σταδίου III [49-51].

- Λεμφαγγειακή διήθηση(Lymphovascular Invasion, LVI): Ο βαθμός διήθησης των τοπικών ενδοτοιχωματικών αγγείων και λεμφαγγείων, έχει καθιερωθεί ως αρνητικός προγνωστικός παράγοντας, αυξάνοντας τον κίνδυνο της υποτροπής για τα εξαιρεθέντα καρκινώματα σταδίου II [52].

1.5. Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες

Ο πιο συχνός ανοσοφαινότυπος αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου είναι θετικότητα για την κυττοκερατίνη 20 (CK20+) και για το δείκτη CDX2, με αρνητική κυττοκερατίνη 7 (CK7-). Ωστόσο, ως και 20% των καρκινωμάτων μπορεί να έχουν CK7+/CK20- ή CK7-/CK20- προφίλ. Μάλιστα, η απουσία της έκφρασης της CK20, έχει σχετιστεί με το καρκινώματα με μικροδορυφορική αστάθεια. Ο δείκτης CDX2+ είναι χαρακτηριστικός της εντερικής προέλευσης του νεοπλάσματος και ανευρίσκεται θετικός σε άνω του 90% των κολο-ορθικών καρκίνων, ωστόσο δεν είναι παθογνωμονικός για καρκινώματα του παχέος εντέρου. Μπορεί να μην εκφράζεται από τα μυελοειδή καρκινώματα, τα οποία μπορεί να είναι CK20-/ CDX2- [53-56].

Ο ανθρώπινος υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, HER2(Human epidermal growth factor receptor 2) αποτελεί σημαντικό πρωτο-ογκογονίδιο, που ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεταφέρει στον πυρήνα του κυττάρου σήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω φωσφορυλίωσης τυροσινικών κινασών, και λειτουργεί ως ογκογονίδιο σε περίπτωση υπερέκφρασής του. Η προγνωστική του σημασία όπως και η προβλεπτική του αξία για την εφαρμογή θεραπειών με μονοκλωνικά αντι-HER2 αντισώματα, είναι γνωστή από τον καρκίνο του μαστού και του στομάχου, όπου αξιολογείται ανοσοϊστοχημικά. Φαίνεται ότι η υπερέκφραση της ογκογόνου πρωτεΐνης βασίζεται είτε σε πολλαπλασιασμό του γονιδίου είτε σε μεταλλάξεις τύπου missense , οι οποίες μπορεί να ανευρίσκονται ως και σε 7% των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο. Η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 στα κολο-ορθικά καρκινώματα, μπορεί να επιβαρύνει την πρόγνωση, να μειώσει την ανταπόκριση στη θεραπεία αλλά και να παρέχει ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο [57,58].

Ανοσοϊστοχημικά μπορούν επίσης να αναζητηθούν οι επιδιορθωτικές πρωτεΐνες (mismatch repair genes) MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. Έλλειψη 1 ή περισσότερων πρωτεϊνών μπορεί να χαρακτηρίζει τους όγκους με ελαττωματική επιδιόρθωση ζευγών βάσεων (mismatch repair deficient tumors) και συνάδει με υποκείμενη μικροδορυφορική αστάθεια, ελλείψει της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων [59].

1.6. Έλεγχος της Μικροδορυφορικής αστάθειας

Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας (Microsatellite Instability, MSI) διαπιστώνεται ως και σε 15-20% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώνεται σε 19% περίπου των περιπτώσεων πρώιμου κολο-ορθικού καρκίνου και σε 5% των περιπτώσεων μεταστατικού κολο-ορθικού καρκίνου[59]. Μπορεί να οφείλεται σε σωματικές μεταλλάξεις των νεοπλασματικών κυττάρων (somatic mutations) ή σε υποκείμενες κληρονομούμενες μεταλλάξεις (germline mutations) στο πλαίσιο συνδρόμου Lynch(HNPCC), σε 2-4% των περιπτώσεων κολο-ορθικού καρκίνου[59-67].

Το σύστημα mismatch repair genes περιλαμβάνει τα γονίδια MLH1 (mutL homologue 1), MSH2 (mutS homologue 2), MSH6 (mutS homologue 6), PMS2 (postmeiotic segregation increased 2), των οποίων τα πρωτεϊνικά παράγωγα εργάζονται σε ετεροδιμερή ζεύγη [59-67]. Το ετεροδιμερές MSH2/MSH6 προσδένεται στο τμήμα του DNA που ανιχνεύεται η ασύμβατη αζωτούχος βάση, ενώ το ζεύγος MLH1/PMS2 αποκόπτει το ελαττωματικό τμήμα και συνθέτει τη διορθωμένη αλυσίδα DNA αντικαθιστώντας τη σωστή αλληλουχία βάσεων[59]. Στο DNA των κυττάρων ανευρίσκονται σταθερά επαναλαμβανόμενα μοτίβα βάσεων, που ονομάζονται μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Φαίνεται ότι, όταν το κύτταρο έχει ελαττωματικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς λαθών ζευγών βάσεων, λόγω έλλειψης/απουσίας έκφρασης 1 τουλάχιστον από τα γονίδια του συστήματος mismatch repair (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ή και EPCAM), συσσωρεύονται μεταλλάξεις, οι οποίες προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Το νεόπλασμα που χαρακτηρίζεται από ελλείψεις λειτουργικών πρωτεϊνών του συστήματος αυτού ονομάζεται mismatch repair deficient (dMMR), ενώ το νεόπλασμα με άρτια λειτουργικό επιδιορθωτικό σύστημα ονομάζεται mismatch repair proficient (pMMR)[59-67].

Η συσσώρευση μεταλλάξεων, λόγω ελαττωμάτων στη λειτουργία των MMR γονιδίων/πρωτεϊνών αποτυπώνεται έντονα στις φυσιολογικά επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές αλληλουχίες, οι οποίες αρχίζουν να εμφανίζουν παραλλαγές, φαινόμενο που αποδίδεται με τον όρο μικροδορυφορική αστάθεια. Όγκοι που φέρουν το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό χαρακτηρίζονται ως MSI-High, ενώ όγκοι που δεν το φέρουν ως MSS (microsatellite stable) [59-68].

Η κλασική μέθοδος αναζήτησης της μικροδορυφορικής αστάθειας έγκειται στην ανίχνευση συγκεκριμένων μικροδορυφορικών αλληλουχιών με RT-PCR. Περισσότερες από 100,000 μικρές αλληλουχίες DNA μπορούν να ελεγχθούν κατά την εξέταση για μικροδορυφορική αστάθεια. Δύο μονο-νουκλεοτιδικές περιοχές (BAT25 και BAT26) και τρεις δι-νουκλεοτιδικές περιοχές (D5S346, D2S123, και D17S250), είναι αυτές που συστήνεται να εξετάζονται προς διαπίστωση MSI από το 1998 [59-61]. Αρκεί η ανεύρεση παραλλαγών σε 2 ή περισσότερες εκ των 5 ελεγχόμενων περιοχών, για να χαρακτηριστεί ο όγκος ως MSI-High. Σε περίπτωση ανεύρεσης αλλοίωσης σε 1 περιοχή, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως MSI-low, ενώ αν βρεθούν αναλλοίωτες και οι 5 περιοχές ο όγκος χαρακτηρίζεται ως MSS-Stable [67-71]. (Βλ. Εικ 1.6.1)

Εναλλακτικά, μπορεί η έκφραση των πρωτεϊνικών παραγώγων των επιδιορθωτικών γονιδίων να αναζητηθεί με ανοσοϊστοχημεία. Έλλειψη 1 τουλάχιστον πρωτεΐνης χαρακτηρίζει τον όγκο ως MMR deficient (dMMR), και συνήθως συνάδει με MSI-High γονότυπο. Η έκφραση και των 4 πρωτεϊνών, χαρακτηρίζει τον όγκο ως MMR proficient (pMMR) που θεωρείται ότι προέρχεται από καρκίνωμα MSS-stable (ή και MSI-low). Υπάρχει συμφωνία κατά 90-95% μεταξύ του dMMR και του MSI-H, με αποτέλεσμα οι δύο όροι να χρησιμοποιούνται ως ισοδύναμοι τόσο στη βιβλιογραφία όσο και στην καθ' ημέρα κλινική πράξη. Η μικροδορυφορική αστάθεια θεωρείται πιο

ακριβής δείκτης, ωστόσο η ανοσοϊστοχημεία είναι πιο άμεσα διαθέσιμη από την ιστολογική ακόμα εκτίμηση, και ενδείκνυται να επαληθεύεται με την γονιδιακή ανάλυση για MSI [67-71]. (Βλ. Εικ. 1.6.2, 1.6.3)

Ακόμη, σε περίπτωση που το αποτέλεσμα MSI-high (ή για το ανοσοϊστοχημικό του ισοδύναμο dMMR) αφορά στον ιστό, θα πρέπει να ακολουθεί έλεγχος MSI στο περιφερικό αίμα, για να διευκρινιστεί αν πρόκειται για κληρονομούμενο σύνδρομο, ή σποραδικές μεταλλάξεις. Το σύνδρομο Lynch που χαρακτηρίζεται από κληρονομούμενες, germline μεταλλάξεις στα γονίδια MMR: Έλλειψη του *MSH2*, καίριες μεταλλάξεις στα γονίδια *MLH1* και *MSH2*, μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MLH1* και μεταφραστική αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων MMR[59-67]. Ελλείψεις των γονιδίων *MLH1* και *MSH2* αποτελούν 42–50% και 33–39% των περιπτώσεων αντίστοιχα, ενώ μεταλλάξεις των *MSH6* και *PMS2* ανευρίσκονται μόνο σε 7–18% και σε λιγότερο από 7% των περιπτώσεων germline μεταλλάξεων αντίστοιχα [59-67]. Η ανοσοϊστοχημική εξέταση για την πρωτεΐνη *EPCAM* (epithelial cell adhesion molecule) συνίσταται να προστίθεται στην εξέταση για σύνδρομο Lynch, καθώς ετερόζυγη κληρονομούμενη έλλειψη της, μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική λειτουργία του γονιδίου *MSH2* [71].

Ο έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας, μπορεί πλέον να επιτευχθεί με μεγαλύτερη ευαισθησία με ανάλυση του γενετικού υλικού με Next Generation Sequencing (NGS), με δυνατότητα αναγνώρισης μεταλλάξεων των mismatch repair genes [72-74]. Η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης της μικροδορυφορικής αστάθειας βάσει των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ή ακόμα και μέσω του εντοπισμού συγκεκριμένων μεταλλαγών στις κωδικοποιούσες περιοχές των MMR γονιδίων, παράλληλα με ανίχνευση μεταλλάξεων σε πολλά ακόμη γονίδια, χωρίς σπατάλη βιοπτικού υλικού. Συγκεκριμένα, μπορεί να αξιοποιηθούν δείγματα DNA από 0.85 ως 44 Mb (Megabases), ενώ οι εξεταζόμενες αλληλουχίες μπορεί να ξεπεράσουν τις 2900. Η ευαισθησία της μεθόδου, αναφέρεται από 96.4 ως 100%, με ειδικότητα από 97.2 ως 100% [72-74]. Η συγκεκριμένη μέθοδος δύναται να ξεπεράσει τόσο σε διαγνωστική ακρίβεια όσο και σε εξοικονόμηση ιστού την κλασική PCR, ξεπερνώντας παράλληλα τους περιορισμούς της τελευταίας όσον αφορά την ποιότητα και ποσότητα του εξεταζόμενου υλικού και τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά του εξεταζομένου [74].

Κατά την ανοσοϊστοχημική εξέταση του κολο-ορθικού καρκίνου, ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην έλλειψη έκφρασης ειδικά του γονιδίου *MLH1*. Η έλλειψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, μπορεί να οφείλεται όχι μόνο σε μεταλλαγή του υπεύθυνου γονιδίου, αλλά και σε επιγενετική αποσιώπηση του, μέσω μεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως μεθυλίωση του *MLH1* γονιδίου ανευρίσκεται σε 66.5% των περιπτώσεων κολο-ορθικού καρκίνου με έλλειψη της πρωτεΐνης *MLH1*. Το ποσοστό ανέρχεται σε 80.8% των περιπτώσεων με απώλεια *MLH1* πρωτεΐνης και μικροδορυφορική αστάθεια (σχεδόν 70% των σποραδικών όγκων με μικροδορυφορική αστάθεια και σε 38% των όγκων στο πλαίσιο συνδρόμου Lynch) [68].

Η επιγενετική αποσιώπηση του *MLH1* γονιδίου, σχετίζεται με την ύπαρξη μετάλλαξης της ενδοκυττάριας κινάσης *BRAF*, καθώς εντοπίζεται σε 53% των *BRAF* μεταλλαγμένων καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, αλλά μόνο σε 13.7% των *BRAF* wild-type περιπτώσεων [75]. Αντίστροφα, 63% των περιπτώσεων κολο-ορθικού καρκίνου με απώλεια/μεθυλίωση του *MLH1* γονιδίου, παρουσιάζει *BRAF* V600E μετάλλαξη [14,75]. Επομένως, σε απουσία έκφρασης του *MLH1*, πρέπει να γίνεται έλεγχος για *BRAF* μετάλλαξη και γονιδιακός έλεγχος μικροδορυφορικής αστάθειας.

Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται ως MSI-High ή dMMR με βάση την ανοσοϊστοχημεία, έχουν καλύτερη πρόγνωση με επιπτώσεις στους θεραπευτικούς χειρισμούς, ενώ χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ποικιλία νεοαντιγόνων που τους καθιστά ευκολότερα αναγνωρίσιμους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Είναι πλέον σαφές ότι εξαιρεθέντα καρκινώματα σταδίου II (T3, 4 N0) MSI-high δε χρήζουν επικουρικής χημειοθεραπείας, καθώς έχουν χαμηλή πιθανότητα υποτροπής ανεξάρτητα από το ιστολογικό grade και την ύπαρξη νόσου T4, ενώ μεταστατικοί όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια μπορούν να αντιμετωπιστούν με ανοσοθεραπεία αντί της χημειοθεραπείας στην πρώτη γραμμή αγωγής, λόγω της υψηλής ανοσογονικότητάς τους, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια[3].

1.7. Μοριακοί υπότυποι κολο-ορθικού καρκίνου

Οι σύγχρονες τεχνικές μοριακής ανάλυσης του κολο-ορθικού καρκίνου, έχουν επιτρέψει τη διάκριση 4 υπότυπων (CMS, Consensus molecular subtypes) με διακριτά γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, η χρήση των οποίων δεν έχει ωστόσο ακόμα ενσωματωθεί στην καθ' ημέρα κλινική πράξη[76].

-CMS1 (microsatellite instability [MSI], Immune): Ο υπερμεταλλαγμένος, ανοσογονικός υπότυπος που χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια και έντονη ανοσολογική απόκριση. Αποτελεί 14% των περιπτώσεων. Συχνά φέρει μεταλλάξεις του ογκογονιδίου BRAF. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με διάχυτη λεμφοκυτταρική διήθηση, κυρίως από T-κυτταροτοξικά και βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα τύπου 1 [76,77]. Κλινικά, συνήθως αναπτύσσεται σε γυναίκες και σε καρκινώματα του δεξιού κόλου, και χαρακτηρίζεται από υψηλόβαθμο ιστολογικό grade. Μετά την υποτροπή παρουσιάζει, παρ'όλα αυτά, πτωχή πρόγνωση [76, 78-83]

-CMS2 (Canonical): Κανονικός τύπος, με επιθηλιακά κύτταρα, χρωμοσωμική αστάθεια και αυξημένη ενεργοποίηση των μονοπατιών των γονιδίων WNT και MYC, που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Αποτελεί 37% των περιπτώσεων. Συνήθως αναπτύσσεται στο αριστερό κόλον. Χαρακτηρίζεται από υψηλή πιθανότητα επιβίωσης μετά την υποτροπή [76, 81-83].

-CMS3 (Metabolic): Μεταβολικός τύπος, επιθηλιακός με έντονη μεταβολική απορρύθμιση και ποικίλες μεταβολικά-γονιδιακά προφίλ. Αποτελεί το 13% των περιπτώσεων. Συχνά φέρει μεταλλάξεις του ογκογονιδίου KRAS [76, 78-80].

-CMS4 (Mesenchymal): Μεσεγχυματικός τύπος, με έντονη ενεργοποίηση του TGF beta (transforming growth factor β), διήθηση του στρώματος και αγγειογένεση. Αποτελεί το 23% των περιπτώσεων. Χαρακτηρίζεται από αύξηση της ενεργοποίησης των γονιδίων που μεσολαβούν τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς το μεσεγχυματικό φαινότυπο (epithelial mesenchymal transition, EMT), έντονη διήθηση του στρώματος του όγκου, έκφραση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών και ενεργοποίηση του συμπληρώματος [76]. Συνήθως διαγιγνώσκεται σε πιο προχωρημένο στάδιο, με διήθηση επιχώριων λεμφαδένων ή αιματογενή διασπορά σε άλλα όργανα. Σχετίζεται με μειωμένη συνολική επιβίωση και σύντομο διάστημα ως την υποτροπή της νόσου στα εξαιρεθέντα

καρκινώματα. Παραμένει αρνητικός προγνωστικός παράγοντας ανεξάρτητα από την ύπαρξη BRAF, KRAS μεταστάσεων και του MSI status [76].

-Μικτός ή ενδιάμεσος υπότυπος: Καρκινώματα με μικτά χαρακτηριστικά, που πιθανώς αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσα γκρίζα ζώνη μεταξύ δύο άλλων υπότυπων, ή περιπτώσεις νεοπλασματικής ετερογένειας μέσα στο ίδιο νεόπλασμα.

1.8.Συστηματική θεραπεία και σχετικοί χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες

Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου παρουσιάζουν μεταστατική νόσο, με την πλειοψηφία αυτών να εμφανίζει ηπατικές μεταστάσεις (80-90%) [84,85]. Οι δευτεροπαθείς εντοπίσεις εμφανίζονται σε δεύτερο χρόνο, μετά την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς εστίας στους περισσότερους ασθενείς, ωστόσο σε 20-34% των ασθενών έχουν αναπτυχθεί ήδη τη στιγμή της διάγνωσης (σύγχρονες ηπατικές μεταστάσεις) [86]. Επομένως, ιδιαίτερη σημασία αποκτά η συστηματική αντιμετώπιση της νόσου.

Η συστηματική θεραπεία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως νεοεπικουρική, υπό την έννοια ότι αφού επιτευχθεί αρχική ανταπόκριση στη θεραπεία, μπορεί να δώσει τη δυνατότητα της χειρουργικής εξαίρεσης τόσο της πρωτοπαθούς εστίας όσο και των ηπατικών δευτεροπαθών εντοπίσεων σε επιλεγμένες περιπτώσεις ασθενών [87,88].

Η συστηματική θεραπεία περιλαμβάνει κυτταροτοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, στοχευτική θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, αντιαγγειογενετική θεραπεία και στη σύγχρονη εποχή και ανοσοθεραπεία με αναστολείς των σημείων ανοσολογικού ελέγχου (Immune checkpoint inhibitors, ICIs). Θα περιγράψουμε την χρήση της συστηματικής θεραπείας, για τον προχωρημένο/ μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο, η οποία χορηγείται ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής ή και ως νεοεπικουρική θεραπεία στο πλαίσιο αντιμετώπισης δυνητικά εξαιρέσιμης νόσου, μετά από ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία.

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι διαθέσιμοι βιοδείκτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην επιλογή της θεραπευτικής στρατηγικής, όπως περιγράφεται ακολούθως (Βλ. και πίνακα 1.8.1).

1.8.1 Χημειοθεραπεία

Οι κύριοι κυτταροτοξικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι οι εξής: 5-φθοριοουρακίλη (5-fluorouracil, 5-FU), και το προφάρμακο της η καπεσιταβίνη, η λευκοβορίνη, η οξαλιπλατίνα και η ιρινοτεκάνη.

-5-φθοριοουρακίλη (5-fluorouracil, 5-FU): Πυριμιδινικό ανάλογο. Αναστέλλει τη θυμιδική συνθετάση, το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της μονοφωσφορικής δεοξουριδίνης σε μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη, η οποία χρησιμοποιείται κατόπιν περεταίρω φωσφοριλίωσης ως ριβονουκλεοτίδιο (σύνθεση RNA) και δεοξυριβονουκλεοτίδιο (σύνθεση DNA). Το αποτέλεσμα της 5-FU είναι η αναστολή σύνθεσης νέων αλυσίδων DNA κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, και κατά συνέπεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Χορηγείται σε ενδοφλέβια μορφή, με χρόνο ημιζωής 16 λεπτά. Μεταβολίζεται από το ήπαρ, προς ουρία, φθοριοουρακίλη και διοξείδιο του άνθρακα, ενώ οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται στα ούρα [89].

-καπεσιταβίνη (capecitabine): Προφάρμακο της 5-FU που χορηγείται σε από του στόματος μορφή. Μεταβολίζεται στην προς 5'-deoxy-5-fluorouridine η οποία μετατρέπεται σε ενεργό 5-FU. Η μετατροπή λαμβάνει χώρα εντός των νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω των ενζύμων απαμινάση της κυτιδίνης και φωσφορυλάση της θυμιδίνης. Ο χρόνος ημιζωής της είναι περίπου 45 λεπτά, και ο μεταβολισμός της από το στάδιο της 5-FU και μετά ακολουθεί το ίδιο μονοπάτι με το ενεργό φάρμακο [90,91].

-λευκοβορίνη (leucovorin, calcium folinate): Μορφή φυλλικού οξέος που συγχορηγείται με την ενδοφλέβια 5-FU, καθώς ισχυροποιεί την πρόσδεση της τελευταίας στο ένζυμο στόχο της, δηλαδή τη θυμιδική συνθετάση. Ο χρόνος ημιζωής της είναι 4 με 8 ώρες, και απεκκρίνεται κυρίως με τα ούρα αλλά και τα κόπρανα [92,93].

-οξαλιπλατίνα (oxaliplatin): Πλατινούχος αλκυλιωτικός παράγοντας. Δημιουργεί δεσμούς μεταξύ διαφορετικών νουκλεοτιδίων του DNA, συνδέοντας τις αζωτούχες βάσεις τους με ομοιοπολικούς δεσμούς μέσω των πλατινο-ομάδων που φέρει. Η παραμόρφωση των κλώνων του DNA οδηγεί σε ρήξη του μορίου και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Χορηγείται ενδοφλέβια, με χρόνο ημιζωής από 250 ως 270 ώρες, ενώ συνδέεται με αλβουμίνη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%. Απομακρύνεται ταχέως από το πλάσμα και μεταβολίζεται στους ιστούς, χωρίς να υπόκειται στο ηπατικό σύστημα των κυτοχρωμάτων CYP450. Απεκκρίνεται κυρίως στα ούρα [89, 92].

-ιρινοτεκάνη (irinotecan, camptothecin, CPT-11): Αναστολέας τοποϊσομεράσης I. Δημιουργεί θραύσματα στις αλυσίδες του DNA (double strand breaks), παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική διαδικασία αντιγραφής και επιδιόρθωσης και επάγοντας εμμέσως τον κυτταρικό θάνατο, μέσω της συσσώρευσης τραυματισμένων αλυσίδων DNA. Η ιρινοτεκάνη μεταβολίζεται στο ήπαρ προς τον ενεργό της μεταβολίτη SN-38, ο οποίος περαιτέρω γλυκουρονώνεται UDP- γλυκουρονική τρανσφεράση (UGT1 A1) και απεκκρίνεται στη χολή ή και στα ούρα. Ο χρόνος ημιζωής του SN-38 φτάνει τις 12 ώρες, ενώ κατά 95% κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένος με αλβουμίνη. Η ιρινοτεκάνη, χορηγείται ενδοφλεβίως, ο χρόνος ημιζωής της κυμαίνεται από 6-10 ώρες και το ποσοστό που δεσμεύεται από την αλβουμίνη φτάνει ως και 68% της ποσότητάς της που βρίσκεται στο πλάσμα [89, 93].

Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται στην καθ' ημέρα κλινική πράξη είναι:

-FOLFOX (5-FU, Leucovorin, oxaliplatin) και Capox (capecitabine, oxaliplatin): Τα δύο σχήματα θεωρούνται ισοδύναμα και χρησιμοποιούνται κατ'εξοχήν στην 1^η γραμμή θεραπείας, με ή χωρίς την προσθήκη αντιαγγειογενετικής ή στοχευτικής θεραπείας (βλ. κάτωθι) [94,95]. Το διάμεσο PFS αναφέρεται στις μελέτες μεταξύ 8 και 8.5 μηνών, ενώ η διάμεση συνολική επιβίωση μεταξύ 18-19 μηνών.

Βασικές σοβαρού βαθμού τοξικότητες ($\geq$ grade 3) περιλαμβάνουν την κοκκιοκυτταροπενία με ή χωρίς εμπύρετο για το σχήμα FOLFOX και τις διάρροιες και το σύνδρομο παλαμών-πελμάτων (Hand-Foot syndrome) για το σχήμα XELOX [94,95]. Παράλληλα, η οξαλιπλατίνη δύναται να επιφέρει νευροτοξικότητα, κυρίως αισθητική περιφερική νευροπάθεια, η οποία μπορεί να είναι και σοβαρού βαθμού ως και σε 18% των θεραπευόμενων ασθενών [96].

Ως νεοεπικουρική θεραπεία, το FOLFOX έχει βρεθεί να καθιστά δυνατό το χειρουργείο μεταστατικής νόσου σε ποσοστό 12 ως και 40% των ασθενών, με επακόλουθη πενταετή επιβίωση άνευ υποτροπής ως και 22% των χειρουργηθέντων ασθενών. Αναφερόμενη στη βιβλιογραφία συνολική επιβίωση μπορεί να ανέρχεται στους 42 μήνες [97-99]. Σημαντική είναι η ηπατική τοξικότητα της οξαλιπλατίνης με την πρόκληση τραυματισμού των ηπατικών κολποειδών, η οποία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την πιθανότητα χειρουργικής επέμβασης στο ήπαρ για εξαίρεση ηπατικών δευτεροπαθών εντοπίσεων [100,101].

-FOLFIRI (5-FU, Leucovorin, irinotecan): Το συγκεκριμένο σχήμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί του FOLFOX στην πρώτη γραμμή θεραπείας, καθώς αποδίδουν παρόμοια ποσοστά ανταποκρίσεων (31-34%) και ανάλογα διαστήματα PFS (7 μήνες) και OS (14,15 μήνες) [102,103]. Επίσης, φαίνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαδοχικές γραμμές θεραπείας, χωρίς η αποτελεσματικότητά τους να επηρεάζεται από τη σειρά χορήγησης. Σημαντική είναι η τοξικότητα της ιρινοτεκάνης στο γαστρεντερικό σύστημα, αν και συνήθως είναι ήπιας βαρύτητας [102,103].

-FOLFOXIRI (5-FU, Leucovorin, irinotecan, Oxaliplatin):

Στην πρώτη γραμμή θεραπείας το σχήμα FOLFOXIRI (ή FOLFIRINOX) έχει βρεθεί να είναι πλεονεκτικό για τους ασθενείς με Performance status 0-1, με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, μειώνοντας κατά 26% την πιθανότητα προόδου νόσου σε σχέση με τη διαδοχική χορήγηση FOLFOX και FOLFIRI, με αύξηση της σοβαρού βαθμού τοξικότητας από το 17 σε 25% των ασθενών στη μελέτη TRIBE2 [104].

Ως νεοεπικουρική θεραπεία επιτρέπει υψηλότερο ποσοστό R0 εκτομών, ως και σε 10-15% σε σχέση με 4-6% που επιτυγχάνει το FOLFIRI χωρίς οξαλιπλατίνη [105,106]. Στη μελέτη GONO, διάμεση συνολική επιβίωση υπερέβη τους 23 μήνες με το σχήμα FOLFOXIRI, σε σχέση με τους 16.7 μήνες που σημειώθηκε στο σκέλος που έλαβε θεραπεία με FOLFIRI [105,106]. Σημαντική τοξικότητα της ιρινοτεκάνης που μπορεί να επηρεάσει την ηπατεκτομή αποτελεί η στεατοηπατίτιδα, σε συνδυασμό με τον τραυματισμό των ηπατικών κολποειδών από την οξαλιπλατίνη [100,101].

1.8.2 Αντιαγγειογενετική θεραπεία

Το bevacizumab είναι ένα IgG1 εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα, ικανό να δεσμεύει και να απενεργοποιεί το αγγειακό-ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα, VEGF-A (vascular endothelial growth factor, form A) [106, 108]. Ο παράγοντας εκλυόμενος από την υποξία HIF (Hypoxia Induced Factor), ενεργοποιεί τη μεταγραφή του VEGF, ο οποίος, κατά τη σύνδεση με τον υποδοχέα του VEGFR, στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, κινητοποιεί την αγγειογένεση [106]. Με την αναστολή του VEGF μεταδιδόμενου σήματος, περιορίζεται η νεοαγγειογένεση που τροφοδοτεί τα νεοπλασματικά κύτταρα και ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου [106,108].

Το bevacizumab χορηγείται ενδοφλεβίως και έχει χρόνο ημιζωής 19.6 ημέρες [106]. Προστίθεται στη θεραπεία με όλα τα κυτταροτοξικά σχήματα που προαναφέρθηκαν στην πρώτη γραμμή θεραπείας (FOLFOX, FOLFIRI, FOLFIRINOX). Από τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι μπορεί να παρατείνει το PFS και το OS των ασθενών με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο υπό θεραπεία με 5-FU, ενώ κατά την προσθήκη του στο FOLFOX και στο Carox παρατείνει το PFS και σε μη στατιστικά σημαντικό βαθμό και το OS [109-112]. Από συγκρίσεις μεταξύ μελετών, φαίνεται ότι η προσθήκη του bevacizumab μπορεί να αυξάνει και το ποσοστό των αντικειμενικών ανταποκρίσεων της μεταστατικής νόσου [113].

Η προσθήκη του bevacizumab στη συστηματική χημειοθεραπεία μειώνει τον κίνδυνο προόδου νόσου κατά 56-60%, τόσο στα KRAS μεταλλαγμένα όσο και στα KRAS μη μεταλλαγμένα καρκινώματα [113]. Κυρίως ενδείκνυται για τους ασθενείς με μεταλλάξεις του KRAS ή NRAS ογκογονιδίου, οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα [113]. Ιδιαίτερα στα καρκινώματα του αριστερού κόλου, φαίνεται ότι τα anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα δρουν καλύτερα από το bevacizumab όταν προστίθενται στη χημειοθεραπεία [113].

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες παρενέργειές του αφορούν σε υπέρταση, απέκκριση λευκώματος στα ούρα, αιμορραγική προδιάθεση και θρομβωτικά επεισόδια [109-113]. Όταν αποτελεί μέρος της νεοεπικουρικής θεραπείας, η χορήγησή του πρέπει να διακόπτεται τουλάχιστον 5 εβδομάδες προ της επέμβασης. Η συνέχισή του μετά την εκτομή της νόσου δεν υποστηρίζεται από σαφή κλινικά δεδομένα, ωστόσο μπορεί να εξακολουθήσει μέχρι να συμπληρωθούν συνολικά 6 μήνες χορήγησης [113,114].

1.8.3 Αντι-EGFR αντισώματα

1.8.3.1 Η λειτουργία του EGFR και ο ρόλος του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, ErbB1, HER1), είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη ικανή να αναμεταδίδει ενδοκυττάρια σήματα αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιβίωσης [115-119]. Πρόκειται για μέλος της οικογένειας διαμεμβρανικών υποδοχέων ErbB (EGFR/ERBB1/HER1, NEU/ERBB2/HER2, ERBB3/HER3, ERBB4/HER4). Ο γονιδιακός τόπος του βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 (7p22q), και φυσιολογικά ο βαθμός έκφρασής του είναι 40.000 με 100.000 υποδοχείς ανά κύτταρο, με τα καρκινικά κύτταρα να εκφράζουν ως και 1 εκ. υποδοχείς ανά κύτταρο [115].

Ο EGFR κατά το διμερισμό του με άλλα μέλη της οικογένειας των διαμεμβρανικών υποδοχέων HER, όπως ο HER2, ο οποίος συνήθως κινητοποιείται από αυξητικούς παράγοντες που προσδένονται στο εξωκυττάριο τμήμα της, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) ή ο TGF- α (Transcription Growth Factor- α) κινητοποιεί μέσω πρόσδεσης πρωτεϊνών στόχων ή και αλληπάλληλων φωσφορυλίσεων τυροσινικών υποομάδων, ενδοκυττάρια μονοπάτια που ισχύουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. [116-119]

Πιο συγκεκριμένα, το ενεργοποιημένο διμερές του EGFR με το HER2 ή άλλο διαμεμβρανικό υποδοχέα, δρα ως σημείο αγκυροβόλησης για ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, αποτελώντας εφαλτήριο της ενεργοποίησής τους, ή κινητοποιεί ενδοκυττάρια ένζυμα ή και μεταγραφικούς παράγοντες που τροποποιούν την γονιδιακή έκφραση [116-119].

Καίρια ενδοκυττάρια μονοπάτια που κινητοποιούν την κυτταρική επιβίωση και τον αυξημένο πολλαπλασιασμό και ενεργοποιούνται από τον EGFR, περιλαμβάνουν το μονοπάτι των MAP κινασών, με τις διαδοχικές φωσφορυλίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών RAS-RAF-MEK-ERK και το μονοπάτι AKT-PI3K-mTOR [115]. (Βλ. Εικ. 1.8.3.1).

1.8.3.2 Μονοπάτι των MAP κινασών

Η πρωτεΐνη GRB2 παρέχει σημείο πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες SOS ή και GAB1. Η πρωτεΐνη SOS καταλύει τη φωσφορυλίωση του τμήματος GDP της πρωτεΐνης RAS σε GTP, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης της πρωτεΐνης RAS. Η ενεργός πρωτεΐνη RAS προσδένει την πρωτεΐνη RAF-1. Η ενεργός RAF ενεργοποιεί με τη σειρά της την πρωτεΐνη MEK1/2, και η τελευταία την πρωτεΐνη ERK1/2. Η πρωτεΐνη ERK1/2 έχει ποικίλους ενδοκυττάριους στόχους, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα του κυττάρου, οι οποίοι μεσολαβούν την μεταγραφή και παραγωγή της κυκλίνης D1. has various cytoplasmic and nuclear targets, which aid in the transcription and translation of Cyclin D1, κομβικό σηματοδότη για την ενεργοποίηση διαδικασίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω της ενεργοποίησης των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Τελικός στόχος του μονοπατιού είναι η επαγωγή της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, με τον διπλασιασμό του DNA [115-118].

1.8.3.3 μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR

Η επί του ενδοκυττάριου τμήματος του EGFR αγκυροβολημένη πρωτεΐνη GRB2, δεσμεύει επίσης την GAB1. Η GAB1 δεσμεύει την p85 ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K, η καταλυτική p110 υπομονάδα της οποίας μετατρέπει την PIP2 σε PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Το μόριο PIP3 αποτελεί σημείο πρόσδεσης της πρωτεΐνης AKT, η οποία φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες PDK1 και mTORC2. Το ενεργό, φωσφορυλιωμένο AKT έχει πολλά μόρια στόχους, μεταξύ των οποίων αρνητικοί ρυθμιστές της κυκλίνης 1, τους οποίους απενεργοποιεί. Επίσης, αναστέλλει τη λειτουργία του μορίου TSC2, ευοδώνοντας έτσι την ενεργοποίηση του mTOR, που αναστέλλει αρνητικούς ρυθμιστές της μεταγραφής της κυκλίνης 1. Τόσο το μονοπάτι των MAP κινασών όσο και το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR, αναστέλλουν τη λειτουργία προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η BIM, η κασπάση-9 και η BAD [115-118].

1.8.3.4 Ο EGFR ως θεραπευτικός στόχος στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο υποδοχέας EGFR έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται από τα κολο-ορθικά καρκινώματα, σε ποσοστό από 34% ως και άνω του 80% των εξεταζόμενων περιπτώσεων, σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία [112-114]. Μάλιστα, η υπερέκφραση του EGFR σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου έχει φανεί να σχετίζεται με πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου κατά TNM και δυσμενέστερη πρόγνωση [120-122]. Σε αυτή τη βιολογική βάση, αναπτύχθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύοντα τον EGFR, αποσκοπώντας στην μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [115-117]. Τα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, είναι το χημειοθεραπευτικό cetuximab αντίσωμα και το ανασυνδυασμένο, ανθρώπινο αντίσωμα panitumumab, τάξης χημειοθεραπευτικό IgG1 και IgG2, αντίστοιχα [123-125].

1.8.3.5 Το κλινικό όφελος της χορήγησης αντι-EGFR θεραπείας- Σχετικοί βιοδείκτες

Τόσο το cetuximab όσο και το panitumumab, έχουν εγκριθεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medical Association, EMA) προς χορήγηση σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, σε ασθενείς αρνητικούς για μεταλλάξεις των ογκογονιδίων RAS (KRAS, NRAS) ως θεραπεία μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού [126,127].

Καρκινώματα του παχέος εντέρου που φέρουν μεταλλάξεις της KRAS (εξώνια 2,3,4) ή/και της NRAS (εξώνια 2,3,4) πρωτεΐνης δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αντι-EGFR αντισώματα [128-131]. Το πρωτο-ογκογονίδιο KRAS, είναι ενδοκυττάριος πρωτεΐνη που συνδέεται με την τριφωσφορική και διφωσφορική γουανοσίνη (GTP, guanosine triphosphate/ GDP, guanosine diphosphate). Όπως και η NRAS πρωτεΐνη, ανήκει στην οικογένεια των φωσφατασών της γουανοσίνης (GTPάση). Η KRAS δρα ως μοριακός διακόπτης αναλόγως της πρόσδεσης του GDP (ανενεργός κατάσταση) και πρόσδεσης του GTP (ενεργός κατάσταση). Η αλλαγή από την πρόσδεση GDP προς GTP μεσολαβείται από πρωτεΐνες όπως η son of sevenless (SOS) και η Ras guanyl nucleotide-releasing protein, ενώ η αντίστροφη διαδικασία από πρωτεΐνες που κινητοποιούν την υδρόλυση του GTP προς GDP, όπως η p120GAP (GTPase activating protein) και η neurofibromin (NF1) [132,133]. Τα επιπλέον ηλεκτρόνια του τριφωσφορικού μορίου GTP, ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια κινασών όπως η οδός RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma)/ MEK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase), καθώς και το μονοπάτι PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/ AKT (protein kinase)/ mTOR (mechanistic target of rapamycin). Στην ανενεργό μορφή, η πρόσδεση του GDP δεν επιτρέπει την κινητοποίηση των ενδοκυττάρων μονοπατιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [134].

Στη μεταλλαγμένη μορφή της, που εντοπίζεται σε 45% των κολο-ορθικών καρκινωμάτων [127], η πρωτεΐνη KRAS παραμένει συνεχώς σε ενεργό κατάσταση, κινητοποιώντας την κυτταρική αύξηση, ανεξαρτήτως της ενεργότητας του EGFR διαμεμβρανικού διμερούς. Επομένως, σε κυτταρικό επίπεδο, η αναστολή του EGFR από τα μονοκλωνικά αντισώματα cetuximab και panitumumab, δεν επηρεάζει τον KRAS/NRAS εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Με βάση τα ανωτέρω, η θεραπεία με cetuximab/panitumumab έχει θέση μόνο σε KRAS wild-type καρκινώματα του παχέος εντέρου [128-131].

Πράγματι, σε αναδρομικές και προοπτικές μελέτες χορήγησης τόσο του cetuximab όσο και του panitumumab σε ασθενείς με κολο-ορθικά καρκινώματα με μεταλλάξεις της KRAS πρωτεΐνης, διαπιστώθηκε μηδενικό ποσοστό αντικειμενικών ανταποκρίσεων, σε αντίθεση με τους ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις, των οποίων οι αντικειμενικές ανταποκρίσεις έφταναν το 40% [128-131]. Παράλληλα, τόσο το PFS όσο και το OS των ασθενών με RAS μεταλλάξεις υπό αγωγή με EGFR αναστολείς, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις [128-131].

Εξαίρεση αποτελεί η συγχορήγηση EGFR στόχευσης και στοχευτικού αναστολέα της μετάλλαξης KRAS G12C, η οποία δοκιμάζεται σε τρέχουσες κλινικές μελέτες. Χαρακτηριστικά, η δομή της KRAS πρωτεΐνης δεν επιτρέπει τη στόχευση της καθώς δε διαθέτει σημείο πρόσδεσης πιθανών αναστολέων. Ειδικά η μετάλλαξη G12C, εξασφαλίζει σημείο πρόσδεσης των αναστολέων sotorasib και adagrasib, λόγω της παρεμβλλόμενης κυστεΐνης που δρα ως αγκυροβόλιο, με αποτέλεσμα να αποτελεί μια στοχεύσιμη μορφή της μετάλλαξης. Η KRAS G12C μετάλλαξη εντοπίζεται σε 3% των κολο-ορθικών καρκινωμάτων [135].

Ανάλογο ρόλο αρνητικού προβλεπτικού δείκτη, για τη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκινώματος, ιδίως στην πρώτη γραμμή θεραπείας, παίζει και η μετάλλαξη της πρωτεΐνης BRAF V600E [136-138]. Η ενδοκυττάρια αυτή ογκοπρωτεΐνη που συμμετέχει φυσιολογικά ως ενδιάμεσος τελεστής του μονοπατιού των MAP κινασών, στη μεταλλαγμένη μορφή της παραμένει επίσης συνεχώς ενεργή, ανεξαρτήτως της EGFR φαρμακευτικής αναστολής, με αποτέλεσμα σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας των αντι-EGFR παραγόντων. Συνεπώς, η πιθανότητα ανταπόκρισης κολο-ορθικού καρκινώματος που φέρει BRAF V600E μετάλλαξη στη θεραπεία με cetuximab/panitumumab, είναι πολύ μικρή, εκτός της περίπτωσης συγχορήγησης BRAF αναστολέα, όπως επιβεβαιώνουν και τα δεδομένα κλινικών μελετών και μεταναλύσεων τυχαιοποιημένων μελετών [126-139]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα επιτυχημένης σύγχρονης EGFR και BRAF αναστολής αποτελεί η μελέτη BEACON, στην οποία συγχορήγηση του cetuximab με τον BRAF αναστολέα encorafenib, στη δεύτερη γραμμή θεραπείας κολο-ορθικού καρκινώματος, με BRAF V600E μετάλλαξη, απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα από την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία [140].

Σημαντικό κλινικό βιοδείκτη για την αποτελεσματικότητα των αντι-EGFR θεραπειών αποτελεί επίσης η εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας, αριστερά ή δεξιά της αριστερής κολικής καμπής. Φαίνεται ότι τα καρκινώματα που απαντώνται στο δεξιό κόλον δε φαίνεται να έχουν όφελος PFS και OS από τη θεραπεία με EGFR αναστολείς, αν και οι αντικειμενικές ανταποκρίσεις αυξάνονται με την EGFR αναστολή. Επομένως, η σύσταση από τις ευρωπαϊκές αλλά και αμερικανικές οδηγίες αντιμετώπισης του κολοορθικού καρκίνου, είναι η χορήγηση των αντισωμάτων cetuximab/panitumumab μόνο σε KRAS, NRAS BRAF wild type όγκους, εφόσον η πρωτοπαθής εστία εντοπίζεται στο αριστερό κόλον. Για τα καρκινώματα του δεξιού κόλου, η EGFR αναστολή χρησιμοποιείται για μεγιστοποίηση της αντικειμενικής ανταπόκρισης, εφόσον η μείωση του φορτίου της νόσου αποτελεί βασικό στόχο της θεραπευτικής προσέγγισης [114, 141-143].

Προσθήκη του cetuximab στην αγωγή πρώτης γραμμής ασθενών με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο έχει αξιολογηθεί από τις τυχαιοποιημένες μελέτες CRYSTAL και OPUS, και έχει φανεί να αυξάνει την συνολική επιβίωση, την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση, καθώς και να επιφέρει σημαντική συρρίκνωση των ηπατικών μεταστάσεων, ως την 8^η εβδομάδα θεραπείας [129, 135-137]. Στη μελέτη φάσης II OPUS, η προσθήκη του cetuximab στη χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής με το σχήμα FOLFOX, απέδωσε αύξηση των αντικειμενικών ανταποκρίσεων από 34% σε 57%, ενώ μείωσε κατά 43% την πιθανότητα προόδου νόσου (διάμεσο PFS 8.3 έναντι 7.2 μηνών, HR 0.567, $P = 0.0064$). Η αύξηση της συνολικής επιβίωσης σε αυτή τη μελέτη από τους 18.5 στους 22.8 μήνες, δεν ήταν στατιστικά σημαντική (HR 0.855, $P = 0.39$) [144]. Στη μελέτη CRYSTAL, η προσθήκη του cetuximab στην θεραπεία 1^{ης} γραμμής με FOLFIRI, απέδωσε αύξηση των αντικειμενικών ανταποκρίσεων από 43 σε 61% και του διαμέσου PFS από τους 9 στους 12 μήνες, με μείωση του κινδύνου προόδου νόσου κατά 32% (HR 0.679, $P = 0.0016$), στους KRAS, BRAF wild type ασθενείς. Η αύξηση της συνολικής επιβίωσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική 0.830 ($p = 0.0549$), ωστόσο η διάμεση συνολική επιβίωση παρατάθηκε από τους 21 στους 25 μήνες [145]. Ωστόσο, στην μετανάλυση των δύο μελετών, επιβεβαιώθηκε η αύξηση των αντικειμενικών ανταποκρίσεων (odds ratio 2.16, $p < 0.0001$) και του PFS (HR 0.66, $p < 0.001$) από την προσθήκη του cetuximab, αλλά διαπιστώθηκε και μείωση της πιθανότητας θανάτου σχεδόν κατά 20% (HR 0.81, $p = 0.0062$) [137]. Μάλιστα, σε μεταγενέστερη μετανάλυση φαίνεται ότι η πρώιμη μείωση του φορτίου της νόσου υπό θεραπεία, μεταφράζεται σε υψηλότερες επιβιώσεις για τους ασθενείς υπό cetuximab, σε σχέση με αυτούς που λαμβάνουν μόνο χημειοθεραπεία [146].

Το panitumumab συγχρηγήθηκε σε συνδυασμό με το σχήμα FOLFOX4 ως θεραπεία πρώτης γραμμής, στην τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III PRIME, και έδειξε παράταση του PFS κατά 1.6 μήνες, καθώς και μία μη στατιστικά σημαντική παράταση της συνολικής επιβίωσης κατά 4 μήνες, σε ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου, ενώ τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά για τους ασθενείς με KRAS μετάλλαξη [147]. Στο πενταετές follow-up της μελέτης, επιβεβαιώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου προόδου νόσου κατά 20% (HR 0.8, $P = 0.01$), και του κινδύνου θανάτου κατά 17% (HR 0.83, $P = 0.03$) [148]. Το panitumumab έχει επίσης δοκιμασθεί επιτυχώς σε συγχρηγήση με το σχήμα FOLFIRI [149], οδηγώντας 69% των KRAS wild type ολιγομεταστατικών ασθενών σε χειρουργική εκτομή της νόσου, με 59% αυτών να επιτυγχάνουν R0 εκτομή, χωρίς να υστερεί σε σχέση με το συνδυασμό FOLFOX/panitumumab.

Η προσθήκη του panitumumab στο σχήμα FOLFIRINOX αύξησε τις ανταποκρίσεις στη μελέτη VOLFI (87% έναντι 61%), όπως και το ποσοστό των μεταστασιεκτομών (από 12% σε 33%), ενώ παρατηρήθηκε τάση προς αύξηση και της συνολικής επιβίωσης [150]. Αντίστοιχα, η προσθήκη του cetuximab στο FOLFIRINOX μπορεί να αποδώσει ποσοστά συνολικής επιβίωσης 92% στον ένα χρόνο από την έναρξη της αγωγής, με αντίστοιχο PFS 56% [151]. Μάλιστα, ως νεοεπικουρική θεραπεία, ο συνδυασμός FOLFOXIRI/cetuximab έχει βρεθεί ανώτερος του FOLFOXIRI ως προς το ποσοστό των πλήρων αντικειμενικών ανταποκρίσεων (95.5% έναντι 76.5%, $p = .010$) και το ποσοστό επίτευξης κλινικής πλήρους εξάλειψης της νόσου (70% έναντι 41%) [152].

Το panitumumab έχει αποδειχθεί ως μη κατώτερο του cetuximab, από την τυχαιοποιημένη μελέτη ASPECCT, ως προς την επιβίωση των ασθενών, ενώ οι ανεπιθύμητες παρενέργειες grade 3-4 εμφανίστηκαν σε μικρότερη συχνότητα στην ομάδα ασθενών που λάμβανε panitumumab σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν cetuximab (<0.5% και 2% αντίστοιχα) [153]. Παρά την κλινική τους ισοδυναμία, θεραπεία με panitumumab σε ασθενείς με πρόοδο νόσου υπό cetuximab, δε συνίσταται, καθώς δεν έχει αποδείχθεί ωφέλιμη για τους ασθενείς [154].

Αξίζει να σημειωθεί, πως ενώ και τα δύο αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ως νεοεπικουρική θεραπεία στις μελέτες που αναφέρθηκαν ανωτέρω, δεν συνίσταται χορήγησή τους ως περιεγχειρητική αγωγή σε εξαρχής εξαίρεσιμη, ολιγομεταστατική νόσο [137]. Στην πρόσφατη ανασκόπηση των δεδομένων της τυχαιοποιημένης μελέτη φάσης III EPOC, η προσθήκη του cetuximab στην περιεγχειρητική χημειοθεραπεία ασθενών με ηπατικές μεταστάσεις, φάνηκε να σχετίζεται με μικρότερη διάμεση ελεύθερη προόδου νόσου και συνολική επιβίωση, και κρίθηκε ακατάλληλο για την περιεγχειρητική περίοδο [155].

1.8.4 Ανοσοθεραπεία

Τα τελευταία έτη η ανοσοθεραπεία έχει ενταχθεί στο πλαίσιο θεραπευτικής αντιμετώπισης του κολο-ορθικού καρκίνου.

Όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, τα κολο-ορθικά καρκινώματα που χαρακτηρίζονται από μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-High) ή/και ανεπάρκεια επιδιορθωτικών ενζύμων (MMR deficient), εκτός από υψηλό αριθμό μεταλλάξεων, παρουσιάζουν και αντίστοιχα μεγάλη ποικιλία νέο-αντιγόνων, μεταλλαγμένων μορφών πρωτεϊνών, οι οποίες, εκτίθενται στην επιφάνεια τους ή στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, κινητοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα [156-158]. Υπολογίζεται ότι η συγκέντρωση των νεοαντιγόνων στα καρκινικά κύτταρα με μικροδορυφορική αστάθεια είναι δεκαπλάσια ως πενήνταπλάσια αυτής στα καρκινικά κύτταρα MSS-stable [156-159]. Οι MSI-High/dMMR κολο-ορθικοί καρκίνοι, θεωρούνται πλέον ανοσογονικοί και επομένως ευαίσθητοι στην ανοσοθεραπεία. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση ανοσοκατασταλτικών μορίων, όπως PD-L1, CTLA-4, LAG-3, και IDO, τα οποία είναι στοχεύσιμα με μονοκλωνικά αντισώματα (για παράδειγμα CTLA-4/ipilimumab, LAG-3/Relatlimab) [156]. Επομένως, ο MSI-High κολο-ορθικός καρκίνος, διαθέτει το βιολογικό υπόβαθρο που προδιαθέτει στην ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. Πράγματι, έχει διαπιστωθεί αυξημένη συγκέντρωση T-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με MSI-high κολο-ορθικά καρκινώματα και αυξημένη ικανότητα παραγωγής IFN-γ από αυτά [156-158].

Φαίνεται ότι η ανοσοθεραπεία με στοχευτικά μονοκλωνικά αντισώματα, έχει θέση στη θεραπεία 1^{ης} γραμμής μεταστατικού, μικροδορυφορικά ασταθούς κολο-ορθικού καρκινώματος, που αποτελεί 4-5% των περιπτώσεων μεταστατικής νόσου [160]. Οι συνιστώμενοι παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής (ή και ως νεοεπικουρική σε ολιγομεταστατική νόσο) είναι: nivolumab (ανθρώπινο αντι-PD-1 IgG4 μονοκλωνικό αντίσωμα) με ή χωρίς το ipilimumab (ανθρώπινο anti-CTLA-4 IgG1 αντίσωμα), pembrolizumab (εξανθρωπισμένο αντι-PD-1 IgG4 αντίσωμα) και dostarlimab-gxly (εξανθρωπισμένο αντι-PD-1 IgG4 αντίσωμα) [161-164].

Τα αντι-PD-1 μονοκλωνικά αντισώματα, στοχεύουν τον παράγοντα PD-1 (Programmed Death receptor 1, αλλιώς γνωστός ως CD279) στην επιφάνεια των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, ο οποίος όταν συνδέεται με τον PD-L1 (Programmed Death receptor Ligand 1, αλλιώς γνωστός ως B7-H1) υποδοχέα της επιφάνειας των νεοπλασματικών κυττάρων οδηγεί σε καταστολή της κυτταροτοξικότητας, της έκκρισης κυτταροκινών και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων [165]. Ανάλογη είναι η λειτουργία του μορίου CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων, το οποίο ανταγωνίζεται τους συνδέτες B7 που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, δεσμεύοντας τους λόγω της υψηλής χημικής συγγένειας που έχουν με αυτούς. Με αυτόν τον τρόπο παρακωλύεται η αλληλεπίδραση των

υποδοχέων CD28 της επιφάνειας των T-λεμφοκυττάρων, με τους συνδέτες B7 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μειώνεται ένα σημαντικό συνεργικό σήμα για την ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου. Η λειτουργία του CTLA-4 προστατεύει από την ανάπτυξη αυτοανοσίας, ενώ η απενεργοποίησή του σε μοντέλα πειραματόζων έχει επιφέρει το θάνατο λόγω αυτοάνοσων συνδρόμων. Κατά την ανάπτυξη της νεοπλασίας, αποτελεί κατασταλτικό μηχανισμό της κυτταροτοξικής ανοσίας, τον οποίο εκμεταλλεύονται τα καρκινικά κύτταρα για να διαφύγουν της ανοσοεπιτήρησης [166,167] (Βλ. Εικ. 1.8.4.1)

Η χορήγηση του pembrolizumab στην πρώτη γραμμή θεραπείας του MSI-High κολο-ορθικού καρκίνου έχει αποδειχθεί ανώτερη της χημειοθεραπείας στη μελέτη KEYNOTE-177. Η ανοσοθεραπεία φάνηκε να καθυστερεί την πρόοδο της νόσου κατά 40% σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, σε σχέση με τη χημειοθεραπεία (διάμεσο PFS: 16.5 έναντι 8.2 μηνών, HR 0.60, P = 0.0002), ενώ στους 32 μήνες από την έναρξη της μελέτης σημειώθηκαν 56 θάνατοι ασθενών υπό ανοσοθεραπεία και 69 θάνατοι ασθενών υπό χημειοθεραπεία. Οι αντικειμενικές ανταποκρίσεις με το pembrolizumab αυξήθηκαν από 33 σε 44%, με 83% και 35% των ανταποκρινόμενων ασθενών να διατηρούν την ανταπόκρισή τους στα 2 χρόνια από την έναρξη της αγωγής. Η σοβαρή τοξικότητα της ανοσοθεραπείας ήταν μόλις 22% σε σχέση με 66% για τη χημειοθεραπεία. Η εντόπιση της νόσου αριστερά ή δεξιά και η παρουσία της BRAF μετάλλαξης δεν επηρέασαν το αποτέλεσμα. Ωστόσο, τα καρκινώματα με KRAS μετάλλαξη δε φάνηκαν να ευνοούνται από την ανοσοθεραπεία (HR 1.19, 95% CI 0.68-2.07) [168].

Ο συνδυασμός nivolumab με χαμηλή δόση ipilimumab (1mg/kg, για 4 κύκλους), έχει επίσης χορηγηθεί σε MSI-High κολο-ορθικό καρκίνο στη μελέτη φάσης II, checkmate-142. Αντικειμενική ανταπόκριση διαπιστώθηκε σε 69% των ασθενών, με έλεγχο της νόσου σε 84% αυτών, και πλήρη ανταπόκριση σε 13%. Η διάμεση διάρκεια ανταπόκρισης, το PFS και η συνολική επιβίωση ξεπέρασαν τα 2 έτη από την έναρξη της αγωγής. Η παρουσία KRAS/BRAF μετάλλαξης δεν μείωσε το όφελος των ασθενών, ενώ σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες παρατηρήθηκαν σε 22% του πληθυσμού της μελέτης [169, 170].

Το dostarlimab έχει δώσει αντικειμενικές ανταποκρίσεις ως 36% σε ασθενείς με MSI-High μεταστατικό, προθεραπευμένο καρκίνο του παχέος εντέρου, με διάμεση διάρκεια ανταπόκρισης άνω του 1 έτους, στη μελέτη GARNET [171].

Αν και δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες με τη χρήση της ανοσοθεραπείας στο νεοεπικουρικό setting, η θεραπεία 1^{ης} γραμμής ολιγομεταστατικής νόσου με ανοσοθεραπευτικούς παράγοντες μπορεί να οδηγήσει σε εξατομικευμένες περιπτώσεις σε χειρουργική εξαίρεση της νόσου.

Βιοδείκτες ανοσογονικότητας στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Τα τελευταία έτη, δεδομένης της αλματώδους ανάπτυξης ανοσοθεραπευτικών στρατηγικών, αναζητούνται εντατικά βιοδείκτες διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος στους περισσότερους συμπαγείς όγκους. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, έχουν διερευνηθεί σε σχέση με τις εφαρμόσιμες δυνητικά ανοσοθεραπείες, ποικίλοι βιοδείκτες ανοσογονικότητας, με άλλοτε άλλη ευαισθησία και ειδικότητα [172].

1.9.1 Μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability, MSI)

Όπως περιγράφηκε ανωτέρω, η ύπαρξη ελαττωματικών μηχανισμών επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων (Mismatch Repair deficiency) αποτυπώνεται σε επίπεδο DNA με την συσσώρευση μεταλλάξεων σε κανονικά σταθερά επαναλαμβανόμενα μοτίβα της γενετικής ακολουθίας του κυττάρου, που ονομάζονται μικροδορυφόροι.

Η ύπαρξη του χαρακτηριστικού αυτού διαπιστώνεται με τους ακόλουθους 3 τρόπους:

-RT-PCR: Η ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης, είναι ο κλασικός τρόπος ανεύρεσης της μικροδορυφορικής αστάθειας, και βασίζεται, αναλόγως της δοκιμασίας που χρησιμοποιείται, στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε 5 περιοχές μικροδορυφόρων, 2 μονονουκλεοτιδικές (BAT25 και BAT26) και 3 διονουκλεοτιδικές περιοχές (D5S346, D2S123, και D17S250) [173]. Εναλλακτικό πάνελ αποτελεί το NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26, όπου οι 3 πρώτες περιοχές είναι επίσης μονονουκλεοτιδικές [174,175]. Μπορεί να εφαρμοστεί τόσο στον ιστό όσο και στο περιφερικό αίμα, για την ανίχνευση σωματικών ή γενετικών/κληρονομούμενων μεταλλάξεων αντίστοιχα, ενώ η ευαισθησία και ειδικότητα της αναφέρονται στη βιβλιογραφία μεταξύ 95.6% και 100%, με θετική προβλεπτική αξία 100% ακόμα και για πάνελ των 3 μικροδορυφόρων [173-178]. Περιορισμός της μεθόδου, αποτελούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που, όπως έχει επισημανθεί στη σχετική βιβλιογραφία, ενδέχεται να ευθύνονται για την πρωτογενή αντίσταση στην ανοσοθεραπεία κολο-ορθικών καρκινωμάτων λανθασμένα διαγνωσθέντων ως MSI-high, που έχει βρεθεί να παρατηρείται ως και 1 στους 10 ασθενείς [179].

-Next Generation Sequencing: Η μέθοδος αποκωδικοποίησης του DNA, ενέχει το πλεονέκτημα ελέγχου πολλαπλών μεταλλάξεων περιοχών μικροδορυφόρων ταυτόχρονα, αυξάνοντας την ευαισθησία ανίχνευσης μικροδορυφορικής αστάθειας με σημαντική εξοικονόμηση βιοοπτικού υλικού [73,74, 180-183]. Η ευαισθησία των διάφορων μεθόδων NGS αναφέρεται σε 96 ως και 100%, ενώ καθίσταται δυνατός ο σύγχρονος έλεγχος για άλλες προγνωστικής ή προβλεπτικής αξίας μεταλλάξεις [73,74, 180-183]. Ακόμη, μπορεί να εντοπίσει μεταλλάξεις στα γονίδια mismatch repair ενζύμων, διακρίνοντας τις πραγματικές μεταλλάξεις από την επιγενετική αποσιώπηση τους, όπως για παράδειγμα από την αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου MLH1, που μπορεί να παρατηρείται από μεθυλίωση του υποκινητή του, η οποία αλληλοεπικαλύπτεται με την ύπαρξη μετάλλαξης BRAF V600E ως και σε 90% των περιπτώσεων [184, 185]. Δύναται να εφαρμοστεί σε ιστικό υλικό αλλά και στο περιφερικό αίμα.

-Ανοσοϊστοχημεία: Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 (και EPCAM), αποτελεί αξιόπιστο υποκατάστατο δείκτη μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς μη ανίχνευση 1 τουλάχιστον γονιδίου καθιστά τον όγκο MMR deficient, που ως και σε 100% των περιπτώσεων προκύπτει και MSI-High από το γενετικό έλεγχο [182,186,187]. Ωστόσο, συνίσταται να επαληθεύεται με ανίχνευση MSI στο γενετικό υλικό. Η έκφραση και των 4 πρωτεϊνών, καθιστά τον όγκο MMR proficient, και συνάδει με όγκο που δε φέρει μικροδορυφορική αστάθεια (MSS stable, ή και low), ως και σε 96.7% των περιπτώσεων [182,186,187]. Αναφέρεται δε πως σε άνω του 70% των περιπτώσεων μπορεί να συνυπάρχει απουσία έκφρασης των MLH1 και

PMS2, σε 21% απουσία έκφρασης των MSH2, MSH6, σε 6% απουσία μόνο του MSH6, και σε 1.5% είτε μεμονωμένη απουσία του PMS2 είτε έλλειψη και των 4 πρωτεϊνών ταυτόχρονα [187]. Υπάρχει ωστόσο, περίπτωση οι 4 πρωτεΐνες να ανιχνεύονται στον ιστό και να συνυπάρχει υποκείμενη υπερμεταλλακτικότητα του όγκου, λόγω έλλειψης άλλων επιδιορθωτικών μηχανισμών όπως μεταλλάξεις του γονιδίου της περιοχής εξωνουκλεάσης της πολυμεράσης E, POLE (polymerase E proofreading exonuclease-domain mutation) [188].

Η μικροδορυφορική αστάθεια, αποτελεί τον κυριότερο προβλεπτικό βιοδείκτη της ανοσοθεραπείας, ενώ, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί δείκτη πρόβλεψης του οφέλους από την επικουρική χημειοθεραπεία σε εξαιρεθέντα καρκινώματα του παχέος εντέρου χωρίς διηθημένους λεμφαδένες, καθώς στα MSI-High καρκινώματα δε φαίνεται αύξηση της επιβίωσης ή μείωση των υποτροπών από την επικουρική χημειοθεραπεία [189]. Ακόμη, αποτελεί θετικό προγνωστικό χαρακτηριστικό, ενώ, λόγω του υψηλού φορτίου μεταλλάξεων και νεοαντιγόνων με το οποίο συνδέεται, θεωρείται ότι προσδίδει στον όγκο μεγαλύτερη ανοσογονικότητα [190].

Η ανίχνευση της μικροδορυφορικής αστάθειας στον καρκίνο του παχέος εντέρου, έχει χρησιμοποιηθεί ως προβλεπτικός βιοδείκτης στις περισσότερες μελέτες της ανοσοθεραπείας στο συγκεκριμένο νεόπλασμα, και αποτελεί βασικό κριτήριο χορήγησής της στην πρώτη γραμμή θεραπείας, όπως φαίνεται και από τις κλινικές μελέτες στον πίνακα 1 [168-171, 191-193].

Αντίθετα, ο κολοορθικός καρκίνος χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, με επαρκείς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς δεν ανταποκρίνεται το ίδιο καλά στην ανοσοθεραπεία. Σε κλινικές μελέτες φάσης I και II, έχουν δοκιμασθεί ανοσοθεραπευτικοί παράγοντες σε συνδυασμό με στοχευτικές θεραπείες, με το PD-L1, και τα CD3 και CD8 λεμφοκύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, να διερευνώνται ως πιθανοί προβλεπτικοί βιοδείκτες. Ωστόσο, δεν υπάρχουν τεκμηριωμένοι βιοδείκτες ανοσογονικότητας στον pMMR/ MSS-stable/low καρκίνο του παχέος εντέρου (βλ. πίνακα 2, 194-200).

1.9.2 Έκφραση PD-L1 (Programmed Death Ligand 1)

Η αξιολόγηση του PD-L1 ως προβλεπτικού βιοδείκτη της ανοσογονικότητας πολλών συμπαγών όγκων, χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στην κλινική πρακτική όσο και στις κλινικές μελέτες [201]. Τόσο ο PD-L1 (αλλιώς B7-H1/CD274) όσο και ο PD-L2 (αλλιώς B7-DC), είναι συνδέτες του υποδοχέα PD-1, με τον τελευταίο να εντοπίζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων. Η σύνδεση του PD-L1 με τον υποδοχέα PD-1, αναστέλλει την κλωνική έκπτυξη των Τ-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα Τ-λεμφοκύτταρα, λειτουργώντας ως προστασία έναντι αυτοάνοσων επιθέσεων. Το μόριο PD-L1 μπορεί ωστόσο να υπερεκφράζεται και στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων, οδηγώντας στην τοπική ανοσοκαταστολή και ευνοώντας την ανάπτυξη του καρκίνου. Επομένως, η παρουσία του έχει διερευνηθεί εκτεταμένα ως βιοδείκτης πιθανής ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία, με μονοκλωνικά αντισώματα που προσδένονται τόσο στο PD-1 (pembrolizumab, nivolumab, dostarlimab) όσο και στο PD-L1 (atezolizumab, durvalumab) [204].

Αξιολογείται με ανοσοϊστοχημική χρώση στην ιστική βιοψία, και μπορεί να αξιολογηθεί και ποσοτικοποιηθεί η έκφρασή του τόσο στα κύτταρα του όγκου όσο και στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου [201-202]. Έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και μειωμένη επιβίωση των ασθενών, καθώς και

λεμφαγγειακή διήθηση και πιο προχωρημένο στάδιο κατά τη διάγνωση [205]. Επίσης, υψηλή έκφραση του PD-L1 έχει βρεθεί να αλληλοεπικαλύπτεται με MSI-High κολο-ορθικά καρκινώματα [206].

Η έκφραση του PD-L1 έχει ανευρεθεί αυξημένη στις μεταστατικές εστίες κολο-ορθικού καρκίνου, σε σχέση με τη πρωτοπαθή εστία (82% έναντι 41%) [207]. Σε μετανάλυση 10 μελετών, διαπιστώθηκε συσχέτιση της υψηλότερης έκφρασης του PD-L1 με καρκινώματα ορμώμενα από το δεξιό κόλον και με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης [208].

Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι από μελέτη ανοσοϊστοχημικής και γενωμικής ανάλυσης σε ιστό πάνω από 250 κολο-ορθικών καρκινωμάτων [209], διαπιστώθηκε ότι τόσο υψηλή έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα, όσο και υψηλή έκφραση του PD-1 στα TILs του νεοπλάσματος, συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με καλύτερη συνολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση, ιδίως στους ασθενείς με MMR proficient καρκινώματα, ανεξάρτητα από άλλους κλινικούς και παθολογοανατομικούς παράγοντες. Αντίθετα, δε διαπιστώθηκε αντίστοιχη διαφορά στους ασθενείς με MMR deficient καρκινώματα.

Σε μελέτη του 2013, ανευρίσκεται υψηλή έκφραση του PD-L1 σε 37% των pMMR όγκων και σε 29% των dMMR όγκων. Χαρακτηριστικά, στους pMMR όγκους αυξημένη έκφραση του PD-L1 φάνηκε να σχετίζεται με αυξημένη διήθηση του όγκου από CD8⁺ λεμφοκύτταρα, αλλά και αυξημένη παραγωγή ιντερφερόνης γ [210].

Στη μελέτη KEYNOTE-028 [194], χορηγήθηκε ο αντι-PD-1 παράγοντας pembrolizumab σε ασθενείς με PD-L1 θετικούς όγκους, με έκφραση του PD-L1 στην κυτταρική μεμβράνη εμπύρηνων νεοπλασματικών και φλεγμονωδών κυττάρων στη βιοψία του όγκου. Ωστόσο, η μοναδική αντικειμενική ανταπόκριση που σημειώθηκε στη μελέτη αυτή, ήταν σε ασθενή με MSI-High καρκίνωμα.

Η χρήση της έκφρασης του PD-L1 ως προβλεπτικού δείκτη είναι αρκετά περιορισμένη και δε συνίσταται από τις διεθνείς οδηγίες.

1.9.3 Tumor Mutational Burden, TMB (φορτίο μεταλλάξεων)

Το φορτίο μεταλλάξεων που φέρει το νεόπλασμα μετράται σε μεταλλάξεις ανά μεγαβάση γενετικού υλικού (mutations per Megabase) και δύναται να προσδιοριστεί μέσω NGS, τόσο στο βιοπτικό υλικό όσο και στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA του περιφερικού αίματος [211-214]. Αξιολογείται συννηθέστερα με targeted sequencing, ωστόσο δυνατή είναι η εφαρμογή whole exome sequencing (WES), whole-genome sequencing (WGS) και RNA sequencing, χωρίς να υπάρχει δεδομένη πρότυπη μέθοδος σε όλα τα εργαστήρια ανά τον κόσμο [214].

Υψηλό TMB θεωρείται ενδεικτικό υψηλότερης ανοσογονικότητας του όγκου, καθώς συνδέεται με μεγαλύτερη ποικιλία νεοαντιγόνων, που καθιστούν το νεόπλασμα πιο εύκολα ορατό στο ανοσοποιητικό σύστημα [212]. Αν και έχει σχετιστεί με καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία σε ποικίλους συμπαγείς όγκους, όπως του πνεύμονα, του ουροθηλίου και του δέρματος, τα σχετικά ευρήματα των κλινικών μελετών για την προβλεπτική του ισχύ δεν είναι ομοιογενή [214].

Στην κλινική πράξη, συνίσταται να αξιολογείται το TMB σε συμπαγείς όγκους χωρίς διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές, προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανό όφελος από χορήγηση ανοσοθεραπείας [215].

Υψηλό TMB (TMB-High) θεωρείται από 10 μεταλλάξεις ανά μεγαβάση γενετικού υλικού, βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης φάσης II, KEYNOTE-158, στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με ποικίλους, προθεραπευμένους συμπαγείς όγκους [216]. Στους ασθενείς με TMB-H η χορήγηση pembrolizumab επέφερε ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης 29%, ενώ σε ασθενείς με χαμηλό TMB οι ανταποκρίσεις ήταν μόλις 6%. Ωστόσο, κανένας από τους 796 ασθενείς της μελέτης δεν είχε κολο-ορθικό καρκίνωμα [216].

Στην μελέτη basket TAPUR [217] συμμετείχαν 27 ασθενείς με προχωρημένο, TMB-H κολο-ορθικό καρκίνωμα. Σημειώθηκε 1 αντικειμενική ανταπόκριση και 7 ασθενείς με σταθερότητα νόσου, στις 16 εβδομάδες χορήγησης pembrolizumab (ORR 4%, DCR 28%).

Συνολικά, το TMB αξιολογείται ως προβλεπτικός δείκτης της ανοσοθεραπείας και στον κολο-ορθικό καρκίνο χωρίς άλλες θεραπευτικές επιλογές, κατά προτίμηση στο πλαίσιο κλινικής μελέτης.

1.9.4 Μετάλλαξη της πολυμεράσης E (Polymerase E, POLE)

Η πολυμεράση E, διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA κατά τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, καθώς συμμετέχει στην έναρξη και στην επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου [218, 219]. Έχει πολλαπλές λειτουργικές υπομονάδες, όπως η υπομονάδα με τη λειτουργία επιδιορθωτικής εξωνουκλεάσης, υπεύθυνη για την αναγνώριση λανθασμένα τοποθετημένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων κατά τη σύνθεση του DNA, μεταλλάξεις της οποίας εντοπίζονται σε ποικίλους συμπαγείς όγκους [219].

Οι συνηθέστερα εντοπιζόμενες μεταλλάξεις της POLE είναι οι P286R, V411L, και S459F, και φαίνεται να οδηγούν σε έναν υπέρμεταλλαγμένο (ultramutated) φαινότυπο κολο-ορθικού καρκινώματος, με ποικιλία νεοαντιγόνων, που θα μπορούσαν να τον καθιστούν πλέον ορατό στο ανοσοποιητικό σύστημα και επομένως ευαίσθητο στην ανοσοθεραπεία [220-222]. Κατά ανάλογο τρόπο, μεταλλάξεις της πολυμεράσης δ (POLD1), επίσης οδηγούν σε υπερμεταλλαγμένο φαινότυπο και μπορούν σε ένα μικρό ποσοστό να συνυπάρχουν με POLE μεταλλάξεις [223].

Φαίνεται πως οι μεταλλάξεις POLE με οδηγό ρόλο στον κολο-ορθικό καρκίνο παρουσιάζουν ιδιαίτερη ετερογένεια. Οδηγός POLE μετάλλαξη, μπορεί να εντοπίζεται σε 1% ως και 2.6% των εξεταζόμενων περιπτώσεων, σύμφωνα με τις σχετικές μελέτες [220]. Σε πρόσφατη γενωμική ανάλυση 47.000 ασθενών με ποικίλα κακοήγη νεοπλάσματα [223], διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις POLE ή/και POLD1 σε 197 από τους 2.674 ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο (7.6% των περιπτώσεων), με τους περισσότερους ασθενείς να φέρουν POLE μετάλλαξη και μειοψηφία αυτών να φέρει αμφότερες τις μεταλλάξεις. Σε ανάλυση επιβίωσης των ασθενών, η διάμεση συνολική επιβίωση των ασθενών με συμπαγείς όγκους θετικών για μία από τις δύο μεταλλάξεις ήταν σχεδόν διπλάσια αυτής των ασθενών χωρίς μετάλλαξη (34 έναντι 18 μηνών). Αν και η ύπαρξη POLE/POLD1 μετάλλαξης και μικροδορυφορικής αστάθειας δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενα χαρακτηριστικά, το όφελος της επιβίωσης από την POLE/POLD1 μετάλλαξη παραμένει στην πολυπαραγοντική ανάλυση ανεξάρτητο από τη μικροδορυφορική αστάθεια [223].

Η ύπαρξη οδηγού POLE μετάλλαξης, οδηγεί σε αυξημένο φορτίο μεταλλάξεων με μέσο όρο TMB από 203.13 ως και 217.98 mut/Mb [220]. Η πλειοψηφία των ασθενών με POLE μετάλλαξη (70%) διαγιγνώσκεται σε ηλικία μικρότερη των 55 ετών, σε στάδιο 0 ως II ενώ 70% των ασθενών είναι άρρενες [220, 224]. POLE μεταλλαγμένα καρκινώματα αναπτύσσονται τόσο στο δεξί όσο και στο αριστερό κόλον, με 64% των καρκινωμάτων αυτών να εντοπίζεται δεξιά σε μη-Ασιατικούς πληθυσμούς, και αριστερά σε 68.4% των ασθενών Ασιατικής καταγωγής [220, 224].

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι, σε mismatch repair proficient κολο-ορθικά καρκινώματα, η ύπαρξη POLE μετάλλαξης σχετίζεται με αυξημένη διήθηση από κυτταροτοξικά CD8+ T λεμφοκύτταρα, έκφραση δεικτών κυτταροτοξικότητας και παραγωγή κυτταροκινών, κατά παρόμοιο πρότυπο με τα MMR deficient καρκινώματα [224,225], ενώ η χαμηλότερη πιθανότητα υποτροπής νόσου που χαρακτηρίζει τους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια, παρατηρείται επίσης στον POLE μεταλλαγμένο κολο-ορθικό καρκίνο [224]. Παράλληλα, αυξημένη έκφραση των δεικτών PD-1 και PD-L1, παρατηρείται σε ασθενείς με POLE μεταλλάξεις και MMR proficient καρκίνωμα σε σχέση με ασθενείς χωρίς POLE μετάλλαξη με μη υπερμεταλλαγμένο φαινότυπο, υποδηλώνοντας μια σαφή σχέση με κινητοποίηση του ανοσοποιητικού στην περιοχή του όγκου [225].

Συνολικά, οι μεταλλάξεις της POLE, αν και εντοπίζονται σε μικρό μέρος των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνωμα, ενδέχεται να αποτελέσουν σημαντικό βιοδείκτη, ιδίως για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας σε καρκινώματα χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια. Προς το παρόν δεν αποτελούν ωστόσο, μέρος της καθημερινής κλινικής πρακτικής.

1.10 Επιπρόσθετο σχόλιο για την επικουρική χημειοθεραπεία στον πρώιμο κολο-ορθικό καρκίνο

Στην επικουρική χημειοθεραπεία του πρώιμου, κολο-ορθικού καρκινώματος, χρησιμοποιείται κυρίως η χημειοθεραπεία, με βάση την 5-φθοριοουρακίλη ή το από του στόματος προφάρμακο της, η καπεσιταβίνη, και ειδικά σε ασθενείς υψηλού κινδύνου υποτροπής, προστίθεται και η οξαλιπλατίνη[142,226-228].

Σε ασθενείς με εξαιρεθέντα καρκινώματα σταδίου I (pT1, T2, N0, M0, βλ. ενότητα), όπως και καρκινώματα σταδίου II (pT3, T4, N0, M0) που φέρουν μικροδορυφορική αστάθεια (MMR deficient, MSI-High), δεν χορηγείται επικουρική χημειοθεραπεία. Ειδικά στη δεύτερη περίπτωση, έχει φανεί ότι η προσθήκη επικουρικής χημειοθεραπείας, δεν προάγει την επιβίωση των ασθενών με καρκινώματα σταδίου II, εφόσον έχουν το χαρακτηριστικό της μικροδορυφορικής αστάθειας, λόγω καλής πρόγνωσης[142,226-228].

Σε ασθενείς με καρκινώματα σταδίου II, χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια (MMR proficient, MSS-stable), μπορεί να χορηγηθεί επικουρική χημειοθεραπεία με την 5-φθοριοουρακίλη/καπεσιταβίνη, ιδίως αν συνηγορούν τα επιμέρους κλινικά-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του νεοπλάσματος, τα οποία περιλαμβάνουν: στάδιο T4, απόφραξη του εντερικού αυλού, ή ρήξη εντερικού τοιχώματος, παρουσία λεμφαγγειακής ή περινευριδιακής διήθησης, πτωχή διαφοροποίηση, εξαίρεση λιγότερων από 12 λεμφαδένων κατά την κολεκτομή[142,226-228].

Σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες, σταδίου III, χορηγείται πάντα επικουρική χημειοθεραπεία, η οποία συνίσταται σε 4-8 κύκλους θεραπείας με καπεσιταβίνη-οξαλιπλατίνη ανά 3 εβδομάδες (σχήμα CAPEOX) ή σε 6-12

κύκλους σχήματος FOLFOX ανά 2 εβδομάδες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης IDEA, φαίνεται ότι για ασθενείς με καρκινώματα pT3, N1 (ως 3 θετικούς λεμφαδένες), μπορεί να δοθεί θεραπεία για 4 έναντι 8 κύκλων CAPEOX, ενώ για ασθενείς με pT4 ή και N2 νόσο, η θεραπεία κατά προτίμηση διαρκεί για 6 μήνες (8 κύκλοι CAPEOX). Όσον αφορά τη θεραπεία με σχήμα FOLFOX, έχει καλύτερο αποτέλεσμα ανεξαρτήτως σταδίου νόσου, όταν διαρκεί για 6 μήνες έναντι 3, δηλαδή οφείλει ιδανικά να δίνεται για 12 κύκλους [142,226-228].

Όσον αφορά ειδικά τη θεραπεία του καρκίνου του ορθού, η νεοεπικουρική θεραπεία με βάση και πάλι το σχήμα CAPEOX ή FOLFOX συνίσταται να δίνεται σε νόσο T3, 4 κλινικά, όπως και σε ανεύρεση θετικών περιοχικών λεμφαδένων. Η θεραπεία συμπληρώνεται με σύγχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία με βάση την 5-φθοριοουρακίλη/καπεσιταβίνη, και δύναται να δοθεί σε εξ ολοκλήρου προεγχειρητικά ή περιεγχειρητικά [229-230]. Η χορήγηση της ακτινοβολίας είναι ιδιαίτερα σημαντική για την πρόληψη της τοπικής υποτροπής, που δύναται να οδηγήσει σε απόφραξη της γαστρεντερικής ή ουρογεννητικής οδού, ενώ η συστηματική χημειοθεραπεία αποτρέπει την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων.

1.11 Συμπεράσματα

Ο κολο-ορθικός καρκίνος, δεν θεωρείται κατεχοχόν ανοσογονικό νεόπλασμα, με την εξαίρεση των MSI-High/dMMR καρκινωμάτων, τα οποία αποτελούν το 15% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου και μόλις το 5% των περιπτώσεων μεταστατικής νόσου. Ενώ το χαρακτηριστικό της μικροδορυφορικής αστάθειας και του υπερμεταλλαγμένου φαινοτύπου προσδίδει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανοσοθεραπεία, δεν υπάρχουν βιοδείκτες για την πρόβλεψη του αποτελέσματος χορήγησης της ανοσοθεραπείας στον MMR proficient καρκίνο, που αποτελεί και την πλειοψηφία των περιπτώσεων. Στη συνέχεια, θα σχολιαστούν έτεροι πιθανοί δείκτες ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, με επίκεντρο τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο (βλ. κάτωθι).

2. Ανοσογονικός κυτταρικός Θάνατος (Immunogenic Cell Death-ICD)

2.1 Ορισμός

Με τον όρο ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος (Immunogenic Cell Death-ICD), περιγράφεται το φαινόμενο κατά το οποίο καρκινικά κύτταρα κατά τη διαδικασία απόπτωσης, υπό την επίδραση ορισμένων αντινεοπλασματικών φαρμακευτικών παραγόντων, εκφράζουν μια συγκεκριμένη χρωροχρονική αλληλουχία μοριακών προτύπων, τα οποία δρουν ως μη ειδικό ενεργοποιητικό ερέθισμα προς τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [218,219]. Τα ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα και ιστικά μακροφάγα, επιτελούν φαγοκυττάρωση καρκινικών κυττάρων και παρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων, με αποτέλεσμα την παραγωγή κλώνων Τ λεμφοκυττάρων, εξειδικευμένων στην αναγνώριση των νεοπλασματικών κυττάρων, με ενισχυμένη κυτταροτοξική δραστηριότητα [231-235].

2.2 Κύρια μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο (Damage Associated Molecular Patterns-DAMPs)

Τα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο (ICD), ονομάζονται μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την καταστροφή (Damage Associated Molecular Patterns-DAMPs). Τα τρία κύρια DAMPs των οποίων η ανίχνευση θεωρείται ο χρυσός κανόνας (gold standard) για την εξέταση της ικανότητας των θεραπευτικών παραγόντων να επάγουν ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, περιλαμβάνουν [231-235]: (Βλ. Εικ.2.2.1)

2.2.1 Έκθεση καλρετικιουλίνης στην εξωκυττάρια επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Η καλρετικιουλίνη, είναι μια συνδεδεμένη με ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, η οποία μετέχει στην εποπτεία της τριτοταγούς δομής και αναδίπλωσης των νεόδητων πρωτεϊνών προς έξοδο από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η καλρετικιουλίνη και άλλες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου, δεν επιτρέπουν την έκκριση των πρωτεϊνών με λανθασμένη τριτοταγή δομή, μέσω της συσκευής Golgi προς τα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, και συνεπικουρούν στην επιστροφή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την τελική καταστροφή τους [235,236]. (Βλ. Εικ. 2.2.1).

Η καλρετικιουλίνη συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από υψηλή συνάφεια προς τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την έκφραση των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας Ι (Major histocompatibility complex Ι- MHC Ι), το οποίο λειτουργεί σαν βασικός τελεστής της εξωκυττάριας παρουσίασης κυτταρικών πεπτιδικών αντιγόνων [236, 237]. Φαίνεται μάλιστα πως η καλρετικιουλίνη συνοδεύει πρωτεΐνες MHC Ι, οι οποίες δε συνδέονται με πεπτιδικά αντιγόνα με υψηλή συγγένεια, εντός κυστιδίων κατευθυνόμενων προς τη συσκευή Golgi, και συντελεί στην επάνοδό τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, προς ανακύκλωση και επίτευξη βελτιωμένης σύνδεσής τους με ενδοκυτταρικά πεπτιδικά αντιγόνα[238]. Κατά τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο μεταφέρεται μέσω κυστιδίων και διαμέσου της συσκευής Golgi, στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης[237,238].

Όταν εκτίθεται στην εξωκυττάρια επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η καλρετικουλίνη λειτουργεί σαν μεσολαβητής της φαγοκυττάρωσης, καθώς προσδένεται στον υποδοχέα CD91, γνωστό και ως LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1), της επιφάνειας των δενδριτικών κυττάρων. Η πρόσδεση της καλρετικουλίνης στον LRP1/CD91, ενισχύει τη σύνδεση του φαγοκυττάρου με το κύτταρο στόχο, ευοδώνοντας παράλληλα την ωρίμανση των φαγοκυττάρων [239]. Με βάση τα ανωτέρω, διαπιστώνεται ο ρόλος της κατά τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο.

2.2.2 Εξωκυττάρια απελευθέρωση ATP

Η τριφωσφορική αδενοσίνη αποτελεί το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, συμμετέχοντας με την παραγωγή και τη διάσπασή της στις περισσότερες ενδοκυτταρικές λειτουργίες [240]. Φαίνεται να απελευθερώνεται από το κύτταρο κατά τον ICD [231-235], και θεωρείται να λειτουργεί ως σηματοδότης προς τα περιφερικά μονοκύτταρα, τα οποία ωριμάζουν σε δενδριτικά κύτταρα με φαγοκυτταρική δραστηριότητα [235]. Συγκεκριμένα, το ATP, μεσολαβεί την ενεργοποίηση των πουρινεργικών υποδοχέων P2X7 στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την έκκριση σημαντικών κυτταροκινών, που μετέχουν στην αντιγονοπαρουσίαση και στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων [241,242]. (Βλ. Εικ. 2.2.2)

2.2.3 Εξωκυττάρια απελευθέρωση πρωτεΐνης HMGB1 (High Mobility Box Group 1)

Η πρωτεΐνη HMGB1, αποτελεί μία από τις πρωτεΐνες που απαντώνται στον πυρήνα του κυττάρου, και αλληλεπιδρούν στενά με τη χρωματίνη και τις ιστόνες, μετέχοντας στη ρύθμιση της έκφρασης της πυρηνικής χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA, καθώς και στη τη διατήρηση των τελομερών και της σταθερότητας του γονιδιώματος [243]. Σε εξωπυρηνική θέση, η πρωτεΐνη HMGB1, συνδέεται με ποικίλους υποδοχείς όπως οι Toll-like receptors (TLRs) και εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αυτοφαγίας, ενώ φαίνεται να επηρεάζει το μεταστατικό δυναμικό και την αγγειογένεση στα καρκινικά κύτταρα [243]. Έχει ανευρεθεί δε υπερέκφραση της σε αρκετούς τύπους νεοπλασμάτων, ιδιαίτερα του πεπτικού συστήματος [243]. (Βλ. Εικ. 2.2.3).

Η πρωτεΐνη HMGB1 έχει αναγνωρισθεί επίσης ως κυτταροκίνη και ως μεσολαβητής φλεγμονώδους αντίδρασης, όταν απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απόπτωσης, της κυτταρικής νέκρωσης ή της ιστικής φλεγμονής, ακόμα και καλοήθους αρχής [244,245]. Φαίνεται να είναι ένα από τα τρία βασικά μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ICD, και είναι εύκολα ανιχνεύσιμο με μέθοδο ELISA [244-248].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HMGB1 αλληλεπιδρά επίσης με τον υποδοχέα TLR4 (Toll-like Receptor 4), που εντοπίζεται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή, διευκολύνει την παρουσίαση των αντιγόνων προς τα Τ λεμφοκύτταρα, παρεμποδίζοντας την ενδοκυττάρια σύντηξη του φαγοσώματος με λυσόσωμα που οδηγεί στην αποδόμηση των φαγοκυτταροθένρων αντιγόνων, με αποτέλεσμα την πληρέστερη έκφραση των τελευταίων στην κυτταρική επιφάνεια [247,248].

2.3 Επιπρόσθετα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ICD

Επιπλέον μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ICD και εξετάζονται στη βιβλιογραφία κατά την προσπάθεια ανίχνευσης των επαγωγών του περιλαμβάνουν:

2.3.1 Φωσφορυλίωση του eIF2α (eukaryotic translation initiation factor 2α, ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης μετάφρασης 2α)

Ο παράγοντας eIF2α είναι μία από τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, η οποία συνδέεται με τα μεταφορικά tRNA, και το ριβόσωμα, και εμπλέκεται τόσο στην έναρξη στη μετάφραση, ενώ, στη φωσφορυλιωμένη της μορφή, ανακόπτει την μετάφραση των πρωτεϊνών με λανθασμένη δομή. Συγκεκριμένα, κατά την ανίχνευση πρωτεϊνών με ελαττωματική δομή στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, ενεργοποιείται η φωσφοκινάση του eIF2α, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, που με τη σειρά της προκαλεί διακοπή της μεταφραστικής διαδικασίας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου[249].

Η φωσφορυλίωση του eIF2α, εκτός από τον πρωτεύοντα ρόλο της στον έλεγχο της δομής των πρωτεϊνών, και στην αντίδραση στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, φαίνεται να προηγείται της μετατόπισης της καλρετικουλίνης στην κυτταρική επιφάνεια, κατά την επέλευση του ICD, γεγονός που υποστηρίζει τη συσχέτισή της με τον ICD. Η ανίχνευσή της φωσφορυλιωμένης της μορφής του eIF2α έχει χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία σαν μοριακή ένδειξη του ICD. Μολαταύτα, δεν συμπεριλαμβάνεται στα αναγνωρισμένα μοριακά κριτήρια, για την ανίχνευση/απόδειξη επέλευσης ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, καθώς δεν έχει αποδειχθεί ανεξάρτητη της καλρετικουλίνης συσχέτισή της με το φαινόμενο[240-232,245].

2.3.2 Έκθεση της πρωτεΐνης HSP70 (Heat shock protein 70) στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης

Η πρωτεΐνη HSP70, είναι μια από τις καλώς διατηρημένες πρωτεΐνες με σημαντικό ρόλο στην οικονομία του κυττάρου (housekeeping protein), που φυσιολογικά απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μετέχοντας στην διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών [250]. Η πρωτεΐνη HSP70 εκτίθεται στην εξωκυττάρια επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, και έχει βρεθεί να ενισχύει τη σύνδεση των νεοαντιγόνων με τις πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex (MHC) class I), διευκολύνοντας την T λεμφοκυτταρική ανταπόκριση [251].

2.3.3 Έκθεση του υποδοχέα LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1 or CD91) στην κυτταρική επιφάνεια

Ο υποδοχέας LRP1, απαντάται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, και αποτελεί το σημείο πρόσδεσης της καλρετικουλίνης, που κινητοποιεί τη φαγοκυττάρωση[252]. Φαίνεται ότι εκτίθεται και από τα αποπτωτικά κύτταρα κατά τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, και ότι χρησιμεύει σαν σημείο πρόσδεσης της καλρετικουλίνης, ώστε να εκτεθεί η δεύτερη στην κυτταρική επιφάνεια. Πράγματι, αποσιωπήση της έκφρασης του LRP1 σε καρκινικά κύτταρα in vitro έχει βρεθεί να οδηγεί σε περιορισμό της έκθεσης της καλρετικουλίνης στην κυτταρική επιφάνεια, αλλά και σε μείωση της ανοσογονικότητας του κυτταρικού θανάτου[253].

2.3.4 Έκθεση του TLR4 (Toll-like receptor 4) στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων

Ο TLR4, είναι ένας υποδοχέας επιφάνειας των δενδριτικών κυττάρων, ο οποίος μεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρώτων και των κυττάρων-στόχων. Έχει βρεθεί να διευκολύνει τη διασύνδεση μεταξύ φαγοκυττάρου

και καρκινικών κυττάρων, καθώς και να ευοδώνει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, μέσω της αύξησης της έκφρασης των υποδοχέων CD80 και CD86[254].

2.4 In vivo screening για επαγωγείς ICD-Μέθοδοι εμβολιασμού

Η καθιερωμένη μέθοδος εκλογής για screening φαρμακευτικών ουσιών ως επαγωγείς του ICD, αφορά σε δοκιμασίες εμβολιασμού μοντέλων ανοσοεπαρκών και ανοσοκατεσταλμένων ποντικών[232,234]. (Βλ. Εικ. 2.4.1, 2.4.2).

Συγκεκριμένα, η εξεταζόμενη ουσία προστίθεται σε κυτταροκαλλιέργειες καρκινικών κυττάρων in vitro, προκαλώντας το θάνατό τους. Στη συνέχεια, εκχύλισμα της καλλιέργειας με νεκρά κύτταρα, χορηγείται σε ανοσοεπαρκή, υγιή ποντίκια, με υποδόρια ένεση. Ως ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιούνται πειραματόζωα στα οποία χορηγούνται καρκινικά κύτταρα της ίδιας σειράς, που θανατώνονται in vitro χωρίς έκθεση στην εξεταζόμενη ουσία. Κατόπιν, ζώντα καρκινικά κύτταρα της ίδιας σειράς που δεν έχουν εκτεθεί στην υπό εξέταση ουσία, ενύονται υποδορώς και στις δύο ομάδες πειραματοζώων, και παρατηρείται η ανάπτυξη νεοπλασίας. Αν παρατηρηθεί σημαντικός περιορισμός στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου, στα πειραματόζωα που εμβολιάστηκαν με κύτταρα εκτεθειμένα στην υπό εξέταση ουσία, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αυτό θεωρείται ως ένδειξη ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού έναντι των καρκινικών κυττάρων, μέσω ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, και συνηγορεί υπέρ της ιδιότητας της εξεταζόμενης ουσίας να επάγει ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο[232].

Έτερη μέθοδος, ενέχει τη χρήση μη ανοσοεπαρκών ποντικών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται 4 ομάδες πειραματοζώων: Α) ανοσοϊκανά ποντίκια, τα οποία λαμβάνουν εμβόλιο με καρκινικά κύτταρα που θανατώθηκαν in vitro υπό την επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας Β) ανοσοϊκανά ποντίκια, τα οποία λαμβάνουν εμβόλιο με καρκινικά κύτταρα που θανατώθηκαν in vitro χωρίς να εκτεθούν στην εξεταζόμενη ουσία Γ) ανοσοανεπαρκή ποντίκια τα οποία λαμβάνουν εμβόλιο με καρκινικά κύτταρα που θανατώθηκαν in vitro υπό την επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας και Δ) Ανοσοανεπαρκή ποντίκια τα οποία λαμβάνουν εμβόλιο με καρκινικά κύτταρα που θανατώθηκαν in vitro χωρίς να εκτεθούν στην εξεταζόμενη ουσία. Αν η υπό εξέταση ουσία δύναται να επάγει ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, όπως και στην ανωτέρω περιγραφείσα πειραματική διάταξη, τα ποντίκια της ομάδας Α, θα καθυστερήσουν σημαντικά να αναπτύξουν κακοήθεις όγκους. Ωστόσο, δε θα παρατηρηθεί διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης όγκων μεταξύ των δύο ομάδων ανοσοανεπαρκών πειραματοζώων Γ και Δ, υποδηλώνοντας έτσι ότι η προστατευτική δράση του εμβολίου νεκρών καρκινικών κυττάρων, μετά από έκθεσή τους στον επαγωγέα ICD, μεσολαβείται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή[232].

Ωστόσο, οι ανωτέρω μέθοδοι προϋποθέτουν μεγάλο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθούν, απαιτούν συγγενικά μοντέλα όγκων τα οποία δεν είναι πάντα διαθέσιμα και επιφέρουν υψηλό οικονομικό κόστος. Παράλληλα, δεν ενδείκνυνται για μαζικό screening πολλών ουσιών, όντας έτσι χαμηλής παραγωγικότητας[232]. Επομένως, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης μοριακών δεικτών, ανιχνεύσιμων in vitro και in vivo, που θα χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα κριτήρια για εξέταση ουσιών ως επαγωγέων του ICD, εξετάζοντας ιδανικά ικανό αριθμό ουσιών ανά πειραματική διάταξη[232, 234].

Η ανίχνευση των DAMPs, (καλρετικυουλίνη σε κυτταρική επιφάνεια, εξωκυττάρια έκκριση ATP και HMBG1 πρωτεΐνης), αποτελούν υποσχόμενους βιοδείκτες ICD, που ενδέχεται να χρησιμοποιούνται για πλέον μαζικό screening φαρμακευτικών παραγόντων ως επαγωγέων ICD.

2.5 Επαγωγείς ICD

Ποικίλες αντινεοπλασματικές θεραπείες ενδέχεται να επάγουν τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, σύμφωνα με κλινικά και προ-κλινικά στοιχεία. Οι επαγωγείς του ICD, μπορούν να διαχωριστούν αδρά σε δύο κατηγορίες, αναλόγως με το μηχανισμό μέσω του οποίου κινητοποιούν την επαγωγή των DAMPs [255,256].

Οι κλασικές αντινεοπλασματικές θεραπευτικές στρατηγικές, κυτταροτοξικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και ακτινοθεραπεία, ανήκουν στην κατηγορία I. Υπό την επίδρασή τους, το οξειδωτικό στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγεί σε ενεργοποίηση της ανταπόκρισης του κυττάρου σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (unfolded protein response, UPR), και στην προς τα άνω ρύθμιση του μονοπατιού που μεσολαβείται από τον eukaryotic initiation factor 2 (eIF2a) και ενεργοποίηση του nuclear factor-κB (NF-κB) [255,256].

Οι τύπου II επαγωγείς, περιλαμβάνει θεραπείες που στοχεύουν ειδικά το ενδοπλασματικό δίκτυο, του οποίου η δυσλειτουργία επάγει άμεσα τον κυτταρικό θάνατο, όπως οι ογκολυτικοί ιοί και η φωτοδυναμική θεραπεία [255,256].

Παραδείγματα επαγωγέων ICD περιλαμβάνουν:

-οξαλιπλάτινα [257]: Η οξαλιπλάτινα χορηγήθηκε *in vitro* σε κύτταρα CT26 (καρκίνου παχέος εντέρου ποντικού), από τα οποία παρασκευάστηκε εμβόλιο, με προστατευτική δράση έναντι ανάπτυξης νεοπλασίας, εξαρτώμενη από την έκφραση καλρετικιουλίνης, και πρωτεΐνης HMBG1. Αντιθέτως, η σισπλάτινα απέτυχε να παράγει εμβόλιο νεκρών κυττάρων με προστατευτική δράση, αναδεικνύοντας ότι, φαρμακευτικές ουσίες με κοινά δομικά χαρακτηριστικά (σύμπλοκα της πλατίνας), δεν μοιράζονται απαραίτητα την ιδιότητα επαγωγής ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου.

-ανθρακυκλίνες, μιτοξαντρόνη[258]: Κύτταρα CT26 (καρκίνου παχέος εντέρου ποντικού), εκτέθηκαν *in vitro* σε δοξορουβικίνη, ιδανουβικίνη και μιτοξαντρόνη, και το εκχύλισμα των νεκρών κυττάρων χορηγήθηκε ως εμβόλιο σε ανοσοεπαρκή ποντίκια. Παρατηρήθηκε προστατευτική δράση του εμβολίου, με αποτροπή ανάπτυξης κακοήθους όγκου, κατόπιν έγχυσης ζώντων καρκινικών CT26 κυττάρων σε >60% των πειραματόζωνων. Η παρασκευή εμβολίου με μιτομυκίνη C, ετοποσίδη, ιρινοτεκάνη και σταυροσπορίνη, δεν επέφεραν το ίδιο προστατευτικό αποτέλεσμα. Παράλληλα, παρατηρήθηκε η αυξημένη μετατόπιση της καλρετικιουλίνης στην κυτταρική μεμβράνη, ως αποτέλεσμα της *in vitro* έκθεσης σε ανθρακυκλίνες και μιτοξαντρόνη, η οποία δεν σημειώθηκε με τους άλλους κυτταροτοξικούς υπό εξέταση παράγοντες.

-βορτεζομίμη [259]: Κύτταρα HM-1 καρκίνου ωοθηκών ποντικού εκτέθηκαν σε βορτεζομίμη, με επακόλουθη παρασκευή εμβολίου νεκρών κυττάρων που φάνηκε να έχει προστατευτική δράση σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, όχι όμως και σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια. Παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα που εκτέθηκαν στον παράγοντα, εμφάνισαν υψηλότερη φαγοκυττάρωση από τα μη εκτεθειμένα, καθώς και υψηλότερο δυναμικό ενεργοποίησης κυτταροτοξικών CD8+ T λεμφοκυττάρων.

-Ογκολυτικοί ιοί[260]: Ο ιός Cocksackie B3 (Cocksackie Virus B3 -CVB3) χορηγήθηκε σε ξενομοσχεύματα όγκων ανθρώπινου μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα σε ποντίκια, προκαλώντας, εκτός από ογκομείωση,

επιστράτευση κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων στην περιοχή του όγκου, καθώς και έκφραση μοριακών προτύπων του ICD (καλρετικουλίνη σε κυτταρική επιφάνεια, εξωκυττάρια έκκριση ATP και HMBG1 πρωτεΐνης).

-φωτοδυναμική θεραπεία [261]: Συγγενικά μοντέλα ποντικών με όγκους από CT26 κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου ποντικού, έλαβαν φωτοδυναμική θεραπεία, με ανταπόκριση ως και 100%. Επανεγγύση CT26 κυττάρων στα ποντίκια που ανταποκρίθηκαν στη φωτοδυναμική θεραπεία, δεν οδήγησε στην εκ νέου ανάπτυξη νεοπλασίας.

-υπεριώδης ακτινοβολία [262]: CT26 κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου ποντικού, εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία UVC in vitro, με επακόλουθη απόπτωσή τους, η οποία συνοδευόταν από την έκφραση καλρετικουλίνης στην κυτταρική επιφάνεια.

-αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα [263]: Έκθεση CT26 τροποποιημένων κυττάρων που εξέφραζαν EGFR υποδοχέα, στο cetuximab, και στο panitumumab, όπως και ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου (DiFi, Caco2), προκάλεσε αύξηση της φαγοκυττάρωσής τους, αύξηση έκφρασης καλρετικουλίνης στην κυτταρική επιφάνεια και αύξηση έκπτυξης ειδικών κλώνων T λεμφοκυττάρων.

2.6 Συμπεράσματα

Ο ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος (ICD) αποτελεί σημαντικό φαινόμενο που μεσολαβεί την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, και μπορεί να επάγεται από ποικίλες αντινεοπλασματικές θεραπείες. Η λειτουργία του φαινομένου και η αξία της επαγωγής του στον κολο-ορθικό καρκίνο, δεν έχουν ως τώρα μελετηθεί συστηματικά.

3. Επαγωγή ICD και άλλες ανοσοτροποποιητικές δράσεις των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου

3.1 Κυτταροτοξικοί παράγοντες-Οξαλιπλατίνα

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, οι βασικοί κυτταροτοξικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου είναι η οξαλιπλατίνα, η ιρινοτεκάνη, η 5-φθοριοουρακίλη και η λευκοβορίνη. Από τα φάρμακα αυτά, ο μόνος τεκμηριωμένος ICD επαγωγέας είναι η οξαλιπλατίνα, με τη δράση της αυτή να έχει περιγραφεί από το 2010 [257,264]. Τόσο σε *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων κολο-ορθικού καρκινώματος MSS stable, όσο και σε μοντέλα πειραματόζων, έχει ανευρεθεί αύξηση της διήθησης του όγκου από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα μετά από θεραπεία με οξαλιπλατίνα, όπως και παραγωγή των DAMPs, δλδ μεμβρανική έκφραση της καλρετικουλίνης και εξωκυττάρια απελευθέρωση HMGB1 [265,266]. Επίσης, σε μοντέλα ποντικών με κολο-ορθικό καρκίνο η χορήγηση της οξαλιπλατίνης, φάνηκε να αυξάνει την ανταπόκριση του όγκου στην αντι-PD-1 στοχεύουσα θεραπεία [267].

Σε κλινικό επίπεδο, η οξαλιπλατίνα φαίνεται να λειτουργεί συνεργικά με την ανοσοτροποποιητική αναστολή του PD-1 μορίου της επιφάνειας των T λεμφοκυττάρων[268]. Στη θεραπεία του γαστρικού καρκίνου, η συγχορήγηση ανοσοθεραπείας με τους αντι-PD-1 παράγοντες nivolumab και pembrolizumab, φαίνεται να αποδίδει κλινικό όφελος στους ασθενείς, τόσο στο PFS όσο και στο OS υπό αγωγή με φθοριουρακίλη και οξαλιπλατίνα [268], όπως φάνηκε από τις αντίστοιχες κλινικές μελέτες που οδήγησαν στην έγκριση αυτών των θεραπευτικών συνδυασμών. Στη μελέτη Checkmate 649, προσθήκη του nivolumab στην πρώτη γραμμή θεραπείας ασθενών με γαστρικό καρκίνωμα με 5FU και οξαλιπλατίνα, οδήγησε σε αύξηση του στατιστικά σημαντική μείωση της πιθανότητας θανάτου (OS HR 0.71, $p < 0.0001$) και προόδου νόσου (PFS HR 0.68, $p < 0.0001$) σε ασθενείς με ποσοστό έκφρασης του PD-L1 μορίου 5% και άνω [269]. Πράγματι, σε βιοπτικό υλικό ασθενών μετά από χημειοθεραπεία με οξαλιπλατίνα, διαπιστώνεται η αυξημένη συγκέντρωση κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, υποστηρίζοντας την ανοσοδιεγερτική επίδραση της οξαλιπλατίνης μέσω ICD [266]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αντίστοιχα κλινικά δεδομένα για την ανοσοτροποποιητική δράση της στον κολο-ορθικό καρκίνο.

3.2 Τα Anti-EGFR αντισώματα ως επαγωγείς ICD

Τα στοχευτικά αντισώματα έναντι του EGFR που χρησιμοποιούνται στο μεταστατικό, KRAS μη μεταλλαγμένο καρκίνο του παχέος εντέρου, φαίνεται να επάγουν ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, όταν ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου DiFi, αρνητικά για μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, εκτέθηκαν *in vitro* σε συνδυασμό χημειοθεραπείας (FOLFIRI, 5FU, Irinotecan) και του μονοκλωνικού αντισώματος cetuximab, διαπιστώθηκε αυξημένη μετατόπιση της καλρετικουλίνης στη μεμβρανική επιφάνεια των κυττάρων, σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνο σε χημειοθεραπεία. Όταν τα καρκινικά κύτταρα αυτά συγκαλλιεργήθηκαν με δενδριτικά κύτταρα, διαπιστώθηκε υψηλότερη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, υπό την επίδραση του cetuximab, σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε χημειοθεραπεία. Είναι αξιοσημείωτο ότι, όταν οι κυτταροκαλλιέργειες εκτέθηκαν σε Fab κλάσμα του cetuximab, παρατηρήθηκε η ίδια αύξηση της φαγοκυττάρωσης *in vitro* από τα συγκαλλιεργούμενα δενδριτικά κύτταρα. Επομένως, η ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης δεν εξαρτάται από το σταθερό Fc τμήμα του αντισώματος, δηλαδή το cetuximab δεν δρα κατ'ανάγκη ως οψώνινη των καρκινικών κυττάρων, συνδεόμενο μέσω του τμήματος Fc με τα δενδριτικά κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι η δενδριτική φαγοκυτταρική δραστηριότητα ενισχύεται κατά μη ειδικό τρόπο, συνηγορώντας υπέρ της επέλευσης μη ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου[264] (Βλ. Εικ.3.2.1).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε CT26 κύτταρα, γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν EGFR. Στη συνέχεια, εμβόλια παρασκευάστηκαν από CT26 κύτταρα, γενετικά τροποποιημένα για να εκφράζουν EGFR και μη, τα οποία θανατώθηκαν *in vitro* με ψύξη ή κατόπιν έκθεσης σε χημειοθεραπεία, ή κατόπιν έκθεσης σε συνδυασμό χημειοθεραπείας και cetuximab. Μετά τον εμβολιασμό τους, τα πειραματόζωα έλαβαν συγγενικό μόσχευμα CT26 ζώντων κυττάρων και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη όγκου και η επιβίωσή τους. Εν τέλει φάνηκε ότι το εμβόλιο από CT26 κύτταρα γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν το στόχο του cetuximab (EGFR) και θανατώθηκαν με συνδυασμό cetuximab και χημειοθεραπείας, παρείχαν την ισχυρότερη προστατευτική δράση, καθυστερώντας την ανάπτυξη του όγκου και το θάνατο του πειραματόζωου. Δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα για τα μη γενετικά τροποποιημένα CT26, όπου η χορήγηση cetuximab δεν οδήγησε σε ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, καθώς το παραγόμενο εμβόλιο από τις συγκεκριμένες καλλιέργειες δεν είχε προστατευτικό αποτέλεσμα στα ανοσοεπαρκή πειραματόζωα[264].

Σε επόμενο βήμα του πειράματος, απομονώθηκαν CD8+ κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα από τα ποντίκια που έλαβαν το προστατευτικό εμβόλιο (CT26 κύτταρα γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν το EGFR και θανατώθηκαν με συνδυασμό cetuximab και χημειοθεραπείας) και χορηγήθηκαν σε ανεξάρτητη ομάδα πειραματόζωων. Το αποτέλεσμα ήταν καθυστέρηση ανάπτυξης νεοπλασίας, όταν ζώντα CT26 κύτταρα χορηγήθηκαν στη δεύτερη ομάδα πειραματόζωων, υποδηλώνοντας ότι το cetuximab, προκάλεσε όχι μόνο αύξηση της φαγοκυττάρωσης, αλλά και ενίσχυση της ειδικής κυτταροτοξικής ανοσίας, καθώς και της μακροχρόνιας μνήμης ειδικών κλώνων αντινεοπλασματικών Τ λεμφοκυττάρων[264].

Η έκθεση κυτταροκαλλιεργιών ανθρώπινων κυττάρων DiFi σε ranitumumab είχε επίσης ως αποτέλεσμα αύξηση της φαγοκυττάρωσης, με παράλληλη μετατόπιση της καλρετικουλίνης στην κυτταρική μεμβράνη υποδηλώνοντας τη δράση του αντισώματος ως επαγωγέα του ICD[260].

Αξιοσημείωτο είναι ότι, η μεταλλάξεις του BRAF προκαλούν αντίσταση στον επαγόμενο ICD από το cetuximab, ωστόσο η συγχορήγηση αναστολέα της κινάσης MEK, αποκαθιστά την επαγόμενη από το cetuximab φαγοκυττάρωση[264].

3.3 Άλλες ανοσοτροποποιητικές δράσεις των αντι-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να έχει ανοσοτροποποιητικές δράσεις, οι οποίες συμβάλουν στην αντινεοπλασματική δράση τους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα με ανθρώπινο Fc σταθερό τμήμα, το οποίο αναγνωρίζεται από τους αντίστοιχους υποδοχείς στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, έχει βρεθεί να συμβάλλει στην οψωνινοποίηση των καρκινικών κυττάρων, ενισχύοντας έτσι τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα[270,271].

Συγκεκριμένα, το cetuximab, είναι χιμαιρικό αντίσωμα με ανθρώπινου τύπου σταθερό Fc τμήμα, το οποίο φαίνεται να συμβάλλει στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων[272]. Σε σειρά in vitro πειραμάτων το 2012, ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου, που είχαν εκτεθεί σε χημειοθεραπεία και cetuximab in vitro, παρουσίασαν υψηλό δυναμικό φαγοκυττάρωσης από δενδριτικά κύτταρα, με τα οποία συγκαλλιεργήθηκαν, σε μεγαλύτερο βαθμό από τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνο σε χημειοθεραπεία. Ακόμα περισσότερο, όταν τα δενδριτικά κύτταρα που φαγοκυττάρωσαν καρκινικά κύτταρα που είχαν καλυφθεί με cetuximab, επώασθηκαν με περιφερικά μονοκύτταρα από υγιείς δότες, τα τελευταία διαφοροποιήθηκαν σε κλώνους ενεργών T- λεμφοκυττάρων, με υψηλή ειδικότητα στην αναγνώριση των επιφανειακών αντιγόνων των καρκινικών κυττάρων [272]. Τα ανωτέρω ευρήματα υποστηρίζουν την ενίσχυση και την εξειδίκευση της κυτταροτοξικότητας των T λεμφοκυττάρων, ως παράπλευρο αποτέλεσμα του στοχευτικού cetuximab. Τα ευρήματα αυτά επαληθεύθηκαν και σε άλλες σειρές πειραμάτων, συνηγορώντας υπέρ της οψωνινοποιητικής και έμμεσα ανοσοτροποποιητικής δράσης και άλλων εξανθρωπισμένων, χιμαιρικών ή εξ ολοκλήρου ανθρώπινων αντισωμάτων [273].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι, τα στοχευτικά αντισώματα που παρουσιάζουν αυτόν τον ανοσοτροποποιητικό χαρακτήρα, είναι τάξης G1[273,274]. Πιο συγκεκριμένα, το Fc τμήμα τάξης G1 φαίνεται να εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα CD16 των δενδριτικών κυττάρων, καθοδηγώντας τα να φαγοκυτταρώσουν τα καρκινικά κύτταρα [261]. Τα αντισώματα τάξης IgG2, φαίνεται να έχουν χαμηλότερη συγγένεια με τον CD16 υποδοχέα, επομένως δεν λειτουργούν το ίδιο αποδοτικά ως οψωνίνες [274]. Συγκεκριμένα για το ranitumumab, υπάρχουν ενδείξεις από in vitro μελέτες σε κυτταρικές σειρές καρκίνου κεφαλής τραχήλου [275], και επιδερμικού καρκινώματος [276,277] ότι ενισχύει τη δραστηριότητα των δενδριτικών κυττάρων, ωστόσο λιγότερο αποδοτικά από το cetuximab.

3.4 Συμπεράσματα

Τόσο η ευρύτητα χρησιμοποιούμενη οξαλιπλάτινα, όσο και τα μονοκλωνικά anti-EGFR αντισώματα, δύνανται να ασκήσουν ανοσοτροποποιητικές δράσεις, κατά τη χορήγησή τους, κινητοποιώντας την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα και την ενισχύοντας την επακόλουθη αντινεοπλασματική κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, συστηματική μελέτη και καταγραφή επαγωγής αυτών των επιδράσεων δεν έχει διενεργηθεί, ενώ οι μέθοδοι τεκμηρίωσης τους είναι διαφορετικοί σε κάθε μελέτη. Συνεπώς, η συστηματική και οργανωμένη διερεύνηση αφενός μεν των ανοσοτροποποιητικών δράσεων των αντινεοπλασματικών θεραπειών και η παγίωση μεθόδων ανίχνευσής τους, αποτελεί σημαντικό στόχο για την μελλοντική ερευνητική δραστηριότητα. Η ανάγκη αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη όσον αφορά στον MMR proficient κολο-ορθικό καρκίνο, όπου δεν υφίστανται τεκμηριωμένοι βιοδείκτες ανοσολογικής απάντησης και πιθανής ευαισθησίας στην ανοσοθεραπεία.

4. Ανασκόπηση της αξιολόγησης του φαινομένου του ICD

4.1. Ανίχνευση ICD σχετιζόμενων DAMPs και συσχέτισή τους με κλινικά δεδομένα

Κατά την προσπάθεια διαπίστωσης του φαινομένου του ICD, τόσο σε προκλινικό, όσο και σε προκλινικό επίπεδο, τα DAMPs που ανωτέρω περιγράφηκαν, μπορούν να αναζητηθούν με διάφορες μεθόδους, ως μοριακές ενδείξεις του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου. Ακολούθως, παρατίθενται κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα ανίχνευσης των εν λόγω μοριακών προτύπων σε ποικίλους συμπαγείς όγκους.

4.1.1 Καλρετικουλίνη

Σε μελέτη έκφρασης της καλρετικουλίνης το 2018 [278], σε καρκινώματα του ενδομητρίου, η χαμηλή έκφραση της καλρετικουλίνης φάνηκε να σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση και περισσότερο επιθετική πορεία νόσου, σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα παρασκευάσματα με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για καλρετικουλίνη είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στην κυτταρική μεμβράνη, θεωρήθηκαν ως θετικά για την έκφραση της καλρετικουλίνης.

Στην ίδια μελέτη[278], εξετάστηκε ποσοτικά η καλρετικουλίνη στους ιστούς των ασθενών με Western blot. Η χορήγηση νεοεπικουρικής θεραπείας με δοξορουβικίνη, ένα φάρμακο που θεωρείται επαγωγέας του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της καλρετικουλίνης, όπως και το p-eIF2α (phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2α) στα καρκινώματα του ενδομητρίου που είχαν παρουσιάσει ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, ενώ αυτό δεν παρατηρήθηκε στα καρκινώματα που δεν ανταποκρίθηκαν στη δοξορουβικίνη.

Η έκφραση της καλρετικουλίνης έχει σχετισθεί με ευνοϊκότερη πρόγνωση στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα[279]. Υψηλότερη έκφραση καλρετικουλίνης στη μεμβράνη των κυττάρων, φάνηκε να σχετίζεται με υψηλή βαθμό διήθησης του όγκου από ώριμα δένδριτικά κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα μνήμης, στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Παράλληλα, οι ασθενείς με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης καλρετικουλίνης και με αύξηση διήθησης του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού παρουσίασαν την καλύτερη πρόγνωση.

Σε παλαιότερη μελέτη του 2013 [280], διαπιστώθηκε αύξηση του mRNA που κωδικοποιεί την καλρετικουλίνη σε συμπαγείς μεταστατικές εστίες σε σχέση με την έκφρασή της στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές από καρκινώματα των ωθηκών. Ωστόσο, η πρόγνωση των ασθενών με πλευριτικές συλλογές με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης καλρετικουλίνης, ήταν βελτιωμένη σε σχέση με αυτούς των οποίων οι πλευριτικές συλλογές χαρακτηρίζονταν από χαμηλό επίπεδο έκφρασης καλρετικουλίνης. Σε αντίθεση με τα ανωτέρω ευρήματα, η υψηλότερη έκφραση καλρετικουλίνης από κύτταρα καρκίνου του οισοφάγου, έχει βρεθεί να σχετίζεται με πτωχότερη πρόγνωση, σε μια κινεζική μελέτη του 2007 [281].

Η αύξηση της έκφρασης της καλρετικουλίνης έχει διαπιστωθεί ανοσοϊστοχημικά και σε νευροβλαστώματα, όπου η θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για καλρετικουλίνη συσχετιζόταν με καλύτερα διαφοροποιημένα νεοπλάσματα και μεγαλύτερη επιβίωση[282].

Συγκεκριμένα σε ότι αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, έχει εξετασθεί η επίδραση της δισουλφιράμης σε κύτταρα ξενομοσχεύματος καρκίνου παχέος εντέρου σε ποντίκια, όπου ανευρέθη μέσω κυτταρομετρίας ροής ότι η επιφανειακή έκφραση της καλρετικουλίνης ενισχύθηκε υπό την επίδραση της δισουλφιράμης, η οποία

παρεμπόδιζε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου κολοορθικού καρκίνου [283]. Παρόμοια αποτελέσματα ανευρέθησαν σε μελέτες υπό την επίδραση οξαλιπλατίνης, γνωστού επαγωγέα του κυτταρικού θανάτου [284, 285], όπως και υπό την επίδραση της πεμετρεξέδης, σε μελέτη η οποία διαπίστωσε αύξηση συγκέντρωσης της καλρετικουλίνης στο υπερδιήθημα κυτταροκαλλιέργειας καρκίνου του παχέος εντέρου, κατόπιν έκθεσης στην πεμετρεξέδη [286]. Η μιτοξαντρόνη, ένας ακόμη διαπιστωμένος επαγωγέας του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, έχει βρεθεί να αυξάνει τη μετατόπιση της καλρετικουλίνης στην επιφάνεια κυττάρων κολοορθικού καρκίνου, κατόπιν προσδιορισμού με κυτταρομετρία ροής [287]. Σε άλλη μελέτη, έχει ανευρεθεί αύξηση της έκφρασης της καλρετικουλίνης στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω ανοσοφθορισμού, σε κυτταροκαλλιέργειες καρκινικών κυττάρων κολοορθικού καρκίνου με γνωστή KRAS μετάλλαξη [288].

Έχει διαπιστωθεί μετατόπιση της καλρετικουλίνης στην κυτταρική μεμβράνη με ανοσοϊστοχημική χρώση, σε κύτταρα ξеноμοσχεύματος κολοορθικού καρκίνου, υπό την επίδραση θεραπείας με ηλεκτρο-υπερθερμία [289]. Σε αναδρομική μελέτη 33 ασθενών με κολοορθικό καρκίνο που υπεβλήθησαν σε μεταστασιεκτομή ηπατικών, δευτεροπαθών εντοπίσεων, ανευρέθηκε με ανοσοϊστοχημική χρώση αύξηση της καλρετικουλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων σε βιοψίες ασθενών με ηπατικές μεταστάσεις από κολοορθικό καρκίνο, κατόπιν της χορήγησης νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, με βάση την φθοριουρακίλη ή/και την οξαλιπλατίνη. Μάλιστα, η αύξηση της επιφανειακής καλρετικουλίνης συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής νόσου κατόπιν της χειρουργικής εξαίρεσης της νόσου [290].

Σε μελέτη 52 ασθενών με καρκίνο μαστού και 8 ασθενών με καρκίνο οισοφάγου, οι οποίοι έλαβαν προεγχειρητική χημειοθεραπεία, εξετάστηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση καλρετικουλίνης και πρωτεΐνης HMGB1 στο βιοψικό υλικό. Η μεμβρανική έκφραση καλρετικουλίνης όπως και η έκφραση της HMGB1, αυξήθηκε κατόπιν της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας σε σχέση με την αρχική βιοψία. Ωστόσο, τα επίπεδα των πρωτεϊνών δε βρέθηκαν να σχετίζονται με το βαθμό διήθησης από CD8+ T λεμφοκύτταρα, με την ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία ή την επιβίωση του ασθενούς [291]. (Βλ. Εικ. 4.1.1)

Σε πιο πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η έκφραση της καλρετικουλίνης στην κυτταρική επιφάνεια σε ιστικά δείγματα πασχόντων από καρκίνο ωοθηκών, που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση ογκομείωσης. Διαπιστώθηκε ότι η ομάδα ασθενών με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για την καλρετικουλίνη στην επιφάνεια του κυττάρου, παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά DFS και OS, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό [292].

4.1.2. πρωτεΐνη HMGB1 (*high mobility group box 1*)

Έχει διαπιστωθεί επαγωγή της έκφρασης του HMGB1 σε ιστικά παρασκευάσματα πασχόντων από πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου και καρκίνο μαστού, μετά τη χορήγηση νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας [281].

Σε μελέτη ιστικών δειγμάτων από φυσιολογικό παγκρεατικό ανθρώπινο ιστό, από καρκίνο παγκρέατος και από καρκινώματα παγκρέατος ασθενών που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία προ της χειρουργικής εξαίρεσης παγκρεατικού καρκίνου, διαπιστώθηκε μέσω ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής αυξημένη εξωκυττάρια απελευθέρωση του HMGB1 σε ασθενείς που είχαν λάβει νεοεπικουρική θεραπεία, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν λάβει, όσο και σε σχέση με τα δείγματα φυσιολογικού ιστού. Σε ασθενείς που έλαβαν

χημειοθεραπεία με φθοριουρακίλη και οξαλιπλατίνα, η απελευθέρωση του HMGB1 ήταν υψηλότερη από ότι σε ασθενείς που είχαν λάβει γεμισιταβίνη, ωστόσο χωρίς η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. έχει διαπιστωθεί σε δείγματα ασθενών με καρκίνο παγκρέατος, μετά τη χορήγηση νεοεπικουρικής θεραπείας, σε σχέση με το επίπεδο προ θεραπείας όπως και σε σχέση με δείγματα ασθενών που δεν είχαν λάβει θεραπεία [293].

Σε ανοσοϊστοχημική μελέτη ιστικών δειγμάτων παγκρεατικού καρκινώματος για την πρωτεΐνη HMGB1, η έκφραση του HMGB1 και ιδίως στον πυρήνα των κυττάρων βρέθηκε μειωμένη σε σχέση με τον περιβάλλοντα υγιή παγκρεατικό ιστό, ενώ σε αναδρομική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η ομάδα των ασθενών με τη χαμηλότερη έκφραση HMGB1, είχε στατιστικά σημαντική χαμηλότερη επιβίωση, σε σχέση με τους ασθενείς με έκφραση HMGB1 σε υψηλότερο επίπεδο (πλησιέστερο στο φυσιολογικό ιστό) [294].

Το ενδοκυττάριο, κυτταροπλασματικό HMGB1, έχει χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος δείκτης εξωκυττάριας απελευθέρωσης του. Σε μελέτη ασθενών με καρκίνο του ορθού, αναζητήθηκε με ανοσοϊστοχημική χρώση το HMGB1 σε ιστό ασθενών με καρκίνο του ορθού πριν και μετά τη χορήγηση νεοεπικουρικής χημειο-ακτινοθεραπείας, όπου διαπιστώθηκε αύξηση της κυτταροπλασματικής μετατόπισης του HMGB1 μετά τη θεραπεία. Παράλληλα, στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι υψηλότερο επίπεδο κυτταροπλασματικού HMGB1, στη βιοψία προ χορήγησης θεραπείας, σχετιζόταν με λιγότερες υποτροπές και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση στους ασθενείς [295].

Σε προοπτική μελέτη ασθενών που έλαβαν χημειοακτινοθεραπεία για πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου, διαπιστώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του HMGB1 στον ορό των ασθενών μετά τη χημειο-ακτινοθεραπεία, σε σχέση με τα επίπεδα προ θεραπείας. Όταν εξετάστηκαν αναδρομικά ιστικά δείγματα ασθενών με πλακώδη καρκινώματα οισοφάγου, διαπιστώθηκε μέσω ανοσοϊστοχημικής χρώσης εντονότερη έκφραση του HMGB1, σε ιστό ασθενών που είχαν λάβει προεγχειρητική χημειοθεραπεία, σε σχέση με ασθενείς που δεν είχαν λάβει. Στην ομάδα ασθενών με την εντονότερη έκφραση του HMGB1, διαπιστώθηκε υψηλότερο ποσοστό διήθησης από κυτταροτοξικά CD8 T λεμφοκύτταρα, σε σχέση με ασθενείς που παρουσίαζαν πιο ασθενή έκφραση HMGB1, καθώς και μεγαλύτερη επιβίωση [296].

Σε έτερη προοπτική μελέτη, συλλέχθηκε πλάσμα από ασθενείς με καρκίνο του ορθού προ θεραπείας και μετά την νεοεπικουρική χημειοθεραπεία, καθώς και μετά την ολοκλήρωση της σύγχρονης χημειο-ακτινοθεραπείας. Διαπιστώθηκε αύξηση του HMGB1 στο πλάσμα των ασθενών με KRAS wild type καρκίνωμα, μετά την ολοκλήρωση της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, χωρίς περεταίρω αύξηση μετά την ολοκλήρωση και της επακόλουθης σύγχρονης χημειο-ακτινοθεραπείας. Αντίθετα, σε ασθενείς με μετάλλαξη του kras, διαπιστώθηκε μείωση της HMGB1 στο πλάσμα των ασθενών, μετά τη νεοεπικουρική θεραπεία. Η αύξηση της HMGB1, σχετίστηκε με μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης υποτροπής και θανάτου για τους ασθενείς [297].

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και από μετρήσεις HMGB1 στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο μαστού, όπου η χορήγηση νεοεπικουρικής θεραπείας από την πρώτη δόση οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων HMGB1, η οποία σχετιζόταν και με υψηλότερα ποσοστά συνολικής πενταετούς επιβίωσης [298]. Η αύξηση του κυκλοφορούντος HMGB1 στο πλάσμα των ασθενών, σχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης στη νεοεπικουρική θεραπεία, σε ακόμα μία μελέτη ασθενών με καρκίνο μαστού [299]. Εν αντιθέσει, σε αναζήτηση κυτταροπλασματικού HMGB1 σε ιστικά δείγματα τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, που παρουσίασαν κλινική πρόοδο νόσου μετά τη χορήγηση της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, παρατηρήθηκε εντονότερη

έκφραση HMGB1, σε σχέση με ασθενείς που δεν έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία και δεν παρουσίασαν άμεση υποτροπή μετά το χειρουργείο [300].

Σε έτερη μελέτη ασθενών με καρκίνο μαστού, σε πρώιμο και μεταστατικό στάδιο, έγινε καταγραφή της κινητικής του HMGB1 στο περιφερικό αίμα [297]. Τα αποτελέσματα ήταν οριακά στατιστικά σημαντικά, ωστόσο οι μεταβολές του HMGB1 φάνηκαν να σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Υψηλότερες συγκεντρώσεις προ έναρξης θεραπείας σχετίζονταν με πιο όψιμη ανταπόκριση, ενώ χαμηλότερα επίπεδα εμφανίζονται σε ασθενείς με καλή ανταπόκριση, με ικανοποιητική ειδικότητα.

4.1.3. HSP 70, HSP 90 (Heatshock Proteins)

Σε ανοσοϊστοχημική μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης HSP70, διαπιστώθηκε αύξηση της στον έσω χιτώνα φλεβών ασθενών που είχαν υποβληθεί σε νεοεπικουρική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία για καρκινώματα κεφαλής-τραχήλου [301].

Σε άλλη μελέτη ασθενών που έλαβαν νεοεπικουρική χημειοθεραπεία για οστεοσάρκωμα, η έκφραση του HSP70 παρουσίασε μείωση στους περισσότερους ασθενείς μετά τη χημειοθεραπεία. Μάλιστα, η μείωση της έκφρασης της HSP70, βρέθηκε να σχετίζεται με μεγαλύτερο ποσοστό νέκρωσης του όγκου, ενώ τα οι ασθενείς των οποίων τα ιστικά δείγματα χαρακτηρίζονταν από έντονη χρώση για την HSP70, παρουσίασαν σχετικά μειωμένη παθολογοανατομική ανταπόκριση [302].

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε αναδρομική μελέτη έκφρασης της HSP90 σε πλακώδη καρκινώματα του οισοφάγου, όπου διαπιστώθηκε μείωση της HSP90, σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης στον υγιή βλεννογόνο, μετά τη χορήγηση νεοεπικουρικής χημειο-ακτινοθεραπείας [303]. Σε επόμενη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας, υψηλή έκφραση της HSP90 σε ιστικά δείγματα πασχόντων από καρκίνο ορθού, συσχετίστηκαν σαφώς με έλλειψη ανταπόκρισης στη νεοεπικουρική χημειο-ακτινοθεραπεία [303].

Σε μελέτη ασθενών με HER2 θετικό καρκίνο μαστού, εξετάστηκε η έκφραση της HSP90 πριν και μετά τη χειρουργική εκτομή, σε ασθενείς που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία με ταξάνη και τραστουζουμάμπη. Τα υψηλότερα ποσοστά πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης, διαπιστώθηκαν στις ασθενείς με την πλέον έντονη έκφραση της HSP90, στον ιστό που είχε ληφθεί προ της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας. Ωστόσο, τα ιστικά δείγματα που ελήφθησαν μετά τη χημειοθεραπεία, παρουσίασαν τάση μείωσης της HSP90, σε μη στατιστικά σημαντικό βαθμό [304]. Σε έτερη μελέτη ασθενών που έλαβαν νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με βάση την ανθρακυκλίνη, διαπιστώθηκε αύξηση της πυρηνικής έκφρασης της HSP70, μετά τη χορήγηση της χημειοθεραπείας, σε σχέση με τα προ θεραπείας επίπεδα. Η αύξηση δε φάνηκε να σχετίζεται με την πιθανότητα παθολογοανατομικής ανταπόκρισης, ωστόσο οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα HSP70 στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, παρουσίασαν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου [305].

4.1.4. LDL receptor-related protein 1 (LRP-1)

Η έκφραση του υποδοχέα LRP-1 έχει εξεταστεί σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού σταδίου II/III, προ και μετά τη χορήγηση νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, μέσω ανοσοϊστοχημείας. Προ της χημειοθεραπείας, η έκφραση του LRP-1 ήταν υψηλότερη στον καρκινικό σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό, στα 2/3 των εξεταζόμενων ασθενών. Η έκφραση του υποδοχέα παρέμεινε υψηλότερη στον καρκινικό σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό μετά

τη χορήγηση νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας. Παράλληλα, η νεοεπικουρική θεραπεία οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του υποδοχέα στις μισές από τις εξεταζόμενες ασθενείς ενώ μειώθηκε στο 1/3 των ασθενών [306].

4.1.5. TLR4 (Toll-like receptor 4)

Η έκφραση του TLR4 έχει μελετηθεί αναδρομικά σε δείγματα ασθενών που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εξαίρεση μη μεταστατικού αδενοκαρκινώματος παγκρέατος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, μέτρια και έντονη θετικότητα του TLR4 σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες, φάνηκε να σχετίζεται με στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη συνολική επιβίωση, ανεξάρτητα από άλλες κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους [307].

Η έκφραση του TLR4 έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνεται μετά τη χορήγηση χημειο-ακτινοθεραπείας. Ποσοτική PCR του κωδικοποιούντος mRNA του TLR4, ανέδειξε μείωση της έκφρασής του υποδοχέα σε δείγμα ιστού 52% των εξεταζόμενων ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής τραχήλου, μετά την χημειο-ακτινοθεραπεία, σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης προ θεραπείας [308].

Σε πιο πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η έκφραση TLR4 σε ιστικά δείγματα πασχόντων από καρκίνο ωοθηκών, που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση ογκομείωσης. Διαπιστώθηκε ότι η ομάδα ασθενών με μέτρια/έντονη θετικότητα για τον υποδοχέα, παρουσίασε υψηλότερη ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση και συνολική επιβίωση, αν και σε όχι στατιστικά σημαντικό βαθμό. Σε ασθενείς που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία με πακλιταξέλη προ χειρουργείου, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του mRNA του TLR4 σχετιζόταν ποσοτικά με το βαθμό διήθησης από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα [309].

4.2 Αξιολόγηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου προς ανεύρεση ενδείξεων ανοσολογικής διέγερσης

Η κυτταρική σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, δεν αποτελεί επισήμως τεκμήριο ύπαρξης ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου. Είναι ενδιαφέρον ωστόσο, ότι, η χορήγηση μονοκλωνικών αντι-EGFR αντισωμάτων, ενδέχεται να επηρεάζει το μικροπεριβάλλον του όγκου, τροποποιώντας τις συγκεντρώσεις των κυτταροτοκικών και ανοσοκατασταλτικών κυττάρων.

Σε μελέτη 53 ασθενών με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο, με ηπατικές μεταστάσεις, υπό θεραπεία με cetuximab, αξιολογήθηκε η συγκέντρωση των TILs στις εντοπίσεις των ηπατικών μεταστάσεων. Οι ερευνητές διαχώρισαν 3 ομάδες ασθενών: Αυτούς που έλαβαν χημειοθεραπεία με cetuximab, αυτούς που έλαβαν χημειοθεραπεία χωρίς cetuximab και αυτούς που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία προ της μεταστασιεκτομής. Η συγκέντρωση των ανοσολογικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στους ασθενείς που είχαν λάβει cetuximab, σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν λάβει ($P < 0.001$). Διαπιστώθηκε διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα και καταστροφή των καρκινικών εστιών στους ασθενείς που είχαν λάβει cetuximab και χημειοθεραπεία. Επίσης, διαπιστώθηκε αυξημένη διήθηση από λεμφοκύτταρα CD3+ ($P = 0.003$), CD8+ ($P = 0.003$) και CD56+ ($P = 0.001$) στην ομάδα που είχε λάβει θεραπεία με cetuximab [310].

Σε άλλη μελέτη [311], ανευρέθη ότι σε ασθενείς που είχαν λάβει συνδυασμό cetuximab με χημειοθεραπεία, διαπιστώθηκε καταστολή της παραγωγής των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών IL10 και του TGFβ, καθώς και του ανοσοκατασταλτικού συστήματος νιτρικών iNOS/NO. Στο πλάσμα ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο χωρίς θεραπεία (40 ασθενείς), ανευρέθησαν υψηλότερα επίπεδα NO σε σχέση με αυτούς που είχαν λάβει μόνο χημειοθεραπεία ($P = 0.189$) και αυτούς που είχαν λάβει χημειοθεραπεία με cetuximab ($P = 0.0006$). Επίσης, οι ασθενείς που είχαν λάβει cetuximab σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία, παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου σε σχέση με αυτούς τους ασθενείς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία ($P=0.0229$). Επιπλέον, οι σχετιζόμενες με τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα FOXP3+ κυτταροκίνες TGFβ και IL-10, ανευρέθησαν μειωμένες σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στα εναιωρήματα καλλιέργειών από περιφερικά μονοπύρρηνα των ασθενών (PBMCs- peripheral blood mononuclear cells) που είχαν λάβει συνδυασμό cetuximab και χημειοθεραπεία, σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν λάβει μόνο χημειοθεραπεία ($P=0.0143$ και $P=0.0317$) και αυτούς που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία treatment ($P = 0.0027$ και $P=0.0194$). Οι ασθενείς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία, αν και παρουσίαζαν μειωμένες συγκεντρώσεις TGFβ και IL-10, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν λάβει καθόλου θεραπεία [311].

Σε ασθενείς με καρκίνο κεφαλής-τραχήλου, που λαμβάνουν χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με cetuximab, έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία FOXP3+ ανοσοκατασταλτικών κυττάρων, σχετίζεται με πτωχότερη πρόγνωση και ότι ενδεχομένως η στόχευση με ανοσοτροποποιητικό παράγοντα ενδέχεται να αντιστρέφει αυτήν την τοπική ανοσοκαταστολή [312].

Η παρουσία CD56+ κυττάρων έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση ως προς το PFS και την αντικειμενική ανταπόκριση, σε ασθενείς με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο που λάμβαναν cetuximab, ενώ αυτή η συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς που λάμβαναν μόνο χημειοθεραπεία (HR: 2.6, (95%CI:1.14-6.0), $p = 0.019$) [313].

Σε μελέτη 63 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ανοσολογικού προφίλ στο περιφερικό αίμα, με κυτταρομετρία ροής, πριν και μετά από τη θεραπεία με cetuximab. Διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των CD3+ T, CD8+ T λεμφοκυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων, αυξήθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μετά τη θεραπεία με cetuximab. Επίσης, η κυτταροτοξικότητα των NK και CD8+ T λεμφοκυττάρων αυξήθηκε μετά από τη θεραπεία με cetuximab [314].

Σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού υπό νέο-επικουρική χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με ranitumumab, η αύξηση TILs στις βιοψίες των ασθενών, συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με πλήρη παθολογοανατομική ανταπόκριση της νόσου [315].

4.3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, το φαινόμενο της επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου δεν έχει επαρκώς και συστηματικά διερευνηθεί σε ασθενείς. Επιπλέον, δεν έχει διενεργηθεί συστηματική αξιολόγηση των πιθανών δεικτών του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου σε ζώντες ασθενείς, είτε αυτοί αφορούν την ανίχνευση των DAMPs είτε αυτοί αφορούν την αξιολόγηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και τη διήθηση από ανοσολογικά κύτταρα. Η ανάπτυξη μεθόδων προς ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών του ICD σε ασθενείς υπό θεραπεία, θα ήταν πολύτιμη, καθώς θα συντελούσε στην πιο ακριβή πρόβλεψη ανταπόκρισης στην αγωγή, καθώς και στη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στην καταστολή της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αυτό αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία, καθώς οι μοριακοί δείκτες του ICD, ενδεχομένως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μελλοντικοί βιοδείκτες, για την επιλογή ασθενών με μεγάλο αναμενόμενο όφελος από ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές.

5. Η κυτταρική σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου

5.1 Λεμφοκύτταρα διηθούντα τους όγκους, Tumor Infiltrating lymphocytes (TILs)

5.1.1 Ορισμός

Ως «Tumor infiltrating lymphocytes» (TILs), περιγράφονται όλοι οι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί που διηθούν τον κακοήγη όγκο, και η παρουσία τους έχει περιγραφεί σε πολλές συμπαγείς κακοήθειες, όπως στον καρκίνο του μαστού, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στο μελάνωμα και σε άλλους. Μπορεί να εντοπίζονται τόσο εντός του κακοήθους ιστού, όσο και στο περιβάλλον στρώμα, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού-ξενιστή ενάντια στα κακοήγη κύτταρα [316-318]. Περιλαμβάνουν κυρίως κυτταροτοξικά CD8+ και βοηθητικά CD4+ T-λεμφοκύτταρα, καθώς και μικρό αριθμό B-λεμφοκυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killer cells, NK cells) [318-320]. Επί μεγάλης ανάπτυξης των TILs εντός του όγκου, ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται και θυλακιώδη βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή λεμφοκυττάρων [321].

Η παρουσία τους έχει μελετηθεί συστηματικά ως προγνωστικός ή προβλεπτικός βιοδείκτης, σε ασθενείς με συμπαγείς κακοήθειες, κατά τη διάγνωση και κατά την πορεία της αντινεοπλασματικής θεραπείας. (Βλ. Εικ. 5.1.1)

5.1.2 Λειτουργικός ρόλος, μηχανισμοί δράσης

Ρόλος των TILs είναι να ανιχνεύουν και να εξουδετερώνουν τα κακοήγη κύτταρα, και πράγματι, η παρουσία τους έχει σχετιστεί με ευνοϊκότερη πρόγνωση για τον ασθενή και υψηλότερη πιθανότητα να αποκομίσει όφελος από την αντινεοπλασματική θεραπεία, όπως φαίνεται από μελέτες μοντέλων ποντικών αλλά και ασθενών. Ωστόσο, υπάρχει ένα εξαιρετικά πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των TILs, των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, το οποίο διαρκώς μεταβάλλεται δυναμικά υπό την επίδραση της αντινεοπλασματικής θεραπείας [303-318]. Παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα προσπαθούν να αναπτύξουν τρόπους διαφυγής από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, επάγοντας τοπική ανοσοκαταστολή, με οδούς που διαφέρουν από το ένα νεόπλασμα στο άλλο [322].

Συγκεκριμένα, τα T-λεμφοκύτταρα και ιδιαίτερα τα κυτταροτοξικά CD8+, θεωρούνται οι κατεξοχήν τελεστές της κυτταρικής ανοσίας εναντίον των καρκινικών κυττάρων. Πρόκειται για εξειδικευμένα κύτταρα, φέροντα συμπλέγματα μείζονος ιστοσυμβατότητας τύπου I, με δυνατότητα αναγνώρισης καρκινικών αντιγόνων. Η σύνδεση με τα καρκινικά αντιγόνα προκαλεί την ενεργοποίησή τους, με αποτέλεσμα την παραγωγή περφορίνης, και κοκκιοενζύμων, όπως και κυτταροκινών με εξειδίκευση στην επαγωγή του θανάτου των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να προκαλείται βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα. Ένα υποσύνολο CD4+ βοηθητικών λεμφοκυττάρων, είναι απαραίτητα για την παραγωγή κυτταροκινών που μεσολαβούν την ενεργοποίηση και την έκπτυξη των κυτταροτοξικών κυττάρων. Τα NK κύτταρα, αναγνωρίζουν και εξουδετερώνουν τα καρκινικά χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη ευαισθητοποίηση και έκθεσή τους στα καρκινικά αντιγόνα [323-325]. Τα B-λεμφοκύτταρα, μεσολαβούν τη χυμική ανοσία έναντι του όγκου, δίνοντας γένεση σε πλασματοκύτταρα που παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα ενάντια των καρκινικών αντιγόνων. Υπάρχουν μάλιστα ενδείξεις ότι τα B-λεμφοκύτταρα δημιουργούν λεμφοζιδιακού τύπου δομές, η παρουσία των οποίων φαίνεται να αποτελεί θετικό προγνωστικό παράγοντα, ενώ τα NK κύτταρα δρουν επίσης συνεργατικά με τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς [326].

Καθώς τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται διεξόδους διαφυγής από την ανοσοεπιτήρηση, τα TILs σταδιακά αποτυγχάνουν να ανακόψουν την πρόοδο της νόσου. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν έκκριση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών από τα καρκινικά κύτταρα, αλληλεπίδραση υποδοχέων της επιφάνειας των καρκινικών και των Τ λεμφοκυττάρων, και την χημειοτακτική πρόσκληση ανοσορυθμιστικών και ανοσοκατασταλτικών κυττάρων (ανοσοκατασταλτικά CD4+, MDSCs). Το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι διακριτό για κάθε νεόπλασμα, ακόμα και μεταξύ νεοπλασμάτων κοινής ιστικής προέλευσης, ενώ δύναται να υπάρχει και αξιοσημείωτη ετερογένεια των ανοσοκατασταλτικών μηχανισμών και στον ίδιο όγκο, ανάλογα με τις τοπικο-περιοχικές επιδράσεις του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και τα ιδιαίτερα κυτταρικά και μοριακά χαρακτηριστικά του καθ'όλη την έκταση της νόσου [322].

5.2 Κατηγορίες TILs και οι λειτουργίες τους

5.2.1 Κυτταροτοξικά CD8+ λεμφοκύτταρα

Τα κυτταροτοξικά CD8+ λεμφοκύτταρα, αποτελούν τα πιο ισχυρά κύτταρα της ανοσολογικής απόκρισης ενάντια στα νεοπλασματικά κύτταρα, καθώς μπορούν να τα αναγνωρίζουν και να τα εξουδετερώνουν, ενώ μπορούν να μετατοπιστούν στις περιοχές όπου υπάρχει ανάγκη κυτταροτοξικής ανοσιακής απόκρισης [324].

Τα CD8⁺ λεμφοκύτταρα, αλληλεπιδρούν με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης 1 (major histocompatibility complex class-I, MHC-1) στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (antigen-presenting cells (APCs) και των κυττάρων στόχων [327], τα οποία εκθέτουν τμήματα των αντιγονικών πεπτιδίων, παραγόμενα από την ενδοκυττάρια αποδόμηση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Τα συμπλέγματα MHC-1 και αντιγονικών πεπτιδίων, αναγνωρίζονται από τα CD8+ κύτταρα, τα οποία, συνδέονται με το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο ή το κύτταρο στόχο (εν προκειμένω το καρκινικό κύτταρο), και εξετάζουν την επιφάνεια του εξ επαφής. Η άμεση διακυττάρια επαφή και οι σχετικές κινήσεις των κυττάρων, οδηγούν στην παραγωγή βιομηχανικών σημάτων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των συμπλεγμάτων των υποδοχέων των Τ λεμφοκυττάρων (CD8⁺ T-cell receptor (TCR) complex) [328]. Υπό την επίδραση των χημειοκινών και των ιντεγκρινών που εντοπίζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τα νεοπλασματικά κύτταρα-στόχους, τα ενεργοποιημένα πλέον CD8+ Τ λεμφοκύτταρα δημιουργούν ανοσολογικές συνάψεις με τα νεοπλασματικά, μέσω μοριακών υποδοχέων που φέρουν στην επιφάνεια τους, οι οποίοι συνδέονται με αντίστοιχους υποδοχείς επιφάνειας των καρκινικών Τ λεμφοκυττάρων [329]. Κατά την επιβεβαίωση του στόχου, διενεργείται σύνδεση μεταξύ των TCR και CD8 μορίων στην επιφάνεια του κυτταροτοξικού Τ λεμφοκυττάρου με το αναγνωριζόμενο αντιγονικό πεπτίδιο και την υπομονάδα άλφα του συμπλέγματος MHC (MHC-α subunit), στην επιφάνεια του νεοπλασματικού κυττάρου αντίστοιχα. Εν συνεχεία, ένα επικουρικό συνεργικό ενεργοποιητικό σήμα από τον CD28 υποδοχέα, επάγει την ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκυττάρου.

Η σύνδεση του υποδοχέα TCRαβ με το αντιγονικό πεπτίδιο που εκτίθεται στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου, προσδεδεμένο στο MHC-1 σύμπλεγμα, οδηγεί στη φωσφορυλίωση των τυροσινικών τμημάτων των συνδεδεμένων με το TCR ενδοκυττάρων δομών, με αποτέλεσμα την αναμετάδοση του ενεργοποιητικού σήματος στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα του κυττάρου [330]. Το μόριο CD8, ως ομοδιμερές α υπομονάδων ή ετεροδιμερές αβ υπομονάδων, συνδέεται με το σύμπλεγμα TCR-MHC-1 για να εξασφαλίσει την σύνδεση μεταξύ του συμπλέγματος TCR-CD3 με το σύμπλεγμα MHC-1- πεπτιδίου, και μπορεί να εκατονταπλασιάσει την ευαισθησία στο σύμπλεγμα πεπτιδίου-MHC-1 [331]. Το CD8 μόριο προσδένεται στην α3 υπομονάδα του MHC, η

οποία είναι διακριτή από τις $\alpha 1$, $\alpha 2$ υπομονάδες όπου συνδέεται το σύμπλεγμα TCR, δίνοντας τη δυνατότητα στους TCR λεμφοκυτταρικούς υποδοχείς για αλληλεδράσεις ανεξάρτητες του CD8 μορίου [332,333].

Ο ενεργοποιητικός μηχανισμός για τη δημιουργία του συμπλέγματος CD8+ TCR δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Το εξωκυττάριο τμήμα του TCR, αποτελεί το τμήμα στο οποίο προσδένεται το αντιγόνο, ενώ το ενδοκυττάριο τμήμα συνδέεται με τις σηματοδοτικές υπομονάδες του CD3 (ζ , CD3δε and CD3γε). Τα πολυπεπτίδια CD3 γ , δ , ϵ και ζ , απαρτίζονται από ενδοκυττάριας τυροσινικές δομές, των οποίων η φωσφορυλίωση επάγει ενεργοποιητικά σήματα [334]. Τόσο η α , όσο και η β εξωκυττάρια υπομονάδα του TCR, περιέχουν έναν τομέα V, με δομή παρόμοια με των ανοσοσφαιρινών, από την οποία εξαρτάται η εξειδικευμένη αναγνώριση των αντιγόνων, και μια σταθερή μονάδα (C domain), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική απόληξη η οποία δεν περιέχει σηματοδοτικές δομές. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση μεσολαβείται από το CD3 σύμπλεγμα, αλλά προϋποθέτει τη σύνδεση του CD8 με το MHC για την έναρξη της μετάδοσης του ενεργοποιητικού σήματος και εντατικοποίησής του. Η πρωτεΐνη CD45 είναι μια από τις πλέον συχνά εντοπιζόμενες στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων, και δρα σαν θετικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του TCR, μέσω της αποφωσφορυλίωσης και της επακόλουθης ενεργοποίησης της κινάσης Lck, μέσω του ενδοκυττάριας τομέα της τυροσινικής φωσφατάσης. Η Lck κινάση, μπορεί στη συνέχεια να φωσφορυλιώσει το CD3 και τις αλυσίδες ζ , επάγοντας το ενδοκυττάριο σήμα ενεργοποίησης του κυττάρου [335].

Οι CD28 υποδοχείς της επιφάνειας των CD8+ T λεμφοκυττάρων, με τους υποδοχείς CD80/B7.1 ή CD86/B7.2, οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, των μακροφάγων και των ενεργοποιημένων B λεμφοκυττάρων, και διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ευαισθησία των CD8+ T λεμφοκυττάρων, καθώς μειώνει τον ουδό ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και έκκρισης κυτταροκινών, ιδίως της IL-2 [336]. Κατά την ενεργοποίηση του CD28 υποδοχέα, τα τυροσινικά ενδοκυττάρια τμήματα του φωσφορυλιώνονται, με αποτέλεσμα την πρόσδεση της phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), και της επακόλουθης ενεργοποίησης των ενδοκυττάριας μονοπατιών protein kinase B (PKB/Akt) και nuclear factor- κ B (NF- κ B), που οδηγούν στην ενεργοποίηση και αυξημένη επιβίωση του T λεμφοκυττάρου, με τελικό αποτέλεσμα την κυτταροτοξική του δράση.

Οι αλληλεπιδράσεις του CD8+ T-λεμφοκυττάρου με το κύτταρο στόχο, χαρακτηρίζονται από την διαρκή επαφή του με το κύτταρο-στόχο. Η μηχανική ενέργεια από την κίνηση του κυτταροτοξικού T-λεμφοκυττάρου, επί του κυττάρου στόχου οδηγεί σε απελευθέρωση κυτταροτοξικών κοκκίων τα οποία περιέχουν κοκκιοένζυμα, περφορίνη, καθεψίνη, κοκκιολυσίνη, τα οποία ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη [337]. Εναλλακτικά, τα λυτικά ένζυμα και η περφορίνη ενδοκυτταρώνονται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, διαπερνούν την μεμβράνη του ενδοσώματος και εν συνεχεία απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχου [338].

Επιπλέον, ο συνδέτης Fas (Fas ligand, FASL) εκφράζεται στην επιφάνεια των CD8⁺ T κυττάρων και η πρόσδεσή του με τους αντίστοιχους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων, ενεργοποιεί τα σχετιζόμενα με το μόριο Fas μοριακά μοτίβα θανάτου (Fas-associated protein with death domains, FADD), τα οποία ενεργοποιούν ενδοκυττάριας κασπάσες και ενδονουκλεάσες, που με τη σειρά τους πραγματοποιούν τον κατακερματισμό του DNA του κυττάρου-στόχου [339].

Τα κυτταροτοξικά CD8+ λεμφοκύτταρα αξιολογούνται ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες σε ποικίλους όγκους, ενώ υπάρχουν μέθοδοι αξιολόγησης της ανοσολογικής υπογραφής (immune signature) κάθε

όγκου, η οποία δύναται να παρέχει αξιόλογες πληροφορίες για την πορεία της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία[340].

Η συγκέντρωση και η *in situ* εντόπιση των κυτταροτοξικών CD8+ T-λεμφοκυττάρων, μεταξύ των TILs, έχει καίρια σημασία στην ανάπτυξη τοπικής αντικαρκινικής κυτταροτοξικής δραστηριότητας. Υπάρχουν μέθοδοι ανεύρεσης και αξιολόγησης των CD8+ T λεμφοκυττάρων, οι οποίες θα αναλυθούν περαιτέρω στη συνέχεια.

5.2.2 Διέξοδοι διαφυγής από την κυτταροτοξική ανοσία

Τα νεοπλασματικά κύτταρα, μπορούν να αναπτύξουν μεθόδους διαφυγής από το ανοσοποιητικό με ποικίλους τρόπους:

- Μείωση της επιφανειακής έκφρασης των μορίων MHC, με αποτέλεσμα μείωση της έκθεσης των νεοπλασματικών αντιγόνων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού [341].

- Έκκριση ενζύμων που απενεργοποιούν την περφορίνη [341].

- Έκφραση υποδοχέων που απενεργοποιούν άμεσα τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα: Στην επιφάνεια των κυτταροτοξικών CD8+ T- λεμφοκυττάρων, εκφράζονται ανοσοκατασταλτικοί υποδοχείς, οι οποίοι λειτουργούν ως ρυθμιστές της λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων, ούτως ώστε τα τελευταία να μην καταστρέφουν ανεγξέλεγκτα υγιείς ιστούς, δημιουργώντας αυτοάνοσα νοσήματα. Οι ανοσοκατασταλτικοί αυτοί υποδοχείς, γνωστοί ως σημεία ανοσοορρολογικού ελέγχου (immune checkpoints), εκφράζονται παροδικά από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, και εξυπηρετούν την επιλεκτική απενεργοποίηση τους, εν μέσω της πληθώρας εισερχόμενων σημάτων [341,342].

- ανάπτυξη κολλαγόνου από ινοβλάστες: Σε κλινική μελέτη ασθενών με περιτοναϊκές, πνευμονικές και ηπατικές μεταστάσεις από καρκίνο παχέος εντέρου, διαπιστώθηκε μειωμένη λεμφοκυτταρική διήθηση από CD3 και CD8+ T-λεμφοκύτταρα στις περιτοναϊκές δευτεροπαθείς εντοπίσεις, σε σχέση με τις ηπατικές/πνευμονικές μεταστάσεις. Παράλληλα, στις περιτοναϊκές εμφυτεύσεις διαπιστώθηκε υψηλή εναπόθεση ινών κολλαγόνου, και θετική έκφραση του ινοβλαστικού δείκτη α-SMA (smooth muscle actin), στην οποία αποδόθηκε από τους ερευνητές η μειωμένη διείσδυση των T-λεμφοκυττάρων, σε σχέση με τις έτερες σπλαγχνικές εντοπίσεις [343].

Φαίνεται ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα, μπορούν να καταστείλουν τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, εκμεταλλευόμενα αυτά ακριβώς τα σημεία ανοσοορρολογικού ελέγχου [344,345]. Συγκεκριμένα, τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς όπως ο PD-L1 (Programmed Death Ligand 1), ο οποίος κατά τη σύνδεσή του με το αντίστοιχο μόριο-σημείο ανοσοορρολογικού ελέγχου PD-1 (Programmed Death receptor, CD279), στην επιφάνεια των T- λεμφοκυττάρων, απενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των τελευταίων, αναστέλλει την ενεργοποίησή τους και επάγει τη διαδικασία απόπτωσης [346]. Τα τελευταία χρόνια ανακαλύπτονται πολλοί τέτοιοι υποδοχείς, όπως οι lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), T-cell immunoglobulin, mucin domain-3 (TIM-3), T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) και ο inducible T-cell co-stimulatory receptor (ICOS). Τα μόρια αυτά έχουν αξιολογηθεί ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί δείκτες, όπως και ως στόχοι των ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων τα τελευταία έτη [347-350].

-Εξάντληση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων: Η διαρκής έκθεση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων στα νεοαντιγόνα των όγκων, μπορεί να επάγει την εμμένουσα έκφραση των ανοσολογικών σημείων ελέγχου, που δρουν ως αναστολείς της έκπτυξης των T-λεμφοκυττάρων, χωρίς η απομάκρυνση του αντιγόνου να δύναται να αναιρέσει την λεμφοκυτταρική καταστολή. Η έκθεση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων σε αντιγόνα για κάποιες εβδομάδες, μπορεί να επάγει την έκθεση του CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte Associated protein-4), στην επιφάνεια των κυττάρων, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα «εξαντλημένα» T-λεμφοκύτταρα, διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, παράγοντας επιπλέον ανενεργά T-λεμφοκύτταρα τα οποία απαρτίζουν ένα ανοσολογικά ανενεργό-ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον [351,352].

5.2.3 CD4+ T-λεμφοκύτταρα

Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα μπορούν να ασκήσουν πολλές αντινεοπλασματικές λειτουργίες: δρουν ως βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T helper cells, Th) ενεργοποιώντας τα CD8+ κατ'εξοχήν κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, μπορούν καθ'αυτά να επιτελέσουν κυτταροτοξική λειτουργία εφόσον τα κύτταρα-στόχοι εκφράζουν μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC-II), να προσελκύσουν μακροφάγα με αντινεοπλασματική δράση και να αναστείλουν την αγγειογένεση του νεοπλάσματος [325]. Υπάρχουν 3 τύποι CD4+ T βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, που προέρχονται από τη διαφοροποίηση του πρώιμου, αδιαφοροποίητου CD4+ T-λεμφοκυτταρου [353]:

- Τύπος 1: περιλαμβάνουν τα Th1 κύτταρα: παράγουν IFN- γ και εκφράζουν το γονίδιο T-bet

-Τύπος 2: περιλαμβάνουν τα Th2 κύτταρα, που παράγουν ιντερλευκίνες IL-4, IL-5, IL-13 και εκφράζουν το γονίδιο GATA-3, καθώς και τα Th9 που παράγουν IL-9 και εκφράζουν το μόριο PU 1.

-Τύπος 3: περιλαμβάνουν τα Th17 κύτταρα: παράγουν ιντερλευκίνες IL-17A, IL-17F, IL-22 και εκφράζουν το ROR γ t, καθώς και τα Th22 που χαρακτηρίζονται από παραγωγή της IL-22.

Άλλες σημαντικές κατηγορίες είναι τα Tfh κύτταρα: παράγουν IL-21 και εκφράζουν BCL6 και τα ρυθμιστικά κύτταρα: παράγουν TGF- β και εκφράζουν FOXP3.

Η διαφοροποίηση των CD4+ T λεμφοκυττάρων σε υποκατηγορίες, σηματοδοτείται από συνδυασμό μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, χαρακτηριστικών για την κάθε κατηγορία. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να συνεχίζουν να επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του κυττάρου ακόμα και μετά την αρχική διαφοροποίησή του, προσδίδοντας στο κύτταρο δυνατότητα επαναπρογραμματισμού της λειτουργίας του. Επιπλέον πλαστικότητα των βοηθητικών κυττάρων επιτυγχάνεται από τη ρύθμιση της μετάφρασης των μεταγραφόμενων γονιδίων μέσω micro-mRNAs και άλλων μη κωδικοποιών mRNAs [354-356].

Τα βοηθητικά CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα (CD4+ helper cells, Th cells) παίζουν κομβικό ρόλο σε όλες τις πτυχές της ανοσολογικής απάντησης, καθώς πολλαπλασιάζονται και παράλληλα διαφοροποιούνται προς διάφορες υποκατηγορίες με διακριτή, εξειδικευμένη λειτουργία [357]. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα δενδριτικά, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και την εξειδίκευση τους [358].

Τα ενεργοποιημένα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, προάγουν την περεταίρω ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, και την παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν την επαρκή και διαρκή ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα κυτταροτοξικής δράσης [357].

Ορισμένα πολλαπλασιαζόμενα T-λεμφοκύτταρα, με την προς τα άνω ρύθμιση της έκφρασης του μορίου CXCR5, μετατοπίζονται στα λεμφοζίδια των B-λεμφοκυττάρων, και, κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα εξειδικευμένα B-λεμφοκύτταρα, διαφοροποιούνται προς λεμφοζιδιακά βοηθητικά λεμφοκύτταρα του λεμφοζιδιακού βλαστικού κέντρου, όπου τροφοδοτούν και υποστηρίζουν την ενεργοποίηση και την επιλογή των κλώνων B-λεμφοκυττάρων με τη μεγαλύτερη δυνατότητα παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια με τα αντιγόνα-στόχους [359]. Υπάρχει, ωστόσο και η δυνατότητα των βοηθητικών CD4+ T-λεμφοκυττάρων, να εισαχθούν στην συστηματική κυκλοφορία και να εξαγγειωθούν στους ιστούς, όπου, κατά την αναγνώριση αντιγονικού στόχου, παράγουν κυτταροκίνες που βοηθούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού να ενεργοποιηθούν για να ξεκινήσει η ανοσολογική απόκριση. Οι πολλαπλές δυνατότητες των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, εξυπηρετεί την αναγνώριση των αντιγονικών στόχων αλλά και τη χημειοταξία των κυττάρων του ανοσοποιητικού στους ιστούς όπου χρειάζονται.

Οι διαφορετικές κατηγορίες των βοηθητικών CD4+ T-λεμφοκυττάρων, εκφράζουν διαφορετικούς επιφανειακούς δείκτες, οι οποίοι κατευθύνουν και την χημειοταξία και εξαγγείωση των κυττάρων αυτών στις ιστικές περιχές όπου χρειάζονται και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Τα CCR7⁺/CD62L⁺ CD4⁺ T λεμφοκύτταρα κεντρικής μνήμης (T central memory cells, Tcm) είναι λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα μνήμης, που μαζί με τα CD4⁺ T stem cell-like memory (Tscm) κύτταρα, επανακυκλοφορούν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα έχοντας τη υψηλό δυναμικό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επανενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης [360-362]. Τα CCR7⁻/CD62L⁻ CD4⁺ T κύτταρα μνήμης (effector memory Tem cells), χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό διαφοροποίησης και μεταναστεύουν ταχέως στους ιστούς, όπου μαζί με τα ιστικά κύτταρα μνήμης, επάγουν μια ταχεία και αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση [363,364].

Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους τα CD4+ λεμφοκύτταρα ασκούν τις αντινεοπλασματικές τους ιδιότητες, παραμένουν υπό διερεύνηση. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα δεν εκφράζουν υποδοχείς του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC-II), με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αναγνωριστούν άμεσα από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα, παρά μόνο έμμεσα από την διασταυρούμενη παρουσίαση αντιγόνων του καρκίνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του στρώματος. Τα τελευταία, φαγοκυτταρώνουν κύτταρα του όγκου ή τμήματά τους, όπως κυστίδια, και τα εκθέτουν στην επιφάνειά τους δεσμευμένα στα μόρια του MHC-II, οπότε καθίστανται αναγνωρίσιμα για τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα [365]. Στους περισσότερους συμπαγείς όγκους, η έκφραση των μορίων του MHC-II είναι περισσότερο έντονη στα τοπικά ιστικά μακροφάγα, επηρεάζοντας, αναλόγως του βαθμού της έκφρασης, τη λειτουργικότητα των CD4+ λεμφοκυττάρων.

Οι αντινεοπλασματικές λειτουργίες των CD4+ T-Λεμφοκυττάρων, περιλαμβάνουν:

1. CD4+ T μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα: Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, αναγνωρίζουν και ασκούν κυτταροτοξική επίδραση σε καρκινικά κύτταρα, μέσω παραγωγής TNF, IFN-γ και κοκκιοενζύμου B. Απαραίτητη προϋπόθεση για την άσκηση αυτής της άμεσης κυτταροτοξικότητας είναι η έκφραση των μορίων MHC-II, στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων [366,367].

2. Ενεργοποίηση των μακροφάγων έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων: Τα βοηθητικά CD4+ T-λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν άμεσα με τα μακροφάγα, μέσω της σύνδεσης του συνδέτη του υποδοχέα CD40 (CD40L, CD40 Ligand), που φέρουν στην επιφάνεια τους, με τον υποδοχέα CD40 στην επιφάνεια των μακροφάγων. Όπως και τα CD8+ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς TCR (T cell Receptor), οι οποίοι συνδέονται με το σύμπλεγμα των μορίων του MHC-II, με φαγοκυτταρωμένα από το μακροφάγο καρκινικά αντιγόνα, που εκτίθενται επί της επιφάνειας των μακροφάγων. Το μόριο CD4+ φαίνεται ότι διασφαλίζει τη σταθερότητα αυτής της σύνδεσης. Με αυτόν τον τρόπο, κινητοποιείται το σύστημα της συνθετάσης του νιτρικού οξέος (nitric oxide synthetase, iNOS) και παράγεται μονοξείδιο του αζώτου (NO) που επάγει τον κυτταρικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα [368,369].
3. Η έκκριση IFN-γ και TNF-α, από το CD4+ βοηθητικό κύτταρο κατά την αλληλεπίδραση του με τα μακροφάγα, οδηγεί σε αποδιοργάνωση της αγγειογένεσης που τροφοδοτεί τον όγκο[370].
4. Η έκκριση IFN-γ και TNF-α αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει τη γήρανση των νεοπλασματικών κυττάρων[382].

Συνεργασία με τα κυτταροτοξικά CD8+ T-λεμφοκύτταρα: Τα βοηθητικά CD4+ T-λεμφοκύτταρα, αναγνωρίζουν αντιγόνα εκτιθέμενα από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και μεσολαβούν την επιστράτευση κυτταροτοξικών CD8+ T-λεμφοκυττάρων εξειδικευμένων για τον αντιγονικό στόχο [359]. Επιπλέον, η συνεργική δράση CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων, ενισχύει περαιτέρω την αντινεοπλασματική ανοσολογική απόκριση. Υπάρχουν ενδείξεις όταν τα καρκινικά κύτταρα δεν εκφράζουν τόσο αντιγόνα αναγνωριζόμενα από τα CD4, όσο και από τα CD8 T-λεμφοκύτταρα, δεν είναι δυνατή η επαγωγή της κυτταροτοξικότητας. Επίσης φαίνεται ότι πολυκλωνικά CD4+ T-λεμφοκύτταρα, μπορούν να αποτρέψουν τη διαφυγή από την ανοσοεπιτήρηση καρκινικών κυττάρων που έχουν μειώσει την έκφραση των καρκινικών αντιγόνων προκειμένου να μη γίνονται αντιληπτά, μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης με εναπομείναντα εκφραζόμενα αντιγόνα [373-375].

5.2.4 Κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα (*regulatory T lymphocytes, Tregs*)

Τα ανοσορρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα αποτελούν μια κατηγορία T κυττάρων, προορισμένα να δρουν ως ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης, με χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ [376-378]. Αν και υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για ανοσορρυθμιστικά CD8+ T-λεμφοκύτταρα, τα οποία δεν έχουν προσδιοριστεί επαρκώς [378,379]. Τα κύτταρα αυτά, μπορούν να καταστέλλουν ποικιλία ανοσολογικών κυττάρων, όπως κυτταροτοξικά και βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, NK, B-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα [382].

Η λειτουργία των Tregs είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης με σκοπό την αποφυγή της αυτοάνοσης καταστροφής κυττάρων του οργανισμού. Ιδιαίτερα, η έκφραση του κομβικού μεταγραφικού παράγοντα FOXP3 (forkhead box P3) παίζει καίριο ρόλο για την διαφοροποίηση και τη λειτουργία των Tregs, καθώς και την έκκριση κατασταλτικών κυττοκινών και την έκφραση των ανοσοκατασταλτικών μορίων στην κυτταρική επιφάνεια [380-382].

Τα Tregs καταστέλλουν την ανοσολογική απόκριση χρησιμοποιώντας μια ποικιλία μηχανισμών, μέσω επαφής με τα ανοσολογικά κύτταρα στόχους ή και χωρίς άμεση επαφή με αυτά[383,384]. Εκφράζουν υψηλά επίπεδα του

CTLA-4 [385], με αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των T και B λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του CTLA-4 φαίνεται να επηρεάζει και τη λειτουργία των δένδριτικών κυττάρων, μετατρέποντάς τα σε ανοσοκατασταλτικά, μέσω της αυξημένης έκφρασης της 2,3-διοξυγενάσης της ινδολεαμίνης (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO), η οποία οδηγεί σε έλλειψη τρυπτοφάνης και απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων [386-389].

Τα Tregs επίσης εκφράζουν σε υψηλό επίπεδο υποδοχείς της IL-2 (CD25, CD122, και C132), δεσμεύοντας την και αναστέλλοντας την εξαρτώμενη από την IL-2 ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των T και NK κυττάρων [390-392].

Τα Tregs δεσμεύουν τον παράγοντα TGF- β στην επιφάνειά τους, καταστέλλοντας τα T λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα και τα δένδριτικά κύτταρα, διατηρώντας παράλληλα την θετική ανατροφοδότηση των ανοσοκατασταλτικών FOXP3+ T κυττάρων [393-395]. Η έκκριση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων όπως οι ιντερλευκίνες IL-10 και IL-35, από τα Tregs είναι ακόμη ένας μηχανισμός καταστολής των T κυττάρων [396,397].

Επίσης, τα Tregs δύνανται να μειώνουν την αντιγονοπαρουσίαση, τη διάσπαση του εξωκυττάρου ATP και να διαταράσσουν τη μεταβολική ισορροπία των κυττάρων-στόχων [398-401].

Τα Tregs εκφράζουν ανοσοκατασταλτικά μόρια στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα άμεση ανοσοκαταστολή των T λεμφοκυττάρων, μέσω της αλληλεπίδρασης των μορίων lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-MHC-II, ICOS)-ICOS ligand (ICOSL), PD-1/PD-L1 [402]. Η λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων επηρεάζεται αρνητικά από την πρόσδεση του CTLA-4 μορίου που εκφράζεται επί των Tregs, που οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των ενεργοποιητικών υποδοχέων CD80/86 [403].

Στους συμπαγείς όγκους, ενδέχεται τα CD4⁺FOXP3⁺ T λεμφοκύτταρα μπορεί να διηθούν τον όγκο, και να καταστέλλουν τα κυτταροτοξικά κύτταρα, μεταναστεύοντας προς τα σημεία ανάπτυξης του όγκου. Συνεπώς, η καταστολή των Tregs του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, αναζωογονεί τα κυτταροτοξικά και τα βοηθητικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα ενίσχυση της αντινεοπλασματικής τους δράσης [404-407].

Τα Tregs μπορούν να εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία των πασχόντων αλλά και να διεισδύουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπου μπορεί να αποτελούν 10-50% των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων των όγκων. Έχει βρεθεί ότι η αναστολή της δράσης τους με χορήγηση αντι-CD25 μονοκλωνικών αντισωμάτων, μειώνει την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλα ποντικών. Στον άνθρωπο, υψηλή αναλογία Tregs κυττάρων προς τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στο μελάνωμα και στο γαστρικό καρκίνο [408-411]. Πράγματι, τα Tregs έχουν καίρια θέση στο μικροπεριβάλλον του όγκου καταστέλλοντας την τοπική ανοσολογική απόκριση, και ευοδώνοντας την ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων, ενώ η παρουσία τους μεταξύ των διηθούσων τον όγκο λεμφοκυττάρων, επιβαρύνει την πρόγνωση και σχετίζεται με βραχύτερο διάστημα συνολικής επιβίωσης [412-414].

Η ικανότητα των Tregs να εξαγγειώνονται στους ιστούς φαίνεται να καθορίζεται από υποδοχείς χημειοκινών στην επιφάνειά τους, όπως ο CXCR5 στα Tregs που προέρχονται από λεμφαδένες ασθενών με καρκίνο πνεύμονα. Το μοτίβο C-C των υποδοχέων χημειοκινών CCR4 με την χημειοκίνη CCL12, CCR4 με CCL17, CCR10 με CCL28, και CXCR4 με CXCL1 έχουν περιγραφεί ως ζεύγη υποδοχέων Tregs και των αντίστοιχων συνδετών- χημειοκινών [415].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία των Tregs δεν εξασφαλίζει πάντα ένα ανοσοκατεσταλμένο περιβάλλον για τη νεοπλασματική ανάπτυξη. Έχει παρατηρηθεί πως τα Tregs με χαμηλή έκφραση του FOXP3 παράγοντα, των οποίων η παρουσία σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση, σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο. Επομένως, ειδικά σε ασθενείς με μεγάλο πληθυσμό Tregs, η αξιολόγηση πρέπει να περιλαμβάνει σε εκτίμηση του πληθυσμού των κυττάρων που εκφράζουν σε χαμηλό/υψηλό ποσοστό τον FOXP3, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των αληθώς ανοσοκατασταλτικών κυττάρων στην έκβαση του ασθενούς [411].

5.3 Αξιολόγηση των TILs στην κλινική έρευνα

5.3.1 Τα TILs στον κολο-ορθικό καρκίνο

Τα TILs έχουν συνδεθεί με την αυξημένη τοπική ανοσολογική απόκριση εναντίον του νεοπλάσματος και η καταμέτρηση των κυτταροτοξικών CD8+ και FOXP3 ανοσοκατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων κυττάρων έχει αποτελέσει κριτήριο αξιολόγησης της τοπικής ανοσολογικής απόκρισης, κατά την εφαρμογή θεραπείας. Σε πρόσφατη κλινική μελέτη φάσης I/II, πραγματοποιήθηκε ενδοσκοπική ενδο-ογκική χορήγηση εμβολίου της γρίπης, σε ασθενείς με εξαιρεσίμο κολο-ορθικό καρκίνο, σταδίου I ως III, ως νεοεπικουρική θεραπεία. Κατά την ιστολογική εξέταση των χειρουργικών παρασκευασμάτων, διαπιστώθηκε αύξηση του πληθυσμού των CD8+TILs, (διάμεση τιμή 73 έναντι 315 κύτταρα/mm², $p < 0.05$), παράλληλα με στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του δείκτη FOXP3 που σηματοδοτεί τα Tregs, ενώ αυξήθηκε επίσης η μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταροτοξική επίδραση των λεμφοκυττάρων [416].

Σε έτερη πρόσφατη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους, 17% των οποίων έπασχαν από κολο-ορθικό καρκίνο, εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1(INCAGN01949) με ικανότητα πρόσδεσης στο λεμφοκυτταρικό υποδοχέα OX40. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας εκφράζεται στα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, παρέχοντας ένα συνεργικό σήμα ενεργοποίησής τους, ενώ μπορεί να εκφράζεται και στα Tregs. Στόχος της χορήγησης του αντισώματος, ήταν αφενός η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και η μεσολαβούμενη από το σταθερό τμήμα του FCγ καταστολή των Tregs. Αν και η θεραπεία έγινε καλώς ανεκτή, δεν σημειώθηκε αύξηση κυτταροτοξικών TILs, ούτε μείωση της διήθησης του όγκου από Tregs, ενώ αμετάβλητος παρέμεινε και ο αριθμός κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων, τόσο κυτταροτοξικών όσο και ανοσοκατασταλτικών [417].

Τα CD8+ TILs, έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέτρο αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των αντινεοπλασματικών εμβολίων. Πρόσφατα, το πεπτιδικό εμβόλιο PolyPEPI1018, αποτελούμενο από 7 σχετιζόμενα με τον όγκο αντιγόνα, που εκφράζονται στον κολο-ορθικό καρκίνο χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, οδήγησε σε αύξηση των TILs στις ηπατικές μεταστάσεις 3 από τους 4 εξεταζόμενους ασθενείς, καθώς και αύξηση της έκφρασης των ανοσολογικών γονιδιακών σετ [418].

Φαίνεται ότι η χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας μπορεί να μεταβάλλει δυναμικά την σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, σε ότι αφορά τα TILs. Στη μελέτη MIROX, δείγματα από πρωτοπαθείς και μεταστατικές εστίες ασθενών με MSS stable/ MMR proficient καρκίνο παχέος εντέρου, με εξαιρεσίμη, ολιγομεταστατική νόσο, η οποιοί έλαβαν επικουρική ή περιεγχειρητική θεραπεία με FOLFOX. Η έκφραση των δεικτών CD8 και PD-L1 ήταν αυξημένη στις μεταστατικές εστίες μετά τη νεοεπικουρική χρήση FOLFOX. Στους ασθενείς με νεοεπικουρική χορήγηση FOLFOX, οι εξαιρεθείσες μεταστατικές εστίες ήταν έντονα θετικές για το δείκτη CD3 στη γραμμή διήθησης του όγκου (28.2% αντί 14.7%), μέτρια προς έντονα θετικές για το CD3 στο

στρώμα του όγκου (47.5% αντί 32.4%), και μέτρια προς έντονα θετικές για το δείκτη CD8 στη γραμμή διήθησης του όγκου (41.1% αντί 21.2%) σε σύγκριση με τις εξαιρεθείσες εστίες ασθενών που δεν είχαν λάβει χημειοθεραπεία προ του χειρουργείου. Η χρώση για το δείκτη των Tregs FOXP3 βρέθηκε ασθενής και ιδιαίτερα μειωμένη στη γραμμή διήθησης του όγκου κατόπιν της έκθεσης των ασθενών σε χημειοθεραπεία, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P = 0.0010$). Το 21% των ασθενών που δεν είχαν εκτεθεί σε χημειοθεραπεία προ του χειρουργείου (7/33), είχαν υψηλό δείκτη CD8 και υψηλή έκφραση του PD-L1, ενώ το ίδιο συνέβαινε σε 34% των ασθενών (13/38) που είχαν λάβει προεγχειρητικά FOLFOX. Η αυξημένη παρουσία του CD3 στις μεταστάσεις, σχετίστηκε με καλύτερο DFS, όπως και η υψηλότερη έκφραση του PD-L1, σε ασθενείς με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της μελέτης[419].

Σε μελέτη φάσης Ib, δοκιμάστηκε η χορήγηση του TAS-116, ενός αναστολέα της Heat shock protein 90, σε συνδυασμό με το nivolumab. Από τη μελέτη των ιστικών δειγμάτων δεν προέκυψε μείωση του ποσοστού των ανοσοκατασταλτικών Tregs, που βρίσκονταν ανάμεσα στα TILs του όγκου. Υπήρξε όμως μείωση της έκφρασης του CTLA-4 από τα Tregs της περιοχής του όγκου, επομένως η χορήγηση της θεραπείας ενδέχεται να καθιστά τα Tregs που διηθούν τον όγκο λιγότερο ανοσοκατασταλτικά [420].

Στη μελέτη REGOMUNE, αξιολογήθηκε η συγχορήγηση του regorafenib με τον αντι-PD-L1 παράγοντα avelumab, παρατηρήθηκε συσχέτιση της αύξησης των CD8+ στα TILs με στατιστικά σημαντικό μεγαλύτερο PFS(3.7 vs 2.3 months, $P = 0.035$) και OS (not reached vs 4.3 months, $P = 0.03$) σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δε σημειώθηκε αύξηση. Αντίθετα, η αυξημένη παρουσία M2 μακροφάγων ανάμεσα στα TILs, φάνηκε να σχετίζεται με χειρότερη έκβαση όσον αφορά το PFS και το OS των ασθενών υπό θεραπεία[420].

Ο β αναστολέας προπρανολόλη, έχει επίσης βρεθεί να επηρεάζει τον πληθυσμό των CD8+ T-λεμφοκυττάρων ανάμεσα στα TILs τόσο ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου όσο και σε μοντέλα ποντικών με καρκίνο παχέος εντέρου, με παράλληλη αύξηση του κοκκιοενζύμου B και της IFN- γ σε δείγματα βιοψιών [421].

Έχει περιγραφεί φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κατηγοριών των ανοσοκατασταλτικών Tregs σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, στον ιστό και στην περιφερική κυκλοφορία των ασθενών, και σύγκριση με υγιείς ιστούς. Φαίνεται ότι τα CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺ T κατασταλτικά κύτταρα, αντιπροσωπεύονται ισχυρά στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Τα CD4⁺ TILs, εκφράζουν σε υψηλό βαθμό τους δείκτες: death protein-1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4), T cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3) και lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3). Οι δείκτες CTLA-4, TIM-3, και LAG-3 εκφράζονται κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων FoxP3⁺Helios⁺ Tregs του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Τα FoxP3^{high} Tregs εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα των δεικτών Helios, CTLA-4 και TIM-3 σε σχέση με τα Tregs με χαμηλή έκφραση FOXP3 (FoxP3^{low})[422].

Σε ανάλυση βιοψιών ασθενών με εξαιρεθέντα κολο-ορθικό καρκίνο από τις μελέτες QUASAR2 και VICTOR, διαπιστώθηκε η σημασία της παρουσίας των CD8+ λεμφοκυττάρων ανάμεσα στα TILs για την πιθανότητα υποτροπής της νόσου. Το ποσοστό CD8⁺ λεμφοκυττάρων εντός του όγκου φάνηκε να σχετίζεται ισχυρότερα με την πρόγνωση του ασθενούς από την παρουσία των CD3+ κυττάρων. Η αυξημένη συγκέντρωση των CD8+ T λεμφοκυττάρων, σχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα υποτροπής ανεξαρτήτως παραγόντων όπως mismatch repair deficiency, μεταλλάξεις της DNA πολυμεράσης POLE, χρωμοσωμική αστάθεια(για κάθε διπλασιασμό της συγκέντρωσης των κυττάρων, HR = 0.92, 95%CI = 0.87-0.97, $P = 3.6 \times 10^{-3}$). Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή ήταν απύσχα/μη στατιστικά σημαντική στους ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και νόσο T3, μέτρια στους ασθενείς

με T4 πρωτοπαθή νόσο ή θετικούς λεμφαδένες, και ισχυρή μόνο στους ασθενείς με νόσο T4 και θετικούς λεμφαδένες. Επομένως, η πυκνότητα των CD8+ λεμφοκυττάρων μειώνει την πιθανότητα υποτροπής ιδίως στους ασθενείς με μέτριο προς υψηλό κίνδυνο υποτροπής του εξαιρεθέντος αδενοκαρκινώματος [423].

Η παρουσία CD8+ λεμφοκυττάρων ανάμεσα στα TILs έχει βρεθεί να σχετίζεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, ενώ η νεοεπικουρική χημειο-ακτινοθεραπεία έχει φανεί να επάγει τη διήθηση των όγκων από CD8+ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα [424,425]. Ειδικά τα εκφράζοντα τον υποδοχέα χημειοκινών CCR7, CD8 λεμφοκύτταρα έχουν συσχετιστεί με αυξημένη επιβίωση των ασθενών υπό θεραπεία πρώτης γραμμής[426]. Σε ασθενείς με εξαιρεθέν καρκίνωμα παχέος εντέρου, η αναλογία CD8 προς τα FOXP3 Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου, φαίνεται να επηρεάζει την πιθανότητα υποτροπής των ασθενών και τη συνολική τους επιβίωση, ενώ χαμηλό ποσοστό CD8 με σχετική αύξηση FOXP3 Tregs σχετίστηκε με μεγαλύτερη πιθανότητα λεμφαδενικής διήθησης [427].

Η συγκέντρωση TILs στον πρώιμο κολο-ορθικό καρκίνο μπορεί να σχετίζεται και με την εντόπισή του στο αριστερό ή δεξιό κόλον. Σε ανάλυση βιοψιών ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, διαπιστώθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις TILs στους όγκους που εντοπιζόνταν αριστερά της σπληνικής καμπής σε σχέση με αυτούς που εντοπιζόνταν δεξιά της σπληνικής καμπής, σε στατιστικά σημαντικό ($P < 0.0001$). Οι ασθενείς με δεξιά εντοπιζόμενα νεοπλάσματα, είχαν διπλάσια πιθανότητα υποτροπής της νόσου αν στο παρασκεύασμά τους διαπιστωνόταν χαμηλή συγκέντρωση TILs, σε σχέση με τους ασθενείς με δεξιά εντοπιζόμενα νεοπλάσματα και υψηλή συγκέντρωση TILs (HR 2.02, 95% confidence interval 1.45-2.82, $P_{adj} < 0.0001$). Ωστόσο, δεν υπήρχε τέτοια διαφορά στους ασθενείς με αριστερά εντοπιζόμενα νεοπλάσματα ($P_{adj} = 0.1731$). Ενδιαφέρον είναι ότι σε ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής σύμφωνα με τα κλινικά κριτήρια (T3, N1) η χαμηλή συγκέντρωση TILs, επηρέαζε αρνητικά την πιθανότητα υποτροπής μόνο σε ασθενείς με δεξιά εντοπιζόμενα νεοπλάσματα ($P_{adj} = 0.0058$). Οι ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής από τα κλινικά κριτήρια (T4 ή/και N2), είχαν υψηλότερη πιθανότητα υποτροπής με χαμηλή συγκέντρωση TILs, ανεξαρτήτως πλευράς εντόπισης ($P_{adj} < 0.025$). Σημειώνεται δε, από τους ερευνητές ότι, σε όγκους που έχουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής, ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας είναι τα TILs, ενώ σε χαμηλού κλινικού κινδύνου υποτροπής όγκους, είναι ο δεύτερος μετά την μετάλλαξη του KRAS [428].

5.3.2 Τα TILs σε άλλους συμπαγείς όγκους

Τα TILs έχουν επίσης αξιολογηθεί σε άλλους συμπαγείς όγκους, στο πλαίσιο κλινικών μελετών, ως προγνωστικός και ως προβλεπτικός δείκτης, αλλά και ως θεραπευτικό μέσο. Πρόσφατα, εξετάστηκε και η μεταμόσχευση αυτόλογων TILs σε ασθενείς με καρκίνο ρινοφάρυγγα μετά από χημειοακτινοθεραπεία, χωρίς να επιτευχθεί ωστόσο παράταση του διαστήματος χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) με την προσθήκη των TILs [429]. Κατά ανάλογο τρόπο, 11 ασθενείς με μελάνωμα έλαβαν συνδυαστική ανοσοθεραπεία με nivolumab μαζί με αυτόλογη μεταμόσχευση TILs, με καλή ανοχή [430]. Ανταπόκριση σημείωσε το 36% των ασθενών, ενώ 2 από τους ασθενείς που εμφάνισαν πρόοδο νόσου παρουσίαζαν δυσλειτουργία των TILs.

Κατά την ανάλυση βιοψιών ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία TILs σε ποσοστό $\geq$ του 10% στο στρώμα του όγκου, σχετίζεται με μείωση του κινδύνου επανεμφάνισης καρκίνου στον ίδιο μαστό κατά 66% (HR 0.34, 95% CI 0.16-0.73, $p=0.006$). Μάλιστα, η πιθανότητα επανεμφάνισης καρκίνου μαστού στον ίδιο μαστό χωρίς τη χορήγηση επικουρικής ακτινοβολίας, ήταν 12% σε σχέση με 4.4% που ήταν το ποσοστό της υποτροπής κατόπιν επικουρικής ακτινοβολίας, με την αντίστοιχη διαφορά να είναι 29.6% έναντι 12.8% σε

ασθενείς χωρίς με χαμηλό ποσοστό TILs στο στρώμα του όγκου. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι σε ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής σύμφωνα με τη γονιδιακή έκφραση και το βαθμό διαφοροποίησής τους, το ποσοστό διήθησης του όγκου από λεμφοκύτταρα δεν επηρέασε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό θετικά την έκβαση των ασθενών [431].

Σε ασθενείς που λαμβάνουν νεοεπικουρική θεραπεία trastuzumab, pertuzumab, επιρουβικίνη και κυκλοφωσφαμίδη, για HER2 θετικό καρκίνο μαστού, φαίνεται ότι ο υψηλότερος βαθμός διήθησης από TILs ανευρίσκεται σε παρασκευάσματα με πλήρη παθολογοανατομική ύφεση σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δεν επιτυγχάνεται πλήρης ύφεση [432]. Σε συγκριτική μελέτη ασθενών υπό νεοεπικουρική θεραπεία για HER2 θετικό καρκίνο μαστού, με δοσεταξέλη, trastuzumab, και pertuzumab ή trastuzumab emtansine (T-DM1), όπου το ποσοστό πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης δεν διέφερε μεταξύ των σκελών της μελέτης, διερευνήθηκε η παρουσία των TILs στην αρχική βιοψία ως πιθανός προγνωστικός παράγοντας. Δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των σκελών των ασθενών ως προς το διάστημα ελεύθερο υποτροπής ή τη συνολική επιβίωση. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι η εκτίμηση των TILs κατά την αρχική βιοψία, δύναται να προσδώσει πολύτιμη προβλεπτική πληροφορία για το ενδεχόμενο πτωχής ανταπόκρισης, ούτως ώστε να αναζητηθεί μια εναλλακτική θεραπευτική στρατηγική. Συγκεκριμένα, συγκέντρωση TILs $\geq 10\%$ στην αρχική βιοψία ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης, χωρίς να επηρεάζεται από την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, το σκέλος της θεραπείας, το μέγεθος του όγκου και τη διήθηση λεμφαδένων. Υπήρχε 72% συμφωνία μεταξύ των καταμετρούμενων TILs και της ψηφιακής καταμέτρησης, ενώ καμιά από τις δύο καταμετρήσεις δεν φάνηκε να σχετίζεται με την πιθανότητα υποτροπής της νόσου. Παράλληλα, μειωμένη μεταβολική ανταπόκριση της νόσου ($SUV_{max} \geq 2.6$) μετά το δεύτερο κύκλο θεραπείας σε συνδυασμό με μειωμένα TILs ($< 10\%$), στην αρχική βιοψία, σχετιζόταν με μειωμένη πιθανότητα επίτευξης πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης [433].

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρούνται σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό, πρώιμο καρκίνο μαστού υπό νεοεπικουρική χημειοθεραπεία, καθώς η υψηλότερες συγκεντρώσεις TILs ($\geq 10\%$) στο στρώμα του όγκου σχετίζονται με μεγαλύτερη πιθανότητα πλήρους παθολογοανατομικής ύφεσης και μικρότερη πιθανότητα υποτροπής νόσου. Μάλιστα, η συγκέντρωση των TILs στις 3 εβδομάδες από την χημειοθεραπεία, φαίνεται να είναι ανεξάρτητος παράγοντας του διαστήματος χωρίς υποτροπή, ακόμα και μεταξύ των ασθενών με πλήρη παθολογοανατομική ύφεση, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό [434].

Η συσχέτιση μεταξύ πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης του HER2 θετικού καρκίνου μαστού κατά τη νεοεπικουρική θεραπεία και της υψηλής συγκέντρωσης TILs στο παρασκεύασμα, περιγράφεται και σε έτερη μελέτη ασθενών [435]. Ωστόσο, στην ίδια μελέτη οι σχετιζόμενες με B-λεμφοκύτταρα γονιδιακές υπογραφές που εξετάστηκαν στο mRNA του ιστού φάνηκε να υπερβαίνουν την καταμέτρηση των TILs για την εκτίμηση πιθανότητας πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης του όγκου. Η πρόβλεψη των TILs βρισκόταν σε συμφωνία με την πρόβλεψη των γονιδιακών υπογραφών σε 82% των περιπτώσεων.

Η ποσοτικοποίηση των TILs με χρήση ψηφιακής εικόνας και αυτόματης καταμέτρησης σε τομές αιματοξυλίνης/ηωσίνης, δοκιμάστηκε πρόσφατα σε αναδρομική ανάλυση κλινικών μελετών ασθενών με εξαιρεθέν γαστρικό καρκίνωμα. Διαπιστώθηκε ότι η αυξημένη συγκέντρωση TILs σχετιζόταν με μικρότερη πιθανότητα υποτροπής της νόσου, ενώ η επικουρική χημειοθεραπεία φάνηκε να επιδρά ευνοϊκά παρατείνοντας το DFS των ασθενών με χαμηλή συγκέντρωση TILs [436].

Σε κοορτή 8 ασθενών με p16 θετικό καρκίνο στοματοφάρυγγα υπό αγωγή με cetuximab, ελήφθησαν βιοψίες πριν και 1 εβδομάδα μετά από την αρχική δόση φόρτισης. 5 από τους 8 ασθενείς, παρουσίασαν σημαντική αύξηση των CD8⁺ κυττάρων που διηθούν τον όγκο(επί +5.8 φορές, 2.5-15.8) [437].

5.4 Μεθοδολογία Καταμέτρησης TILs

Προτεινόμενη μεθοδολογία για την καταμέτρηση των TILs έχει δημοσιευτεί από τους Denkert et al. [438] σε μελέτη που εξέτασε το βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης σε στικές βιοψίες ασθενών με καρκίνο μαστού, με σκοπό να διαπιστωθεί συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη νεοεπικουρική θεραπεία. Η ιστοπαθολογική ανάλυση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος διενεργήθηκε σε τομές αιματοξυλίνης/ηωσίνης. Ως ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα αξιολογήθηκαν τα μονοπύρρηνα κύτταρα εντός νεοπλασματικών φωλεών ή σε άμεση επαφή με τα νεοπλασματικά κύτταρα, και καταγράφηκαν σαν το ποσοστό των επιθηλιακών φωλεών που περιέχουν διηθούντα λεμφοκύτταρα. Τα στρωματικά λεμφοκύτταρα καταγράφηκαν ως το ποσοστό της στρωματικής περιοχής του όγκου που περιέχει διηθούντα λεμφοκύτταρα, με ή χωρίς άμεση επαφή με τα νεοπλασματικά κύτταρα [438].

Εξετάστηκε ένα σύνολο 1,058 βιοψιών, που είχαν ληφθεί προ της χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας, σε δύο μελέτες χορήγησης νεοεπικουρικής θεραπείας με βάση ανθρακυκλίνη ή ταξάνη[438]. Διαπιστώθηκε πως το ποσοστό των TILs στα δείγματα των ασθενών ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την πλήρη παθολογοανατομική ανταπόκριση του νεοπλάσματος στη νεοεπικουρική θεραπεία, στον πληθυσμό και των δύο μελετών. Συγκεκριμένα, σε δείγματα καρκίνου μαστού όπου παρατηρήθηκε επικράτηση του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων σε σχέση με τα καρκινικά, παρατηρήθηκε ποσοστό παθολογοανατομικής πλήρους ύφεσης της τάξης του 42%, Αντίθετα, σε ιστικά δείγματα με ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση TILs, τα ποσοστά πλήρους παθολογοανατομικής ύφεσης δεν ξεπέρασαν το 7%[438].

Όσον αφορά τα δείγματα ασθενών με αυξημένο αριθμό TILs (ποσοστό >10%)[439], το ποσοστό πλήρους παθολογοανατομικής ανταπόκρισης ήταν 31%. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ύπαρξη λεμφοκυτταρικού διηθήματος >10%, φάνηκε να αυξάνει ανεξάρτητα κατά 20 ως και 38% την πιθανότητα πλήρους παθολογοανατομικής ύφεσης[438]. Επιπλέον, κατά την ανοσοϊστοχημική μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η υψηλότερη έκφραση των δεικτών CD3, CD20 και CXCR3, επίσης βρισκόταν πιο συχνά σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν πλήρως στη νεοεπικουρική θεραπεία, σε σχέση με ασθενείς που δεν εμφάνισαν πλήρη ύφεση. Επιπροσθέτως, διενεργήθηκε μοριακή ανάλυση του mRNA των δειγμάτων, κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι οι σχετιζόμενες με T-λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς πρωτεΐνες, φάνηκαν να σχετίζονται επίσης με με υψηλότερη πιθανότητα επίτευξης πλήρους παθολογοανατομικής ύφεσης[438].

Το πιο πρόσφατο consensus για τη μέθοδο αξιολόγησης των TILs, προτάθηκε από τους Salgado et al. το 2014, [439-441], με βάση αξιολογήσεις σε ιστικά δείγματα καρκίνου μαστού, σε τομές με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης. Οι βασικές συστάσεις αξιολόγησης των TILs, σε ιστικά παρασκευάσματα ασθενών με καρκίνο μαστού, περιλαμβάνουν τα εξής σημεία:

1. Η καταμέτρηση των TILs ενδύκνεται να γίνεται για το στρωματικό συστατικό του όγκου. Ως στρωματικό συστατικό ορίζεται η ενδονεοπλασματική περιοχή που καταλαμβάνεται από μονοπύρρηνα φλεγμονώδη κύτταρα.
2. Η αξιολόγηση των TILs οφείλει να διενεργείται εντός των ορίων του διηθητικού κακοήθους νεοπλασματος.
3. TILs εντοπιζόμενα σε περιοχές του νεοπλασματος με συνθλιβείες από την επεξεργασία του δείγματος, νεκρωτικές περιοχές, ή περιοχές υαλινοποίησης, όπως και αυτά που βρίσκονται σε περιοχή όπου διενεργήθηκε βιοψία διά βελόνης (core biopsy) εξαιρούνται της καταμέτρησης.
4. TILs εντοπιζόμενα εκτός των ορίων του όγκου, καθώς και περιξ του υγιούς ιστού ή in situ ενδοπορικού καρκινώματος (DCIS), εξαιρούνται της καταμέτρησης.
5. Όλα τα μονοπύρρηνα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων προσμετρώνται, ωστόσο τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα εξαιρούνται.
6. Μία τομή των 4-5mm, σε μεγέθυνση x 200-400, ανά ασθενή θεωρείται επαρκής.
7. Πλήρεις τομές προτιμώνται των βιοψιών εφόσον είναι διαθέσιμες. Δείγματα ιστού που έχουν ληφθεί διά βελόνης, μπορούν να αξιολογηθούν στο πλαίσιο χορήγησης νεοεπικουρικής θεραπείας, ωστόσο, δεν υπάρχει τεκμηριωμένη μεθοδολογία αξιολόγησης TILs κατά τη νεοεπικουρική θεραπεία.
8. Η καταμέτρηση πρέπει να γίνεται για το μέσο όρο των TILs στην περιοχή του όγκου, χωρίς να γίνεται εστιασμός στα hotspots.
9. Ο αριθμός των TILs πρέπει να αξιολογείται ως συνεχής μεταβλητή. Το ποσοστό των στρωματικών TILs είναι μια ημιποσοτική παράμετρος για αυτή την αξιολόγηση, επί παραδείγματι, 80% στρωματικά TILs αντιστοιχεί σε ένα 80% της στρωματικής περιοχής του όγκου, με χαρακτηριστική πυκνή ανάπτυξη μονοπύρρηνων κυττάρων. Πρέπει επίσης να υπολογίζεται το μοτίβο ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων, καθώς αυτά δεν σχηματίζουν συνήθως συμπαγείς κυτταρικές συναθροίσεις. Επομένως, ακόμα και ένα ποσοστό 100% στρωματικών TILs, δεν αποκλείει την ύπαρξη ενδιάμεσου ιστού μεταξύ μεμονωμένων λεμφοκυττάρων.
10. Δεν υπάρχει επίσημη σύσταση για κλινικά σημαντικό ουδό TILs, ενώ η βαρύτητα μετατίθεται στην αξιοπιστία και εγκυρότητα της μεθόδου καταμέτρησης. Εφόσον η μέθοδος κριθεί ως αξιόπιστη, θα μπορέσουν να καθοριστούν και τα κλινικά σημαντικά όρια των μετρήσεων. Ο λεμφοεπικρατητικός τύπος καρκίνου μαστού, είναι αυτός στον οποίο το πλήθος των T-λεμφοκυττάρων υπερβαίνει αυτό των κυττάρων του όγκου, και συνήθως περιλαμβάνει ποσοστό T-λεμφοκυττάρων 50-60% στη στρωματική περιοχή του όγκου.

Όσον αφορά τις τεχνικές επεξεργασίας και καταμέτρησης, σημαντικά σημεία θεωρούνται τα κάτωθι[439-441]:

1. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου x200-400 κρίνεται ως επαρκής.
2. Πάχος των τομών 4–5 μm , θεωρείται βέλτιστο, για μονιμοποιημένο ιστό σε κύβους παραφίνης. Δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα πρωτόκολλα καταμέτρησης για δείγμα κατεψυγμένου ιστού.
3. Τα TILs δύνανται να αξιολογηθούν στο πλαίσιο νεοεπικουρικής θεραπείας, σε δια βελόνης βιοψίες και σε μονιμοποιημένο ιστό μετά τη χειρουργική εξαίρεση του νεοπλάσματος. Ωστόσο, η αξιολόγηση TILs μετά τη νεοεπικουρική θεραπεία δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.
4. Οι ιστικές μικροσυστοιχίες (tissue microarrays, TMAs) ενέχουν τον κίνδυνο μη αξιολόγησης της ετερογένειας του όγκου κατά ιστική τομή. Ωστόσο, φαίνεται να μπορούν να αναγνωρίσουν υπο-ομάδες των TILs, με βάσει βιοδείκτες, κάτι που τις καθιστά μια πιθανώς καλή μέθοδο για ταχεία ανάλυση μεγάλου πλήθους δειγμάτων, σε μελλοντικές κλινικές μελέτες [443,444].
5. Οι ανοσοϊστοχημεικοί δείκτες των υπότυπων των TILs, αποτελούν ενδιαφέροντα στόχο της έρευνας, ωστόσο η αξιολόγησή τους δε δύνανται να ενσωματωθεί στην καθημερινή κλινική πρακτική, καθώς δεν υπάρχουν αρκετές ενδείξεις της προγνωστικής/προβλεπτικής τους σημασίας.
6. Η αξιολόγηση TILs από αυτόματους μετρητές, συνεχίζει να εντάσσεται στο πεδίο της έρευνας.
7. Δεν είναι γνωστό αν η ταυτοποίηση του RNA ή των πρωτεϊνών των TILs, δύνανται να προσφέρει κλινικά σημαντική πληροφορία. Υφίστανται ωστόσο τεχνικές αναγνώρισης μοριακών υπογραφών των λεμφοκυτταρικών διηθημάτων, που αποτελούν αντικείμενο έρευνας [445].
8. Η αξιολόγηση τόσο των ενδοεπιθηλιακών όσο και τα στρωματικών κυττάρων, ανέδειξαπαρόμοια αποτελέσματα, ωστόσο η αξιολόγηση των ενδοεπιθηλιακών TILs δε φαίνεται να προσθέτει προγνωστική πληροφορία σε αυτή που παρέχει η αξιολόγηση των στρωματικών, ως ανεξάρτητη μεταβλητή κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση [446-448].

πό τις διαθέσιμες μελέτες, φαίνεται πως η αξιολόγηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης, μπορεί να διενεργηθεί με τους ακόλουθους τρόπους [438-454]:

1. Με απλή καταμέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων σε τομές κεκρωσμένες με αιματοξυλίνη/ηωσίνη.
2. Με ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, ειδικούς για την ανίχνευση λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, που επιτρέπει και την διακριτή αξιολόγηση των λεμφοκυτταρικών υπο-ομάδων (κυτταροτοξικά, βοηθητικά, κατασταλτικά, T και B).
3. Με μοριακή ανάλυση του ιστικού mRNA, μέσω αναζήτησης γονιδίων/πρωτεϊνών που σχετίζονται με λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς.

Παρά τις πολλές διαθέσιμες μελέτες, δεν υπάρχει απόλυτα αποδεκτός, καλά τεκμηριωμένος αλγόριθμος για την αξιολόγηση των λεμφοκυττάρων με τις διαθέσιμες μεθόδους, ενώ η προγνωστική/προβλεπτική αξία αυτών των καταμετρήσεων, ανά τα διάφορα νεοπλασμάτα, είναι ακόμη αντικείμενο διερεύνησης.

5.5 Συμπεράσματα

Η ανάλυση της κυτταρικής σύστασης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, μπορεί να προσδώσει πολύτιμες πληροφορίες για την τοπική ανοσολογική απάντηση. Παγιωμένες μέθοδοι συστηματικής αξιολόγησης των ανοσολογικών κυττάρων που εντοπίζονται πλησίον του όγκου, και μπορούν να εντοπιστούν με απλές ή/και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις στο βιοπτικό υλικό των ασθενών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατοι δείκτες ανοσολογικών φαινομένων όπως ο ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος, και να αποτελέσουν τους μελλοντικούς βιοδείκτες πρόβλεψης πιθανότητας στην ανοσοθεραπεία, στον κολοορθικό καρκίνο αλλά και σε άλλους συμπαγείς όγκους.

6.Τα TILs ως βιοδείκτης

6.1 Αξιολόγηση TILs σε μεταστατικές εστίες.

Ο βαθμός λεμφοκυτταρικής διήθησης μεταξύ πρωτοπαθούς εστίας και μεταστατικών εστιών διαφέρει, αντανakλώντας τόσο τη διαφοροποίηση της αλληλεπίδρασης όγκου και ανοσοποιητικού κατά την εξέλιξη της νόσου, όσο και τις ανατομικές διαφορές μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθών εστιών [438].

Σε μικρές σειρές ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, χαμηλότερα επίπεδα TILs διαπιστώθηκαν στις μεταστατικές εστίες, σε σχέση με την πρωτοπαθή [455-457]. Η μείωση των TILs στις δευτεροπαθείς εστίες εντοπίζεται επίσης στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα [458], αλλά και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [459,460], εύρημα που συνάδει με τη θεωρία της ανοσοδιαφυγής κατά την εξέλιξη της νόσου. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος, φάνηκε ότι στις μεταστατικές εστίες ο λόγος των κυτταροτοξικών CD8 TILs προς τα κατασταλτικά FOXP3 TILs μειώνεται, προτείνοντας μια επιπλέον μετατόπιση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος προς έναν πλέον ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο[458].

Οι μεταβολές στο λεμφοκυτταρικό διήθημα των μεταστατικών εστιών, φαίνονται να ποικίλουν ανάλογα και με την εντόπιση της μετάστασης στον οργανισμό του ξενιστή. Οι πνευμονικές μεταστατικές εστίες τόσο στο μελάνωμα [461] όσο και στο HER2 θετικό καρκίνο μαστού [462], περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση TILs. Επίσης, παρόλο που το κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελεί άσυλο από το ανοσοποιητικό, στις εγκεφαλικές μεταστάσεις συχνά απαντάται λεμφοκυτταρικό διήθημα, το οποίο σχετίζεται μάλιστα με βελτιωμένη πρόγνωση[463,464].

Τα TILs που εντοπίζονται στις λεμφαδενικές μεταστατικές εστίες του μελανώματος, φαίνεται να παρέχουν παρόμοιες προγνωστικές πληροφορίες με αυτά της πρωτοπαθούς εστίας[461], ενώ υψηλός αριθμός TILs στα διηθούντα όρια των εστιών του μελανώματος, σχετίζεται με βελτιωμένη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία[461].

Τα TILs στις ηπατικές και πνευμονικές μεταστατικές εστίες κολο-ορθικού καρκίνου επίσης φαίνεται να έχουν προγνωστικό ενδιαφέρον [465-467]. Σε μελέτη 101 ασθενών, διενεργήθηκε αξιολόγηση των TILs στο διηθητικό όριο δευτεροπαθών ηπατικών εστιών, με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των κυττάρων που εξέφραζαν τους δείκτες CD3, CD8, granzyme B, και FOXP3, και αναπτύχθηκε ένα σκορ λεμφοκυτταρικής διήθησης, σε υποομάδα 33 ασθενών (training set). Το σκορ εν συνεχεία εφαρμόστηκε σε ανεξάρτητη ομάδα 68 ασθενών (validation set). Το συγκεκριμένο immunoscore, με βάση τους λεμφοκυτταρικούς δείκτες, έδειξε ικανό να προβλέψει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, με ευαισθησία 79% και ειδικότητα 100%. Συγκεκριμένα, το τεστ κατάφερε να προβλέψει όλους τους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία, καθώς κανένας από αυτούς δεν χαρακτηριζόταν από υψηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση το διηθητικό μέτωπο των ηπατικών μεταστάσεων. Η ευαισθησία του σκορ ήταν μικρότερη από 100%, καθώς 10 από τους 47 ασθενείς που τελικά ανταποκρίθηκαν, είχαν λανθασμένα αξιολογηθεί βάσει της σύστασης των TILs στις ηπατικές μεταστάσεις, ως υποψήφιοι για πτωχή ανταπόκριση. Σύμφωνα με τους ερευνητές, ενδέχεται σε αυτούς τους ασθενείς η ευαισθησία του τεστ να επηρεάζεται από το χειρισμό του βιοπτικού υλικού, καθώς στους λανθασμένα αξιολογημένους ασθενείς είχαν προηγηθεί πολλαπλές βιοψίες διά βελόνης. Υψηλή πυκνότητα διηθούντων λεμφοκυττάρων, βρέθηκε να σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου αλλά και τη συνολική επιβίωση υπό χημειοθεραπεία, αναδεικνύοντας το σκορ σε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης [466].

Σε ερευνητική εργασία που αξιολόγησε τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς CD4+, CD8+, FOXP3+, CD68+, και CD163+ σε βιοψίες κολο-ορθικού καρκινώματος, τόσο στο κέντρο και στο διηθητικό μέτωπο της πρωτοπαθούς εστίας, όσο και σε απομακρυσμένη μετάσταση, με βοήθεια ψηφιακής ανάλυσης, και συμπεριέλαβε 196 ασθενείς [467], βρέθηκε ότι η λεμφοκυτταρική διήθηση στις δευτεροπαθείς εντοπίσεις του νεοπλάσματος, ήταν η μόνη ανεξάρτητη προγνωστική μεταβλητή, για την συνολική επιβίωση, αν και υψηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση και στην πρωτοπαθή εστία, σχετιζόταν με καλύτερη συνολική επιβίωση, με στατιστικά σημαντικό, ωστόσο όχι ανεξάρτητο τρόπο. Αξιοσημείωτο είναι πως η συσχέτιση της υψηλόβαθμης λεμφοκυτταρικής διήθησης με καλύτερη πιθανότητα επιβίωσης, διατηρούνταν ακόμα και παρουσία της μετάλλαξης KRAS αλλά και PIK3CA[467]. Ακόμη, διαπιστώθηκε διαφοροποίηση της σύστασης της λεμφοκυτταρικής διήθησης, μεταξύ των διαφορετικών εντοπίσεων των μεταστατικών εστιών, καθώς τα CD4, CD3, CD8 και FOXP3 λεμφοκύτταρα, ήταν υψηλότερα στις πνευμονικές, σε σχέση με τις ηπατικές μεταστάσεις, ενώ οι ωοθήκες, χαρακτηρίζονταν από χαμηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση για όλους τους πληθυσμούς λεμφοκυττάρων [467].

Είναι ενδιαφέρον ότι η σύγκριση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος στους πρωτοπαθείς όγκους μαστού και στις μετάρχρονες υποτροπές, μπορεί να διακρίνει τις αληθείς υποτροπές που χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα TILs, από τα δεύτερα πρωτοπαθή νεοπλάσματα του μαστού που περιέχουν μικρότερο λεμφοκυτταρικό διήθημα [468]. Αυτό συνάδει με τη θεωρία της ανάπτυξης μιας νέας πρωτοπαθούς εστίας, κατά τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσολογική επιτήρηση, ενώ οι υποτροπές/μεταστάσεις της νόσου αναπτύσσονται παρά την αντίσταση των εξειδικευμένων για το νεόπλασμα ανοσοκυττάρων [439-441].

Η αξιολόγηση των TILs στο πλέον πρόσφατο δείγμα νεοπλασματικού ιστού, έστω και αν προέρχεται από μεταστατική εστία, ενδεχομένως να αντανάκλα πιο αξιόπιστα την παρούσα κατάσταση αλληλεπίδρασης μεταξύ του ξενιστή και του νεοπλάσματος, κατά ανάλογο τρόπο με βιοδείκτες όπως στοχεύουσες μεταλλάξεις που επανεξετάζονται σε μεταστατικές εστίες κατά την πρόοδο της νόσου, όπως για παράδειγμα μεταλλάξεις του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [441].

6.2 Η κλινική σημασία των TILs για τον κολο-ορθικό καρκίνο και ο ρόλος του Immunoscore

Η σημασία των TILs στα κολο-ορθικά καρκινώματα διερευνάται ήδη από τη δεκαετία του 1930 [469]. Μάλιστα, η αξιολόγηση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος έχει προταθεί ως παράμετρος του συστήματος αξιολόγησης TNM, για τον καρκίνο του παχέος εντέρου [470].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πολλοί υποκείμενοι βιολογικοί μηχανισμοί ευθύνονται για την ανάπτυξη κολο-ορθικού καρκινώματος, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS, BRAF, APC, TP53, και η μικροδορυφορική αστάθεια, οφειλόμενη σε ελλείμματα των γονιδίων επιδιόρθωσης του mismatch repair system [471,472].

Τα κολο-ορθικά καρκινώματα που χαρακτηρίζονται από ελλείμματα επιδιόρθωσης/ μικροδορυφορική αστάθεια (dMMR/MSI-high) έχουν ιδιαίτερα ιστολογικά χαρακτηριστικά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα TILs, λεμφοκυτταρική αντίδραση προσομοιάζουσα σε νόσο του Crohn, ιστολογική διαφοροποίηση βλεννώδους τύπου/τύπου σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring) και μυελοειδές προτυπο ανάπτυξης, σύμφωνα με τα κριτήρια του Bethesda για τη διαλογή ασθενών που χρήζουν ελέγχου μικροδορυφορικής αστάθειας [473].

Σε αρκετές μελέτες διαφαίνεται η συμφωνία της αξιολόγησης των TILs στον καρκίνο του παχέος εντέρου στο ιστολογικό παρασκεύασμα με την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας [474-477]. Συγκεκριμένα, η καταμέτρηση των ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων στο ιστικό παρασκεύασμα, σε τομές με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης, μπορεί να προβλέψει την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας με ευαισθησία της τάξης του 93% και ειδικότητα από 62% ως 97%, με ουδό τα 2-5 ενδοεπιθηλιακά TILs ανά οπτικό πεδίο [474-477].

Σύμφωνα με την συγκριτική μελέτη αξιολόγησης προβλεπτικών μοντέλων μικροδορυφορικής αστάθειας, από τους Joost et al.[478], το θήλυ φύλο, η ηλικία ≥ 60 ετών, όγκος στο εγγύς παχύ έντερο, έλλειψη νεκρωτικού υλικού, βλεννώδης διαφοροποίηση και παρουσία TILs, σχετίζονται με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς παρουσία τουλάχιστον 4 από τα άνωθεν χαρακτηριστικά, μπορεί να διαγνώσει το 93% των καρκινωμάτων με μικροδορυφορική αστάθεια, με ειδικότητα 76%.

Σήμερα, η σύσταση για την εξέταση της μικροδορυφορικής αστάθειας είναι γενική και πλέον αφορά όλους τους ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο [479], ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ λεμφοκυτταρικής διήθησης και παρουσίας ελαττωματικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA του νεοπλασματικού κυττάρου, εξακολουθεί να διατηρεί τη σημασία της. Επί παραδείγματι, η παρουσία μετάλλαξης της πολυμεράσης POLE, στον τομέα της εξωνουκλεάσης, όπως ήδη περιγράφηκε στην εισαγωγή, επάγει έναν υπερμεταλλαγμένο, ιδιαίτερα ανοσογόνο νεοπλασματικό φαινότυπο, παρά την απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας ή ελλειμμάτων των γονιδίων επιδιόρθωσης [480]. Σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία TILs μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βιοδείκτη ανοσογονικότητας του νεοπλασματος, πέρα από την μικροδορυφορική αστάθεια [439-441], οδηγώντας σε πολύτιμη κλινική πληροφορία, που ενδέχεται να επηρεάσει τις θεραπευτικές αποφάσεις.

Η παρουσία TILs στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, φαίνεται να έχει προγνωστική αξία ανεξαρτήτως ύπαρξης μικροδορυφορικής αστάθειας [481], η οποία έχει αναδειχτεί ήδη από τη δεκαετία του 1980[482], με την διαβάθμιση της λεμφοκυτταρικής διήθησης σε πτωχή, μέτρια ή εκτεταμένη. Πιο πρόσφατα, σε μελέτη πάνω από 2300 κολοορθικών καρκινωμάτων [481], που πραγματοποιήθηκε στο Ισραήλ, οι όγκοι με συγκέντρωση ενδοεπιθηλιακών TILs ανά οπτικό πεδίο (HPF, x40) μεγαλύτερη ή ίση με 2, βρέθηκαν να χαρακτηρίζονται από μικρότερη πιθανότητα θανάτου σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, σε σχέση με όγκους με λιγότερα από 2 λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο. Παρομοίως, όγκοι με έντονη αντίδραση τύπου Crohn, ήτοι με 3 και πάνω λεμφοκυτταρικές αθροίσεις ανά ιστολογική τομή, σχετιζόνταν επίσης με καλύτερη συνολική επιβίωση και επιβίωση από το κολο-ορθικό καρκίνωμα, σε σχέση με τους χωρίς αντίδραση όγκους. Υψηλός βαθμός διήθησης από TILs, καθώς και έκδηλη αντίδραση τύπου Crohn, βρέθηκαν να μειώνουν την πιθανότητα θανάτου κατά 24% και 29%, αντίστοιχα, ανεξάρτητα από την παρουσία έτερων προγνωστικών παραγόντων. Η υψηλόβαθμη διήθηση από TILs (παρουσία ≥ 2 λεμφοκυττάρων ανά οπτικό πεδίο), φάνηκε να σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με πρωτοπαθή εστία στο δεξιό κόλον, μικρότερο ποσοστό καρκινώματος σταδίου III, IV, καλά διαφοροποιημένα νεοπλάσματα (Grade I), ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας, και αντίδραση τύπου Crohn, σε σχέση με τη διήθηση από 0,1 λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο[481].

Σε έτερη προσπάθεια, η αξιολόγηση των όλων των φλεγμονωδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων, πραγματοποιήθηκε με βαθμολογία από το 0 ως το 3, όπου 0= χωρίς αύξηση στα φλεγμονώδη κύτταρα, 1= μια εστιακή αύξηση των φλεγμονωδών κυττάρων στο διηθητικό όριο του όγκου, χωρίς καταστροφή των νεοπλασματικών νησίδων, 2= διήθημα δίκην ταινίας στο διηθητικό άκρο του όγκου, με μερική καταστροφή των νεοπλασματικών νησίδων, 3= έκδηλη φλεγμονώδης αντίδραση, με σχηματισμό φλεγμονώδους ζώνης στο διηθητικό όριο του όγκου, και καταστροφή των νεοπλασματικών νησίδων. Η βαθμονόμηση αυτή, αποτέλεσε τη βάση για το Klintrup-Mäkinen score που αναπτύχθηκε το 2005 [483]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ως υψηλού βαθμού φλεγμονώδης αντίδραση, χαρακτηρίστηκε το σκορ 2,3 ενώ το σκορ 0,1 χαρακτηρίζονταν ως χαμηλού βαθμού φλεγμονώδης αντίδραση. Υψηλόβαθμη φλεγμονώδης, και λεμφοκυτταρική διήθηση, φάνηκε να σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά πενταετούς συνολικής επιβίωσης από τη νόσο, σε σχέση με τα χαμηλά σκορ, τόσο στην κεντρική περιοχή όσο και στο διηθητικό όριο του όγκου [483]. Η προγνωστική αξία του σκορ αυτού επαληθεύτηκε περαιτέρω σε ανεξάρτητες ομάδες ασθενών [484-488]. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της υψηλόβαθμης φλεγμονώδους/λεμφοκυτταρικής αντίδρασης με υψηλότερες πιθανότητες συνολικής επιβίωσης, με τρόπο ανεξάρτητο από έτερους προγνωστικούς παράγοντες, αν και, η εντονότερη φλεγμονώδης αντίδραση, συχνά βρίσκεται να σχετίζεται με άλλα καλής προγνώσης ιστολογικά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα η έλλειψη αγγειακής διήθησης [484-488].

Σε συγκριτική μελέτη μεθόδων αξιολόγησης της φλεγμονώδους/λεμφοκυτταρικής διήθησης [486] σε 365 περιπτώσεις κολοορθικού καρκινώματος, αξιολογήθηκαν: 1) υπότυποι TILs (CD3, CD8, CD45RO, FOXP3), 2) το Galon immune score και το Klintrup-Mäkinen score. Βρέθηκε ότι υψηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση σχετιζόταν με καλύτερη πιθανότητα επιβίωσης από καρκίνο, με τα CD3 TILs να αποτελούν τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα στο διηθητικό όριο του όγκου, και τα CD8 αντίστοιχα στις νεοπλασματικές εστίες. Η διήθηση από τα T λεμφοκύτταρα σχετιζόταν με χαμηλότερο στάδιο όγκου και μικρότερη πιθανότητα αγγειακής διήθησης. Και οι τρεις υπό αξιολόγηση μέθοδοι, αναδείχτηκαν σε προγνωστικούς παράγοντες για την επιβίωση των ασθενών, με κολο-ορθικά καρκινώματα με ή χωρίς διηθημένους λεμφαδένες.

Η προγνωστική σημασία της διήθησης του νεοπλάσματος από κυτταροτοξικά CD8 λεμφοκύτταρα και κύτταρα μνήμης, πρώιμα (CD45RO+CCR7-CD28+CD27+) ή όψιμα (CD45RO+CCR7-CD28-CD27-), είχε αναδειχθεί από το 2005, όταν η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης τέτοιων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, παρουσίασε συσχέτιση με χαμηλό διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, χαμηλότερο στάδιο εξέλιξης της νόσου και υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών [489].

Επί αυτής της βάσης, το Immunoscore αναπτύχθηκε σε μια προσπάθεια ενσωμάτωσης της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού με τον όγκο, στην προγνωστική αξιολόγηση των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο [490]. Περιλαμβάνει την αξιολόγηση των T-λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD8 (κυτταροτοξικά) και CD45RO (μνήμης), τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό άκρο του όγκου, με ένα σύστημα βαθμονόμησης από το 0 ως το 4, αναλόγως της πυκνότητας των λεμφοκυττάρων στις υπό αξιολόγηση περιοχές, και εφαρμόστηκε αρχικά σε 602 ασθενείς με εξαιρέσιμο κολο-ορθικό καρκίνωμα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες (σταδίου I και II) [491]. Ο ουδός για τη χαμηλή/υψηλή συγκέντρωση λεμφοκυττάρων ήταν: για τα CD8 λεμφοκύτταρα τα 83 κύτταρα ανά mm², και για τα CD45RO λεμφοκύτταρα τα 110 ανά mm² στο κέντρο του όγκου, και τα 102 και 221 κύτταρα ανά mm² στο διηθητικό όριο του όγκου, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ασθενείς με χαμηλή συγκέντρωση τόσο CD8 όσο και CD45RO λεμφοκυττάρων, τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό όριο του όγκου, λάμβαναν 0 στη βαθμολογία, ενώ για κάθε περιοχή με υψηλή συγκέντρωση κυττάρων, λάμβαναν έναν επιπλέον πόντο δημιουργώντας τα αντίστοιχα γκρουπ: Im0(Low, Low, Low, Low), Im1 (High, Low, Low, Low, Low), Im2 (High, High, Low, Low), Im3 (High, High, High, Low), Im4 (High, High, High, High). Οι ασθενείς κατανεμήθηκαν ως εξής: Im0: 4%, Im1: 10%, Im2: 17%, Im3: 27% και Im4: 42%. Οι ασθενείς με υψηλές συγκεντρώσεις λεμφοκυττάρων και στις δύο υπό αξιολόγηση περιοχές του νεοπλασματος (Im4), είχαν πενταετές ποσοστό διάστημα επιβίωσης χωρίς υποτροπή 86% και συνολικής επιβίωσης 95%, ενώ οι ασθενείς με Im1,2 (27% του πληθυσμού της μελέτης) είχαν αντίστοιχα ποσοστά 56% και 62%. Για τους ασθενείς με μηδενικό σκορ, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 25% και 27.5% [491]. Η επίδραση του immunoscore στην ανταπόκριση και στην επιβίωση των ασθενών, παρέμεινε στατιστικά σημαντική ανεξάρτητα από άλλες μεταβλητές, κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση.

Η αξιολόγηση του immunoscore αξιολογήθηκε σε επόμενη μελέτη [492] 599 ιστολογικών δειγμάτων κολο-ορθικού καρκίνου, σταδίου I ως IV, σε σύγκριση με το σύστημα TNM ως προς την προγνωστική του ισχύ. Διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης του νεοπλάσματος και της διασποράς της νόσου με μειωμένη ενδονεοπλασματική συγκέντρωση T-λεμφοκυττάρων.

Συγκεκριμένα, στην κοορτή 1 της μελέτης, με 415 ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνωμα σταδίου I-III, το 60% των ασθενών με αυξημένη συγκέντρωση TILs, είχαν in situ (μη διηθητικό νεόπλασμα) ή όγκο σταδίου T1 (χωρίς διήθηση της γνήσιας μυϊκής στοιβάδας), ενώ σε κανέναν από τους ασθενείς με χαμηλή συγκέντρωση TILs δεν διαπιστώθηκε τόσο περιορισμένο στάδιο νόσου. Μεταξύ των ασθενών που δεν παρουσίασαν υποτροπή της νόσου, η συγκέντρωση των CD8 κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων παρουσίαζε αντίστροφη συσχέτιση με το στάδιο κατά T. Αντίθετα, ανάμεσα στους ασθενείς εκείνους που παρουσίασαν υποτροπή της νόσου, η συγκέντρωση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων ήταν χαμηλή, ανεξαρτήτως του σταδίου του όγκου κατά T. Οι ασθενείς κατατάχθηκαν βάσει του immunoscore ως εξής: Im0: 9%, Im1: 12%, Im2: 27%, Im3: 22%, Im4: 30%. Το 73% των ασθενών, είχαν είτε χαμηλού κινδύνου υποτροπής νόσο (Im3 + Im4 = 52%) είτε υψηλού κινδύνου (Im0 + Im1 = 21%). Οι ασθενείς που βαθμολογήθηκαν με το υψηλότερο σκορ (Im4, 30% του πληθυσμού της μελέτης), είχαν ποσοστό ελεύθερο νόσου στα πέντε έτη 85%, ενώ το ίδιο ποσοστό για τους ασθενείς με Im1 και Im0 ήταν 53% και 32%, αντίστοιχα. Η μονοπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε ότι το ανοσολογικό σκορ σχετιζόταν

σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη νόσου επιβίωση, τη συνολική επιβίωση και την πιθανότητα θανάτου από τη νόσο (DFS HR, 0.64, P 0.002, DSS HR 0.60 P<0.001, OS HR 0.70, P<0.001). Το immune score φάνηκε να πλεονεκτεί στη δυνατότητα πρόβλεψης πιθανότητας υποτροπής και επιβίωσης, αποδίδοντας σαφώς μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα, σε σύγκριση με την κατά TNM ταξινόμηση, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα ROC. Τα αποτελέσματα επαληθεύθηκαν σε ανεξάρτητη κοορτή ασθενών, καθώς και σε ασθενείς σταδίου I-IV [492].

Πιο πρόσφατα, προτάθηκε η τροποποίηση του Immoscore, ούτως ώστε να συμπεριλάβει τα CD3 λεμφοκύτταρα στη θέση των CD45RO, καθώς ενδέχεται να είναι πιο αξιόπιστα για την πρόγνωση της πιθανότητας ανάπτυξης μεταστάσεων [470].

Το Immunoscore με βάση τα CD3 και CD8 λεμφοκύτταρα, έχει επίσης αξιολογηθεί σε μια διεθνή συνεργασία 23 παθολογοανατομικών εργαστηρίων, από 17 διαφορετικές χώρες, που δημοσιεύτηκε το 2016, έχοντας συμπεριλάβει 1336 ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο σταδίου I έως III, που δεν είχαν λάβει νεοεπιχειρητική θεραπεία [493]. Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν το χρονικό διάστημα μέχρι την υποτροπή της νόσου, με διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 5.9 έτη. Οι ασθενείς είχαν σε ποσοστά 19%, 56% και 25% καρκίνο σταδίου I, II και III, αντίστοιχα.

Στην κοορτή ανάπτυξης του σκορ, οι ασθενείς με χαμηλό immunoscore (332) υποτροπίασαν σε συντομότερο χρονικό διάστημα από τους 358 ασθενείς με υψηλό σκορ λεμφοκυτταρικής διήθησης (HR 0.35 (95% CI 0.23-0.52), P < 0.0001). Η κοορτή επαλήθευσης περιέλαβε 630 ασθενείς, με υψηλότερη πιθανότητα υποτροπής για τους 303 ασθενείς με χαμηλό immunoscore, σε σχέση με τους 327 ασθενείς με υψηλό βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης (HR 0.54 (95% CI 0.34-0.84), P = 0.006). Το Immunoscore αναδείχθηκε σε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, λαμβάνοντας υπόψιν το φύλο, την ηλικία, το στάδιο νόσου και την πρωτοπαθή εντόπιση στο δεξιό ή αριστερό κόλον, και στα δύο σετ ασθενών[493].

Ειδικά για το στάδιο II, οι ασθενείς με υψηλό immunoscore είχαν κατά 73% μικρότερη πιθανότητα υποτροπής, σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλό σκόρ, στο σετ ανάπτυξης του σκορ, και κατά 56% χαμηλότερο κίνδυνο υποτροπής στην κοορτή αξιολόγησης/επαλήθευσης του τεστ [493].

Το Immunoscore, μπορεί να υπολογιστεί με βάση 2 λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς, (CD3/CD45RO, CD3/CD8 ή CD8/CD45RO), με την καταμέτρηση των κυττάρων στο κέντρο αλλά και στο διηθητικό όριο του όγκου.

Πιο πρόσφατα, ένα σκορ με βάση τα FOXP3+ και CD8+ TILs στην βιοψία της πρωτοπαθούς εστίας, αξιολογήθηκε ως προβλεπτικός παράγοντας επίδρασης της επικουρικής θεραπείας [494]. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της πυκνότητας των FOXP3+ και των CD8+ TILs, με ανοσοϊστοχημική μέθοδο, για τον υπολογισμό του regulatory-Immunoscore (RIS). Συνολικά εξετάστηκαν 1213 ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο σταδίου I-III DNA, χωρίς ελλείμματα επιδιόρθωσης. Το υπολογιζόμενο RIS, αναδείχθηκε σε σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, ανεξαρτήτως ηλικίας, φύλου, ανατομικής εντόπισης του όγκου, στην πολυπαραγοντική ανάλυση (p < .0001). Για τους ασθενείς σταδίου II, η χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας, φάνηκε να μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής, σε ασθενείς με χαμηλό και ενδιάμεσο RIS. Σε ασθενείς σταδίου III, η επικουρική θεραπεία για 6 και πλέον μήνες μείωσε τον κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με θεραπεία για λιγότερο από 6 μήνες, σε ασθενείς με ενδιάμεσο RIS[494].

Ειδικά στον καρκίνο του ορθού, τα TILs μπορούν να αξιολογηθούν ως δείκτης πρόβλεψης ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική χημειο-ακτινοθεραπεία. Φαίνεται ότι υψηλόβαθμη διήθηση από κυτταροτοξικά CD8 T-λεμφοκύτταρα, σχετίζονται με υψηλό ποσοστό παθολογοανατομικής ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική θεραπεία, όπως και το ότι η αναλογία CD8/FOXP3 μπορεί επίσης να σχετίζεται με το βαθμό παθολογοανατομικής ύφεσης της νόσου[441].

6.3 Δεδομένα προοπτικών μελετών

Η συσχέτιση των μεταβολών της σύστασης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία είναι γνωστή και μελετάται εντατικά τα τελευταία χρόνια [424].

Σε μία πρόσφατη μελέτη φάσης II [495], διερευνήθηκε η συνέργεια του ανοσοθεραπευτικού αντι-PD-1 παράγοντα nivolumab με την αντιδιαβητική ουσία μετφορμίνη. Από προκλινικά δεδομένα, φαίνεται πως η μετφορμίνη μειώνει την εξάντληση των TILs, επαυξάνοντας τη δράση των immune checkpoint inhibitors, όπως το nivolumab. Με βάση αυτά, εξετάστηκε η συγχορήγηση μετφορμίνης και nivolumab σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια. Συμμετείχαν ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, MSS stable, που δεν είχαν λάβει προηγουμένως ανοσοθεραπεία. Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης, ενώ δευτερογενή καταληκτικά σημεία ήταν η ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (Progression Free Survival, PFS) και η συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS).

Από τους 24 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν [495], το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης αξιολογήθηκε στους 18. Δεν σημειώθηκαν αντικειμενικές ανταποκρίσεις, ενώ 2/18 ασθενείς είχαν σταθερότητα νόσου. Η διάμεση συνολική επιβίωση ήταν 5.2 μήνες (95% CI (3.2 to 11.7)), και η ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση 2.3 μήνες (95% CI (1.7 to 2.3)). Ωστόσο, διαπιστώθηκε αύξηση του ποσοστού TILs, με το συνδυασμό. Επίσης, μειώθηκαν τα naïve CD8+Tλεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Συγκεκριμένα, 18 ασθενείς υπεβλήθησαν σε βιοψία προ της έναρξης χορήγησης θεραπείας, και σε επαναληπτική βιοψία, οι εννέα μετά την περίοδο μονοθεραπείας με μετφορμίνη και οι άλλοι εννέα δύο εβδομάδες μετά την πρώτη δόση του nivolumab. Αναζητήθηκαν οι κάτωθι λευκοκυτταρικοί πληθυσμοί: CD4⁺/CD8⁺ T λεμφοκύτταρα (CD45⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD38⁺, CD45RO⁻), naïve CD4⁺/CD8⁺ T λεμφοκύτταρα (CD45⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD38⁻, CD45RO⁻), CD4⁺/CD8⁺ T κύτταρα κεντρικής μνήμης (CD45⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD38⁻, CD45RO⁺), CD4⁺/CD8⁺ T κύτταρα ενεργού μνήμης (CD45⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD38⁺, CD45RO⁺).

Παρατηρήθηκε μείωση στα ενεργά CD4+(CD45⁺ CD4⁺ CD38⁺ CD45RO⁻)TILs, στην επαναληπτική βιοψία σε σχέση με την πρώτη, μετά το τέλος της περιόδου μονοθεραπείας με μετφορμίνη (p=0.031). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε τέτοια μείωση σε ασθενείς που έλαβαν συνδυαστική θεραπεία με nivolumab και μετφορμίνη. Η συνδυαστική θεραπεία, οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά διήθησης από CD45⁺ λεμφοκύτταρα στους ιστούς των ασθενών (p=0.031). Επιπλέον, ασθενείς παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά έκφρασης του δείκτη Tim3+ (CD366) στα υπάρχοντα T-λεμφοκύτταρα, στον ιστό των ασθενών [495].

Σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο σταδίου I ως III, MSS stable, που υπεβλήθησαν σε θεραπευτικό χειρουργείο, αξιολογήθηκε η ανοσογονική επίδραση του αντιγριπικού εμβολιασμού, στο πλαίσιο μελέτης φάσης I/II [415]. Στους 10 συμμετέχοντες, πραγματοποιήθηκε ενδο-ογκική έγχυση εμβολίου γρίπης, με πραγματοποίηση βιοψίας προ και μετά του εμβολιασμού. Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των CD8+ TILs, στο διηθητικό όριο του όγκου μετά τον εμβολιασμό (median 73 vs 315 cells/mm², $p=0.016$) παράλληλα με μείωση των FOXP3 ανοσοκατασταλτικών λεμφοκυττάρων, ($p<0.001$).

Σε μελέτη φάσης I/II, χορηγήθηκε συνδυασμός ογκολυτικού ιού rexastimogene devacirepvec (PexaVec) με τον αντί-PD-L1 παράγοντα durvalumab με ή χωρίς tremelimumab (αντι-CTLA-4 παράγοντας) σε βαριά προθεραπευμένους ασθενείς με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο[496]. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε γενικευμένη τάση μεταβολής των TILs που μελετήθηκαν.

Μεταβολές των TILs αξιολογήθηκαν επίσης σε μελέτη φάσης I, στο πλαίσιο της οποίας χορηγήθηκε ο ενεργοποιητής του υποδοχέα Toll-like Receptor 9 rixatimod, σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, σε συνδυασμό με nivolumab. Τρεις από τους 25 ασθενείς παρουσίασαν αντικειμενική ανταπόκριση και 8 είχαν σταθερή νόσο, στις εννέα εβδομάδες θεραπείας. Χαρακτηριστικά, διαπιστώθηκε αύξηση της διήθησης από CD4+ και CD8+ T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς, σε έναν από τους ασθενείς με αντικειμενική μερική ανταπόκριση, στις πέντε εβδομάδες από την έναρξη της θεραπείας [497].

Σε μελέτη που αφορούσε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο ορθού [498], αξιολογήθηκε η επίδραση της νέο-επικουρικής χημειο-ακτινοθεραπείας, στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συμπεριελήφθησαν 158 ασθενείς που έλαβαν προεγχειρητική χημειο-ακτινοθεραπεία, στο πλαίσιο της μελέτης ADORE. Διαπιστώθηκε ότι το υψηλό επίπεδο λεμφοκυτταρικής διήθησης από CD3+, CD4+, CD8+ και PD-L1+ λεμφοκύτταρα, καθώς και από δενδριτικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, στην βιοψία προ της έναρξης αγωγής, σχετιζόταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με καλή ανταπόκριση στη νεοεπικουρική χημειο-ακτινοθεραπεία[498].

Οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού, μετά την προ-εγχειρητική θεραπεία, εξετάστηκαν σε 101 ασθενείς. Μετά τη χορήγηση της νεοεπικουρικής θεραπείας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των CD3+($P=0.03$) και CD8+ T-λεμφοκυττάρων($P<0.001$), με παράλληλη μείωση της πυκνότητας των CD4⁺FoxP3⁺ ανοσοκατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων ($P<0.001$) και των CD20+ B-λεμφοκυττάρων ($P<0.001$). Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της πυκνότητας των PD-L1+ και των βοηθητικών CD4+FOX-3- T-λεμφοκυττάρων. Αύξηση παρατηρήθηκε επίσης στη συγκέντρωση των δενδριτικών κυττάρων ($P < .05$), χωρίς όμως να αυξηθούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [498].

Σημαντική επίσης, ήταν η μετατροπή των σχετιζόμενων με τον όγκο μακροφάγων από M1 προ-φλεγμονώδη, προς M2 ανοσοκατασταλτικά, και η μείωση των B λεμφοκυττάρων, εύρημα ενδεικτικό μιας ανοσοκατασταλτικής διάστασης της επίδρασης της προεγχειρητικής θεραπείας. Οι ασθενείς που παρουσίασαν μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης των CD3+ T-λεμφοκυττάρων ($P=0.013$) και των PD-L1+ T-λεμφοκυττάρων($P=0.005$), είχαν παρατεταμένο διάστημα χωρίς υποτροπή νόσου, σε σχέση με ασθενείς που παρουσίασαν μικρή μεταβολή. Επίσης, μετά τη χημειο-ακτινοθεραπεία, οι ασθενείς που παρουσίασαν αύξηση των ανοσοκατασταλτικών λεμφοκυττάρων CD4⁺FoxP3⁺, βρέθηκαν να υποτροπιάζουν σε μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τους

ασθενείς στους οποίους δε βρέθηκε αυξημένη διήθηση από ανοσοκατασταλτικού τύπου λεμφοκύτταρα ($p=0.033$)[498].

Προοπτική αξιολόγηση των μεταβολών της λεμφοκυτταρικής διήθησης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, πραγματοποιήθηκε πρόσφατα σε 40 ασθενείς με καρκίνο ορθού, υπό νεοεπικουρική χημειο-ακτινοθεραπεία [499]. Στους ασθενείς αξιολογήθηκαν οι συγκεντρώσεις CD4+, CD8+, FOXP3+ στη βιοψία της ενδοσκοπησης, και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τη βιοψία της χειρουργικής εκτομής του νεοπλάσματος. Η αξιολόγηση, πραγματοποιήθηκε σε 30 ασθενείς, εκ των οποίων οι 15 ελάμβαναν συμπλήρωμα αργινίνης, ωμέγα-3 λιπαρών και νουκλεοτίδια, προς ενίσχυση του ανοσοποιητικού, ενώ οι άλλοι 15 λάμβαναν κανονική διατροφή 1900 χιλιοθερμίδων ημερησίως. Οι εξεταζόμενοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί, δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ τους, τόσο στη διαγνωστική όσο και στη μετεγχειρητική βιοψία, ανάμεσα στα 2 γκρουπ. Ωστόσο, στη βιοψία της χειρουργικής εκτομής υπήρχε υψηλότερη αναλογία CD4/CD8 κυττάρων στους ασθενείς με την κανονική διατροφή, σε σχέση με τους ασθενείς με ανοσο-ενισχυτική διατροφή (0.25 (0.14–0.50) vs. 0.66 (0.28–1), $p = 0.026$)[499].

Στη μελέτη REGOMUNE [420] όπου συγχορηγήθηκε regorafenib σε συνδυασμό με avelumab, σε 48 ασθενείς με μεταστατικό, προεγχειρημένο κολο-ορθικό καρκίνωμα, το ποσοστό σταθερότητας νόσου ήταν 53.5%, με τα καλύτερα αποτελέσματα να παρατηρούνται σε ασθενείς με αύξηση του βαθμού λεμφοκυτταρικής διήθησης, κατά την 1^η ημέρα του δεύτερου κύκλου θεραπείας, σε σχέση με την πρωταρχική βιοψία. Η αύξηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης παρατηρήθηκε σε 9 από τις 15 εξεταζόμενες περιπτώσεις ασθενών (60%), και σχετίστηκε με παρατεταμένη ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (3.7 έναντι 2.3 μηνών, $P = 0.035$) και συνολική επιβίωση (>8.1 έναντι 4.3 μηνών, $P = 0.03$). Για το σύνολο του πληθυσμού της μελέτης, η συνολική επιβίωση ήταν περίπου 11 μήνες, με τους ασθενείς να εμφανίζουν πρόοδο νόσου σε διάστημα περίπου 4 μηνών από την έναρξη της θεραπείας τους [420].

Σε 92 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη OSLO-COMET[500], μελετήθηκε η λεμφοκυτταρική διήθηση σε σχέση με την προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Όλοι εκτός ενός, είχαν κολοορθικό καρκίνωμα χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, και έφεραν ηπατικές μεταστάσεις. Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που προχώρησαν σε μεταστασιεκτομή σε λιγότερο χρονικό διάστημα από 9.5 εβδομάδες από την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις διηθούντων ενδονεοπλασματικών T-λεμφοκυττάρων (διάμεση τιμή 491 κύτταρα/mm²), ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους ασθενείς που δεν είχαν λάβει προεγχειρητική θεραπεία (292 κύτταρα/mm², $P < 0.0001$) [500]. Ενδιαφέρον είναι ότι χαμηλότερες σχετικά συγκεντρώσεις διηθούντων λεμφοκυττάρων, παρατηρούνταν επίσης στους ασθενείς που καθυστέρησαν την χειρουργική επέμβαση (236 κύτταρα/mm²), για περισσότερο από 9.5 εβδομάδες, γεγονός που αναδεικνύει την παροδικότητα της αύξησης της λεμφοκυτταρικής διήθησης, και θέτει το ερώτημα του βέλτιστου χρόνου της χειρουργικής επέμβασης, κατά τις μεταστασιεκτομές, μετά τη χορήγηση νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας[500].

Επί του παρόντος, διεξάγεται μελέτη συγχορήγησης του σχήματος FOLFOXIRI με ή χωρίς bevacizumab, σε συνδυασμό με τον αναστολέα του PD-L1 atezolizumab, με τη βάση της επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου από την οξαλιπλάτινα, και την αύξηση της επίδρασης του atezolizumab στο ανοσοποιητικό σύστημα [501].

Σε προοπτική μελέτη που ξεκίνησε το 2020, εξετάζεται η συγχορήγηση του επαγωγέα ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου οξαλιπλάτινα, με την ανοσοθεραπεία με atezolizumab (αντι-PD-L1 παράγοντας) και τον αντιαγγειογενετικό παράγοντα bevacizumab, ο οποίος θεωρείται ότι παρεμποδίζει την εξάντληση των T-λεμφοκυττάρων [502].

Ενδιαφέρον είναι επίσης, ότι ο συνδυασμός του cetuximab με τον ανοσοτροποποιητικό παράγοντα avelumab, έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη μελέτη CAVE [503], στην οποία αξιολογήθηκε η χορήγηση του συνδυασμού σε βαριά προθεραπευμένους ασθενείς. Από τους 77 ασθενείς που συμμετείχαν, η διάμεση συνολική επιβίωση ήταν σχεδόν 18 μήνες για τους ασθενείς με χαμηλή αναλογία ουδετεροφίλων προς λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (<3), και σχεδόν 9 μήνες για τους ασθενείς με υψηλή αναλογία (≥ 3). Η ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ήταν περίπου 3.5-4 μήνες και για τις δύο κατηγορίες ασθενών, ενώ ειδικά για τους ασθενείς χωρίς KRAS/BRAF μετάλλαξη και χαμηλή αναλογία ουδετεροφίλων προς λεμφοκύτταρα η διάμεση συνολική επιβίωση έφτασε τους 22 μήνες. Ενδέχεται λοιπόν, να υπάρχει συνέργεια μεταξύ του cetuximab και της ανοσοενισχυτικής δράσης του avelumab, ακόμα και σε βαριά προθεραπευμένους ασθενείς με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο [503].

Σε μελέτη του 2020 [504], η θεραπεία με διπλό ανοσοαποκλεισμό με συνδυασμό durvalumab (αντι-PD-L1 αναστολέας) και tremelimumab (αντι-CTLA-4 αναστολέας), απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε ασθενείς με πολυθεραπευμένο μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνωμα, σε σχέση με την υποστηρικτική αγωγή. Η συνολική επιβίωση ήταν 6.6 μήνες για τους ασθενείς που λάμβαναν διπλή ανοσοθεραπεία, σε σύγκριση με 4 μήνες για τους ασθενείς σε υποστηρικτική αγωγή, με μείωση του κινδύνου θανάτου σχεδόν κατά 30% (HR 0.72, 90% CI, 0.54-0.97, $P = 0.07$). Δεν υπήρχε διαφορά στην ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση που ήταν περίπου 2 μήνες και στα δύο σκέλη. Ειδικά για τους ασθενείς χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, οι οποίοι αποτελούσαν και την πλειοψηφία των ασθενών (166/179), η συνολική επιβίωση βελτιώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό υπό ανοσοθεραπεία, σε σχέση με την υποστηρικτική αγωγή (HR, 0.66, 90% CI, 0.49-0.89, $P=0.02$). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα συνολικής επιβίωσης, διαπιστώθηκε σε ασθενείς με φορτίο 28 και άνω μεταλλάξεων ανά μεγαβάση, που αντιπροσώπευαν το 1/5 των ασθενών χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια (HR, 0.34, 90% CI, 0.18-0.63, $P = 0.004$). Άνω του 80% των ασθενών είχαν λάβει χημειοθεραπεία που περιελάμβανε 5FU, ιρινοτεκάνη και οξαλιπλάτινα, καθώς και bevacizumab, ενώ το 1/3 των ασθενών είχαν λάβει αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα[504].

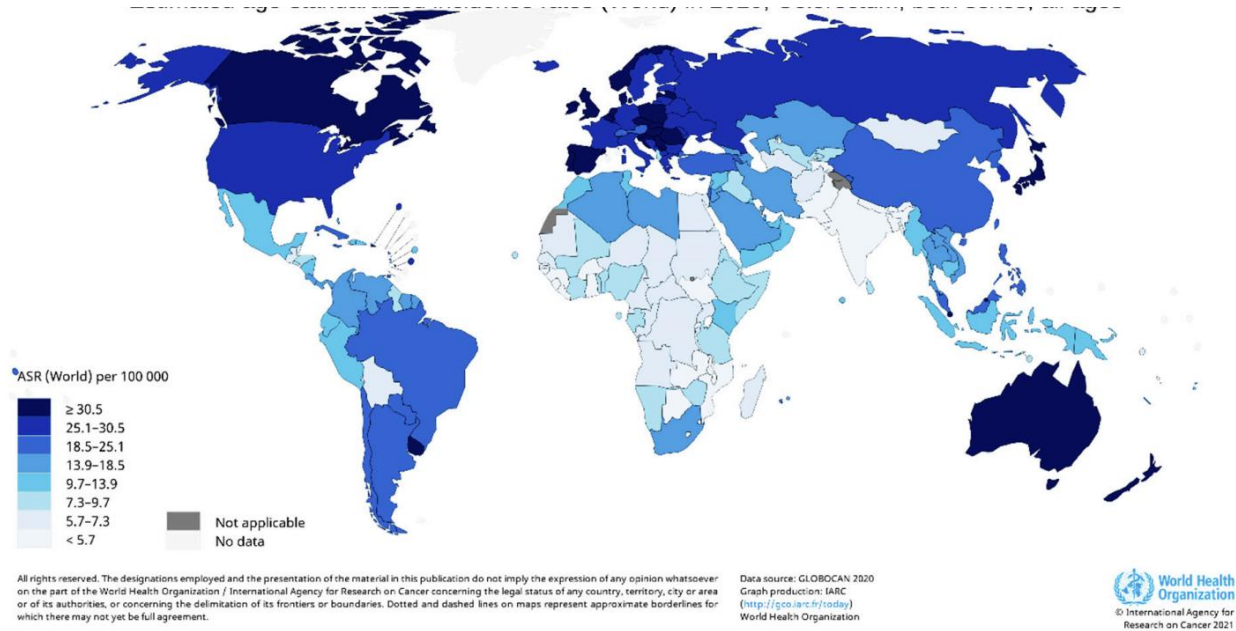
Οι προοπτικές μελέτες που παρέχουν θετικές ενδείξεις για την επίδραση ποικίλων θεραπειών στον βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης, συνοψίζονται στον πίνακα 6.3.1.

6.4 Συμπεράσματα

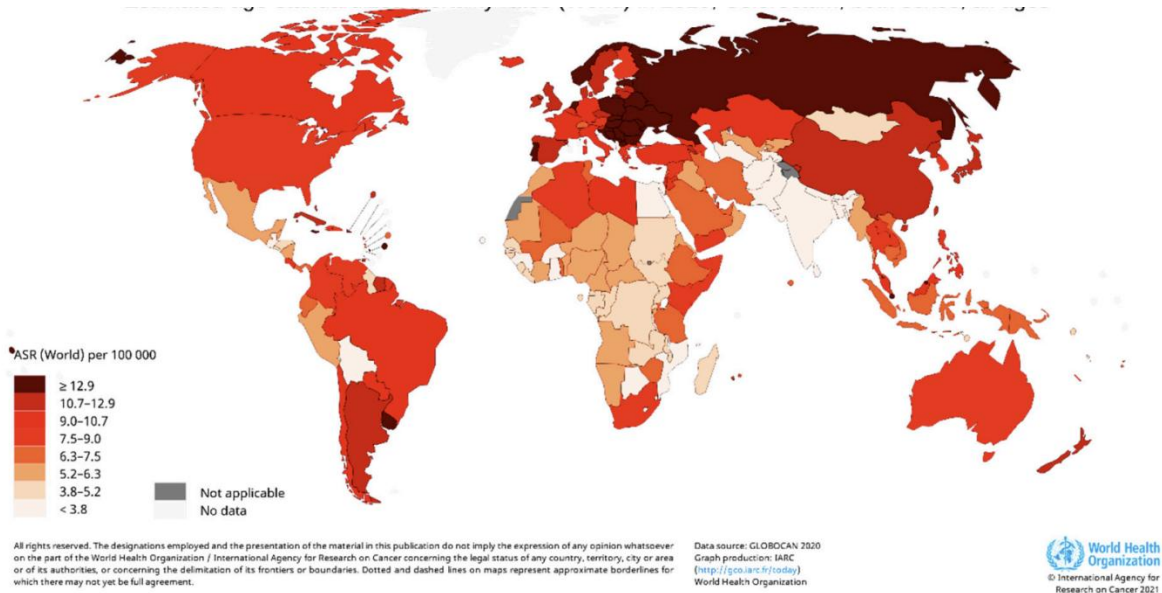
Σε αρκετές μελέτες διαπιστώνεται η αύξηση των κυτταροτοξικών κυττάρων και η μείωση των ανοσοκατασταλτικών, μετά από αντineοπλασματική θεραπεία, δεν έχει μελετηθεί συστηματικά η επίδραση των αντineοπλασματικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκινώματος, στους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς που διηθούν το νεόπλασμα. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα περισσότερα δεδομένα για την αξιολόγηση των TILs, αφορά ασθενείς με καρκίνο μαστού [439-440].

Ακόμη, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την παρακολούθηση της εξέλιξης του επιπέδου λεμφοκυτταρικής διήθησης μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας. Τέλος, δεν έχει σχηματιστεί συγκεκριμένος αλγόριθμος αξιολόγησης των TILs στον υπό θεραπεία κολο-ορθικό καρκίνο, ο οποίος να επιτρέπει τη συστηματική μελέτη της λεμφοκυτταρικής διήθησης ως αξιόπιστου προγνωστικού ή και προβλεπτικού βιοδείκτη.

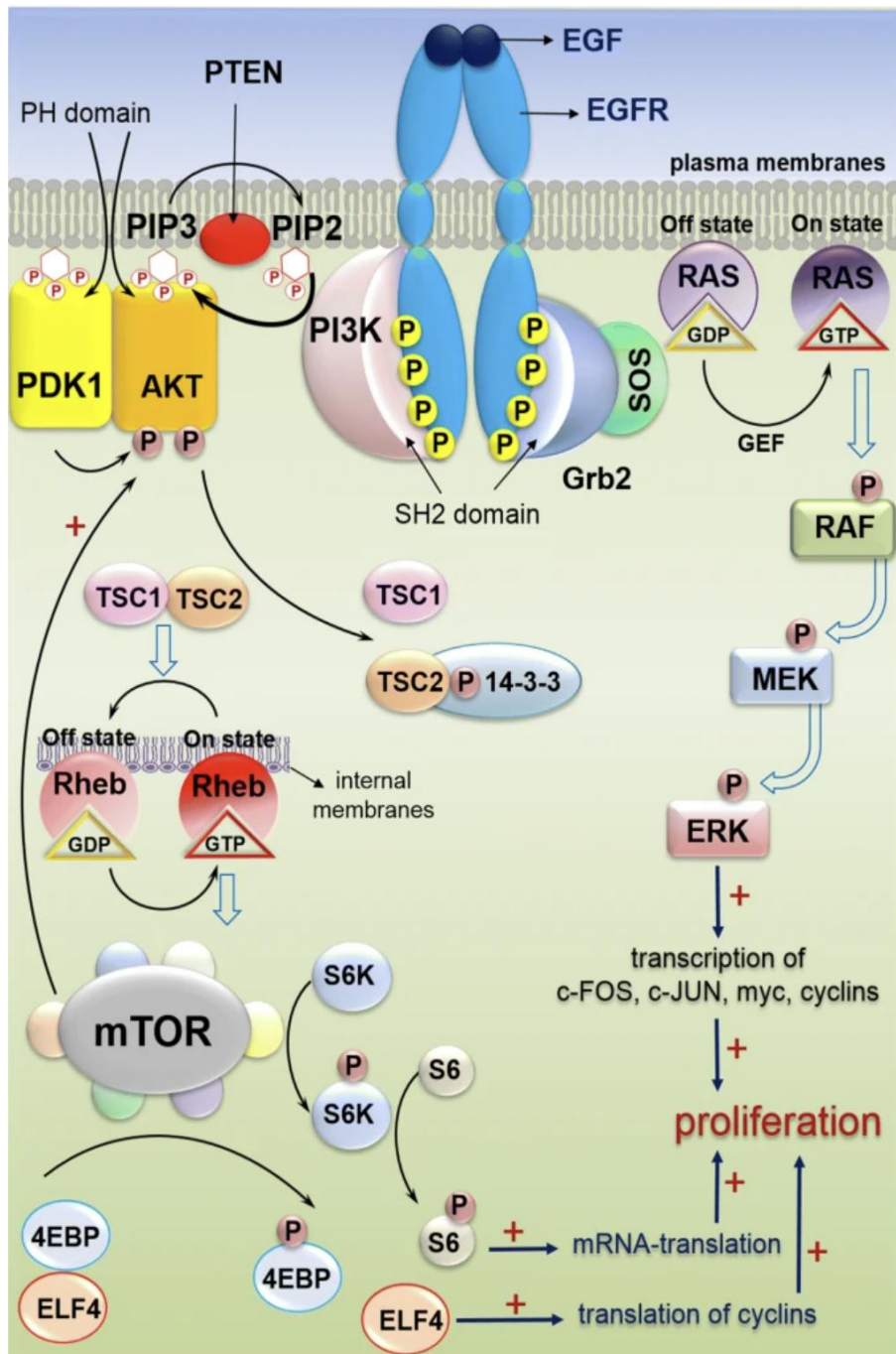
Εικόνες και Πίνακες Γενικού Μέρους



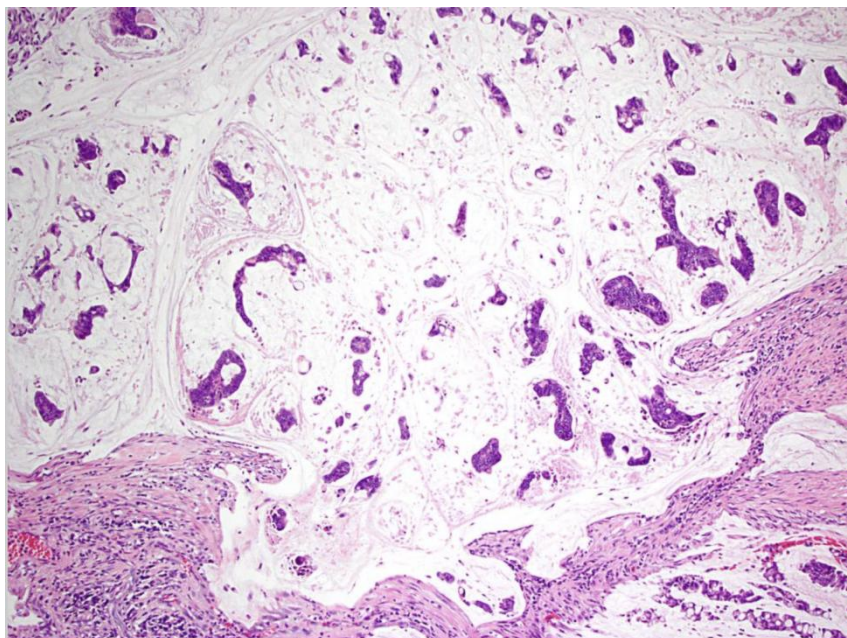
Εικ. 1.1.1: Εκτιμώμενη παγκόσμια επίπτωση κολο-ορθικού καρκίνου, και στα δύο φύλα, για όλες τις ηλικίες, σύμφωνα με το χάρτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), κατά το έτος 2020 [505].



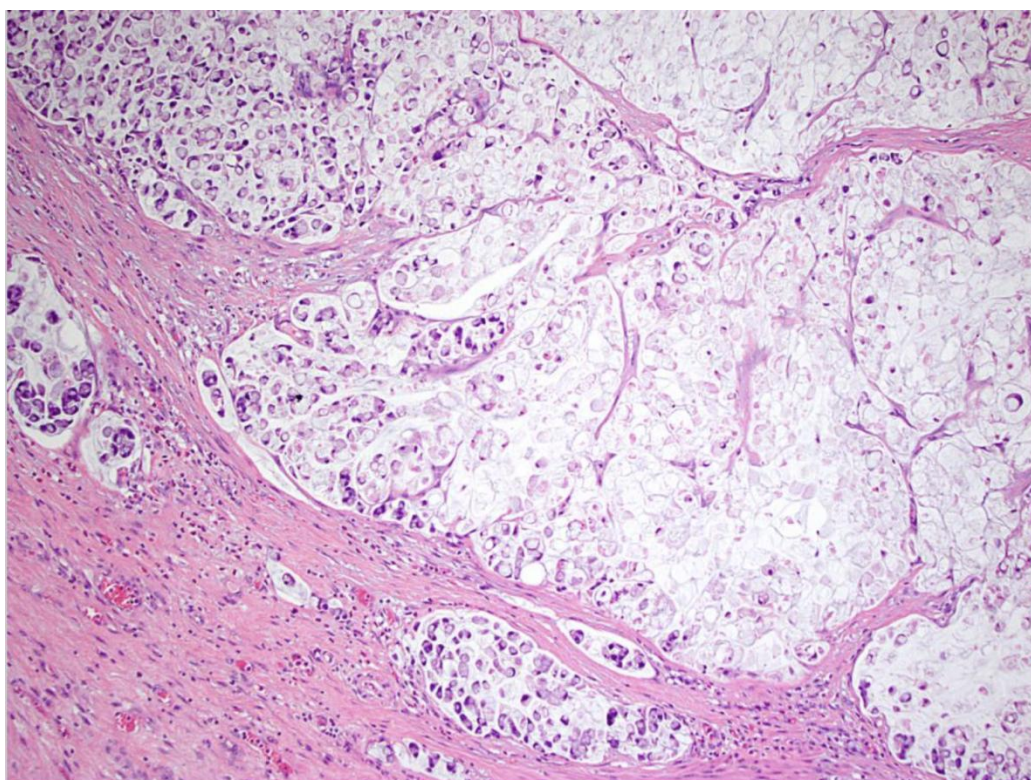
Εικ. 1.1.2: Εκτιμώμενα ποσοστά θνητότητας από κολο-ορθικό καρκίνο, ανά τον κόσμο, και στα δύο φύλα, για όλες τις ηλικίες, σύμφωνα με το χάρτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), κατά το έτος 2020 [505].



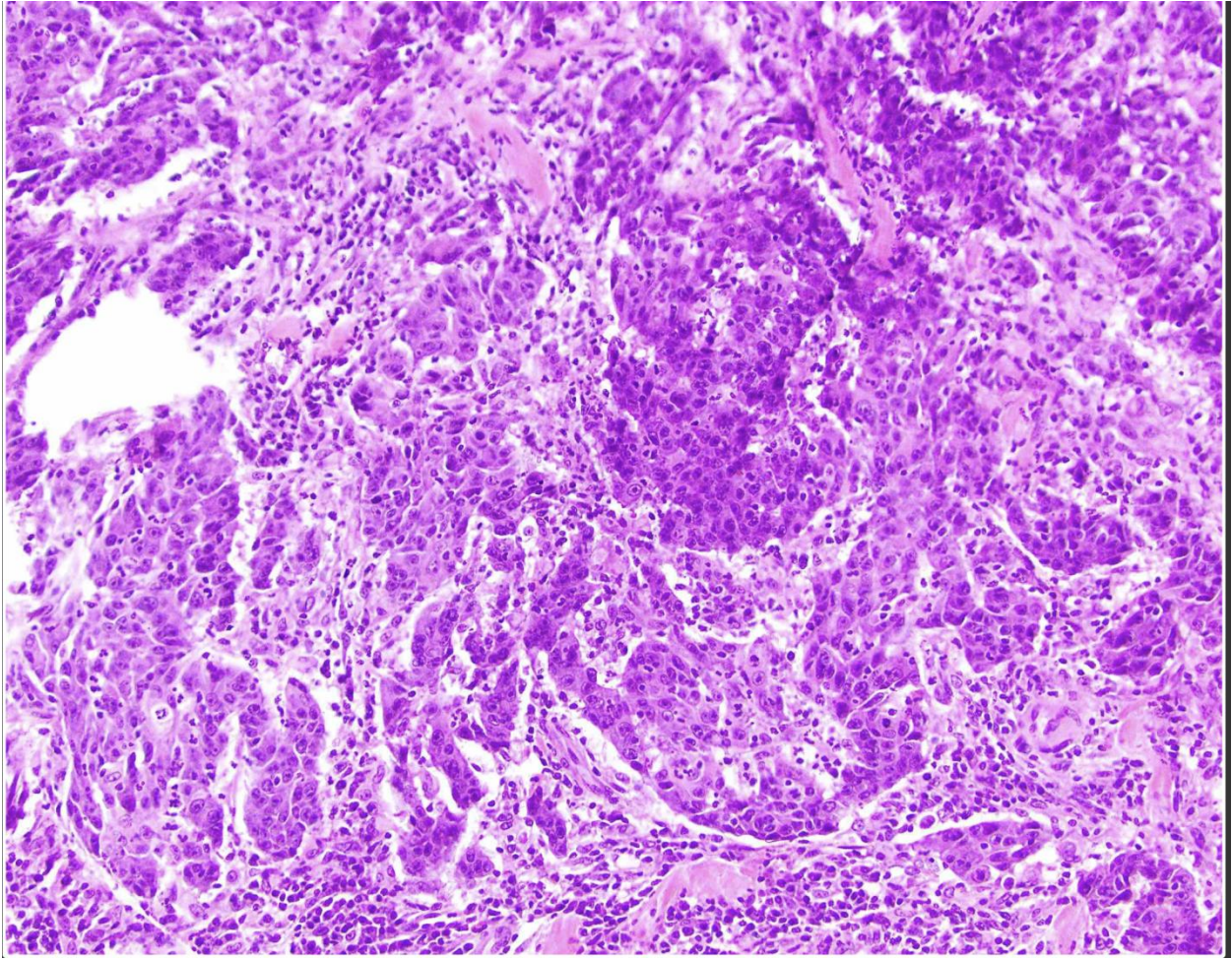
Εικ. 2.8.3.1 Σχηματική αναπαράσταση των ενδοκυττάρων μονοπατιών του EGFR και της PI3K, που εμπλέκονται στην βιολογία του κολο-ορθικού καρκίνου. Κατά την πρόσδεση αυξητικού παράγοντα στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR, επάγεται ο διμερισμός του υποδοχέα, με επακόλουθη ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου τμήματος με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και κινητοποίηση της αλληλοφωσφορυλίωσης των ενδοκυττάρων τυροσινικών τμημάτων του υποδοχέα. Το ενεργοποιημένο, ενδοκυττάριο τμήμα του EGFR, λειτουργεί ως αγκυροβόλιο για τις ενδοκυττάριες πρωτεΐνες της οικογένειας Src 2. Ακολούθως, προσδένονται οι πρωτεΐνες GRB2 και SOS, οι οποίες εξυπηρετούν την πρόσδεση και ενεργοποίηση της GDP/GTP εξαρτώμενης κινάσης KRAS, και την ανταλλαγή του GDP με GTP, που καθιστά την πρωτεΐνη KRAS ενεργό. Σε αυτή τη μορφή, η RAS πρωτεΐνη προσδένει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη RAF, η οποία φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες MEK, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την πρωτεΐνη ERK. Η ενεργός ERK πρωτεΐνη, μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που οδηγούν στην έκφραση πρωτεϊνών όπως οι c-FOS, c-JUN, myc, με επακόλουθη ενίσχυση της επιβίωσης του κυττάρου και κινητοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η GRB2 πρωτεΐνη, επάγει την πρόσδεση της πρωτεΐνης PI3K, η οποία μεσολαβεί τη φωσφορυλίωση του PIP2 σε PIP3. Το ενεργό PIP3, προσδένεται στην πρωτεΐνη AKT, η οποία αγκυροβολεί στην ενδοκυττάρια επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Η ενεργοποιημένη AKT παρεμποδίζει τη λειτουργία της TSC2, μέσω φωσφορυλίωσης, με επακόλουθη ενεργοποίηση της mTORC1 στην επιφάνεια του λυσοσώματος. Κατά την ενεργοποίηση της, η mTORC1 ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες που εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση, την σύνθεση πρωτεϊνών και της αυτοφαγίας, μέσω της κινάσης S6 και του προσδέτη του ευκαρυωτικού παράγοντα ενεργοποίησης της μετάφρασης 4E-1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, EIF4EBP1) [506].



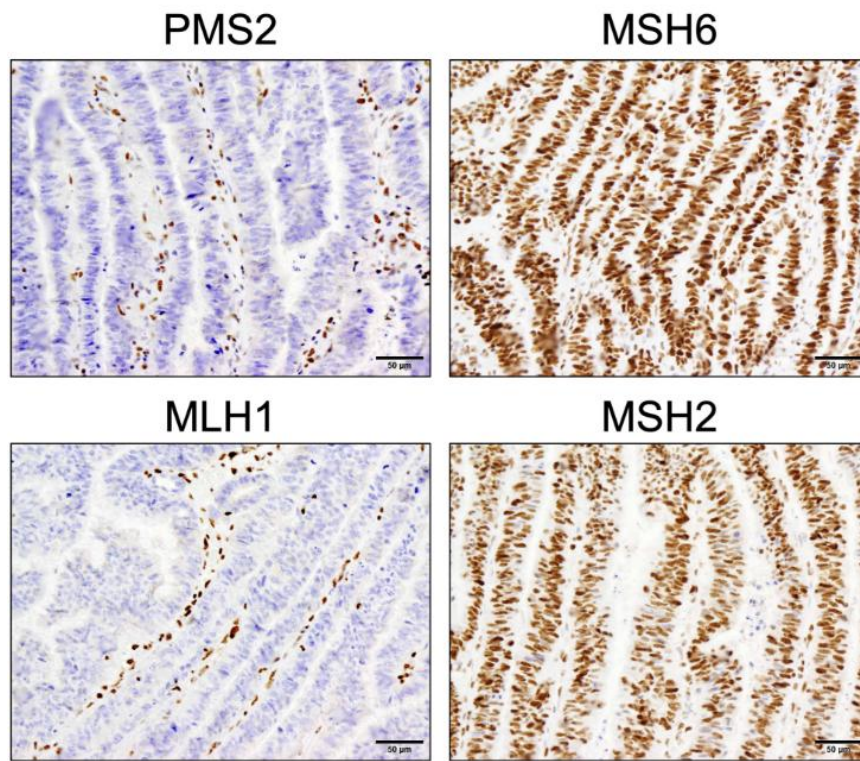
Εικ.1.4.2.1 Ιστολογική τομή βλεννώδους αδενοκαρκινώματος, άνω του 50% της έκτασης του οποίου καταλαμβάνεται από λίμνες βλέννης, μέσα στις οποίες εντοπίζονται αθροίσεις νεοπλασματικών κυττάρων. Αποτελεί το 10-15% των περιπτώσεων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, με ορισμένες περιπτώσεις να χαρακτηρίζονται και από μικροδορυφορική αστάθεια. Φέρει KRAS μεταλλάξεις πιο συχνά από έτερους ιστολογικούς τύπους [507].



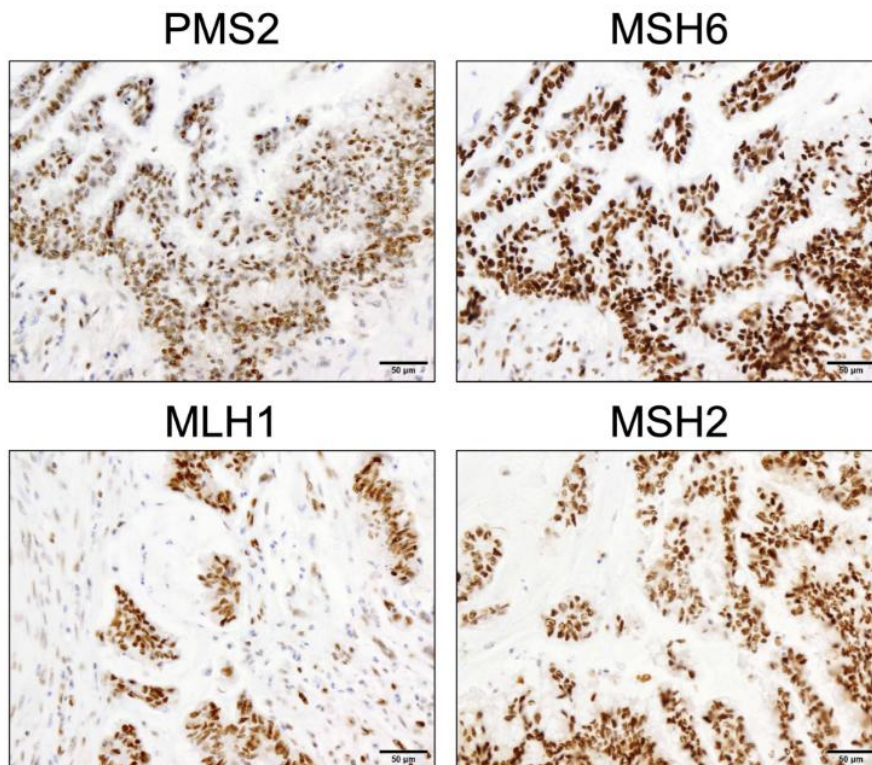
Εικ. 1.4.2.2 Ιστολογική τομή αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου, με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, με ενδοκυττάρια παραγωγή βλέννης [507].



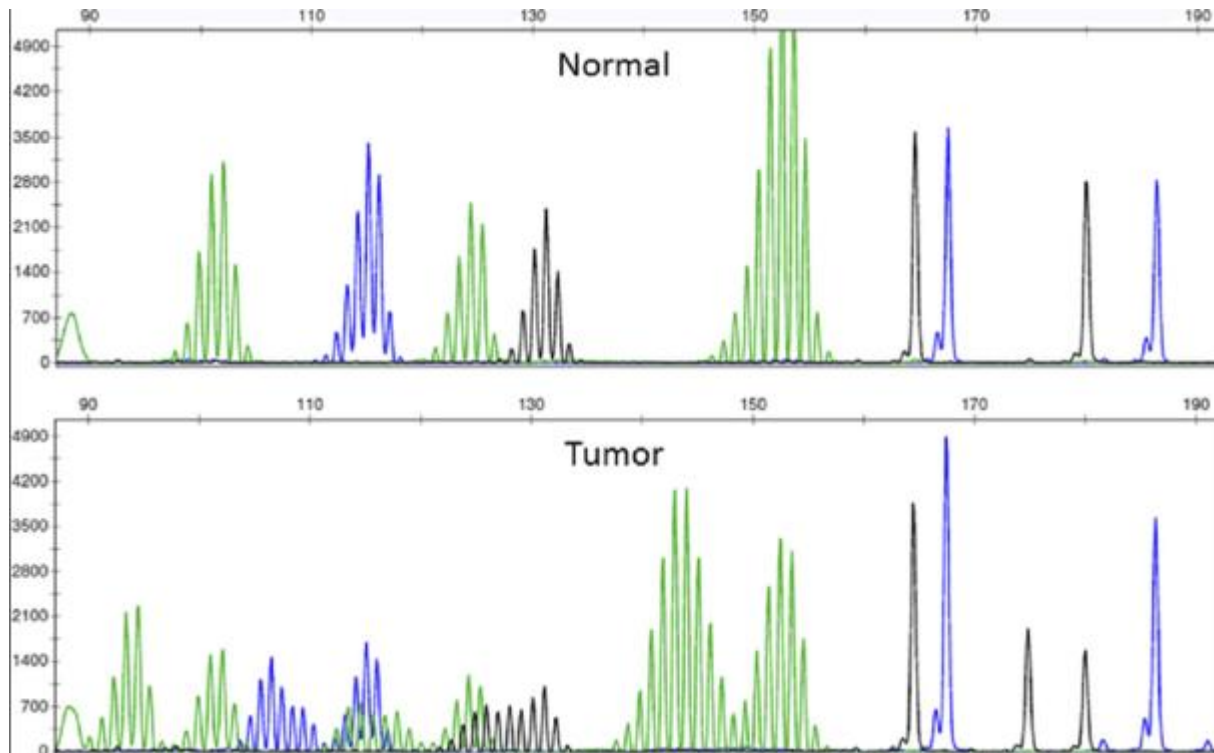
Εικ. 1.4.2.3 Ιστολογική τομή μυελοειδούς κολο-ορθικού καρκινώματος, με αυξημένη κυτταροβρίθεια, κυτταρική και πυρηνική ατυπία, χωρίς σχηματισμό αδενίων. Αποτελεί σπάνιο ιστολογικό υπότυπο, συνήθως χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια, ενώ παρά τη χαμηλή διαφοροποίησή του έχει καλή πρόγνωση. Συχνά, ανευρίσκεται και μετάλλαξη του BRAF. Χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία διηθούντων λεμφοκυττάρων [508].



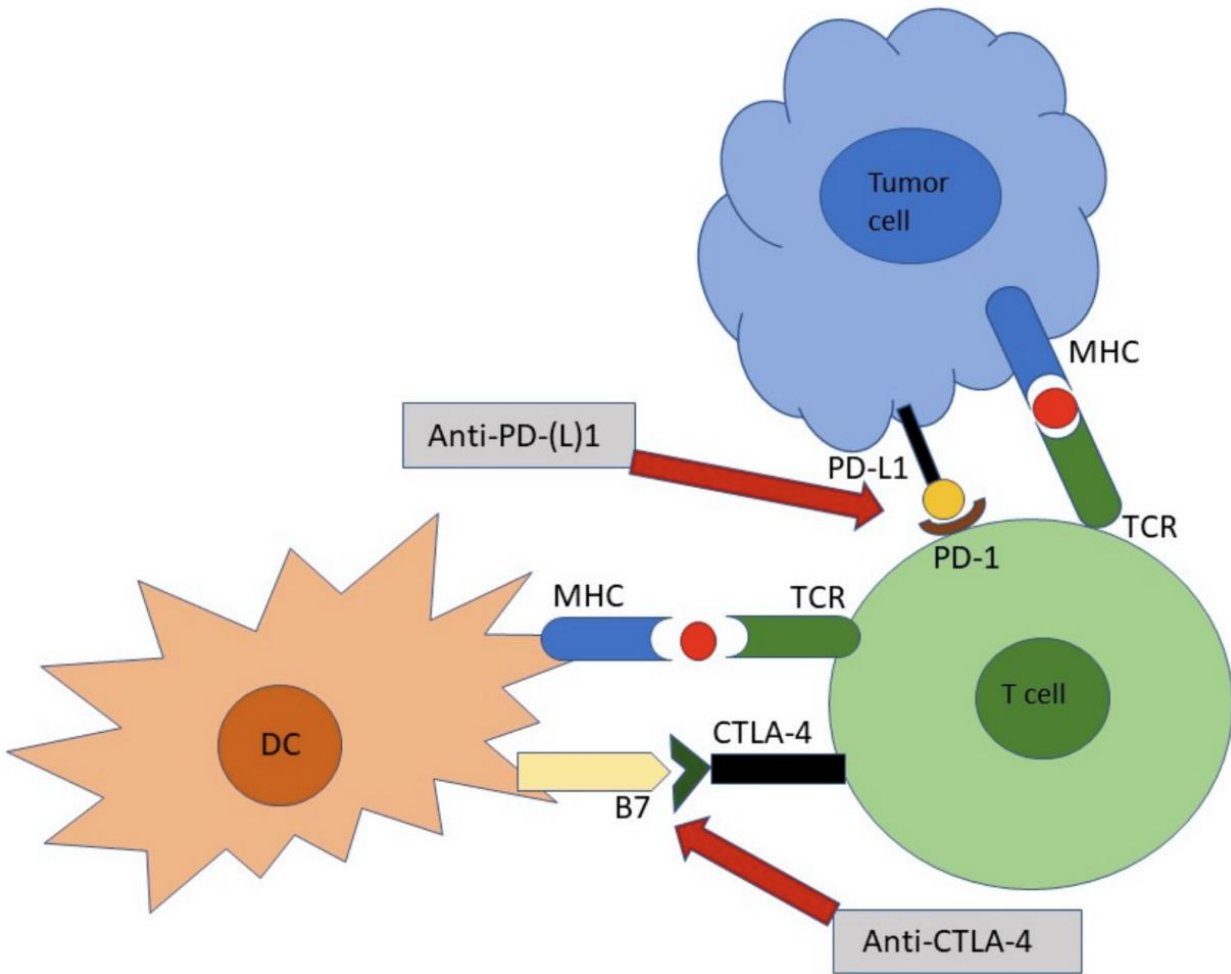
Εικ. 1.6.2 Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για τις επιδιορθωτικές πρωτεΐνες PMS2, MSH6, MLH1, MSH2. Η έκφραση του ενζύμου MLH1 είναι χαμηλή. Το συγκεκριμένο περιστατικό χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια επιδιορθωτικού μηχανισμού (MMR deficient), λόγω της έλλειψης του MLH1 [509].



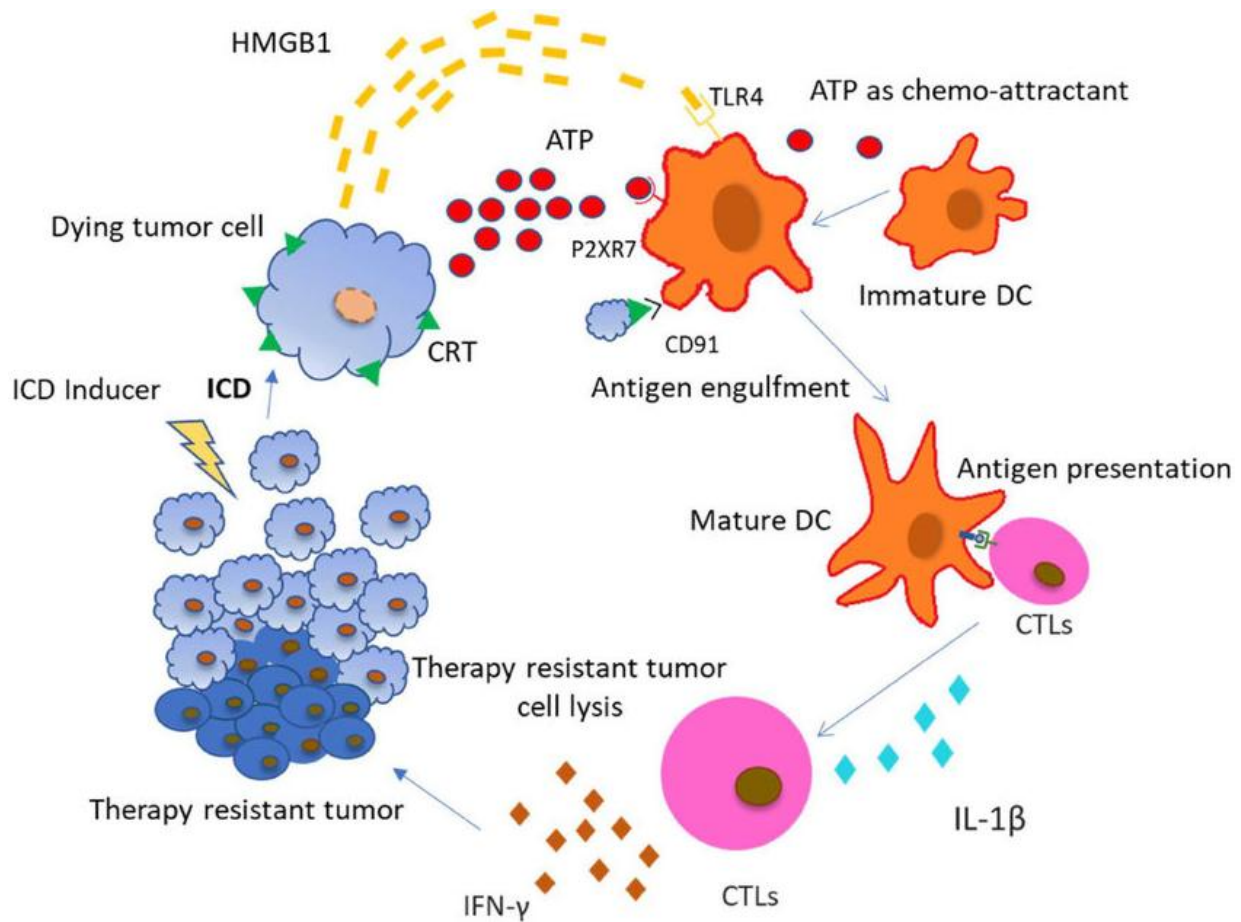
Εικ. 1.6.3 Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για τις επιδιορθωτικές πρωτεΐνες PMS2, MSH6, MLH1, MSH2. Το συγκεκριμένο περιστατικό χαρακτηρίζεται από επάρκεια του επιδιορθωτικού μηχανισμού (MMR proficient), λόγω της θετικής χρώσης για όλα τα ένζυμα [509].



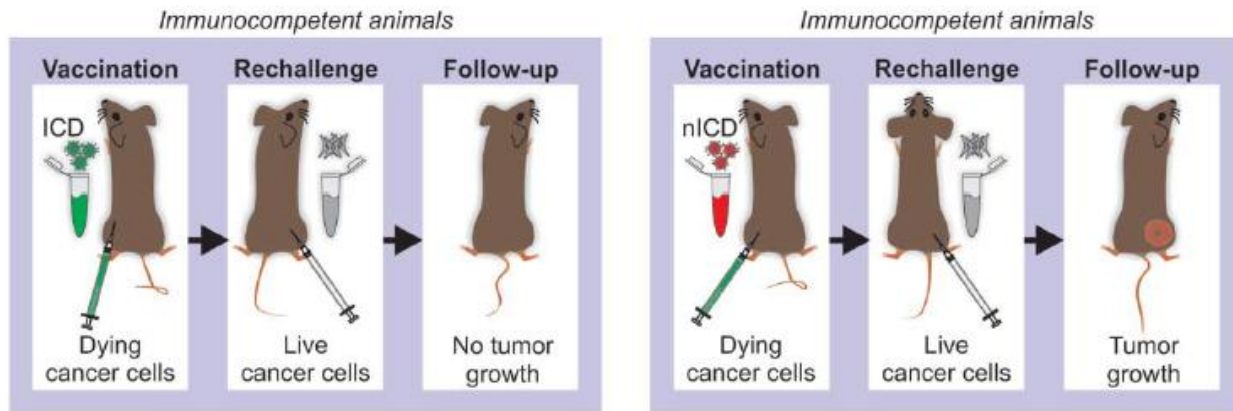
Εικ. 1.6.1 Έλεγχος μικροδορυφορικής αστάθειας, με την τεχνική RT-PCR. Διακρίνεται μικροδορυφορική αστάθεια στο νεοπλασματικό ιστό και για τα 5 εξεταζόμενα μονο-νουκλεοτίδια, BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, και MONO-27, όπως διαφαίνεται από το διαφορετικό μοτίβο μεταξύ του φυσιολογικού και του νεοπλασματικού ιστού, που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή με κολο-ορθικό καρκίνο. Αρκούν 2 μόνο ασταθή νουκλεοτίδια, για το σαφή χαρακτηρισμό του καρκινώματος ως φέρον μικροδορυφορική αστάθεια [510].



Εικ. 1.8.4.1. Σχηματική αναπαράσταση των σημείων ανοσολογικού ελέγχου και της δράσης των immune checkpoint inhibitors. Τα λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν τόσο με τα καρκινικά όσο και με τα δενδριτικά κύτταρα μέσω των υποδοχέων CTLA-4, PD-1 και άλλους που εντοπίζονται στην επιφάνεια τους, και συνδέονται με τους αντίστοιχους συνδέτες επιφάνειας των δενδριτικών κυττάρων και των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται αυτή τη σύνδεση προκειμένου να καταστείλουν την κυτταροτοξικότητα των Τ-λεμφοκυττάρων. Οι immune checkpoint inhibitors, αίρουν αυτό το ανοσοκατασταλτικό αποτέλεσμα, μπλοκάροντας τους υποδοχείς PD-1, CTLA-4 και άλλους, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της λειτουργικότητας και του πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων [511].

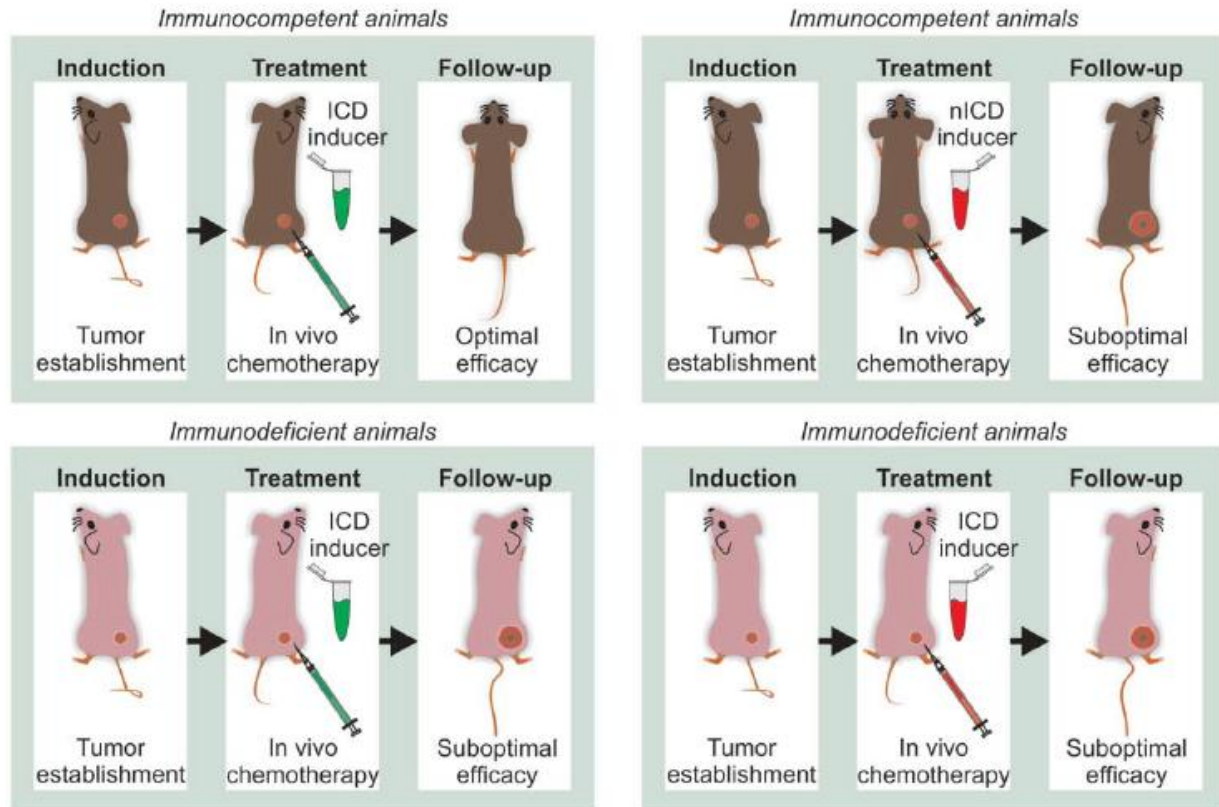


Εικ. 2.2.1. Σχηματική αναπαράσταση της επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου. Χημειοθεραπευτικά φάρμακα ή άλλοι παράγοντες (πχ ακτινοβολία), μπορούν να επάγουν την απελευθέρωση χαρακτηριστικών μοριακών προτύπων, από τα θνήσκοντα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα που υφίστανται ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, εκθέτουν καλρετικουλίνη στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, παράλληλα εκκρίνοντας ATP και την πρωτεΐνη HMGB1. Τα συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα προσδένονται σε υποδοχείς επιφάνειας πολλών κυττάρων του ανοσοποιητικού, μεταξύ των οποίων τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία κινητοποιούν και την κυτταροτοξική ανοσολογική απόκριση. Οι υποδοχείς των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων TLR4, P2X7R και CD91, συνδέονται με τα μοριακά πρότυπα του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου HMGB1, ATP και εκτεθειμένη στην κυτταρική επιφάνεια καλρετικουλίνη, αντίστοιχα. Το ATP συνεπικουρεί στην επιστράτευση των δενδριτικών κυττάρων στην περιοχή ανάπτυξης του καρκίνου, η καλρετικουλίνη βοηθά στην ενδοκυττάρωση των καρκινικών αντιγόνων από τα δενδριτικά κύτταρα, και τέλος η πρωτεΐνη HMGB1 βελτιστοποιεί την αντιγονοπαρουσίαση προς τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται και από την έκκριση IL-1β από τα δενδριτικά κύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους παράγουν φλεγμονώδης κυτταροκίνες, μεταξύ των οποίων η IFN-γ, η οποία οδηγεί στην εξάλειψη των νεοπλασματικών κυττάρων, ακόμα και των ανθεκτικών στην χημειοθεραπεία. (ICD: Immunogenic Cell Death, CRT: Calreticulin, ATP: Adenosine Triphosphate, HMGB1: High mobility group Box 1, APCs: Antigen Presenting Cells, TLR4-Toll-like receptor 4, IL-1β-Interleukin 1 beta, IFN-γ: Interferon-gamma, CTL: Cytotoxic T lymphocyte [512].

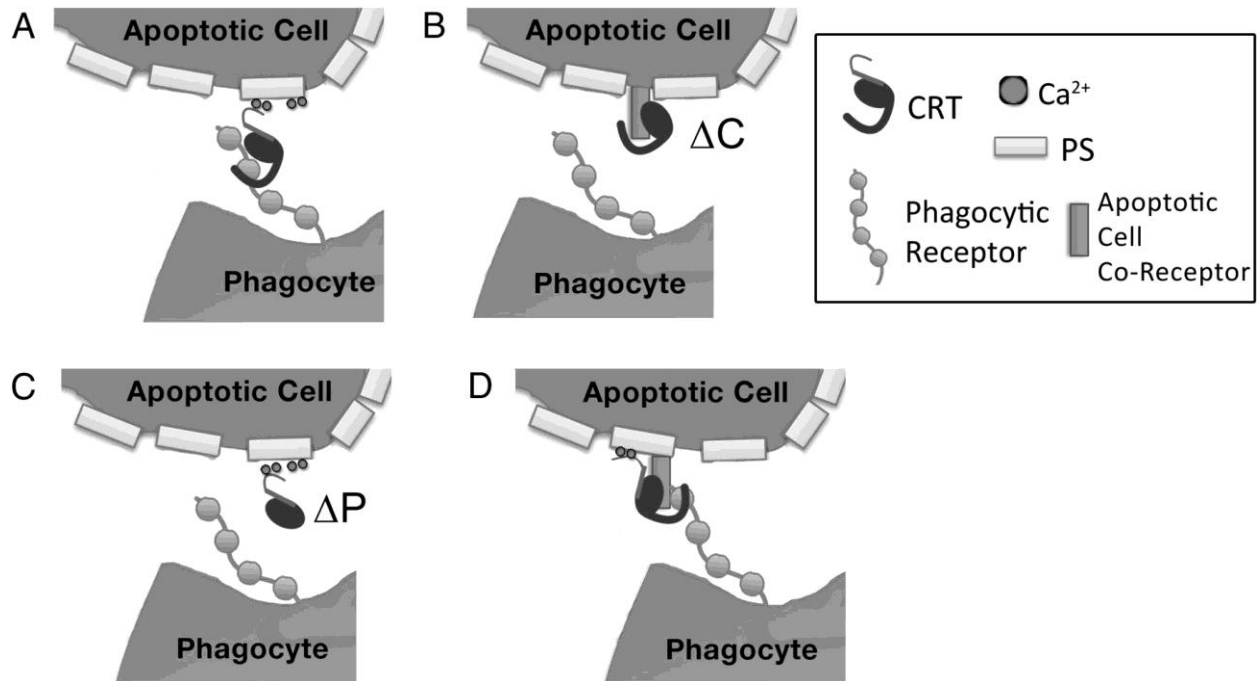


Εικ.
2.4.1.

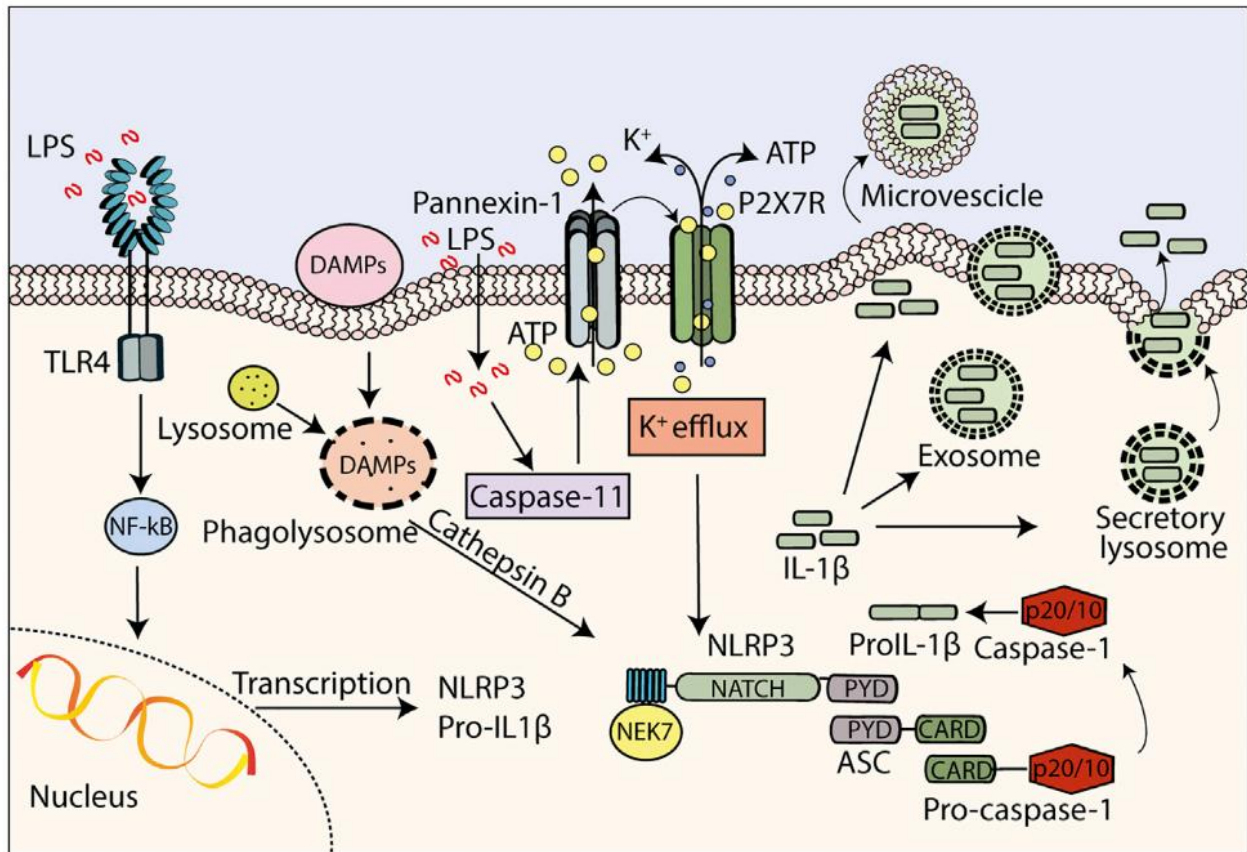
Διάγραμμα in vivo ελέγχου πιθανού επαγωγέα ICD, σε ανοσοϊκανά πειραματόζωα. Στα ανοσοϊκανά πειραματόζωα, ο εμβολιασμός με θνήσκοντα καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν επωαστεί in vitro με τον πιθανό επαγωγέα ICD (πχ οξαλιπλάτινα), οδηγεί σε ενίσχυση της ανοσοποίησης ενάντια στην νεοπλασματική ανάπτυξη. Κατά τον εμβολιασμό με ζώντα καρκινικά κύτταρα, της ίδιας σειράς, δεν αναπτύσσεται όγκος. Ο εμβολιασμός με θνήσκοντα καρκινικά κύτταρα, που έχουν επωαστεί με ουσία που δεν έχει την ιδιότητα επαγωγέα ICD (πχ σισπλατίνη) δεν επάγει αντίστοιχη ανοσοποίηση. Κατά τον εμβολιασμό με ζώντα καρκινικά κύτταρα, αναπτύσσεται όγκος. Ανάπτυξη όγκου στο σημείο έγχυσης ζώντων καρκινικών κυττάρων [232].



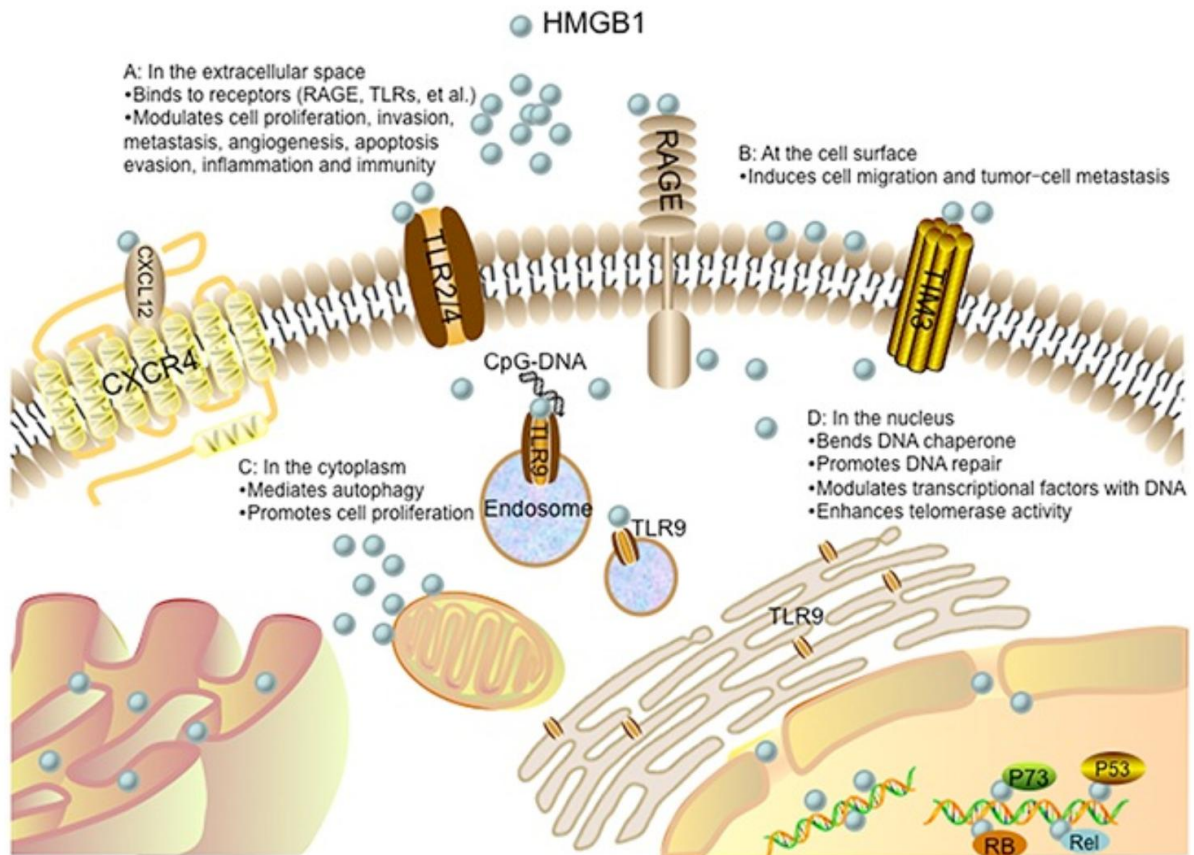
Εκ. 3.4.2. Διάγραμμα in vivo εξέτασης ουσίας για τη δυνατότητα επαγωγής ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου σε ανοσοϊκανά και ανοσοανεπαρκή πειραματόζωα. Σε ανοσοϊκανά ποντίκια, ο in vivo εμβολιασμός με ICD επαγωγέα, οδηγεί σε ογκομείωση, με ανταπόκριση της καρκινικής μάζας. Στα ανοσοανεπαρκή ποντίκια, ο εμβολιασμός με ICD επαγωγέα δεν επιφέρει αντικειμενική ανταπόκριση του νεοπλάσματος (ξενομόσχευμα), κατά τον ίδιο τρόπο με τους μη ICD επαγωγείς [232].



Εικ.2.2.1. Σχηματική αναπαράσταση της ανοσογονικής λειτουργίας της καλρετικουλίνης. Κατά την έκθεση σε επαγωγέα ICD, η καλρετικουλίνη μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο όπου εδράζεται κανονικά, στην εξωκυτταρική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Η καλρετικουλίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας LRP1 (CD91, low density lipoprotein receptor related protein 1) που εντοπίζεται στην επιφάνεια των μακροφάγων, κινητοποιώντας την φαγοκυττάρωση. Η εν λόγω οψωνινοποίηση του καρκινικού κυττάρου διευκολύνεται περαιτέρω από τη σύνδεση της καλρετικουλίνης με την φωσφατιδυλσερίνη (PS: phosphatidylserine), η οποία ενισχύεται από την πρόσδεση ιόντων ασβεστίου [237].

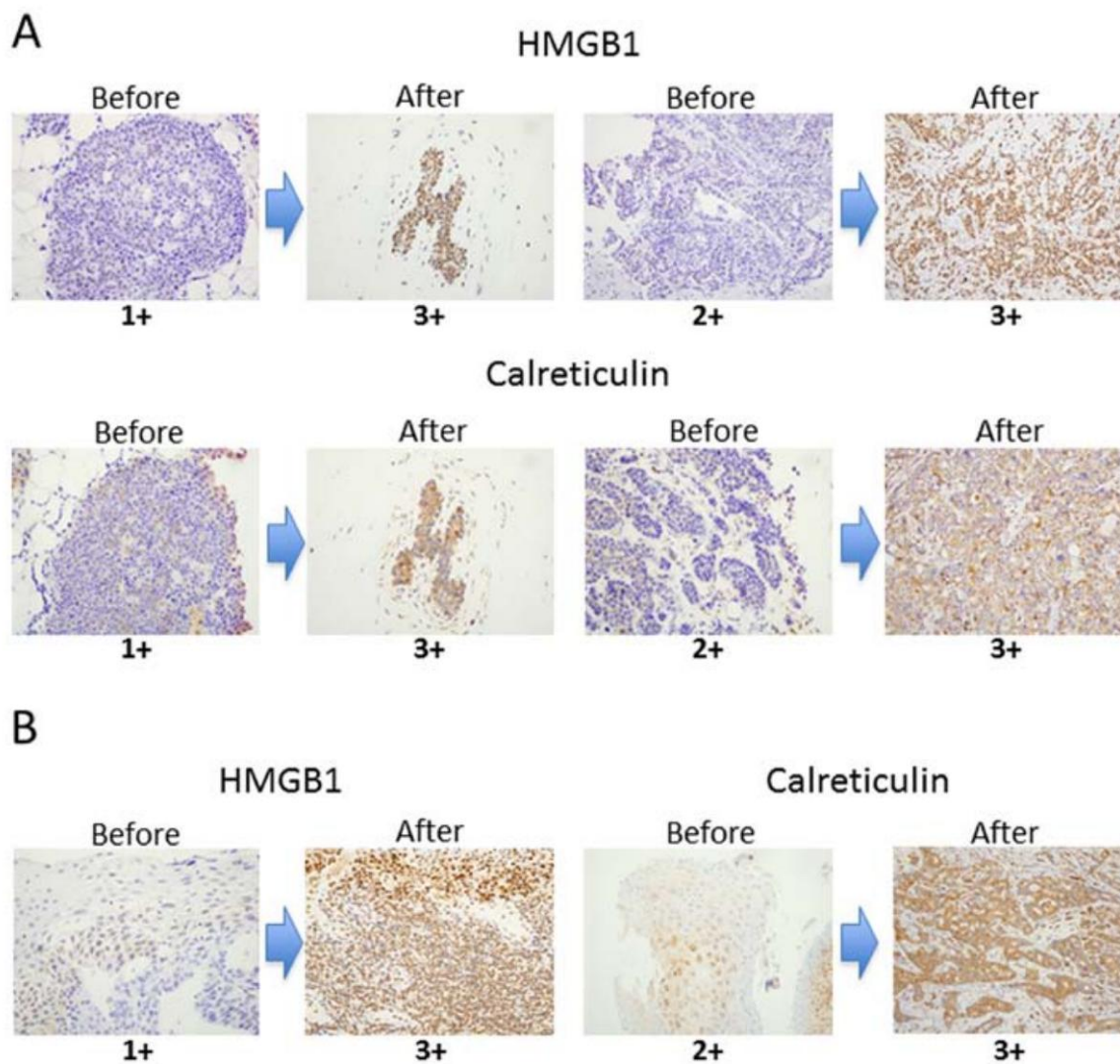


Εικ. 2.2.2. Ο ρόλος του ATP σε συνδυασμό με τον υποδοχέα στην κινητοποίηση παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1β). Το ATP κινητοποιεί την αντλία P2X7R, που εντοπίζεται στην επιφάνεια κυττάρων του ανοσοποιητικού, η οποία εξάγει ιόντα καλίου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών NEK7, NLRP3, ASC, και κασπάσης-1. Το ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα ενεργοποιεί την ιντερλευκίνη-1β, η οποία μεσολαβεί την τοπική κινητοποίηση του ανοσοποιητικού καθώς εκκρίνεται από το κύτταρο [513].

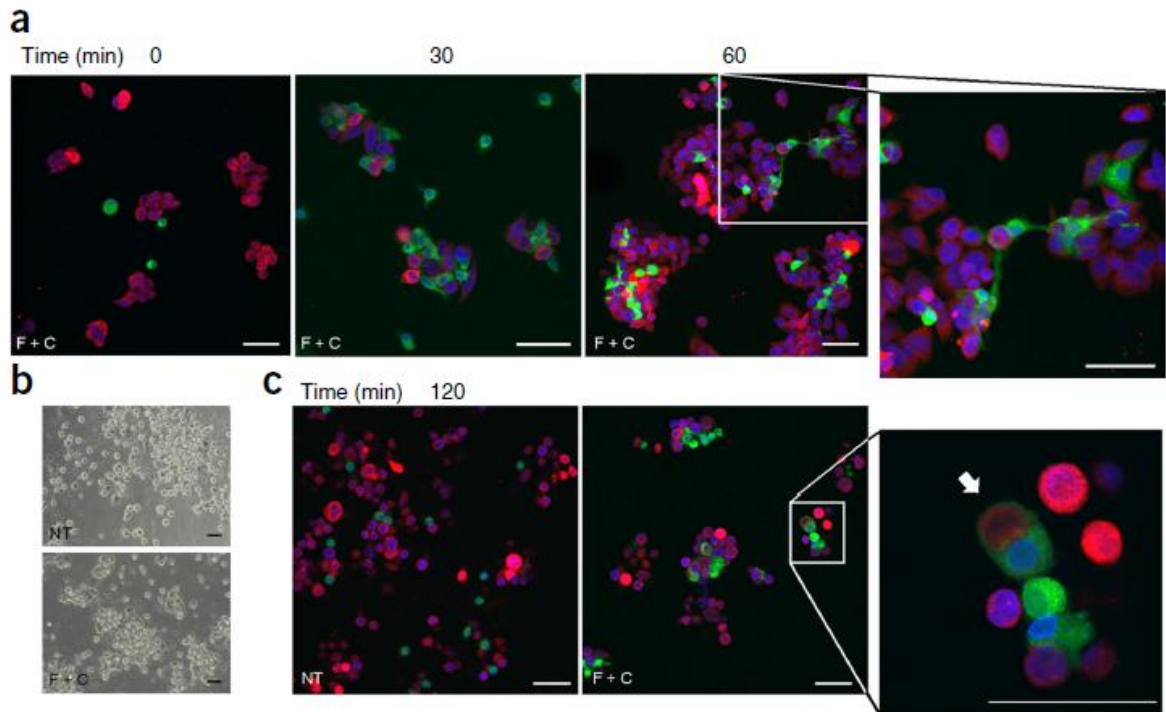


Εικ.
2.2.3

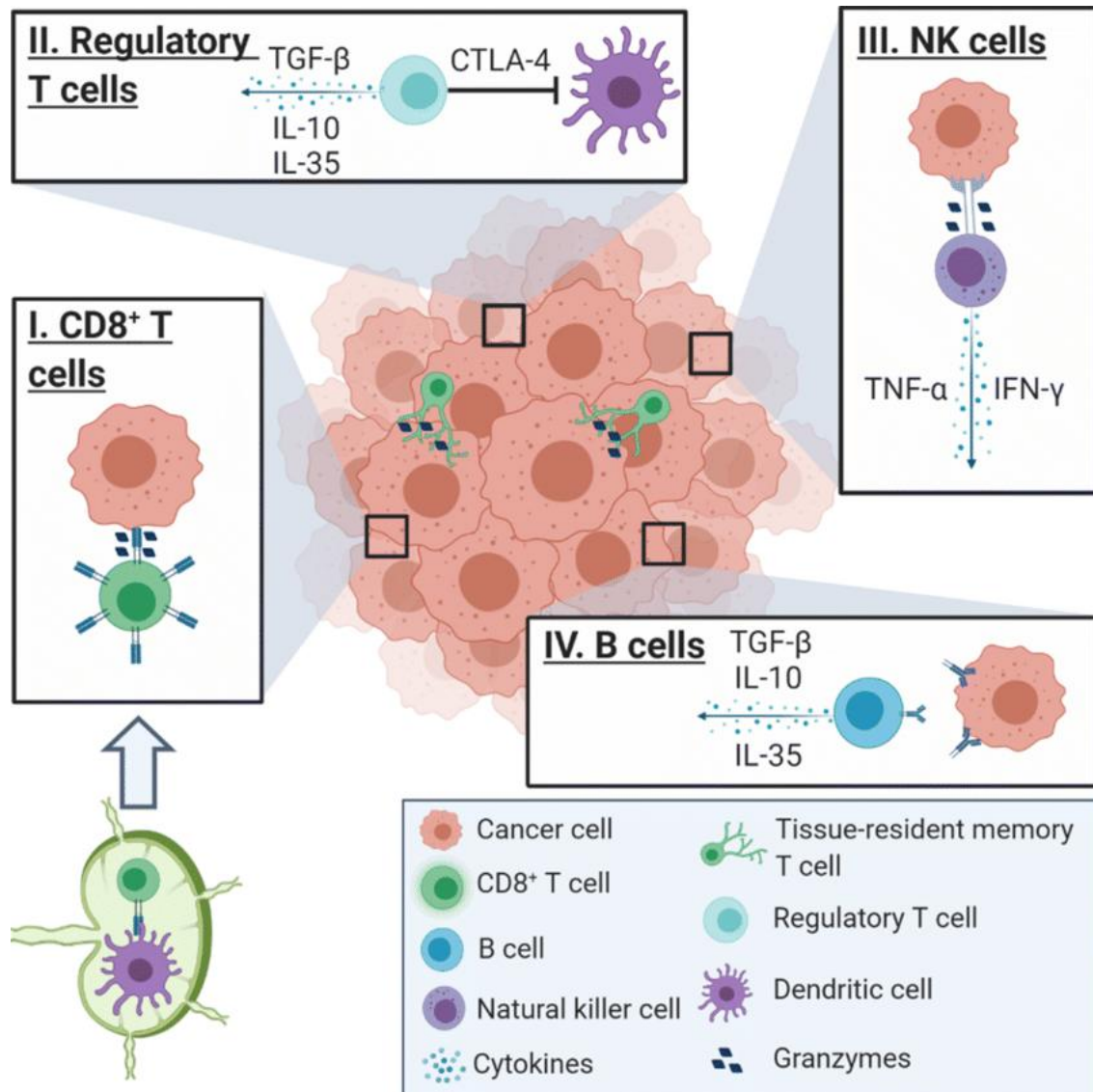
Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του HMGB1. (Α) Όταν απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο, το HMGB1 προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων του ανοσοποιητικού, που περιλαμβάνουν τους RAGE, TLRs, TIM3 και CXCR4, κινητοποιώντας την ανοσολογική/φλεγμονώδη αντίδραση, αλλά και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντίσταση στην απόπτωση. (Β) Στην εξωκυττάριο επιφάνεια, φαίνεται πως η πρωτεΐνη HMGB1 ευνοεί την κυτταρική μετανάστευση. (Γ) Στο εσωτερικό του κυττάρου, η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει την αυτοφαγία και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (Δ) Στον πυρήνα, το HMGB1 δρα ως χαπερόνιο που μετέχει στην επιδιόρθωση και μεταγραφή του DNA, ενώ αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες όπως η p53 και μέλη της οικογένειας του NFκB. Ενισχύει επίσης τη δράση της τελομεράσης, και τη διατήρηση των τελομερών [243].



Εικ. 4.1.1. Αντιπροσωπευτικές ιστολογικές τομές που αναδεικνύουν με ανοσοϊστοχημική χρώση την πρωτεΐνη HMGB1 και καλρετικουλίνη σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (A) και πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου (B), προ και μετά της χορήγησης της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας. Παρατηρείται η αύξηση της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών, συμβατή με την λειτουργία τους ως μοριακά πρότυπα του ICD. Η χορηγούμενη ανοσοθεραπεία ενδεχομένως έδρασε σαν επαγωγέας του ICD, επάγοντας την αύξηση της έκφρασης της καλρετικουλίνης και του HMGB1 [290].



Εικ. 4.2.1. In vitro ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης καρκινικών κυττάρων από το cetuximab, μελέτη με άνοσο υβριδισμό (a) Δενδριτικά κύτταρα (πράσινο) σε συγκαλλιέργεια με καρκινικά κύτταρα της σειράς DiFi κολο-ορθικού καρκινώματος (κόκκινο), τα οποία έχουν επωαστεί με φθοριοουρακίλη, ιρινοτεκάνη και cetuximab. (b) Εικόνες κυττάρων DiFi που έχουν επωαστεί με FOLFIRI και cetuximab (F+C) και κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με αντινεοπλασματικό παράγοντα (NT), και συγκαλλιιεργούνται με δενδριτικά κύτταρα. (c) Άνοσοφθορισμός κατά τη συγκαλλιέργεια καρκινικών και δενδριτικών κυττάρων, παρατηρείται η εντονότερη δραστηριότητα φαγοκυττάρωσης (και σε μεγέθυνση) στην καλλιέργεια όπου αναπτύσσονται τα καρκινικά κύτταρα που επώαστηκαν με FOLFIRI-cetuximab, σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν εκτέθηκαν σε αντινεοπλασματικό παράγοντα (NT). Με το λευκό βέλος αναδεικνύεται η ενδοκυττάρωση ενός κόκκινου, καρκινικού DiFi κυττάρου από το σημασμένο με πράσινο μακροφάγο (Scale bars, 50 μ m) [263].



Εικ.5.1.1 Διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) στο μικροπεριβάλλον του όγκου (I) Τα ανενεργά, μη εκτεθειμένα σε αντιγόνα (naïve) CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα, που εντοπίζονται στους λεμφαδένες, ενεργοποιούνται κατά τη σύνδεση τους με τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα. Τα επαγόμενα ενεργά, CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα, αναγνωρίζουν τα καρκινικά αντιγόνα και συνδέονται με αυτά, οδηγώντας τα σε απόπτωση μέσω έκκρισης κοκκιοενζύμων. (II) Τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα, παρεμποδίζουν την ανοσολογική απόκριση ενάντια στον όγκο, εκκρίνοντας ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες, και περιορίζοντας την δραστηριότητα των δενδριτικών κυττάρων, συνδεόμενα με αυτά μέσω της επίδρασης του υποδοχέα CTLA-4 με τον CD80/86 που βρίσκεται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. (III) Τα κύτταρα φυσικοί φονείς αναγνωρίζουν τα καρκινικά ως ξένα και τα θέτουν σε διαδικασία απόπτωσης, ενώ εκκρίνουν κυτταροκίνες που ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση, και επιστρατεύουν τα CD8⁺ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, ώστε να εισδύσουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου. (IV) Τα B-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν εξειδικευμένα αντισώματα IgG έναντι των νεοπλασματικών όγκων που ωθούν σε απόπτωση τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, μπορούν να εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες που διευκολύνουν την νεοπλασματική ανάπτυξη, όπως οι TGF- β , IL-10, IL-35 (Nelson, Ngamcherdtrakul et al.2021) [514].

Πίνακας 1.2.1.1. Γενετικά σύνδρομα που εμπλέκονται στην παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου. NCCN Guidelines Version 2.2023 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal.[15].

Σύνδρομο	Εμπλεκόμενα γονίδια	Κίνδυνος ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου	Έναρξη κολονοσκόπησης για φορείς	Άλλα νεοπλάσματα που εμφανίζονται σε φορείς
Σύνδρομο Lynch	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, BRAF	40-60%	από την ηλικία των 20-25 ετών	Ca ενδομητρίου, ωοθήκης, στομάχου, μαστού
Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση	APC, MUTYH	100%	από την ηλικία των 10-15 ετών, προληπτική ολική κολεκτομή	Ηπατοβλάστωμα, ca θυρεοειδούς, στομάχου, δωδεκαδακτύλου, μυελοβλάστωμα
Σύνδρομο Peutz-Jeghers	STK11(LKB1)	39%-57%	από την ηλικία των 18 ετών	Ca μαστού, παγκρέατος, λεπτού εντέρου, πνεύμονα
Juvenile Polyposis	BMPR1A, SMAD4	39%-68%	Από την ηλικία των 12 ετών	Πολύποδες στομάχου
Cowden Syndrome	PTEN	18%	από την ηλικία των 35 ετών	Ca θυρεοειδούς, ωοθηκών, όγκοι ΚΝΣ
Li-Fraumeni Syndrome	TP53	100%	από την ηλικία των 25 ετών	Ca μαστού, ωοθηκών, σάρκωμα Ewing, οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, ca επινεφριδίων, όγκοι ΚΝΣ

Πίνακας 1.8.1. Οι κυριότεροι βιοδείκτες στον κολο-ορθικό καρκίνο και η κλινική τους σημασία (NCCN Guidelines Version 3.2024, Colon Cancer) [142].

βιοδείκτης	Επί θετικού αποτελέσματος	Υλικό	Μέθοδος
KRAS (NRAS) (εξώνια 2,3,4)	Δεν υπάρχει όφελος από την αντι-EGFR στοχευτική θεραπεία (cetuximab, panitumumab)	Νεοπλασματικός ιστός	RT-PCR, NGS
KRAS G12C	Επί προόδου νόσου κατόπιν χορήγησης οξαλιπλατίνης και ιρινοτεκάνης, μπορεί να δοθεί θεραπεία με adagrasib, sotorasib	Νεοπλασματικός ιστός	RT-PCR, NGS
BRAF V600E	Ενδεχομένως όχι όφελος από αντι-EGFR στοχευτική θεραπεία (cetuximab, panitumumab) χωρίς BRAF αναστολέα	Νεοπλασματικός ιστός	RT-PCR, NGS ανοσοϊστοχημεία
BRAF V600E	Δυνατότητα 2 ^{ης} γραμμής θεραπείας με αναστολέα BRAF (encorafenib) και cetuximab	Νεοπλασματικός ιστός	RT-PCR, NGS ανοσοϊστοχημεία
MMR deficiency	Ανοσοθεραπεία στην 1 ^η γραμμή στην προχωρημένη νόσο	Νεοπλασματικός ιστός	ανοσοϊστοχημεία
	Όχι επικουρική θεραπεία στο στάδιο II, στην πρώιμη νόσο	Νεοπλασματικός ιστός	ανοσοϊστοχημεία
MSI-High	Ανοσοθεραπεία στην 1 ^η γραμμή στην προχωρημένη νόσο	Νεοπλασματικός ιστός, πλάσμα	RT-PCR, NGS
	Όχι επικουρική θεραπεία στο στάδιο II, στην πρώιμη νόσο	Νεοπλασματικός ιστός, πλάσμα	RT-PCR, NGS
MLH1 mutated	Έλεγχος για BRAF μετάλλαξη	Νεοπλασματικός ιστός, πλάσμα	RT-PCR, NGS ανοσοϊστοχημεία
MSH2 mutated	Έλεγχος για EPCAM μετάλλαξη	Νεοπλασματικός ιστός, πλάσμα	RT-PCR, NGS ανοσοϊστοχημεία
TMB $\geq 10\text{mt}/\text{MB}$	Δυνατότητα για ανοσοθεραπεία (Immune checkpoint inhibitors)	Νεοπλασματικός ιστός	NGS
POLE/D1 mutation	Δυνατότητα για ανοσοθεραπεία (Immune checkpoint inhibitors)	Νεοπλασματικός ιστός	NGS, RT-PCR
HER2 υπερέκφραση	Δυνατότητα για αντι-HER2 στοχευτική θεραπεία (trastuzumab/pertuzumab, trastuzumab/tucatinib, trastuzumab/lapatinib, Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki)	Νεοπλασματικός ιστός	Ανοσοϊστοχημεία, in situ hybridization, NGS
NTRK fusion	Θεραπεία με NTRK αναστολείς με larotrectinib, entrectinib	Νεοπλασματικός ιστός, πλάσμα	Ανοσοϊστοχημεία, in situ hybridization, NGS
RET fusion	Θεραπεία με NTRK αναστολείς με selpercatinib	Νεοπλασματικός ιστός, πλάσμα	Ανοσοϊστοχημεία, in situ hybridization, NGS

Πίνακας 6.3.1. Προοπτικά δεδομένα μεταβολής TILs κατά τη χορήγηση θεραπείας σε πάσχοντες από κολο-ορθικό καρκίνο.

Κλινική μελέτη	Πειραματική θεραπεία	Θεραπευτικό setting	Επίδραση θεραπείας σε TILs	αναφορά
NCT03800602	Metformin και nivolumab	Συστηματική, μετά την 1 ^η γραμμή	Αύξηση κυττάρων ενεργού μνήμης CD45+	Akce, Farran et al. 2023 [495]
NCT04591379	Αντιγριπικό εμβόλιο	Συστηματική, μετά την 1 ^η γραμμή	Αύξηση κυτταροτοξικών CD8+ TILs μείωση των FOXP3 ανοσοκατασταλτικών λεμφοκυττάρων	Gögenur, Balsevicius et al. 2023 [415]
NCT03206073	Pixatimod και nivolumab	Συστηματική, μετά την 1 ^η γραμμή	αύξηση CD4+ και CD8+, NK TILs (σε ασθενή με αντικειμενική μερική ανταπόκριση)	Lemech, Dredge et al. [497]
ADORE	Capecitabine, 5-FU/Leucovorin με ακτινοθεραπεία	νεοεπικουρική	αύξηση CD3+και CD8+ TILs μείωση CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ ανοσοκατασταλτικών TILs	Cho, Kim et al. 2022 [498]
REGOMUNE	regorafenib και avelumab	Συστηματική, μετά την 1 ^η γραμμή	Πρώιμη αύξηση TILs=> καλύτερη επιβίωση	Cousin, Cantarel et al. 2021 [420]
OSLO-COMET	Capecitabine, 5-FU/Leucovorin με ακτινοθεραπεία	νεοεπικουρική	Προεγχειρητική θεραπεία οδηγεί σε αύξηση TILs	Dagenborg, Marshall et al.2020 [500]

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Επιστημονικό υπόβαθρο και σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας

1. Επιστημονικό υπόβαθρο

Ο κολο-ορθικός καρκίνος αποτελεί, όπως ανωτέρω περιγράφηκε, μία από τις συχνότερες κακοήθειες που βάλλουν το γενικό πληθυσμό, σήμερα και σε ηλικίες κάτω των 50 ετών, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν μεταστατική νόσο, με συχνότερη εντόπιση το ήπαρ.

Η ανοσοθεραπεία, έχει αλλάξει εντελώς το πεδίο της ογκολογίας, παρέχοντας καινοτόμες θεραπευτικές στρατηγικές σε ασθενείς με περιορισμένες διαθέσιμες επιλογές, αλλά και συμπληρώνοντας τη δράση των κλασικών θεραπευτικών στρατηγικών. Όσον αφορά τον κολο-ορθικό καρκίνο, η ανοσοθεραπεία έχει αποδείξει το όφελος της στην θεραπεία του MSI-High καρκίνου του παχέος εντέρου, ενώ συνίσταται να χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων συμπαγών όγκων και στον κολο-ορθικό καρκίνο με υψηλό φορτίο μεταλλάξεων (TMB), σε προθεραπευμένους ασθενείς χωρίς άλλες θεραπευτικές επιλογές. Ο θεμέλιος λίθος της εν λόγω προσέγγισης είναι η αλυσίδα μεταξύ υπερμεταλλαγμένου γονιδιώματος, υψηλής ποικιλίας νέο-αντιγόνων στο νεοπλασματικό κύτταρο, και της επακόλουθης υψηλής αναγνωρισιμότητας των νεοπλασματικών κυττάρων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά και κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα.

Όπως εξηγήθηκε ανωτέρω, υπερμεταλλαγμένοι φαινότυποι αφορούν μόνο 5 ως 7% των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο (MSI-High, μεταλλάξεις POLE/POLD1, high TMB). Δεν έχει μελετηθεί ωστόσο εκτενώς το ενδεχόμενο κινητοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος χωρίς να προαπαιτείται ύπαρξη ποικιλίας νέο-αντιγόνων, και ο αντίστοιχος υπερμεταλλαγμένος φαινότυπος. Αυτό το ερώτημα αφορά την πλειοψηφία των ασθενών, με μη υπερμεταλλαγμένο γενετικό υλικό (MMR proficient, POLE wild type, low TMB).

Ο ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος, αποτελεί μια ανοσοτροποποιητική επίδραση μη ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων, κατά την οποία η κινητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος δεν εξαρτάται από τα νέο-αντιγόνα των νεοπλασματικών κυττάρων, αλλά από συγκεκριμένα, μοριακά μοτίβα (DAMPs). Η διερεύνηση φαρμάκων ως επαγωγέων ICD γίνεται με *in vivo* μελέτες σε μοντέλα πειραματοζώων όπως περιγράφηκε ανωτέρω ή, εναλλακτικά, ανιχνεύοντας τα σχετιζόμενα μοριακά πρότυπα (DAMPs) ως υποκατάστατους δείκτες του φαινομένου.

Η ανίχνευση των DAMPs που σηματοδοτούν τον ICD, μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλες μεθόδους, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*:

- Η καλρετικουλίνη, η οποία κατά τον ICD εκτίθεται στην εξωκυττάρια επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, μπορεί να διερευνηθεί σε μεμονωμένα κύτταρα που προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες ή βιοπτικό υλικό πειραματοζώων με κυτταρομετρία ροής και ανοσοφθορισμός. Η ανοσοϊστοχημική αναζήτησή της είναι επίσης εφικτή σε βιοπτικό υλικό ασθενών. Αν και υπάρχουν εξειδικευμένα αντισώματα έναντι της καλρετικουλίνης, ιδιαίτερη δυσκολία παρουσιάζει η διάκριση μεταξύ της καλρετικουλίνης που βρίσκεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων από την κυτταροπλασματική καλρετικουλίνη, κατά την ανοσοϊστοχημική εξέταση [426,427]. Ωστόσο, τη διάκριση δύναται να επιτύχει ο έλεγχος με κυτταρομετρία ροής [428].

-Το εξωκυττάρια εκλυόμενο HMGB1, μετράται συνήθως με τη μέθοδο ELISA, εφαρμόσιμη τόσο στο εναιώρημα κυτταροκαλλιιεργειών όσο και στο πλάσμα ασθενών [429].

-Το εξωκυττάρια εκλυόμενο ATP είναι δύσκολο να δεσμευθεί και να μετρηθεί καθώς αποτελεί ένα μόριο που απαντάται ευρέως σε όλα τα κύτταρα και μπορεί να διασπάται άμεσα μετά την απελευθέρωσή του, ενώ δεν αποτελεί ειδικό δείκτη του ICD [430].

-Άλλα μόρια που σηματοδοτούν τον ICD, όπως οι TLR4 υποδοχείς, οι HSP70/90 και η πρωτεΐνη LRP1, επίσης μπορούν να εντοπιστούν στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής ή και με ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένο ιστό.

Αν και τα εν λόγω μοριακά πρότυπα έχουν αξιοποιηθεί ως δείκτες διερεύνησης φαρμακευτικών παραγόντων ως πιθανούς επαγωγείς ICD, δεν μπορούν να αντιμετωπίζονται ως δείκτες επαγωγής του ICD σε ασθενείς. Ωστόσο, ακόμα και αν τα θεωρήσουμε έτσι, είναι ιδιαίτερα δύσκολη και μη αποδοτική η αξιολόγησή τους σε βιοπτικό υλικό ή και πλάσμα ασθενών.

Αντίθετα, η διερεύνηση της κυτταρικής σύστασης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, είναι καλά τεκμηριωμένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την εξέταση του βαθμού διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Δύναται δε, να εφαρμοστεί εύκολα σε μονιμοποιημένο ιστό βιοπτικού υλικού ασθενών, και να αξιολογηθεί ποιοτικά και ποσοτικά.

Βασικό πρόβλημα αποτελεί η απουσία τεκμηριωμένων δεικτών ανοσογονικότητας για τον MMR proficient καρκίνο του παχέος εντέρου, όπου οι ανοσοθεραπευτικοί παράγοντες δεν έχουν βρει τη θέση τους στο θεραπευτικό αλγόριθμο. Παράλληλα, δεν έχουν μελετηθεί συστηματικά οι επιδράσεις των κυτταροτοξικών και στοχευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Φαίνεται ωστόσο, ότι ακόμα και ευρέως χρησιμοποιούμενες θεραπείες, όπως τα αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα, ενδέχεται να καταλείπουν κατά τη χορήγησή τους μια κινητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, ακόμα και μη εξαρτώμενη από τα νέο-αντιγόνα, η οποία θα μπορούσε αφενός να αποδίδει άμεσα όφελος στον ασθενή, αφετέρου να αποτελεί δόκιμο εφαλτήριο χορήγησης ανοσοθεραπείας.

Η εξέταση των κυττάρων του ανοσοποιητικού στο μικροπεριβάλλον του όγκου, ενδέχεται να μπορεί να απαντήσει στο ερώτημα της ανοσογόνου επίδρασης των θεραπειών που εφαρμόζονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, αποδίδοντας σημαντικές προβλεπτικές και προγνωστικές πληροφορίες.

2. Σκοπός της μελέτης

2.1. Βασικός Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου υπό την επίδραση της αντινεοπλασματικής θεραπείας στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός ανοσοδιέγερσης μέσω επέλευσης του φαινομένου, θα διερευνηθεί η κυτταρική σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, προκειμένου να διαπιστωθούν οι διακυμάνσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, σε σχέση με τη θεραπεία. Κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί συγκεκριμένα άμεσα η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της διήθησης του όγκου από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, που αποτελεί και την καταληκτική ανοσογόνο επίδραση του ICD, τόσο στην πρωτοπαθή, όσο και στις δευτεροπαθείς νεοπλασματικές εστίες.

2.2. Επιμέρους στόχοι

Οι επιμέρους στόχοι, περιλαμβάνουν:

Περιγραφικοί στόχοι

- 1) Την ανασκόπηση και εξαγωγή περιστατικών ασθενών που έλαβαν αγωγή για μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, στην Ογκολογική Κλινική του Π.Γ.Ν.Ι. Ιωαννίνων, και υπεβλήθησαν σε κάποια χρονική στιγμή στην πορεία της νόσου τους σε χειρουργική εκτομή μίας ή περισσότερων δευτεροπαθών εντοπίσεων της νόσου.
- 2) Την καταγραφή των γραμμών θεραπείας και των θεραπευτικών αντινεοπλασματικών παραγόντων που χορηγήθηκαν στους ασθενείς αυτούς, κατά την πορεία της νόσου τους έως το τέλος της περιόδου παρακολούθησης ή ως το θάνατο του ασθενούς.
- 3) Την καταγραφή δημογραφικών χαρακτηριστικών κατά τη διάγνωση (ηλικία, φύλο, ατομικό αναμνηστικό, οικογενειακό αναμνηστικό κακοήθους νεοπλασίας).
- 4) Την ανασκόπηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών της πρωτοπαθούς εστίας, καθώς και του σταδίου και της εντόπισης της πρωτοπαθούς, κατά τη διάγνωση.
- 5) Την ανασκόπηση αποτελεσμάτων μοριακού ελέγχου, ή ανοσοϊστοχημικών δεικτών του νεοπλάσματος όπου είναι διαθέσιμα.
- 6) Την καταμέτρηση και αξιολόγηση της συνολικής επιβίωσης, και της ελεύθερης προόδου ή και υποτροπής νόσου επιβίωσης, ως την 1^η και 2^η αξιολογούμενη υποτροπή/πρόοδο νόσου.

Πειραματικοί Στόχοι

- 1) Την καταμέτρηση υποτύπων λεμφοκυττάρων διηθούντων τον όγκο (TILs), με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αναγνώρισης λεμφοκυτταρικών δεικτών (CD8, CD3, CD4, FOXP3), σε ασθενείς με διαθέσιμο βιοπτικό υλικό.
- 2) Τον υπολογισμό πυκνοτήτων των TILs, σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθείς εντοπίσεις νεοπλάσματος.
- 3) Την διενέργεια σύγκρισης του πληθυσμού και των πυκνοτήτων των υποτύπων των TILs μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας, προς διερεύνηση μεταβολής.

Ερευνητικοί Στόχοι

- 1) Την διερεύνηση προγνωστικών μεταβλητών/παραγόντων επιβίωσης των ασθενών, από τα προαναφερθέντα δημογραφικά/παθολογοανατομικά/μοριακά χαρακτηριστικά.
- 2) Την αναζήτηση τάσης μεταβολής (αύξουσα/φθίνουσα), σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή εστία, σε κάθε εξεταζόμενο ασθενή.
- 3) Τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ πληθυσμού ή και πυκνότητας των υπότυπων των αξιολογούμενων TILs, στην πρωτοπαθή και στη δευτεροπαθή εστία, με την επιβίωση των ασθενών και την αξιολόγηση των TILs ως ανεξάρτητη προγνωστική μεταβλητή επιβίωσης.
- 4) Τη διερεύνηση της μεταβολής πληθυσμού ή και πυκνότητας των υπότυπων των TILs, μεταξύ πρωτοπαθούς/δευτεροπαθούς εστίας ως προγνωστικού παράγοντα επιβίωσης.
- 5) Τη συσχέτιση των αντινεοπλασματικών παραγόντων που χορηγούνται προ χειρουργικής εξαίρεσης νεοπλασματικών εστιών με την επιβίωση των ασθενών.

Μεθοδολογία

1.Επιλογή ασθενών

1.1 Κριτήρια επιλογής

Η διεξαγωγή της παρούσας διατριβής υποβλήθηκε προς το Δ.Σ. του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, και έλαβε έγκριση με τη σύμφωνη γνώμη της Επιστημονικής Επιτροπής Έρευνας, με την απόφαση υπ' αριθμό 5/26-03-2020 (Θ. 18) βλ.επίμετρο 1).

Για την παρούσα αναδρομική μελέτη, διενεργήθηκε ανασκόπηση του αρχείου ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.). Η περίοδος παρακολούθησης των ασθενών ήταν από 01/2012 ως και 03/2024. Οι ζώντες ασθενείς κατά την έναρξη της ανάλυσης υπέγραψαν έντυπο εθελούσιας, ενημερωμένης συγκατάθεσης για την ανώνυμη επεξεργασία των δεδομένων τους και των ιστών τους.

Συγκεκριμένα, αναζητήθηκαν ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο (καρκίνο παχέος εντέρου), οι οποίοι πληρούσαν τα ακόλουθα κριτήρια:

- Προσήλθαν για θεραπεία στην Ογκολογική Κλινική του Π.Γ.Ν.Ι. και έλαβαν αντινεοπλασματική αγωγή στο διάστημα μεταξύ 01/2012-03/2024.
- Είχαν τουλάχιστον 1 (μία) ιστολογική βιοψία θετική για αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου.
- Είχαν αναπτύξει μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου κατά τη στιγμή της διεξαγωγής της έρευνας.
- Είχαν υποβληθεί σε τουλάχιστον 2 (δύο) ιστικές βιοψίες, κατά την πορεία της νόσου:
 - α) μία βιοψία από την πρωτοπαθή εστία ή άλλη εστία προ χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας
 - β) μία βιοψία από μεταστατική εστία ή εστία υποτροπής του νεοπλάσματος, μετά τη χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, η οποία μπορεί να έχει χορηγηθεί ως νεοεπικουρική, επικουρική, περιεγχειρητική ή ακόμα και συστηματική πρώτη γραμμής θεραπεία.
- Είχαν βιοπτικό υλικό σε μορφή κύβου παραφίνης, διαθέσιμο για την ακόλουθη ανοσοϊστοχημική ανάλυση (βλ. παρακάτω).

1.2 Καταγραφή δεδομένων ασθενών

Από το αρχείο του νοσοκομείου συγκεντρώθηκαν πληροφορίες που αφορούσαν:

- Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών: ηλικία κατά τη στιγμή της διάγνωσης, φύλο, ατομικό και οικογενειακό αναμνηστικό, χρήση καπνού και αλκοόλ.
- Χαρακτηριστικά της νόσου: κλινική εικόνα κατά τη διάγνωση, εντόπιση πρωτοπαθούς εστίας, στάδιο κατά τη διάγνωση, σύμφωνα με το TNM σύστημα, ύπαρξη διηθημένων λεμφαδένων, ύπαρξη σύγχρονων μεταστάσεων κατά τη διάγνωση, παθολογοανατομική ανταπόκριση μετά από νεοεπικουρική/προεγχειρητική θεραπεία, αντικειμενική ανταπόκριση κατά τη χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, εξαίρεση επί υγιών ορίων κατά τη χειρουργική εκτομή.
- Μορφολογικά/Ιστολογικά χαρακτηριστικά του καρκινώματος: βαθμός διαφοροποίησης, ύπαρξη λεμφαγγειακής/περινευριδιακής διήθησης, παραγωγή βλέννης, ύπαρξη νέκρωσης, εξέλκωσης ή μιτώσεων, όπου αυτά αναφέρονταν.
- Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες, όπου αξιολογήθηκαν.
- Μοριακά χαρακτηριστικά: Ύπαρξη μεταλλάξεων KRAS, NRAS, BRAF ή άλλων, ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).
- Χρονική στιγμή και εντόπιση 1^{ης} και 2^{ης} εξέλιξης νόσου/υποτροπής και χρονική στιγμή θανάτου ασθενούς.
- Δεδομένα επιβίωσης ασθενών: Συνολική επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης ως το θάνατο του ασθενούς ή την τελευταία καταγεγραμμένη επίσκεψη στην Ογκολογική Κλινική του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, μέχρι και το τέλος της περιόδου παρακολούθησης (Overall survival, OS), ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση από την αρχική διάγνωση ως την εμφάνιση της 1^{ης} προόδου νόσου/υποτροπής, (Progression Free Survival 1, PFS1), ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση από την εμφάνιση της 1^{ης} ως την εμφάνιση της 2^{ης} προόδου νόσου/υποτροπής, (Progression Free Survival 2, PFS2).
- Είδος, αλληλουχία και χρονική διάρκεια χορήγησης αντινεοπλασματικών παραγόντων (χημειοθεραπείας, αντι-EGFR αντισωμάτων, αντιαγγειογενετικής θεραπείας)
- Αριθμός γραμμών θεραπείας ανά ασθενή.

1.3 Ανευρεθέντα περιστατικά

Από το αρχείο της Ογκολογικής Κλινικής και του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι Ιωαννίνων, επιλέχθηκαν 20 (είκοσι) περιπτώσεις ασθενών με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο, των οποίων η αρχική διάγνωση τέθηκε κατά το χρονικό διάστημα 01/2012 έως 03/2020.

Βιοπτικό υλικό προς αξιολόγηση ήταν διαθέσιμο σε 12 (δώδεκα) εκ των 20 ασθενών.

Το βιοπτικό υλικό δεν ήταν διαθέσιμο σε 8 (οκτώ) από τους ασθενείς λόγω α) του ότι βρισκόταν σε έτερο εργαστήριο β) παλαιότητας/φθοράς που καθιστούσε αδύνατη την επεξεργασία και αξιολόγηση των λεμφοκυττάρων.

Τα εξεταζόμενα παρασκευάσματα περιελάμβαναν βιοπτικό υλικό μονιμοποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης, εγκλεισθέν σε κύβους παραφίνης.

2. Διερεύνηση τοπικής ανοσοδιέγερσης

2.1 Μελέτη κυτταρικών πληθυσμών ανοσοποιητικού

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, προκειμένου να διερευνηθεί η τοπική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού στην περιοχή του όγκου, και οι μεταβολές της, σε συνάρτηση με την αντινεοπλασματική θεραπεία, διενεργήθηκε αναζήτηση των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού, στο επίπεδο της ιστικής βιοψίας, τόσο πριν όσο και μετά τη χορήγηση της αντινεοπλασματικής θεραπείας. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές προς χρώση και μελέτη από τους διαθέσιμους κύβους παραφίνης των ασθενών.

Οι ιστολογικές τομές μελετήθηκαν τόσο με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης όσο και με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις προς αναζήτηση των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού τόσο στο εσωτερικό όσο και στο περιβάλλον στρώμα του όγκου.

Κατά την παρούσα μελέτη, αναζητήθηκαν οι κυτταρικοί πληθυσμοί T-λεμφοκυττάρων TILs, CD8+, CD4+, FOXP3+, CD3+ στο διαθέσιμο ιστολογικό υλικό.

2.2 Καταμέτρηση TILs και συγκριτική μελέτη σε ζεύγη βιοψιών

Τα διηθούμενα τον όγκο λεμφοκύτταρα (TILs) αξιολογήθηκαν στις ιστολογικές τομές που παρασκευάστηκαν από τους διαθέσιμους κύβους παραφίνης, στα διαθέσιμα 12 ζεύγη ιστικών βιοψιών.

Η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- Μικροτόμηση των κύβων παραφίνης, πάχους των τομών ήταν 4μm, σύμφωνα με τις συστάσεις της σχετικής βιβλιογραφίας [449].
- Αποπαραφινοποίηση τομών.
- Επανυδάτωση ιστολογικών τομών μέσω εμβάπτισης σε ρυθμιστικό διάλυμα, με αυτοματοποιημένη διαδικασία με χρήση της συσκευής Ventana Benchmark XT.
- Διενέργεια χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης των αποπαραφινοποιημένων ιστολογικών τομών των βιοψιών.
- Διενέργεια ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με μονοκλωνικά αντισώματα αντίστοιχα προς τους υπό μελέτη κυτταρικούς πληθυσμούς.

2.3 Χρησιμοποιούμενα αντισώματα

Τα χρησιμοποιούμενα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή, ο κλώνος και η αραιώση τους παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα:

Πρωτογενή αντισώματα			
Εξεταζόμενος δείκτης	Παραγωγός	Κλώνος	Αραίωση
CD3	Abcam, USA	SP7	1:300
CD8	Dako, Glostrup, Denmark	C8/144B	1:50
FOXP3	Abcam, USA	SP97	1:50
CD4	Thermo Fisher Scientific	GK1.5	1:500

2.4 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση, χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες (με πρωτογενές αντίσωμα, ειδικό για το μόριο στόχο) και αρνητικοί μάρτυρες (χωρίς πρωτογενές αντίσωμα, negative reagent control-NRC).

Τα βασικά στάδια της που ακολουθήσαμε ήταν:

1. Θερμική επεξεργασία ιστολογικών τομών σε κλίβανο.
2. Τοποθέτηση αυτοκόλλητης ταινίας με γραμμοκώδικα στα ιστικά πλακίδια
3. Αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με την χρήση κατάλληλου διαλύματος.
4. Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα.
5. Επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες

2.5 Καταμέτρηση λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με ανοσοϊστοχημικούς δείκτες

Για την καταμέτρηση των διηθούντων τον όγκο TILs χρησιμοποιήθηκε διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο πολλαπλής συμπαράτηρησης. Οι κεχρωσμένες ιστολογικές τομές εξετάστηκαν σε μεγέθυνση x100, ούτως ώστε να επιλεχθεί η κατάλληλη προς αξιολόγηση περιοχή του ιστικού παρασκευάσματος. Αναγνωρίστηκαν και εξαιρέθηκαν από τη μελέτη νεκρωτικές περιοχές του όγκου ή περιοχές που είχαν υποστεί σύνθλιψη λόγω τεχνικού σφάλματος κατά το χειρισμό του δείγματος, καθώς και οι περιοχές υγιούς περιβάλλοντος ιστού.

Η αξιολόγηση των TILs έλαβε χώρα εντός των ορίων του διηθητικού στοιχείου του όγκου χωρίς να περιλαμβάνονται κύτταρα εκτός αυτού. Το όριο διήθησης του νεοπλάσματος ορίστηκε ως η ζώνη εύρους 1 mm μεταξύ νεοπλασματικού στοιχείου και υγιούς ιστού, το οποίο εν συνεχεία ελήφθη υπόψη χωρίς διακριτή καταγραφή.

Οι αναζητούμενοι λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί, αξιολογήθηκαν επίσης στο περιβάλλον στρώμα του όγκου.

Η σαφής μεμβρανική κυτταροπλασματική ανοσοχρώση για τα CD3+ και CD8+, CD4+ λεμφοκύτταρα και η πυρηνική ανοσοχρώση για τα FOXP3+ λεμφοκύτταρα ορίστηκε ως θετικό αποτέλεσμα.

Η υψηλότερη μεγέθυνση (x 400) σε συγκεκριμένη επιφάνεια οπτικού πεδίου, την οποία έχει το συγκεκριμένο μικροσκόπιο, με εμβαδόν 0,24mm² (0.2374625mm²), χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια.

2.6 Υπολογισμός εμβαδού αξιολόγησης κυττάρων

Για τον υπολογισμό του εμβαδού σε κάθε οπτικό πεδίο με υψηλή μεγέθυνση (HPF, High Power Field) x 400) έχει εμβαδόν:

$$E=\pi r^2=3.14 \times (\text{διάμετρος}/2)^2=3.14 \times 0.275^2=0.2374625\text{mm}^2=0.24\text{mm}^2$$

$$\text{Σε 2HPF αντιστοιχεί Εμβαδόν } 2E=2 \times 0.2374625\text{mm}^2=0.474925\text{mm}^2$$

$$\text{Σε 4HPF αντιστοιχεί Εμβαδόν } 4E= 4 \times 0.2374625\text{mm}^2=0,94985\text{mm}^2$$

2.7 Εκτίμηση αριθμού ανοσοκυττάρων

Τα θετικά ενδο-ογκικά (και στρωματικά ανοσοκύτταρα, εκτιμήθηκαν σε 10 οπτικά πεδία υψηλής μεγένθυσης (x 400) στο βιοπτικό υλικό κάθε ασθενούς.

Τα υπό αξιολόγηση οπτικά πεδία καταλαμβάνονται από 100% νεοπλασματικό στοιχείο (Tumor Cell Component, TCC), ενώ προσδιορίσθηκε κάθε πεδίο το ποσοστό του στρωματικού (% Stromal Cell Component, SC) και επιθηλιακού στοιχείου(% Epithelial Cell Component, EC), με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες [439].

Αν και οι Salgado et al. [439] προτείνουν την καταμέτρηση μόνο των στρωματικών TILs, στην παρούσα μελέτη προχωρήσαμε σε καταμέτρηση των TILs περιέλαβε τόσο τα ενδοογκικά (intratumoral, αλλιώς ενδοεπιθηλιακά, intraepithelial) , όσο και τα στρωματικά διηθούντα λεμφοκύτταρα (stromal, sTILs). Τα ενδο-ογκικά TILs είναι αυτά που απέχουν απόσταση ίση ως και 1 λεμφοκύτταρο από τα νεοπλασματικά κύτταρα, ή βρίσκονται ακόμα και σε άμεση επαφή με αυτά. Τα στρωματικά εντοπίζονται διάσπαρτα μεταξύ των νεοπλασματικών αθροίσεων. Έγινε διακριτή εκτίμηση του πληθυσμού των στρωματικών και ενδο-ογκικών κατηγοριών λεμφοκυττάρων, sCD3, sCD8, sFOXP3 και iCD3, iCD8, iFOXP3, αντίστοιχα. Η συμπερίληψη και των δύο κατηγοριών των TILs, διενεργήθηκε με σκοπό την διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας και των δύο τύπων, με σκοπό να αποφευχθεί η απώλεια σημαντικών επιστημονικών συμπερασμάτων.

Τα TILs (CD8, CD3, FOXP3) ανά οπτικό πεδίο καταμετρήθηκαν ένα προς ένα και καταγράφηκαν ηλεκτρονικά.

Η πυκνότητα των CD8, CD3, FOXP3, τόσο των στρωματικών όσο και των ενδο-ογκικών κυττάρων, υπολογίστηκε ως ο λόγος των θετικών ανοσοκυττάρων προς την εκτιμώμενη επιφάνεια του όγκου (σε mm²), επί τοις 100.

Η διάμεση τιμή των πυκνοτήτων για κάθε λεμφοκύτταρικό πληθυσμό χρησιμοποιήθηκε ως ουδός κατάταξης της κάθε περίπτωσης σε υψηλή και χαμηλή διήθηση από τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς αυτούς. Το ίδιο διενεργήθηκε ενδο-ογκικά, στρωματικά και στο σύνολο του βιοπτικού υλικού.

η πυκνότητα των iCD8 προσδιορίσθηκε ως εξής:

Density= count iCD8 / TCC(100%)xEC(60%)xεμβαδόν(0.24)

και η πυκνότητα των sCD8 ως εξής:

Density= count sCD8/TCC(100%)xSC(40%)xεμβαδόν(0.24)

3. Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε περιγραφική στατιστική με τη χρήση ποσοστού επί τοις εκατό (%) και διάμεσων τιμών (μέγιστη, ελάχιστη) για να παρουσιαστούν τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων, όπως και για την περιγραφή της κατανομής των ανιχνευόμενων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών.

Η διάμεση τιμή της κατανομής των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε ως ουδός κατηγοριοποίησης των εξεταζόμενων νεοπλασμάτων σε όγκους με χαμηλή ή υψηλή περιεκτικότητα σε CD3, CD4, CD8 και FOXP3 λεμφοκύτταρα (στρωματικά, ενδοεπιθηλιακά και συνολικά).

Η ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 στο υλικό της βιοψίας του όγκου, με επιλεγμένα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, εξετάστηκε με εφαρμογή του χ^2 -test ή τη δοκιμασία του Fisher (Fisher's exact test), για τις ποιοτικές μεταβλητές και με τη δοκιμασία αθροίσματος διατάξεων του Wilcoxon (Wilcoxon rank-sum test) για τις συνεχείς μεταβλητές. Η μεταβολή μεταξύ στη συγκέντρωση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας, εξετάστηκαν με τη δοκιμασία προσημασμένης διάταξης του Wilcoxon (Wilcoxon Signed-rank test).

Ως συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS), υπολογίστηκε το χρονικό διάστημα από την αρχική διάγνωση ως το θάνατο του ασθενούς (ανεξαρτήτως αιτίου θανάτου). Για τους ζώντες ασθενείς, όπως και τους ασθενείς που χάθηκαν από την παρακολούθηση, χρησιμοποιήθηκε η τελευταία ημερομηνία εξέτασης στο ογκολογικό τμήμα του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων.

Η ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση 1 (Progression-Free Survival, PFS1), καταμετρήθηκε από την ημερομηνία της διάγνωσης, ως την ημερομηνία της πρώτης καταγεγραμμένης υποτροπής/προόδου νόσου, ή το θάνατο ανεξαρτήτως αιτίας ή την απώλεια του ασθενούς από την παρακολούθηση, ενώ η ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση 2 (Progression-Free Survival, PFS2), υπολογίζεται ως το χρονικό διάστημα από την πρώτη ως τη δεύτερη καταγεγραμμένη υποτροπή/πρόοδο νόσου ή το θάνατο του ασθενούς.

Η πρόοδος νόσου, εκτιμάται σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST 1.1, ως η αύξηση του αθροίσματος των διαμέτρων των νεοπλασματικών εστιών τουλάχιστον κατά 20% ή η εμφάνιση νέων εστιών [515]. Τα ποσοστά επιβιώσεων για τα OS, PFS1 και PFS2, προέκυψαν βάσει ανάλυσης Kaplan–Meier. Η μονοπαραγοντική Cox ανάλυση (univariate Cox regression) εφαρμόστηκε για να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης των εξεταζόμενων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην επιβίωση των ασθενών (OS, PFS1, PFS2). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του προγράμματος SAS (SAS version 9.4, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίζεται με βάση το αμφίδρομο κατώφλι για το p 0.050 (two-sided p value 0.050).

Αποτελέσματα

1.Περιγραφικό μέρος

1.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Από το αρχείο του νοσοκομείου, ανευρέθησαν 20 περιπτώσεις ασθενών με μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνο. Δέκα από τους 20 ασθενείς ήταν γυναίκες και 10 άνδρες.

Η ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση κυμαινόταν από 38 ως 82 ετών. Η διάμεση ηλικία ήταν τα 65 έτη (IQR 52.5-70), με 55% των ασθενών να είναι 65 ετών και άνω.

Κανένας ασθενής δεν είχε προηγούμενο ιστορικό κακοήθους νεοπλασίας ή αντινεοπλασματικής θεραπείας.

Το ατομικό αναμνηστικό ήταν ελεύθερο σε 30% των ασθενών, ενώ το πιο συχνό πρόβλημα υγείας ήταν αρτηριακή υπέρταση (25% των ασθενών). Μόνο 3 από τους 20 ασθενείς είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό για κολο-ορθικό καρκίνο (1 σε μητέρα, 1 σε αδελφό, 1 σε αδελφή).

25% των ασθενών ήταν καπνιστές και το 15% των ασθενών είχαν διακόψει το κάπνισμα τη στιγμή της διάγνωσης. Κατάχρηση αιθυλικής αλκοόλης περιγράφουν 2 μόνο από τους ασθενείς.

Το πιο συχνό σύμπτωμα κατά τη διάγνωση ήταν η απώλεια αίματος από το ορθό σε 40% των ασθενών, ενώ 25% των ασθενών παρουσίαζε διαταραχές κενώσεων. Μόνο σε 2 ασθενείς ο κολο-ορθικός καρκίνος ανευρέθηκε στο πλαίσιο προληπτικού ελέγχου.

Η εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας ήταν αριστερά της σπληνικής κολικής καμπής σε 17 εκ των 20 ασθενών, και στο ορθό/ορθοσιγμοειδές σε 5 εξ αυτών.

Όσον αφορά τη μορφολογία, 40% των νεοπλασματικών εστιών κατά τη διάγνωση παρουσίαζαν εξέλκωση, ενώ μόνο 10% περιείχαν περιοχές νέκρωσης. Λεμφαγγειακή διήθηση/αγγειακά έμβολα περιγράφονται σε 30% των νεοπλασματικών εστιών κατά τη διάγνωση, ενώ περινευριδιακή διήθηση σε 20%.

Το στάδιο κατά TNM ήταν T3 (διήθηση του εντερικού τοιχώματος χωρίς διήθηση του ορογόνου) σε 75% των ασθενών και T4 σε 25%. 50% των ασθενών είχε 3 ή περισσότερους διηθημένους λεμφαδένες κατά τη διάγνωση, ενώ σύγχρονες ηπατικές και πνευμονικές μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης παρουσίαζε το 35% και το 10% των ασθενών, αντίστοιχα. Η αρχική χειρουργική εκτομή, ακόμα και περιλαμβάνοντας μεταστασιεκτομή ήταν R0 για όλους τους ασθενείς.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Χαρακτηριστικά ασθενών n(%)

φύλο	άρρεν	10 (50%)
	θήλυ	10 (50%)
Ηλικία	<65 ετών	9 (45%)
	≥ 65 ετών	11 (55%)
Προηγούμενη κακοήθεια	Ναι	0 (0%)
	όχι	100%
Ατομικό αναμνηστικό	ελεύθερο	6 (30%)
	Διαταραχές θυρεοειδούς	2 (10%)
	Αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ)	5 (25%)
	Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ)	1 (5%)
	Στεφανιαία νόσος (ΣΝ)	2 (10%)
	Άλλο	9 (45%)
	Αρνητικό για κακοήγη νεοπλασία	13 (70%)
Οικογενειακό αναμνηστικό	Θετικό για ca <u>παχέος εντέρου</u>	3 (15%)
	Θετικό για άλλη κακοήγη νεοπλασία	4 (20%)
κάπνισμα	ναι	5 (25%)
	διακοπή	3 (15%)
	όχι	12 (60%)
Κατάχρηση αλκοόλ	ναι	2 (10%)
	όχι	18 (90%)
Κλινική εικόνα κατά τη διάγνωση	Διαταραχές κενώσεων	5 (25%)
	Απώλεια αίματος από το ορθό	8 (40%)
	αναιμία	2 (10%)
	ειλεός	3 (15%)
	Προληπτικός έλεγχος	2 (10%)
Πρωτοπαθής	Αριστερό κόλον	17 (85%)
	Δεξιό κόλον	3 (15%)
	Ορθό/ <u>ορθοσιγμοειδές</u>	5 (25%)
Grade	Μέτρια διαφοροποίηση	15 (75%)
	Μέτρια/χαμηλή διαφοροποίηση	25%
Μορφολογικά χαρακτηριστικά νεοπλάσματος	Παραγωγή <u>βλέννης</u>	3 (15%)
	Ύπαρξη νέκρωσης	2 (10%)
	Ύπαρξη εξέλκωσης	8 (40%)
	<u>Λεμφαγγειακή διήθηση</u> (<u>Lymphovascular invasion, LVI</u>)	6 (30%)
	<u>Περινευριδιακή διήθηση</u> (<u>Perineural invasion, PNI</u>)	4 (20%)
Στάδιο κατά τη διάγνωση (TNM)	T3	15 (75%)
	T4	5 (25%)
	N1	13 (65%)
	N2	7 (35%)
	MX/M0	12 (60%)
	M1	8 (40%)
Διηθημένοι λεμφαδένες	<3	10 (50%)
	≥ 3	10 (50%)
Σύγχρονες μεταστάσεις κατά τη διάγνωση	ηπατικές	7 (35%)
	πνευμονικές	2 (10%)

1.2 Χορηγούμενες θεραπείες

Προεγχειρητική χημειοθεραπεία δόθηκε σε 35% των ασθενών, και μετεγχειρητική στο 95%. Η οξαλιπλατίνα συμπεριλαμβανόταν σε 25% των περιπτώσεων χορήγησης προεγχειρητικής και σε 75% μετεγχειρητικής αγωγής. Cetuximab δόθηκε ως προεγχειρητική θεραπεία σε 2 ασθενείς, και σε 1 μόνο ασθενή μετεγχειρητικά. Αντιαγγειογενετική θεραπεία δόθηκε σε 2 και σε 1 ασθενή ως νεοεπικουρική και ως επικουρική θεραπεία, αντίστοιχα.

Όσον αφορά την ανταπόκριση, ήταν ελάχιστη στους 4/7 (57%) ασθενείς που έλαβαν νεοεπικουρική αγωγή, ενώ δεν αναγνωριζόταν καθόλου σε 2/7 (29%). Για 1/7 ασθενείς δεν αναφέρεται ο βαθμός ανταπόκρισης. (Βλ. Πίνακα 1.2).

Πίνακας 1.2. Χορηγούμενες θεραπείες

Νεοεπικουρική αγωγή (προ-εγχειρητική)	ναι	7 (35%)
	όχι	13 (65%)
	Με οξαλιπλατίνα	5 (25%)
	Με ιρινοτεκάνη	1 (5%)
	Με αντι-EGFR αγωγή (cetuximab/panitumumab)	2 (10%)
	Με αντιαγγειογενετική αγωγή (bevacizumab, ziv-aflibercept)	2 (10%)
	ακτινοθεραπεία	1 (5%)
Επικουρική αγωγή (μετεγχειρητική)	ναι	19 (95%)
	όχι	1 (5%)
	Με οξαλιπλατίνα	15 (75%)
	Με ιρινοτεκάνη	3 (15%)
	Με αντι-EGFR αγωγή (cetuximab/panitumumab)	1 (5%)
	Με αντιαγγειογενετική αγωγή (bevacizumab, ziv-aflibercept)	1 (5%)
Tumor regression score (Παθολογοανατομική ανταπόκριση σε νεοεπικουρική αγωγή)	0/1	0 (0%)
	2	4 (20%)
	3	2 (10%)
	Δεν αναφέρεται (Δ.Α.)	1 (5%)

1.3 Μοριακά χαρακτηριστικά

Τα μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον πίνακα 3. Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας εξετάστηκε σε 9 περιπτώσεις (45%), που ήταν όλες MSS-stable.

Ο έλεγχος για μεταλλάξεις του KRAS, ήταν ο πιο συχνά πραγματοποιούμενος, ενώ μετάλλαξη του KRAS διαπιστώθηκε σε 25% των ασθενών της μελέτης. 65% των ασθενών ήταν αρνητικοί για KRAS μεταλλάξεις. Η πιο συχνά ανευρισκόμενη KRAS μετάλλαξη ήταν η G12D (3 περιπτώσεις), ενώ σε δύο ακόμη ασθενείς ανευρέθηκαν οι μεταλλάξεις G12V και G12A.

Δεν ανευρέθησαν ασθενείς με NRAS μεταλλάξεις, από τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε 50% εξ αυτών. Σε μία μόνο περίπτωση από τις 8 που ελέγχθηκαν, ανευρέθηκε η μετάλλαξη του BRAF V600E.

Μετάλλαξη της TP53 διαπιστώθηκε σε 2 μόνο ασθενείς, ενώ έλεγχος TMB πραγματοποιήθηκε σε μία περίπτωση και βρέθηκε χαμηλό (7.04 mt/Mb).

Σε 2 ακόμα περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε πιο εκτεταμένος μοριακός έλεγχος (SMAD, NTRK, BRCA) χωρίς να ανευρίσκονται κλινικά σημαντικές μεταλλάξεις. (Βλ. Πιν.1.3)

Πίνακας 1.3. Μοριακά χαρακτηριστικά		
MSS/MSI	MSS stable	9 (45%)
	MSI-high	0
	άγνωστο	11 (55%)
KRAS	Mutated	5 (25%)
	Wild type	12 (65%)
	άγνωστο	3 (15%)
NRAS	Mutated	0
	Wild type	10 (50%)
	άγνωστο	10 (50%)
BRAF	mutated	1 (5%)
	Wild type	7 (35%)
	Άγνωστο	12 (65%)
PIK3CA	Mutated	2 (10%)
	Wild type	0
	άγνωστο	18 (90%)
TP53	Mutated	2 (10%)
TMB	<10 (mt/Mb)	1 (5%)
	≥ 10 (mt/Mb)	0
	Άγνωστο	19 (95%)

1.4 Δεδομένα υποτροπής και επόμενων γραμμών θεραπείας

Το ήπαρ ήταν η πιο συχνή εστία υποτροπής της νόσου (75% των ασθενών), ενώ υποτροπή στον πνεύμονα παρουσίασαν 3 ασθενείς. Άλλες εστίες υποτροπής ήταν το έντερο (σε 10% των ασθενών), το περιτόναιο σε 1 ασθενή, ενώ σε 2 ακόμα ασθενείς εμφανίστηκε υποτροπή στα οστά (1/20) και σε ενδοκοιλιακούς λεμφαδένες (1/20).

Στο 40% των ασθενών, η πρώτη εστία υποτροπής ήταν μονήρης, 2 ή περισσότερες εστίες υποτροπής περιγράφονται στο υπόλοιπο 60% των ασθενών.

Η δεύτερη υποτροπή της νόσου, αφορούσε κατά πλειοψηφία το ήπαρ (80% των ασθενών), τον πνεύμονα και το περιτόναιο σε 4 και 3 ασθενείς αντίστοιχα.

Από την εμφάνιση της 1^{ης} υποτροπής και μετά 1, 2, 3 και περισσότερες από 3 γραμμές θεραπείας έλαβε το 10%, το 25% και το 30% των ασθενών αντίστοιχα. Πάνω από 3 γραμμές θεραπείας, έλαβαν ακόμα 5 ασθενείς. Συνολικά, το 65% των ασθενών, έλαβε 3 ή περισσότερες επόμενες γραμμές θεραπείας, μετά την εμφάνιση της 1^{ης} υποτροπής.

Η θεραπεία των υποτροπών περιλάμβανε στοχευτική, αντι-EGFR θεραπεία με cetuximab ή panitumumab σε 45% των ασθενών, και αντιαγγειογενετική θεραπεία με bevacizumab ή ziv-aflibercept σε 65% των ασθενών. Η πλειοψηφία των ασθενών (45%) έλαβε ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνη, συγχρόνως ή διαδοχικά στο πλαίσιο της θεραπείας, ενώ 15% και 30% αυτών, έλαβαν μόνο οξαλιπλατίνη και μόνο ιρινοτεκάνη, αντίστοιχα.

Στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων ασθενών, επιχειρήθηκε εξαίρεση τουλάχιστον 1 εκ των εστιών υποτροπής (70%), ενώ αυτό δεν επιχειρήθηκε σε 6 από τους 20 περιγραφόμενους ασθενείς. (Βλ. Πίν.1.4)

Πίνακας 1.4. Δεδομένα υποτροπής και επόμενων γραμμών θεραπείας

Εντόπιση 1^{ης} υποτροπής	Ήπαρ	15 (75%)
	Πνεύμονας	3 (15%)
	Περιτόναιο	1 (5%)
	Εντερικός σωλήνας	2 (10%)
	Άλλού	2 (10%)
Αριθμός εστιών στην 1^η υποτροπή	Μονήρης	8 (40%)
	2 ή περισσότερες	12 (60%)
Εντόπιση 2^{ης} υποτροπής	Ήπαρ	16 (80%)
	Πνεύμονας	4 (20%)
	Περιτόναιο	3 (15%)
	Άλλού	3 (15%)
	δεν εφαρμόζεται	2 (10%)
Επόμενες γραμμές θεραπείας	0	1 (5%)
	1	2 (10%)
	2	5 (25%)
	3	6 (30%)
	>3	5 (25%)
	Άγνωστο	1 (5%)
	<3	8 (40%)
	≥3	11 (65%)
Αντι-EGFR θεραπεία	Όχι	10 (50%)
	Ναι	9 (45%)
	Άγνωστο	1 (5%)
Αντιαγγειογενετική θεραπεία	Όχι	6 (30%)
	Ναι	13(65%)
	Άγνωστο	1 (5%)
χημειοθεραπεία	Oxaliplatin	3 (15%)
	Irinotecan	6 (30%)
	Oxaliplatin και irinotecan	9 (45%)
	Κανένα	1 (5%)
	Άγνωστο	1 (5%)
Χειρουργική εξαίρεση 1^{ης} υποτροπής	Ναι	14 (70%)
	Όχι	6 (30%)

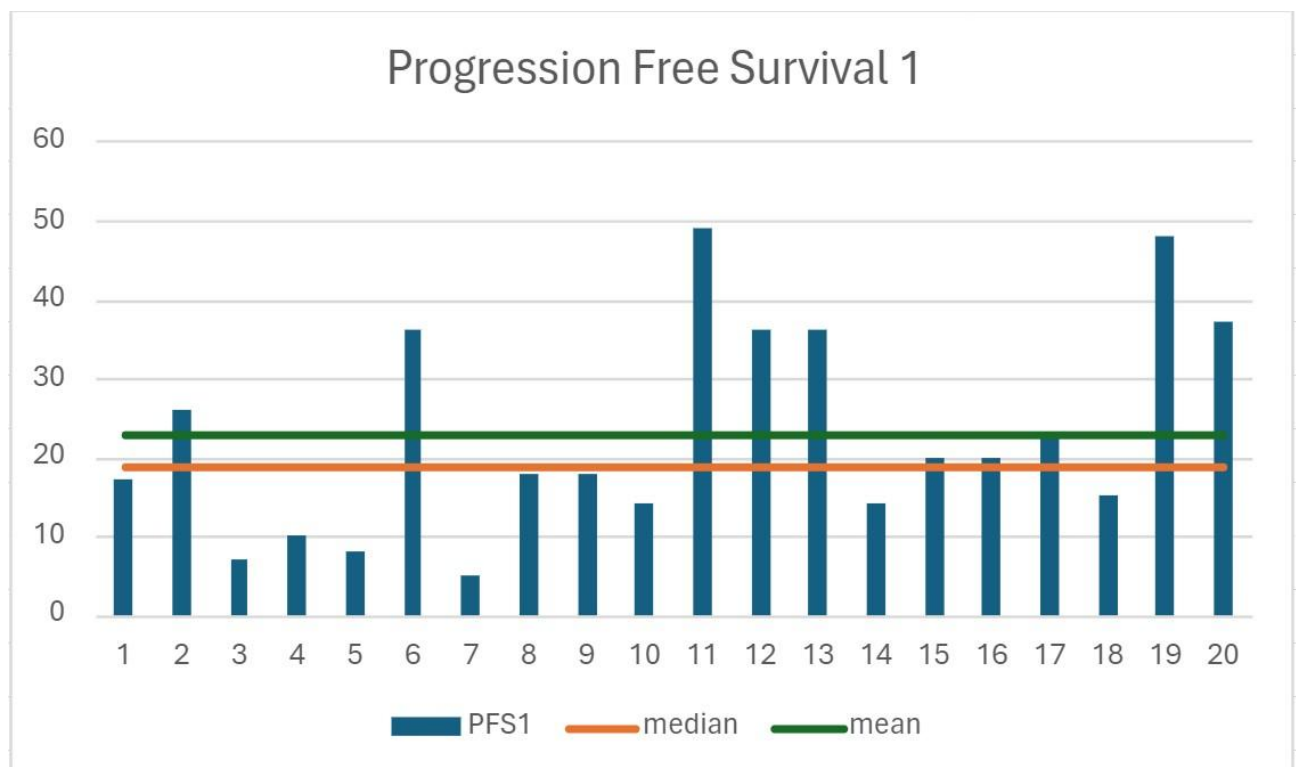
1.5 Δεδομένα επιβίωσης ασθενών

Το διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου από τη διάγνωση ως την 1^η υποτροπή/εξέλιξη νόσου, κυμαινόταν από 5 ως 49 μήνες, με διάμεση τιμή τους 19 μήνες (IQR 14-36 μήνες).

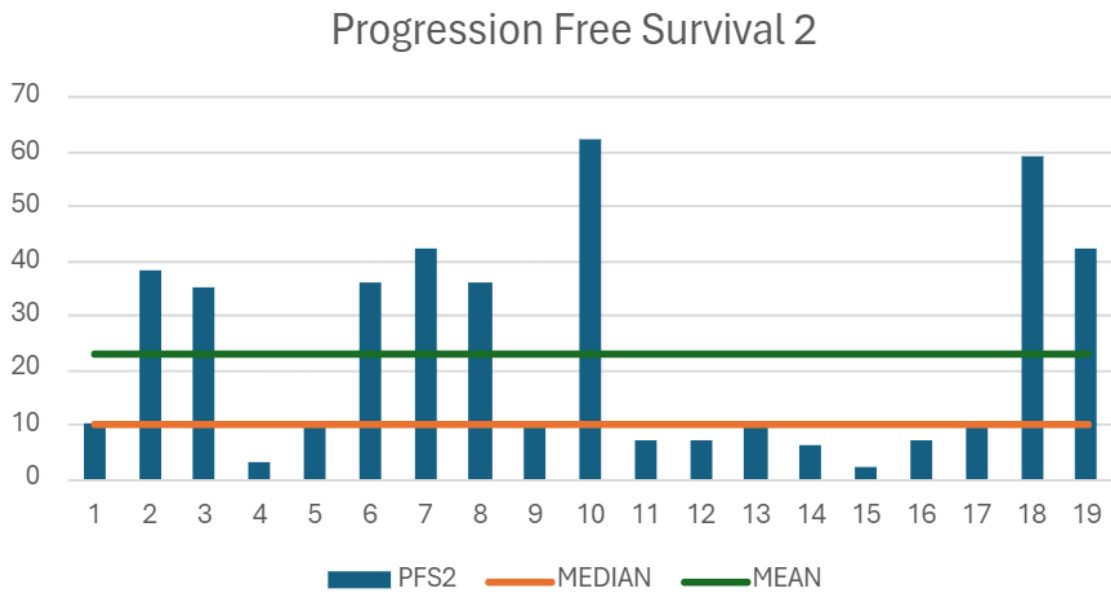
Το διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου από την 1^η ως τη 2^η υποτροπή/εξέλιξη της νόσου, κυμαινόταν από 2 ως 62 μήνες, με διάμεση τιμή τους 10 μήνες (IQR 7-37 μήνες). Παρουσιάζονται τα δεδομένα για τους 19 από τους 20 ασθενείς που παρουσίασαν 2^η εξέλιξη νόσου, ενώ 1 ασθενής παρέμεινε χωρίς εξέλιξη νόσου έως το τέλος της περιόδου παρακολούθησης.

Το διάστημα συνολικής επιβίωσης από τη διάγνωση ως το θάνατο του ασθενούς ή την τελευταία καταγεγραμμένη επίσκεψη κατά το διάστημα της περιόδου παρακολούθησης των ασθενών, κυμαινόταν από 19 ως 113 μήνες, με διάμεση τιμή τους 63 μήνες (IQR: 37.5-79.5 μήνες).

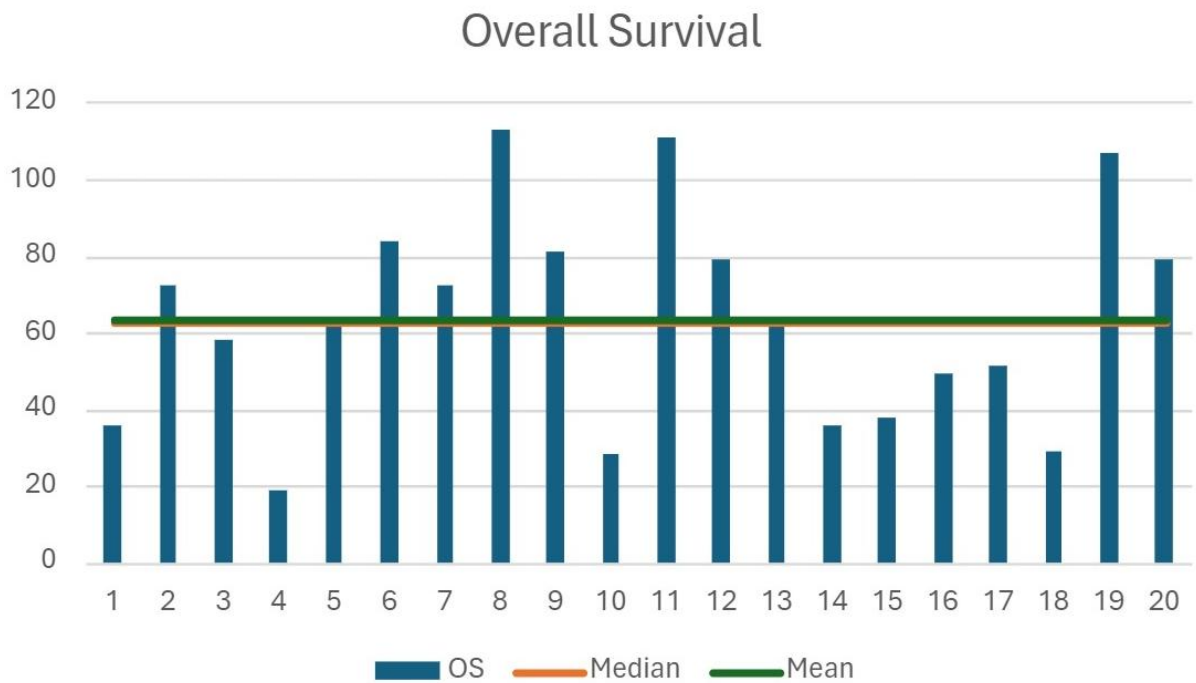
Τα δεδομένα επιβίωσης των ασθενών, συνοψίζονται στα γραφήματα 1.5.1, 1.5.2 και 1.5.3.



Γράφημα 1.5.1. Ελεύθερη πρόοδο νόσου επιβίωση των εξεταζόμενων ασθενών ως την 1^η καταγεγραμμένη εξέλιξη νόσου (PFS1).



Γράφημα 1.5.2. Ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση των εξεταζόμενων ασθενών ως την 2^η καταγεγραμμένη εξέλιξη νόσου (PFS2).



Γράφημα 1.5.3. Συνολική επιβίωση των εξεταζόμενων ασθενών (OS).

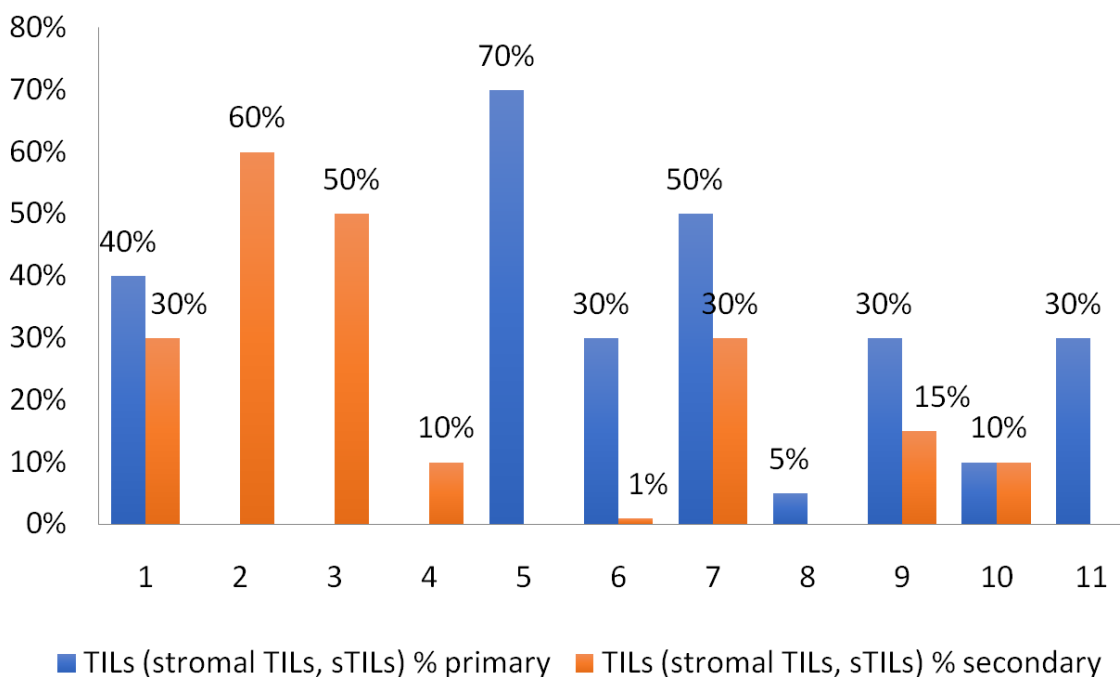
1.6 Καταμέτρηση ποσοστού στρωματικών TILs

Η αξιολόγηση του ποσοστού των στρωματικών TILs κατέστη εφικτή στην πρωτοπαθή εστία για τους ασθενείς υπ' αριθμόν 5, 8 και 11, με αντίστοιχο ποσοστό TILs % της επιφάνειας στρώματος του όγκου 70%, 5% και 30%.

Καταμέτρηση TILs μόνο στην δευτεροπαθή εντόπιση, κατέστη εφικτή σε 3 ασθενείς, τους υπ' αριθμόν 2,3 και 4, οι οποίοι εμφάνισαν ποσοστά 60%, 50% και 10% αντίστοιχα, σε ηπατικές δευτεροπαθείς εντοπίσεις του κολο-ορθικού καρκινώματος.

Στις περιπτώσεις 1,5,6,9 και 10, μπορέσαμε να υπολογίσουμε τα στρωματικά TILs % τόσο στην πρωτοπαθή εντερική εντόπιση (40%, 30%, 50%, 30 και 10%, αντίστοιχα) όσο και σε μία δευτεροπαθή εντόπιση (30%, 1%, 30%, 15% και 10%, αντίστοιχα).

Αν και το δείγμα των ασθενών είναι περιορισμένο, σημειώνεται τάση μείωσης του ποσοστού στρωματικών TILs, στη δευτεροπαθή, σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία, στα περιστατικά 1,5,6 και 9 κατά 10%, 29%, 20%, 15%, αντίστοιχα, όπως απεικονίζεται στο γράφημα 1.6. Στο περιστατικό 10, το ποσοστό TILs παραμένει αμετάβλητο, μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας.



Γράφημα 1.6. Ποσοστά στρωματικών TILs % στην πρωτοπαθή (μπλε) και δευτεροπαθή (πορτοκαλί) εστία, για 11 ασθενείς στους οποίους κατέστη εφικτή η αξιολόγηση του βιοπτικού υλικού, σε τουλάχιστον 1 εστία του κολο-ορθικού καρκινώματος.

2. Ερευνητικό Μέρος

2.1 Αποτελέσματα Στατιστικής Επεξεργασίας

Στην παρούσα ανάλυση, συμπεριελήφθησαν συνολικά 20 ασθενείς, που διαγνώστηκαν με καρκίνο παχέος εντέρου κατά το διάστημα 01/2012-03/2020.

Η διάμεση ηλικία των ασθενών, ήταν τα 65 έτη, με εύρος από 38 ως 82, με τους περισσότερους ασθενείς να έχουν μετρίως διαφοροποιημένα καρκινώματα (75%), και κυρίως εντοπιζόμενα στο αριστερό κόλον (85%).

Οι μισοί από τους ασθενείς ήταν άρρενες και 40% του συνολικού πληθυσμού είχαν σύγχρονες μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς είχαν πρόοδο νόσου σε περισσότερες από μία εντοπίσεις, κατά την πρώτη καταγεγραμμένη πρόοδο/υποτροπή (60%) και 70% των ασθενών υπεβλήθησαν σε χειρουργική εξαίρεση μίας ή περισσότερων δευτεροπαθών εντοπίσεων κατά την πρώτη υποτροπή. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών, περιγράφονται στον πίνακα 2.2.1.

Η αξιολόγηση των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 λεμφοκυττάρων (στρωματικών και ενδοεπιθηλιακών, διενεργήθηκε σε 11 από τους 20 ασθενείς (55%).

Δεδομένα σχετικά με τα CD3, CD4, CD8 και FOXP3 λεμφοκύτταρα, ήταν διαθέσιμα για 72.7% (n=8) των περιπτώσεων στην πρωτοπαθή εστία.

Τα ιστογράμματα των κατανομών στην υπό εξέταση πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας, αποτυπώνονται στα γραφήματα 2.3.1 και 2.3.2.

Οι διάμεσες τιμές για κάθε λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό, συνοψίζονται στους πίνακες 2.3.1 και 2.3.2, για τους πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους, αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο κύριος πληθυσμός των διηθούντων λεμφοκυττάρων αποτελείται από τα στρωματικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα ενδοεπιθηλιακά/ενδο-ογκικά.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των στρωματικών και συνολικών CD3 λεμφοκυττάρων με το φύλο των ασθενών (p -value=0.029 και για τις δύο περιπτώσεις) στην πρωτοπαθή εστία (Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2).

Όλοι οι ασθενείς με υψηλή συγκέντρωση στρωματικών και συνολικών CD3 λεμφοκυττάρων (τιμή υψηλότερη από τη διάμεση της κατανομής), ήταν άρρενες (Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2).

Αυτή η στατιστικά σημαντική συσχέτιση επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της συγκέντρωσης των CD3 λεμφοκυττάρων, ως συνεχούς μεταβλητής, καθώς οι άρρενες ασθενείς βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στρωματικών και συνολικών CD3 λεμφοκυττάρων, σε σχέση με τις γυναίκες ασθενείς (p -values=0.021 και στις δύο περιπτώσεις). (Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2).

Μια οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση, διαφαίνεται επίσης μεταξύ των στρωματικών και συνολικών CD8 λεμφοκυττάρων με το βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος (p -values=0.046 και στις δύο περιπτώσεις) με τους μετρίως διαφοροποιημένους όγκους να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις sCD8 και tCD8, σε σχέση με τους όγκους μέτριας προς χαμηλής διαφοροποίησης (Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2).

Δεν παρατηρήθηκαν επιπλέον σημαντικές συσχετίσεις, μεταξύ των υπό εξέταση κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τις συγκεντρώσεις των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD3, CD8 και FOXP3 (στρωματικά, ενδοεπιθηλιακά και συνολικά) (πίνακες 2.2.1 και 2.2.2).

Ζεύγη δεδομένων από την πρωτοπαθή εστία και από τουλάχιστον μία μεταστατική εστία, ήταν διαθέσιμα σε 6 ασθενείς, για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς CD3 και FOXP3 και σε 7 ασθενείς για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς CD4 και CD8.

Οι συζευγμένες συγκεντρώσεις των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 στην πρωτοπαθή εστία και στη μετάσταση, απεικονίζονται στα διαγράμματα του γραφήματος 2.3.3.

Στα περισσότερα δείγματα (4 εκ των 6; 66.7%) είχαν μειωμένη συγκέντρωση ενδοεπιθηλιακών iCD3 λεμφοκυττάρων στους μεταστατικούς όγκους, ενώ τα στρωματικά και τα συνολικά CD3 λεμφοκύτταρα, ήταν αυξημένα στα περισσότερα δείγματα μεταστατικών εστιών (5 εκ των 6; 83.3%).

Όσον αφορά στα CD4, οι περισσότερες μεταστατικές εστίες, χαρακτηρίζονταν από υψηλά επίπεδα στρωματικών και συνολικών CD4 (5/7; 71.4%) και από μειωμένο πληθυσμό ενδοεπιθηλιακών CD4 λεμφοκυττάρων (4/7; 57.1%).

Παρομοίως, οι περισσότεροι μεταστατικοί όγκοι είχαν αυξημένη συγκέντρωση στρωματικών και συνολικών CD8 λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των στρωματικών CD8 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στις μεταστατικές εστίες, σε σχέση με την πρωτοπαθή (p -value=0.031) (Γράφημα 2.3.3, Πίνακας 2.3.3).

Τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα FOXP3, βρέθηκαν αυξημένα σε 4 εκ των 6 όγκων στη μεταστατική εστία, ενώ τα συνολικά και στρωματικά FOXP3 βρέθηκαν αυξημένα στα μισά από τα δείγματα μεταστατικών εστιών σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία (Γράφημα 2.3.3).

Η διάμεση περίοδος παρακολούθησης των ασθενών διήρκεσε 107 μήνες (95% CI 66.6-111, min-max: 19-113 months) και κατά τη διάρκεια της κατεγράφησαν 16 θάνατοι (80%).

Η διάμεση συνολική επιβίωση ήταν 63 μήνες, (95% CI 38-84), ενώ τα διάμεσα PFS1 και PFS2 ήταν 19 μήνες (95% CI 14-36) και 10 μήνες (95% CI 7-38), αντίστοιχα (Γράφημα 2.3.4).

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην πρωτοπαθή ή στη μεταστατική εστία (CD3, CD4, CD8, FOXP3, stromal, intratumoral, total) με την επιβίωση των ασθενών (OS, PFS1, PFS2), ενδεχομένως λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος (Πίνακες 2.2.2 και 2.2.3).

Στο συμπληρωματικό πίνακα 1 (σελ.141-144), παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην πρωτοπαθή εστία, και των κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών. Οι πυκνότητες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών παρουσιάζονται ως κατηγορικές μεταβλητές, δηλ, υψηλή έναντι χαμηλής τιμής, με ουδό τη διάμεση τιμή της κατανομής.

Στο συμπληρωματικό πίνακα 2(σελ.145-148), παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην πρωτοπαθή εστία, και των κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών. Οι πυκνότητες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών παρουσιάζονται ως συνεχείς, ποσοτικές μεταβλητές.

Στους συμπληρωματικούς πίνακες 3,4, παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών και του νεοπλάσματος, καθώς και οι χορηγούμενες θεραπείες κατά τη διάγνωση (συμπληρωματικός πίνακας 3) και κατά την 1^η εξέλιξη νόσου (συμπληρωματικός πίνακας 4),

2.2 Πίνακες

Πίνακας 2.2.1: Χαρακτηριστικά των ασθενών που εξετάστηκαν κατά τη στατιστική ανάλυση

Πίνακας 1

Age at diagnosis	
Median (min, max)	65.0(38.0,82.0)
N (%)	
Age at diagnosis	
<65	9(45.0)
≥65	11(55.0)
Sex	
Female	10(50.0)
Male	10(50.0)
Grade	
Moderately differentiated	15(75.0)
Moderately/poorly differentiated	5(25.0)
Tumor location	
Left	17(85.0)
Right	3(15.0)
T	
T3	15(75.0)
T4	5(25.0)
Number of positive nodes	
<3	10(50.0)
≥3	10(50.0)
Synchronous metastasis	
No	12(60.0)
Yes	8(40.0)
Tumor regression score (N=6)	

2	4(66.7)
3	2(33.3)
Number of progression sites at first progression	
1	8(40.0)
>1	12(60.0)
Number of progression sites at second progression (N=18)	
1	12(66.7)
>1	6(33.3)
Surgical excision of first relapse	
No	6(30.0)
Yes	14(70.0)
Number of next treatment lines (N=19)	
Median (min,max)	3.0(0.00,6.0)
N (%)	
<3	8(42.1)
≥3	11(57.9)
Neoadjuvant treatment (N=19)	
Yes	7(36.8)
No	12(63.2)
Type of neoadjuvant treatment (N=7)	
Neoadjuvant anti-EGFR treatment only	2(28.6)
Neoadjuvant anti-VEGF treatment only	2(28.6)
Neoadjuvant oxaliplatin treatment only	5(71.4)
Neoadjuvant irinotecan treatment only	0(0.0)
Both neoadjuvant oxaliplatin and irinotecan treatment	1(14.3)
Adjuvant treatment (N=19)	
Yes	19(100)
No	0(0.0)
Type of adjuvant treatment (N=19)	
Adjuvant oxaliplatin treatment only	15(78.9)

Adjuvant irinotecan treatment only	2(10.5)
Both adjuvant oxaliplatin and irinotecan treatment	1(5.3)
<i>Anti-EGFR treatment in next treatment lines after progression (N=19)</i>	
Yes	9(47.4)
No	10(52.6)
irinotecan treatment in next treatment lines after progression	3(15.8)
oxaliplatin treatment in next treatment lines after progression	6(31.6)
Both irinotecan and oxaliplatin treatment in next treatment lines after progression	9(47.4)

Percentages were calculated out of the total number of informative cases.

Πίνακας 2.2.2: Hazard ratios και 95% διαστήματα αξιοπιστίας, από μονοπαραγοντική ανάλυση (univariate Cox regression) των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε σχέση με τα OS, PFS1 και PFS2, στις πρωτοπαθείς εστίες.

	<i>OS</i>		<i>PFS1</i>		<i>PFS2</i>	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
iCD3	1.03 (0.99-1.07)	0.18	1.00 (0.97-1.04)	0.78	1.02 (0.98-1.06)	0.35
sCD3	1.00 (0.99-1.10)	0.91	1.00 (0.99-1.10)	0.45	1.00 (0.99-1.10)	0.78
Total CD3	1.00 (0.99-1.10)	0.88	1.00 (0.99-1.10)	0.44	1.00 (0.99-1.10)	0.76
iCD4	0.96 (0.79-1.17)	0.71	0.96 (0.82-1.13)	0.65	0.86 (0.67-1.09)	0.20
sCD4	1.00 (0.99-1.10)	0.83	1.00 (0.99-1.10)	0.37	1.00 (0.99-1.10)	0.63
Total CD4	1.00 (0.99-1.10)	0.82	1.00 (0.99-1.10)	0.39	1.00 (0.99-1.10)	0.61
iCD8	1.08 (0.97-1.21)	0.17	1.00 (0.98-1.02)	0.68	1.04 (0.99-1.10)	0.11
sCD8	1.00 (0.99-1.10)	0.15	1.00 (0.99-1.10)	0.28	1.00 (0.99-1.10)	0.14
Total CD8	1.00 (0.99-1.10)	0.081	1.00 (0.99-1.10)	0.32	1.00 (0.99-1.10)	0.082
iFOXP3	0.69 (0.36-1.36)	0.29	1.04 (0.58-1.87)	0.89	0.37 (0.09-1.38)	0.14
sFOXP3	1.00 (0.99-1.10)	0.53	1.00 (0.99-1.10)	0.4	1.00 (0.99-1.10)	0.62
Total FOXP3	1.00 (0.99-1.10)	0.53	1.00 (0.99-1.10)	0.41	1.00 (0.99-1.10)	0.61
iCD3						
High	1.26 (0.25-6.32)	0.78	0.75 (0.16-3.50)	0.72	0.54 (0.09-3.31)	0.51
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sCD3						
High	0.98 (0.20-4.90)	0.98	1.00 (0.22-4.52)	0.99	0.54 (0.09-3.31)	0.51
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total CD3						
High	0.98 (0.20-4.90)	0.98	1.00 (0.22-4.52)	0.99	0.54 (0.09-3.31)	0.51
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
iCD4						
High	0.62 (0.12-3.20)	0.57	1.03 (0.22-4.78)	0.97	0.22 (0.02-2.04)	0.18
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sCD4						
High	0.89 (0.18-4.44)	0.89	2.55 (0.46-14.09)	0.28	0.99 (0.16-6.14)	0.99

Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total CD4						
High	0.89 (0.18-4.44)	0.89	2.55 (0.46-14.09)	0.28	0.99 (0.16-6.14)	0.99
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
iCD8						
High	1.26 (0.25-6.32)	0.78	0.24 (0.04-1.37)	0.11	1.24 (0.20-7.55)	0.81
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sCD8						
High	3.74 (0.66-21.04)	0.14	1.22 (0.26-5.60)	0.80	2.07 (0.33-13.13)	0.44
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total CD8						
High	3.74 (0.66-21.04)	0.14	1.22 (0.26-5.60)	0.80	2.07 (0.33-13.13)	0.44
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
iFOXP3						
High	0.47 (0.09-2.42)	0.36	1.35 (0.30-6.12)	0.70	0.22 (0.02-2.04)	0.18
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sFOXP3						
High	0.47 (0.09-2.42)	0.36	1.35 (0.30-6.12)	0.70	0.22 (0.02-2.04)	0.18
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total FOXP3						
High	0.47 (0.09-2.42)	0.36	1.35 (0.30-6.12)	0.70	0.22 (0.02-2.04)	0.18
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--

HR: Hazard ratio; CI: confidence interval

Πίνακας 2.2.3: Hazard ratios και 95% διαστήματα αξιοπιστίας, από μονοπαραγοντική ανάλυση (univariate Cox regression) των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε σχέση με τα OS, PFS1 και PFS2 στις μεταστατικές εστίες.

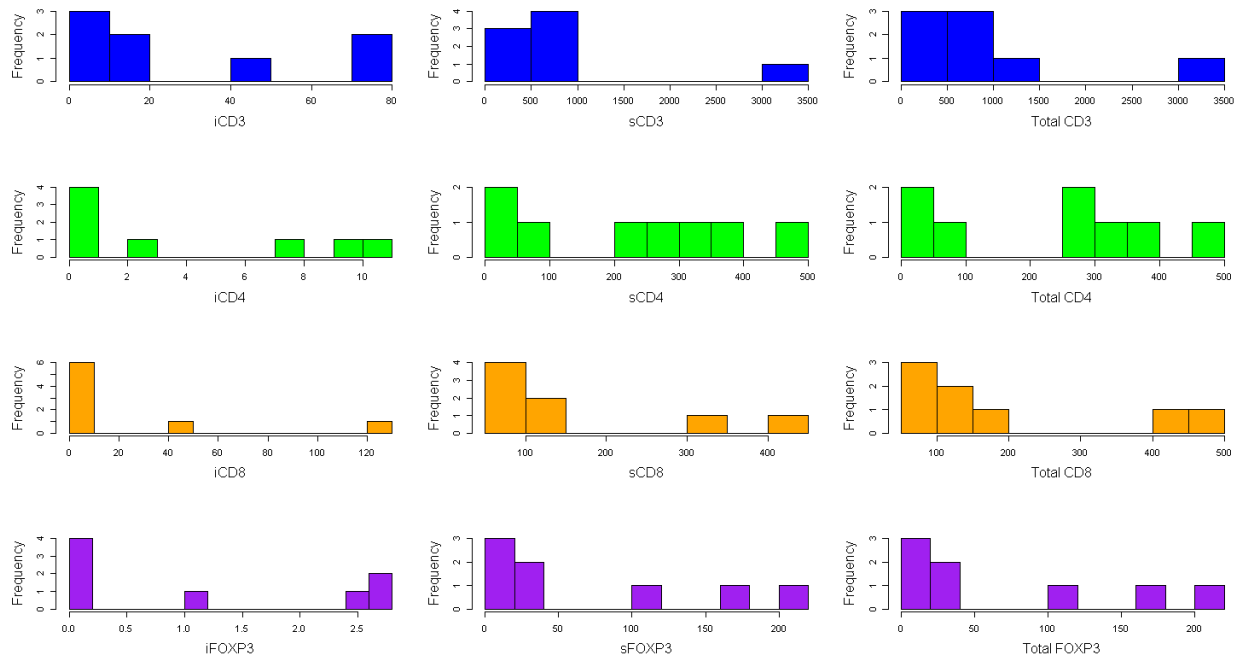
	<i>OS</i>		<i>PFS1</i>		<i>PFS2</i>	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
iCD3	0.98 (0.90-1.07)	0.66	0.99 (0.91-1.07)	0.73	0.99 (0.90-1.10)	0.89
sCD3	1.00 (0.99-1.10)	0.93	1.00 (0.99-1.10)	0.79	1.00 (0.99-1.10)	0.87
Total CD3	1.00 (0.99-1.10)	0.94	1.00 (0.99-1.10)	0.78	1.00 (0.99-1.10)	0.87
iCD4	1.09 (0.81-1.45)	0.58	1.13 (0.88-1.45)	0.34	1.09 (0.80-1.48)	0.58
sCD4	1.00 (0.99-1.10)	0.44	1.00 (0.99-1.10)	0.78	1.00 (0.99-1.10)	0.84
Total CD4	1.00 (0.99-1.10)	0.44	1.00 (0.99-1.10)	0.79	1.00 (0.99-1.10)	0.83
iCD8	1.05 (0.97-1.13)	0.24	0.99 (0.93-1.07)	0.95	1.06 (0.97-1.14)	0.19
sCD8	1.00 (0.99-1.10)	0.77	1.00 (0.99-1.10)	0.49	1.00 (0.99-1.10)	0.85
Total CD8	1.00 (0.99-1.10)	0.7	1.00 (0.99-1.10)	0.48	1.00 (0.99-1.10)	0.93
iFOXP3	0.83 (0.44-1.58)	0.57	1.03 (0.67-1.60)	0.89	0.91 (0.49-1.69)	0.77
sFOXP3	1.00 (0.99-1.10)	0.75	1.00 (0.99-1.10)	0.77	1.00 (0.99-1.10)	0.33
Total FOXP3	1.00 (0.99-1.10)	0.77	1.00 (0.99-1.10)	0.78	1.00 (0.99-1.10)	0.33
iCD3						
High	0.92 (0.18-4.60)	0.92	0.95 (0.21-4.34)	0.95	1.16 (0.19-7.20)	0.87
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sCD3						
High	0.92 (0.18-4.60)	0.92	0.95 (0.21-4.34)	0.95	1.16 (0.19-7.20)	0.87
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total CD3						
High	0.92 (0.18-4.60)	0.92	0.95 (0.21-4.34)	0.95	1.16 (0.19-7.20)	0.87
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
iCD4						
High	3.37 (0.61-18.73)	0.17	4.70 (0.86-25.66)	0.074	3.59 (0.56-22.97)	0.18
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sCD4						
High	1.59 (0.35-7.17)	0.55	0.86 (0.23-3.24)	0.82	0.94 (0.20-4.37)	0.94

Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total CD4						
High	1.59 (0.35-7.17)	0.55	0.86 (0.23-3.24)	0.82	0.94 (0.20-4.37)	0.94
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
iCD8						
High	0.78 (0.17-3.57)	0.75	0.43 (0.10-1.83)	0.26	0.75 (0.17-3.41)	0.71
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sCD8						
High	0.95 (0.21-4.31)	0.95	0.60 (0.16-2.26)	0.45	0.62 (0.14-2.80)	0.53
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total CD8						
High	0.95 (0.21-4.31)	0.95	0.60 (0.16-2.26)	0.45	0.62 (0.14-2.80)	0.53
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
iFOXP3						
High	1.11 (0.22-5.59)	0.9	0.75 (0.19-3.06)	0.69	1.43 (0.23-8.88)	0.7
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
sFOXP3						
High	1.86 (0.37-9.31)	0.45	1.40 (0.35-5.67)	0.64	3.86 (0.40-37.23)	0.24
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--
Total FOXP3						
High	1.86 (0.37-9.31)	0.45	1.40 (0.35-5.67)	0.64	3.86 (0.40-37.23)	0.243
Low	Reference	--	Reference	--	Reference	--

HR: Hazard ratio; CI: confidence interval

2.3 Γραφήματα

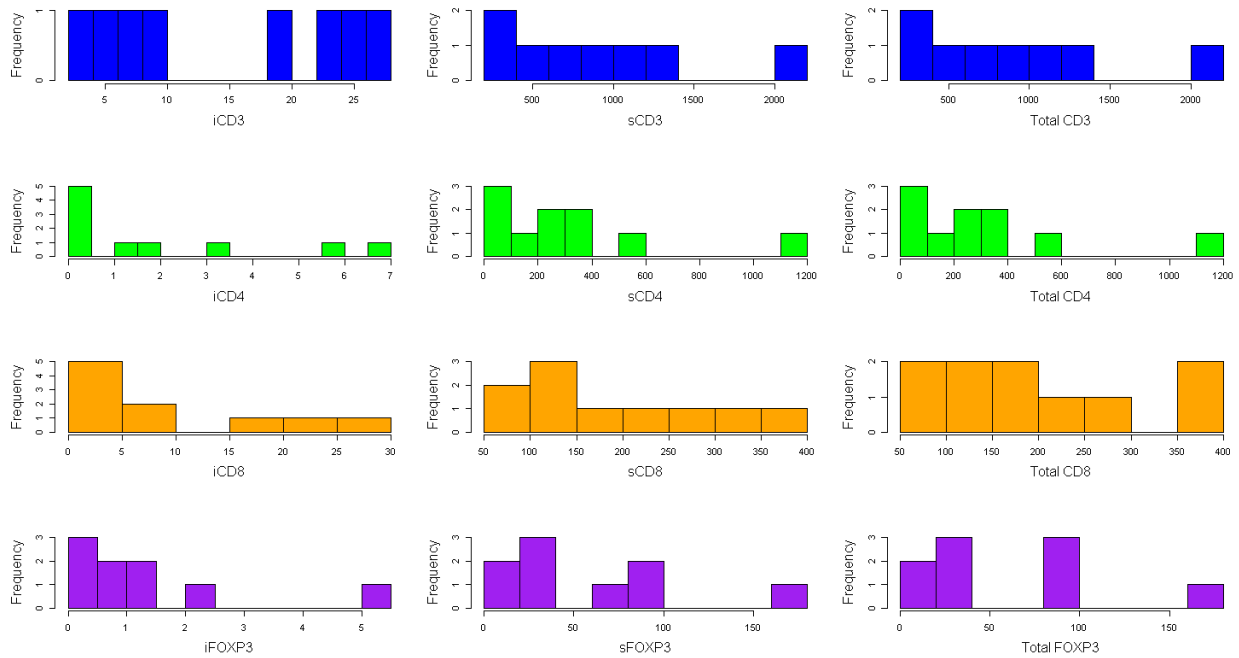
Γράφημα 2.3.1. Ιστογράμματα των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 (στρωματικά, ενδοεπιθηλιακά, συνολικά) σε πρωτοπαθείς όγκους.



Primary tumors (Median density values)			
iCD3	12.798	iCD8	5.729
sCD3	543.9	sCD8	111.80
tCD3	586.8	tCD8	123.58
iCD4	1.458	iFOXP3	0.558
sCD4	264.67	sFOXP3	33.37
tCD4	274.64	tFOXP3	34.76

Πίνακας 2.3.1. Παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές των λεμφοκυτταρικών πυκνοτήτων (κύτταρα/ mm^2) σε πρωτοπαθείς όγκους.

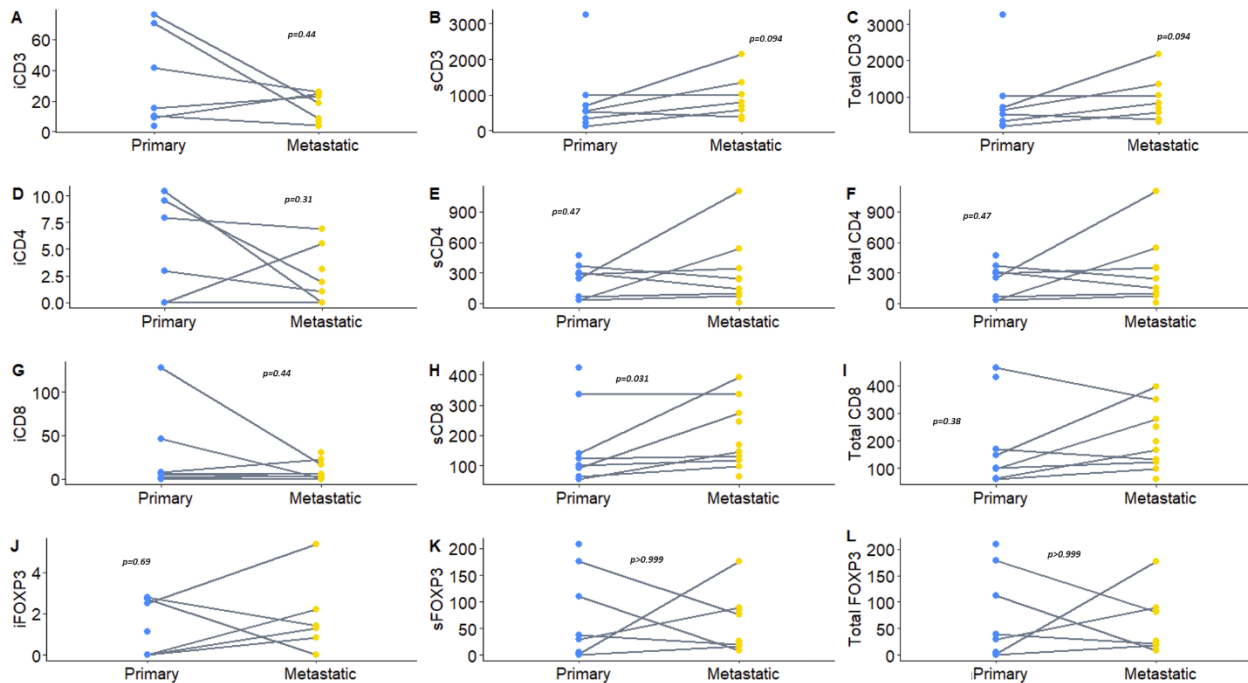
Γράφημα 2.3.2. Ιστογράμματα των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 (στρωματικά, ενδοεπιθηλιακά, συνολικά) σε μεταστατικές εστίες.



Metastatic tumors (Median density values)			
iCD3	13.532	iCD8	4.482
sCD3	742.2	sCD8	156.07
tCD3	757.7	tCD8	181.94
iCD4	0.5208	iFOXP3	0.8333
sCD4	240.139	sFOXP3	26.558
tCD4	242.222	tFOXP3	26.558

Πίνακας 2.3.2. Παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές των λεμφοκυτταρικών πυκνοτήτων (κύτταρα/ mm^2) σε μεταστατικές εστίες.

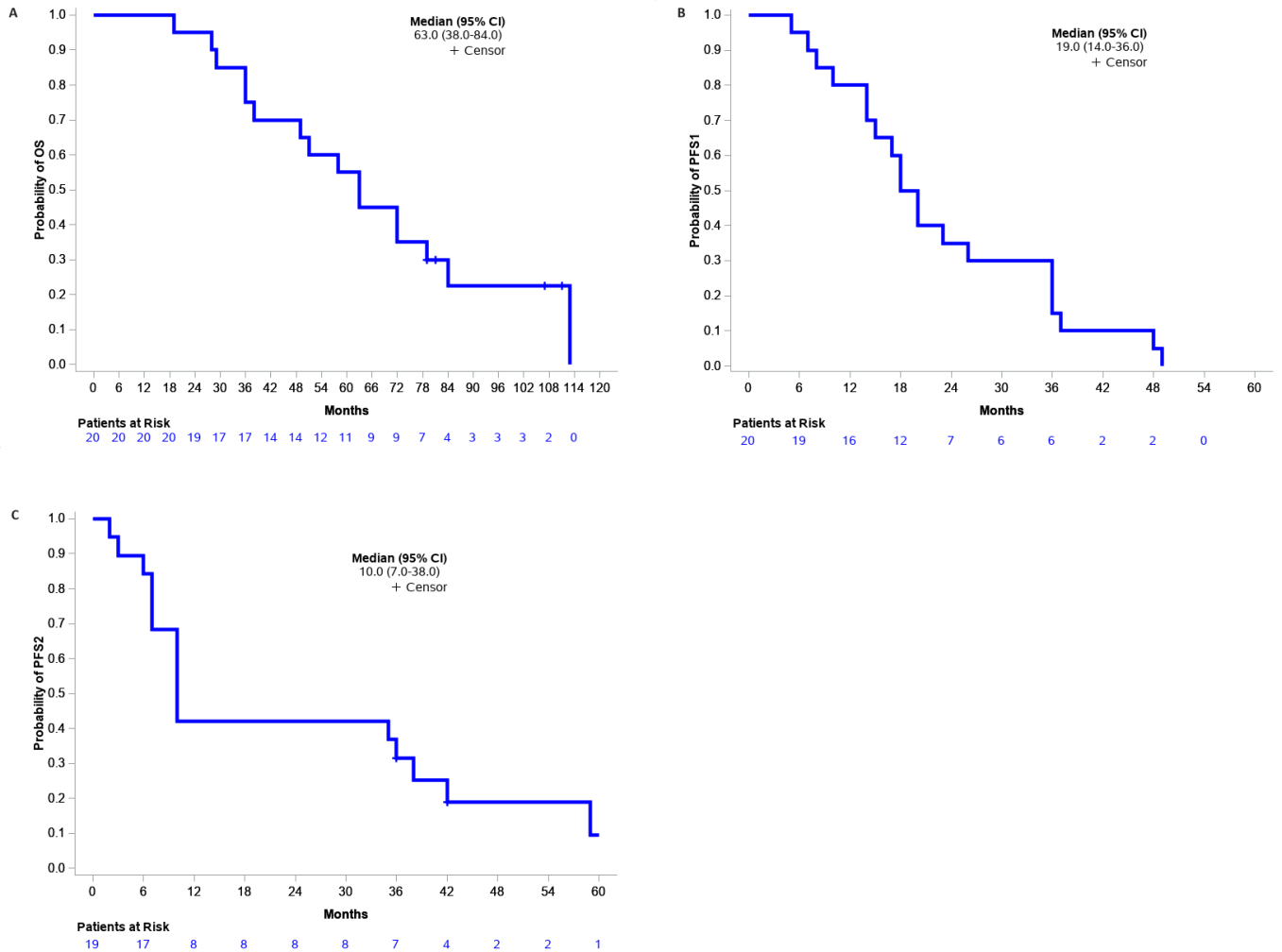
Γράφημα 2.3.3. Η μεταβολή των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας.



TILs	μεταβολή	TILs	μεταβολή	TILs	μεταβολή	TILs	μεταβολή
iCD3	Μείωση σε 66.7% περ.	iCD4	Μείωση σε 57.1% περ.	iCD8	Μείωση σε 100% περ.	iFOXP3	Αύξηση σε 66.7%
sCD3	Αύξηση σε 53.3% περ.	sCD4	Αύξηση σε 71.4% περ.	sCD8	Αύξηση σε 85.7% περ.	sFOXP3	Αύξηση σε 50% περ.
tCD3		tCD4		tCD8		tFOXP3	

Πίνακας 2.3.3. Σύνοψη των μεταβολών των πληθυσμών των διηθούντων λεμφοκυττάρων, στη μεταστατική εστία, συγκριτικά με την πρωτοπαθή, όπως απεικονίζονται στο γράφημα 2.3.3. Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση, παρατηρείται στα στρωματικά CD8 ($p=0.031$), τα οποία αυξάνονται στη μεταστατική εστία σε 6 από τα 7 εξεταζόμενα ζεύγη βιοψιών.

Γράφημα 2.3.4. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για (Α) τη συνολική επιβίωση OS, (Β) την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ως την 1^η υποτροπή (PFS1) και (C) την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ως τη 2^η υποτροπή (PFS2).



Supplemental Table 1. Associations of markers' expression (using the median values as cut-off points) with selected clinicopathological parameters in primary tumors.												
	tCD3				sCD3				Total CD3			
	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value
Age at diagnosis	8			0.43	8			0.99	8			0.99
<65		0(0.0)	2(50.0)			1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)	
≥65		4(100.0)	2(50.0)			3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)	
Sex	8			0.49	8			0.029	8			0.029
Female		3(75.0)	1(25.0)			4(100.0)	0(0.0)			4(100.0)	0(0.0)	
Male		1(25.0)	3(75.0)			0(0.0)	4(100.0)			0(0.0)	4(100.0)	
Grade	8			0.43	8			0.43	8			0.43
Moderately differentiated		2(50.0)	4(100.0)			2(50.0)	4(100.0)			2(50.0)	4(100.0)	
Moderately/poorly differentiated		2(50.0)	0(0.0)			2(50.0)	0(0.0)			2(50.0)	0(0.0)	
Tumor location	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Left		3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)	
Right		1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)	
T	8			0.14	8			0.99	8			0.99
T3		1(25.0)	4(100.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
T4		3(75.0)	0(0.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
Number of positive nodes	8			0.99	8			0.99	8			0.99
<3		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
≥3		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
Synchronous metastasis	8			0.99	8			0.99	8			0.99
No		3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)	
Yes		1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)	
Number of progression sites at first progression	8			0.99	8			0.99	8			0.99
1		2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
>1		2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
Number of progression sites at second progression	7			0.43	7			0.43	7			0.43
1		4(100.0)	2(66.7)			4(100.0)	2(66.7)			4(100.0)	2(66.7)	
>1		0(0.0)	1(33.3)			0(0.0)	1(33.3)			0(0.0)	1(33.3)	
Surgical excision of first relapse	8			0.14	8			0.99	8			0.99
No		0(0.0)	3(75.0)			1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)	
Yes		4(100.0)	1(25.0)			3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)	
Number of next treatment lines	7			0.49	7			0.49	7			0.49
<3		1(33.3)	3(75.0)			1(33.3)	3(75.0)			1(33.3)	3(75.0)	
≥3		2(66.7)	1(25.0)			2(66.7)	1(25.0)			2(66.7)	1(25.0)	

Συμπληρωματικός Πίνακας 1 (Supplemental Table 1). Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (εδώ CD3), στην πρωτοπαθή εστία, ως κατηγορικές μεταβλητές. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του ανδρικού φύλου με υψηλές συγκεντρώσεις sCD3 και tCD3. (Βλ. συνέχεια πίνακα σε επόμενη σελίδα).

Supplemental Table 1. Associations of markers' expression (using the median values as cut-off points) with selected clinicopathological parameters in primary tumors.

	ICD4				sCD4				Total CD4			
	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value
Age at diagnosis	8			0.43	8			0.43	8			0.43
<65		0(0.0)	2(50.0)			0(0.0)	2(50.0)			0(0.0)	2(50.0)	
≥65		4(100.0)	2(50.0)			4(100.0)	2(50.0)			4(100.0)	2(50.0)	
Sex	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Female		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
Male		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
Grade	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Moderately differentiated		3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)	
Moderately/poorly differentiated		1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)	
Tumor location	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Left		3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)	
Right		1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)	
T	8			0.99	8			0.99	8			0.99
T3		2(50.0)	3(75.0)			3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)	
T4		2(50.0)	1(25.0)			1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)	
Number of positive nodes	8			0.99	8			0.99	8			0.99
<3		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
≥3		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
Synchronous metastasis	8			0.99	8			0.99	8			0.99
No		3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)	
Yes		1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)	
Number of progression sites at first progression	8			0.99	8			0.99	8			0.99
1		2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
>1		2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
Number of progression sites at second progression	7			0.99	7			0.99	7			0.99
1		3(75.0)	3(100.0)			3(75.0)	3(100.0)			3(75.0)	3(100.0)	
>1		1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)	
Surgical excision of first relapse	8			0.99	8			0.99	8			0.99
No		1(25.0)	2(50.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
Yes		3(75.0)	2(50.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
Number of next treatment lines	7			0.99	7			0.49	7			0.49
<3		2(50.0)	2(66.7)			3(75.0)	1(33.3)			3(75.0)	1(33.3)	
≥3		2(50.0)	1(33.3)			1(25.0)	2(66.7)			1(25.0)	2(66.7)	

Συμπληρωματικός Πίνακας 1 (Supplemental Table 1). Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (εδώ CD4), στην πρωτοπαθή εστία, ως κατηγορικές μεταβλητές. (Βλ. συνέχεια πίνακα σε επόμενη σελίδα).

Supplemental Table 1. Associations of markers' expression (using the median values as cut-off points) with selected clinicopathological parameters in primary tumors.

	ICD8				sCD8				Total CD8			
	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value
Age at diagnosis	8			0.99	8			0.99	8			0.99
<65		1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)	
≥65		3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)	
Sex	8			0.99	8			0.49	8			0.49
Female		2(50.0)	2(50.0)			3(75.0)	1(25.0)			3(75.0)	1(25.0)	
Male		2(50.0)	2(50.0)			1(25.0)	3(75.0)			1(25.0)	3(75.0)	
Grade	8			0.99	8			0.43	8			0.43
Moderately differentiated		3(75.0)	3(75.0)			2(50.0)	4(100.0)			2(50.0)	4(100.0)	
Moderately/poorly differentiated		1(25.0)	1(25.0)			2(50.0)	0(0.0)			2(50.0)	0(0.0)	
Tumor location	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Left		4(100.0)	3(75.0)			3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)	
Right		0(0.0)	1(25.0)			1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)	
T	8			0.99	8			0.99	8			0.99
T3		2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
T4		2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
Number of positive nodes	8			0.49	8			0.49	8			0.49
<3		1(25.0)	3(75.0)			1(25.0)	3(75.0)			1(25.0)	3(75.0)	
≥3		3(75.0)	1(25.0)			3(75.0)	1(25.0)			3(75.0)	1(25.0)	
Synchronous metastasis	8			0.99	8			0.14	8			0.14
No		3(75.0)	2(50.0)			4(100.0)	1(25.0)			4(100.0)	1(25.0)	
Yes		1(25.0)	2(50.0)			0(0.0)	3(75.0)			0(0.0)	3(75.0)	
Number of progression sites at first progression	8			0.99	8			0.14	8			0.14
1		2(50.0)	1(25.0)			3(75.0)	0(0.0)			3(75.0)	0(0.0)	
>1		2(50.0)	3(75.0)			1(25.0)	4(100.0)			1(25.0)	4(100.0)	
Number of progression sites at second progression	7			0.99	7			0.99	7			0.99
1		3(100.0)	3(75.0)			3(100.0)	3(75.0)			3(100.0)	3(75.0)	
>1		0(0.0)	1(25.0)			0(0.0)	1(25.0)			0(0.0)	1(25.0)	
Surgical excision of first relapse	8			0.14	8			0.14	8			0.14
No		0(0.0)	3(75.0)			0(0.0)	3(75.0)			0(0.0)	3(75.0)	
Yes		4(100.0)	1(25.0)			4(100.0)	1(25.0)			4(100.0)	1(25.0)	
Number of next treatment lines	7			0.49	7			0.99	7			0.99
<3		1(33.3)	3(75.0)			2(66.7)	2(50.0)			2(66.7)	2(50.0)	
≥3		2(66.7)	1(25.0)			1(33.3)	2(50.0)			1(33.3)	2(50.0)	

Συμπληρωματικός Πίνακας 1 (Supplemental Table 1). Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (εδώ CD8), στην πρωτοπαθή εστία, ως κατηγορικές μεταβλητές. (Βλ. συνέχεια πίνακα σε επόμενη σελίδα).

Supplemental Table 1. Associations of markers' expression (using the median values as cut-off points) with selected clinicopathological parameters in primary tumors.

	iFOXP3				sFOXP3				Total FOXP3			
	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value	N	Low	High	p-value
Age at diagnosis	8			0.99	8			0.99	8			0.99
<65		1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)	
≥65		3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)	
Sex	8			0.49	8			0.49	8			0.49
Female		3(75.0)	1(25.0)			3(75.0)	1(25.0)			3(75.0)	1(25.0)	
Male		1(25.0)	3(75.0)			1(25.0)	3(75.0)			1(25.0)	3(75.0)	
Grade	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Moderately differentiated		3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)			3(75.0)	3(75.0)	
Moderately/poorly differentiated		1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)			1(25.0)	1(25.0)	
Tumor location	8			0.99	8			0.99	8			0.99
Left		3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)			3(75.0)	4(100.0)	
Right		1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)	
T	8			0.99	8			0.99	8			0.99
T3		3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)	
T4		1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)	
Number of positive nodes	8			0.99	8			0.99	8			0.99
<3		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
≥3		2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)			2(50.0)	2(50.0)	
Synchronous metastasis	8			0.99	8			0.99	8			0.99
No		3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)			3(75.0)	2(50.0)	
Yes		1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)			1(25.0)	2(50.0)	
Number of progression sites at first progression	8			0.99	8			0.99	8			0.99
1		2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
>1		2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
Number of progression sites at second progression	7			0.99	7			0.99	7			0.99
1		3(75.0)	3(100.0)			3(75.0)	3(100.0)			3(75.0)	3(100.0)	
>1		1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)			1(25.0)	0(0.0)	
Surgical excision of first relapse	8			0.99	8			0.99	8			0.99
No		2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)			2(50.0)	1(25.0)	
Yes		2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)			2(50.0)	3(75.0)	
Number of next treatment lines	7			0.99	7			0.99	7			0.99
<3		2(50.0)	2(66.7)			2(50.0)	2(66.7)			2(50.0)	2(66.7)	
≥3		2(50.0)	1(33.3)			2(50.0)	1(33.3)			2(50.0)	1(33.3)	

Συμπληρωματικός Πίνακας 1 (Supplemental Table 1). Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (εδώ FOXP3), στην πρωτοπαθή εστία, ως κατηγορικές μεταβλητές. (Βλ. συνέχεια πίνακα σε επόμενη σελίδα).

Supplemental Table 2. Associations of markers' expression with selected clinicopathological parameters in primary tumors.

	iCD3					sCD3					Total CD3				
	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value
Age at diagnosis					0.18					0.74					0.74
<65	2	56.14	41.71	70.56		2	551.33	124.01	978.65		2	607.46	194.57	1020.36	
≥65	6	9.97	3.61	75.83		6	543.85	230.76	3245.49		6	586.81	234.38	3255.36	
Sex					0.25					0.021					0.021
Female	4	9.51	3.61	70.56		4	283.48	124.01	525.35		4	289.77	194.57	535.42	
Male	4	28.62	9.87	75.83		4	834.81	562.36	3245.49		4	863.43	638.19	3255.36	
Grade					0.32					0.51					0.51
Moderately differentiated	6	28.62	3.61	75.83		6	626.67	124.01	3245.49		6	672.35	194.57	3255.36	
Moderately/poorly differentiated	2	9.51	8.96	10.07		2	430.78	336.21	525.35		2	440.29	345.16	535.42	
Tumor location					0.28					0.51					0.51
Left	7	15.53	3.61	75.83		7	562.36	124.01	3245.49		7	638.19	194.57	3255.36	
Right	1	8.96	8.96	8.96	0.18	1	336.21	336.21	336.21		1	345.16	345.16	345.16	
T										0.66					0.66
T3	5	41.71	3.61	75.83		5	562.36	124.01	978.65		5	638.19	194.57	1020.36	
T4	3	9.87	8.96	10.07		3	525.35	336.21	3245.49		3	535.42	345.16	3255.36	
Number of positive nodes					0.77					>0.999					>0.999
<3	4	12.7	8.96	70.56		4	513.59	124.01	3245.49		4	525.83	194.57	3255.36	
≥3	4	25.89	3.61	75.83		4	543.85	230.76	978.65		4	586.81	234.38	1020.36	
Synchronous metastasis					0.66					0.66					0.66
No	5	10.07	3.61	75.83		5	525.35	230.76	978.65		5	535.42	234.38	1020.36	
Yes	3	15.53	9.87	70.56		3	690.98	124.01	3245.49		3	706.5	194.57	3255.36	
Number of progression sites at first progression					0.18					0.66					0.66
1	3	8.96	3.61	41.71		3	336.21	230.76	978.65		3	345.16	234.38	1020.36	
>1	5	15.53	9.87	75.83		5	562.36	124.01	3245.49		5	638.19	194.57	3255.36	
Number of progression sites at second progression					0.13					0.62					0.62
Missing	1	41.71	41.71	41.71		1	978.65	978.65	978.65		1	1020.36	1020.36	1020.36	
1	6	9.97	3.61	70.56		6	430.78	124.01	3245.49		6	440.29	194.57	3255.36	
>1	1	75.83	75.83	75.83		1	562.36	562.36	562.36		1	638.19	638.19	638.19	
Surgical excision of first relapse					0.053					0.66					0.66
No	3	70.56	15.53	75.83		3	562.36	124.01	690.98		3	638.19	194.57	706.5	
Yes	5	9.87	3.61	41.71		5	525.35	230.76	3245.49		5	535.42	234.38	3255.36	
Number of next treatment lines					0.48					0.48					0.48
Missing	1	10.07	10.07	10.07		1	525.35	525.35	525.35		1	535.42	535.42	535.42	
<3	4	28.62	8.96	75.83		4	626.67	336.21	978.65		4	672.35	345.16	1020.36	
≥3	3	9.87	3.61	70.56		3	230.76	124.01	3245.49		3	234.38	194.57	3255.36	

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. (Supplemental Table 2.) Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (εδώ CD3), στην πρωτοπαθή εστία, ως συνεχείς μεταβλητές. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των sCD3 και tCD3 και ανδρικού φύλου. (Βλ. συνέχεια πίνακα σε επόμενη σελίδα)

	ICD4					sCD4					Total CD4				
	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value
Age at diagnosis					0.16					0.51					0.51
<65	2	8.72	7.92	9.52		2	295.25	287.85	302.65		2	303.97	297.37	310.57	
≥65	6	0	0	10.42		6	154.98	32.57	471.46		6	160.19	32.57	471.46	
Sex					0.76					0.56					0.56
Female	4	1.46	0	9.52		4	178.16	32.57	365.94		4	182.92	32.57	368.86	
Male	4	3.96	0	10.42		4	272.07	34.03	471.46		4	281.24	34.03	471.46	
Grade					0.59					0.74					0.74
Moderately differentiated	6	3.96	0	10.42		6	264.67	32.57	471.46		6	274.64	32.57	471.46	
Moderately/poorly differentiated	2	1.46	0	2.92		2	217.21	68.47	365.94		2	218.67	68.47	368.86	
Tumor location					0.35					0.51					0.51
Left	7	2.92	0	10.42		7	287.85	32.57	471.46		7	297.37	32.57	471.46	
Right	1	0	0	0		1	68.47	68.47	68.47		1	68.47	68.47	68.47	
T					0.27					0.18					0.18
T3	5	7.92	0	10.42		5	241.49	32.57	302.65		5	251.91	32.57	310.57	
T4	3	0	0	2.92		3	365.94	68.47	471.46		3	368.86	68.47	471.46	
Number of positive nodes					0.54					0.56					0.56
<3	4	4.76	0	10.42		4	264.67	68.47	471.46		4	274.64	68.47	471.46	
≥3	4	1.46	0	7.92		4	168.34	32.57	365.94		4	172.3	32.57	368.86	
Synchronous metastasis					0.2					0.3					0.3
No	5	0	0	7.92		5	68.47	32.57	365.94		5	68.47	32.57	368.86	
Yes	3	9.52	0	10.42		3	287.85	241.49	471.46		3	297.37	251.91	471.46	
Number of progression sites at first progression					0.43					0.3					0.3
1	3	0	0	7.92		3	68.47	32.57	302.65		3	68.47	32.57	310.57	
>1	5	2.92	0	10.42		5	287.85	34.03	471.46		5	297.37	34.03	471.46	
Number of progression sites at second progression					0.41					0.32					0.32
Missing	1	7.92	7.92	7.92		1	302.65	302.65	302.65		1	310.57	310.57	310.57	
1	6	1.46	0	10.42		6	264.67	32.57	471.46		6	274.64	32.57	471.46	
>1	1	0	0	0		1	34.03	34.03	34.03		1	34.03	34.03	34.03	
Surgical excision of first relapse					0.2					0.46					0.46
No	3	9.52	0	10.42		3	241.49	34.03	287.85		3	251.91	34.03	297.37	
Yes	5	0	0	7.92		5	302.65	32.57	471.46		5	310.57	32.57	471.46	
Number of next treatment lines					0.7					0.72					0.72
Missing	1	2.92	2.92	2.92		1	365.94	365.94	365.94		1	368.86	368.86	368.86	
<3	4	3.96	0	10.42		4	154.98	34.03	302.65		4	160.19	34.03	310.57	
≥3	3	0	0	9.52		3	287.85	32.57	471.46		3	297.37	32.57	471.46	

Supplemental Table 2. Associations of markers' expression with selected clinical and pathological variables

	iCD8					sCD8					Total CD8				
	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value
Age at diagnosis					0.74					0.74					>0.999
<65	2	25.78	5.27	46.3		2	107.65	91.29	124.01		2	133.44	96.57	170.31	
≥65	6	5.73	0	128.13		6	119.93	55.97	424.65		6	123.58	61.75	465.49	
Sex					0.56					0.083					0.15
Female	4	4.52	0	46.3		4	80.66	55.97	124.01		4	82.3	61.75	170.31	
Male	4	5.73	5.27	128.13		4	238.82	91.29	424.65		4	288.2	96.57	465.49	
Grade					0.51					0.046					0.046
Moderately differentiated	6	5.73	1.39	128.13		6	132.15	91.29	424.65		6	158.25	96.57	465.49	
Moderately/poorly differentiated	2	3.82	0	7.65		2	58.86	55.97	61.75		2	62.68	61.75	63.62	
Tumor location					0.51					0.13					0.28
Left	7	5.56	0	128.13		7	124.01	61.75	424.65		7	146.19	61.75	465.49	
Right	1	7.65	7.65	7.65		1	55.97	55.97	55.97		1	63.62	63.62	63.62	
T					0.46					0.46					0.3
T3	5	5.9	1.39	128.13		5	124.01	91.29	337.36		5	146.19	96.57	465.49	
T4	3	5.56	0	7.65		3	61.75	55.97	424.65		3	63.62	61.75	430.21	
Number of positive nodes					0.25					0.56					0.56
<3	4	6.78	5.56	46.3		4	132.15	55.97	424.65		4	158.25	63.62	430.21	
≥3	4	3.33	0	128.13		4	95.44	61.75	337.36		4	98.77	61.75	465.49	
Synchronous metastasis					0.46					0.1					0.18
No	5	5.27	0	128.13		5	91.29	55.97	337.36		5	96.57	61.75	465.49	
Yes	3	5.9	5.56	46.3		3	140.28	124.01	424.65		3	170.31	146.19	430.21	
Number of progression sites at first progression					0.46					0.1					0.18
1	3	5.27	1.39	7.65		3	91.29	55.97	99.58		3	96.57	63.62	100.97	
>1	5	5.9	0	128.13		5	140.28	61.75	424.65		5	170.31	61.75	465.49	
Number of progression sites at second progression					0.13					0.32					0.13
Missing	1	5.27	5.27	5.27		1	91.29	91.29	91.29		1	96.57	96.57	96.57	
1	6	5.73	0	46.3		6	111.8	55.97	424.65		6	123.58	61.75	430.21	
>1	1	128.13	128.13	128.13		1	337.36	337.36	337.36		1	465.49	465.49	465.49	
Surgical excision of first relapse					0.053					0.18					0.1
No	3	46.3	5.9	128.13		3	140.28	124.01	337.36		3	170.31	146.19	465.49	
Yes	5	5.27	0	7.65		5	91.29	55.97	424.65		5	96.57	61.75	430.21	
Number of next treatment lines					0.48					0.48					0.48
Missing	1	0	0	0		1	61.75	61.75	61.75		1	61.75	61.75	61.75	
<3	4	6.78	5.27	128.13		4	115.79	55.97	337.36		4	121.38	63.62	465.49	
≥3	3	5.56	1.39	46.3		3	124.01	99.58	424.65		3	170.31	100.97	430.21	

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. (Supplemental Table 2.) Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ
Συμπληρωματικός Πίνακας 2. (Supplemental Table 2.) Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ
κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών
(εδώ CD4), στην πρωτοπαθή εστία, ως συνεχείς μεταβλητές. (Βλ. συνέχεια πίνακα σε επόμενη σελίδα).

ση
ς

Supplemental Table 2. Associations of markers' expression with selec

	iFOXP3					sFOXP3					Total FOXP3				
	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value	N	Median	Min	Max	p-value
Age at diagnosis					0.86					0.74					0.74
<65	2	1.25	0	2.5		2	87.57	0	175.14		2	88.82	0	177.64	
≥65	6	0.56	0	2.78		6	33.37	2.36	208.68		6	34.76	2.36	209.8	
Sex					0.28					0.083					0.083
Female	4	0	0	2.69		4	3.51	0	109.03		4	3.51	0	111.71	
Male	4	1.81	0	2.78		4	106.15	29.58	208.68		4	108.79	29.58	209.8	
Grade					0.86					0.74					0.74
Moderately differentiated	6	0.56	0	2.78		6	33.37	0	208.68		6	34.76	0	209.8	
Moderately/poorly differentiated	2	1.34	0	2.69		2	55.69	2.36	109.03		2	57.04	2.36	111.71	
Tumor location					0.35					0.28					0.28
Left	7	1.12	0	2.78		7	37.16	0	208.68		7	39.94	0	209.8	
Right	1	0	0	0		1	2.36	2.36	2.36		1	2.36	2.36	2.36	
T					0.75					0.46					0.46
T3	5	0	0	2.78		5	29.58	0	175.14		5	29.58	0	177.64	
T4	3	1.12	0	2.69		3	109.03	2.36	208.68		3	111.71	2.36	209.8	
Number of positive nodes					>0.999					0.56					0.56
<3	4	0.56	0	2.78		4	19.76	0	208.68		4	21.15	0	209.8	
≥3	4	1.25	0	2.69		4	69.31	4.65	175.14		4	70.65	4.65	177.64	
Synchronous metastasis					0.53					0.88					0.88
No	5	0	0	2.69		5	29.58	2.36	175.14		5	29.58	2.36	177.64	
Yes	3	1.12	0	2.78		3	37.16	0	208.68		3	39.94	0	209.8	
Number of progression sites at first progression					0.43					0.66					0.66
1	3	0	0	2.5		3	4.65	2.36	175.14		3	4.65	2.36	177.64	
>1	5	1.12	0	2.78		5	37.16	0	208.68		5	39.94	0	209.8	
Number of progression sites at second progression					0.41					>0.999					>0.999
Missing	1	2.5	2.5	2.5		1	175.14	175.14	175.14		1	177.64	177.64	177.64	
1	6	0.56	0	2.78		6	20.91	0	208.68		6	22.3	0	209.8	
>1	1	0	0	0		1	29.58	29.58	29.58		1	29.58	29.58	29.58	
Surgical excision of first relapse					0.87					0.3					0.3
No	3	0	0	2.78		3	29.58	0	37.16		3	29.58	0	39.94	
Yes	5	1.12	0	2.69		5	109.03	2.36	208.68		5	111.71	2.36	209.8	
Number of next treatment lines					0.44					0.72					0.72
Missing	1	2.69	2.69	2.69		1	109.03	109.03	109.03		1	111.71	111.71	111.71	
<3	4	1.25	0	2.78		4	33.37	2.36	175.14		4	34.76	2.36	177.64	
≥3	3	0	0	1.12		3	4.65	0	208.68		3	4.65	0	209.8	

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. (Supplemental Table 2.) Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και δεικτών με τους δείκτες των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (εδώ FOXP3), στην πρωτοπαθή εστία, ως συνεχείς μεταβλητές.

Supplemental table 3. Clinical, histological and molecular characteristics of patients.								
ασθενής	φύλο	ηλικία κατά τη διάγνωση	α/α	οικ/α	κάπνισμα	κατάχρηση αλκοόλ	διάγνωση	κλινική εικόνα
1	θήλυ	51	θυρεοειδίτιδα Hashimoto	αρνητικό	όχι	όχι	Sep-17	διαταραχές κενώσεων
2	άρρεν	79	ΑΥ	πατέρας με ca πνεύμονα	όχι	όχι	Jul-17	αιματοχεσία
3	θήλυ	67	αγχώδης διαταραχή	αδελφή με μελάνωμα	όχι	όχι	Nov-15	αιματοχεσία
4	άρρεν	65	νεφρολιθίαση	αρνητικό	όχι	όχι	Jan-19	αιματοχεσία
5	άρρεν	82	ΣΝ, γαστροραγία	αρνητικό	όχι	όχι	Oct-18	οξεία κοιλία
6	θήλυ	78	ΑΥ, τραχηλικός πολύποδας, ίλιγγος θέσης	αρνητικό	όχι	όχι	Mar-13	διαταραχές κενώσεων
7	θήλυ	69	ΑΥ	αρνητικό	όχι	όχι	Feb-16	αιματοχεσία
8	άρρεν	56	ΣΔΙΙ, Υπερουριχαιμία	αρνητικό	ναι	όχι	Sep-12	αναμία
9	άρρεν	52	ΣΝ	αρνητικό	διακοπή	όχι	Sep-18	διαταραχές κενώσεων
10	θήλυ	52	ελεύθερο	αρνητικό	όχι	όχι	May-19	προληπτικός έλεγχος
11	θήλυ	38	ελεύθερο	αρνητικό	όχι	όχι	Jan-15	αιματοχεσία
12	άρρεν	53	ΑΥ	ca λάρυγγα σε αδελφό μητέρας	διακοπή	ναι	Apr-15	αποφρακτικός ειλεός
13	θήλυ	57	ελεύθερο	αρνητικό	ναι	όχι	Aug-14	αποφρακτικός ειλεός
14	άρρεν	69	ΑΥ, Προστατίτιδα	ca παχέος εντέρου σε αδελφό	ναι	όχι	Aug-18	προληπτικός έλεγχος
15	άρρεν	62	υπερουριχαιμία	ca παχέος εντέρου σε αδελφή	διακοπή	όχι	Jan-19	αναμία
16	άρρεν	71	ελεύθερο	ca κεφ/τραχ. Σε αδελφό, πατέρας με ca πνεύμονα	ναι	ναι	Nov-16	αποφρακτικός ειλεός
17	θήλυ	73	ελεύθερο	μητέρα με ca παχέος εντέρου	όχι	όχι	Aug-15	αιματοχεσία
18	θήλυ	65	ΟΥΜΕ, έλκος στομάχου	αρνητικό	ναι	όχι	Aug-16	αιματοχεσία
19	θήλυ	52	υποθυρεοειδισμό, οστεοπενία, οστεοαρθρίτιδα	αρνητικό	όχι	όχι	Apr-15	αιματοχεσία, διαταραχές κενώσεων
20	άρρεν	67	ελεύθερο	αρνητικό	όχι	όχι	Aug-17	διαταραχές κενώσεων

ασθενής	grade	μορφολογικά χαρακτηριστικά	πρωτοπαθής εστία	T	N	M
1	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	σιγμοειδές	γpT3 (περ/κο λίπος)	N1 (1/13)	ηπατικές
2	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	σιγμοειδές	γpT3 (περ/κο λίπος)	N1 (2/14)	ηπατικές
3	μέτρια δ/ση	βλεννώδες	ορθό	γpT3 (περ/κο λίπος)	N2a(4/14)	ΜΧ
4	μέτρια δ/ση	βλεννώδες	ορθό	pT3 (περ/κο λίπος)	N2a(5/17)	ΜΧ
5	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	αρ. κοιλής καμπίης	pT4a (διασπ. ορογόνο)	N1b (2/58)	ηπατικές
6	μέτρια/χαμηλή δ/ση	Δ.Α.	δεξιό κόλον (ελλεοτυφλική βαλβίδα)	pT4a (Διηθεί όλο το τοίχωμα)	N1b (2/25)	ΜΧ
7	μέτρια/χαμηλή δ/ση	Δ.Α.	ορθό	pT4b(Διηθεί περιεντ/κο λίπος)	N2a(4/12)	ΜΧ
8	μέτρια/εστιακά χαμηλή δ/ση	Δ.Α.	δεξιό κόλον	pT3 (διηθεί περιεκόλ/κό λίπος)	N1(1/22)	ΜΧ
9	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	αριστερό κόλον	pT3(περιεντ/κό λίπος)	N2a (5/13)	ΜΧ
10	μέτρια δ/ση	εντερικού τύπου	σιγμοειδές	γpT3	N1b (3/19)	ηπατικές
11	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	σιγμοειδές	pT3(περιεντ/κό λίπος)	N1b(3/24)	ΜΧ
12	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	σιγμοειδές	pT3	N2a (5/29)	ηπατικές
13	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	αρ. κόλον	pT3	N1a (1/19)	ΜΧ
14	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	ορθοσιγμοειδούς	pT3	N1b (2/9)	ΜΧ
15	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	εγκάρσιου κόλου	γpT3	γpN1c (1/16)	ηπατικές, πνευμονικές
16	μέτρια δ/ση	βλεννώδες	σιγμοειδές	pT4	N2a (5/9)	Πνευμονική
17	μέτρια/χαμηλή δ/ση	Δ.Α.	αρ. κόλου	pT3	N2a(4/22)	ΜΧ
18	μέτρια/χαμηλή δ/ση	Δ.Α.	ορθού	pT3	N1a (1/20)	ηπατικές
19	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	σιγμοειδές	pT3	N1(2/15)	ΜΧ
20	μέτρια δ/ση	Δ.Α.	σιγμοειδές	pT4a	N2a (5/14)	ΜΧ

Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Παρουσιάζονται τα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών, κατά τη διάγνωση. (Βλ. και επόμενη σελίδα)

ασθενής	νεοεπικουρική θεραπεία	επικουρική θεραπεία	LVI	PNI	MMR	KRAS	άλλα μοριακά
1	FOLFOX x4cy	FOLFIRI x8cy	Δ.Α.	Δ.Α.	MSS stable	G12D	PIK3CA mt, DPD proficient
2	FOLFOX-cetuximab x8cy	FOLFOX x4cy	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	wild type	NRAS wild type
3	capecitabine-RT	CAPEOX x 2cy	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	wild type	NRAS wild type
4	Δ.Ε.	CAPEOX x 3cy, FOLFOX x2cy	Δ.Α.	(+)	MSS stable	G12D	TP53 mutated, PIK3A mutated, DPD αρνητικός
5	Δ.Ε.	CAPEOX x4cy	(+)	(+)	MSS stable	wild type	NRAS wild type
6	Δ.Ε.	CAPEOX x 7cy	Δ.Α.	(++)	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
7	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
8	Δ.Ε.	CAPEOX x 8cy	(+)	Δ.Α.	Δ.Α.	G12V	TP53 mt
9	Δ.Ε.	CAPEOX x 8cy	(+)	(+)	Δ.Α.	wild type	NRAS wild type, BRAF wild type
10	FOLFOXIRI-bevacizumab x 12cy	Capecitabine	Δ.Α.	Δ.Α.	MSS stable	G12D	TMB 7.04mut/MB, BRAF wild type, DPD αρνητική
11	Δ.Ε.	CAPEOX x 8cy	(+)	Δ.Α.	MSS stable	wild type	NRAS wild type
12	Δ.Ε.	CAPEOX x 8cy	(+)	Δ.Α.	MSS stable	wild type	NRAS, BRAF, NTRK wild type, SMAD4 mutated
13	Δ.Ε.	CAPEOX x 8cy	Δ.Α.	Δ.Α.	MSS stable	G12A	Δ.Α.
14	Δ.Ε.	CAPEOX x5cy	Δ.Α.	Δ.Α.	MSS stable	wild type	NRAS, BRAF wild type
15	CAPEOX-ziv-aflibercept x 8cy	FOLFIRI-ziv-aflibercept x9cy	(+)	Δ.Α.	MSS stable	wild type	BRAF V600E
16	FOLFOX-cetuximab x6cy	FOLFOX-cetuximab x6cy	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	wild type	NRAS wild type
17	Δ.Ε.	CAPEOX x8 cy	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	wild type	NRAS wild type
18	CAPEOX x 8cy	FOLFIRI, CAPEOX	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
19	Δ.Ε.	CAPEOX x 6 cy	Δ.Α.	Δ.Α.	MSS stable	wild type	NRAS, BRAF wild type
20	Δ.Ε.	CAPEOX x8cy	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	wild type	NRAS, BRAF wild type

Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Παρουσιάζονται τα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών, κατά τη διάγνωση. (Βλ. και επόμενη σελίδα)

ασθενής	ημ/νία υποτροπής	1η υποτροπή	2η υποτροπή	χειρουργική εξαίρεση 1ης υποτροπής)
1	Jan-20	ήπαρ	λεπτό έντερο	όχι
2	Sep-20	περιτοναϊκές εμφυτεύσεις	περιτοναϊκές εμφυτεύσεις	όχι
3	Mar-16	ήπαρ	πνεύμονες	ναι
4	Oct-19	ήπαρ, πνεύμονας	ήπαρ, πνεύμονας	όχι
5	Jun-19	ήπαρ	ήπαρ	ναι
6	Mar-16	υποτροπή σε αναστόμωση	λεπτό έντερο	ναι
7	Jul-16	ήπαρ	ήπαρ	ναι
8	Feb-14	λεπτό έντερο (υποτροπή)	ήπαρ, περιτόναιο	ναι
9	Nov-20	ήπαρ	Δ.Ε.	ναι
10	Oct-20	ήπαρ	ήπαρ	όχι
11	Jan-19	ήπαρ	ήπαρ	ναι
12	Apr-19	μπλοκ λεμφαδένων	οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες, ήπαρ	ναι
13	Oct-15	ήπαρ	ήπαρ	ναι
14	Aug-18	ήπαρ, οστά	ήπαρ	ναι
15	Aug-20	ήπαρ	ήπαρ	όχι
16	May-17	πνεύμονας	ήπαρ, πνεύμονες	ναι
17	May-17	ήπαρ, πνεύμονας	ήπαρ, πνεύμονας	ναι
18	Aug-17	ήπαρ	ήπαρ, περιτόναιο	όχι
19	Apr-19	ήπαρ	ήπαρ	ναι
20	Sep-20	ήπαρ	Δ.Ε.	ναι

ασθενής	επόμενες γραμμές θεραπείας	θάνατος	PFS1	PFS2	OS
1	FOLFOX-Bevacizumab, FOLFOX, FOLFIRI-Ziv-aflibercept	Jun-20	17	10	36
2	FOLFIRI-panitumumab	Aug-23	26	38	72
3	XELOX-bevacizumab, CAPEOX, FOLFOX-cetuximab	Jun-20	7	35	58
4	irox-bevacizumab, regorafenib	Jul-20	10	3	19
5	FOLFOX-cetuximab, FOLFOX-panitumumab, FOLFIRI-Bevacizumab, trifluridine-tipiracil	Mar-23	8	10	63
6	-	Feb-20	36	36	84
7	X	Mar-22	5	X	72
8	FOLFOX-Bevacizumab, FOLFOX, FOLFIRI-Ziv-aflibercept	May-22	18	42	113
9	CAPIRI	Δ.Ε.	18	36	81
10	capecitabine, FOLFIRI-Ziv-aflibercept, trifluridine-tipiracil	Aug-21	14	10	28
11	FOLFIRINOX-panitumumab, FOLFOX-panitumumab	Δ.Ε.	49	62	111
12	FOLFIRI-panitumumab, FOLFIRINOX-bevacizumab, regorafenib, trifluridine/tipiracil	Nov-21	36	7	79
13	FOLFIRI-bevacizumab, FOLFOX-ziv-aflibercept, FOLFIRI-ziv-aflibercept, trifluridine/tipiracil, regorafenib	Nov-19	36	7	63
14	FOLFIRI-cetuximab, FOLFIRI, CAPEOX	Aug-21	14	10	36
15	FOLFIRI- ziv-aflibercept, cetuximab-encorafenib, FOLFOX-bevacizumab, regorafenib	Mar-22	20	6	38
16	FOLFIRI-bevacizumab, regorafenib	Dec-20	20	2	49
17	CAPEOX-bevacizumab, καπεσιταβίνη, trifluridine-tipiracil, CAPIRI-bevacizumab, capecitabine-bevacizumab, regorafenib	Dec-19	23	7	51
18	irinotecan-bevacizumab, trifluridine/tipiracil	Jan-19	15	10	29
19	FOLFIRI-cetuximab, FOLFIRI	Δ.Ε.	48	59	107
20	FOLFOX-cetuximab, capecitabine, bevacizumab	Δ.Ε.	37	42	79

Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Παρουσιάζονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και οι θεραπείες μετά την 1η εξέλιξη νόσου, και τα διαστήματα επιβίωσης.

Συζήτηση

Κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Από την ανασκόπηση στο αρχείο της Παθολογικής-Ογκολογικής κλινικής του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, επιλέχθηκαν 20 περιπτώσεις ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο, για το σκοπό της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Οι μισοί από τους ασθενείς ήταν άνδρες, ενώ, σε συμφωνία με τα διεθνή επιδημιολογικά δεδομένα, η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν τα 65 έτη (IQR 52.5-70), με 55% των ασθενών να είναι 65 ετών και άνω, με την πλειοψηφία των περιπτώσεων να εντοπίζονται στο αριστερό κόλον (85%) [142].

Σε αυτήν τη μικρή ομάδα ασθενών, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές συνοσηρότητες, ενώ θετικό οικογενειακό αναμνηστικό για κολο-ορθικό καρκίνωμα αναφέρεται σε 15% των ασθενών (3/20), σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, όπου ως και 20% των προσβαλλόμενων από κολο-ορθικό καρκίνωμα, έχουν οικογενειακή προδιάθεση, ακόμα και χωρίς την ανεύρεση συγκεκριμένης κληρονομούμενης μετάλλαξης/συνδρόμου [142].

Χαρακτηριστικά, η αιματοχεσία και οι διαταραχές κενώσεων ήταν τα συχνότερα συμπτώματα που οδήγησαν στη διάγνωση (65% των ασθενών), ενώ σε 10% των ασθενών κολο-ορθικός καρκίνος εντοπίστηκε στο πλαίσιο προληπτικού ελέγχου, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη ευρύτερης διάδοσης της ενδοσκόπησης, σε άτομα 45 ετών και άνω, προκειμένου να μειωθεί η θνησιμότητα της νόσου [15], με ακόμη πρωιμότερο έλεγχο κατά την ύπαρξη αναγνωρισμένου συνδρόμου κληρονομούμενου καρκίνου παχέος εντέρου[15].

Κατά τη διάγνωση, το πιο συχνά εντοπιζόμενο στάδιο ήταν το T3 (διήθηση του εντερικού τοιχώματος χωρίς διήθηση του ορογόνου) , ενώ διηθημένοι λεμφαδένες ανευρίσκονταν στους μισούς ασθενείς. Σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ως και 35% των ασθενών προσερχόταν με σύγχρονες ηπατικές μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης [86,142,516].

Προεγχειρητική χημειοθεραπεία δόθηκε σε 35% των ασθενών, και μετεγχειρητική στο 95%. Η οξαλιπλάτινα, βασικός φαρμακευτικός παράγοντας στο περιεγχειρητικό setting, συμπεριλαμβανόταν σε 25% των περιπτώσεων χορήγησης προεγχειρητικής και σε 75% μετεγχειρητικής αγωγής. Καθώς τα αντι-EGFR αντισώματα δεν χρησιμοποιούνται στο περιεγχειρητικό setting, ο παράγοντας cetuximab δόθηκε ως νεοεπικουρική θεραπεία σε 2 ασθενείς, που κατόπιν οδηγήθηκαν σε χειρουργείο, και σε 1 μόνο ασθενή μετεγχειρητικά. Κατ' ανάλογο τρόπο, αντιαγγειογενετική θεραπεία δόθηκε σε 2 και σε 1 ασθενή ως νεοεπικουρική και ως επικουρική θεραπεία, αντίστοιχα. Η νεοεπικουρική αγωγή συνοδευόταν από καθόλου ως ελάχιστη παθολογοανατομική ανταπόκριση στο 35% των ασθενών. Σε αυτή την ομάδα, δεν παρατηρήθηκε μεγαλύτερος βαθμός παθολογοανατομικής ανταπόκρισης. Η προεγχειρητική/νεοεπικουρική θεραπεία, προτείνεται ως τρόπος πρώιμης πρόληψης της συστηματικής διασποράς της νόσου, όπως και ως μέθοδος συρρίκνωσης των όγκων ώστε να καταστεί το χειρουργείο πλέον εφικτό και ασφαλές, ενώ σε ποικίλες μελέτες έχει διαπιστωθεί η βελτίωση της επιβίωσης και η πρόληψη των υποτροπών με την εφαρμογή νεοεπικουρικής/ περιεγχειρητικής αντινεοπλασματικής

θεραπείας, όπως στη μελέτη FOXTROT όπου ο κίνδυνος υποτροπής μειώθηκε κατά 28% στα 2 έτη από το χειρουργείο, στους ασθενείς που είχαν λάβει προεγχειρητική χημειοθεραπεία με FOLFOX, έναντι των ασθενών που έλαβαν τη θεραπεία μετεγχειρητικά. Επίσης, η εκτομή των νεοπλασμάτων επί υγιών ορίων, επιτεύχθηκε σε 94% των ασθενών που έλαβαν προεγχειρητική θεραπεία, έναντι 89% των ασθενών που έλαβαν εξ'ολοκλήρου μετεγχειρητική θεραπεία[517].

Ο μοριακός έλεγχος των ασθενών ήταν περιορισμένος, γεγονός που αντανακλά: πρώτον, τη σημασία των εναλλακτικών μεθόδων διαπίστωσης μεταλλάξεων, κατά την παθολογοανατομική μελέτη με ανοσοϊστοχημεία ή και *in situ* υβριδισμό, με την αναζήτηση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στον ιστό, όταν δεν είναι διαθέσιμες οι μοριακές μέθοδοι (RT-PCR, NGS), ελλείψει εξοπλισμού ή και λόγω μεγαλύτερου κόστους [518], και δεύτερον, τη σημασία της ενσωμάτωσης του μοριακού ελέγχου, τουλάχιστον για τους κλινικά σημαντικούς βιοδείκτες, ανεξάρτητα από τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών [519].

Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας εξετάστηκε σε 9 περιπτώσεις (45%), που ήταν όλες MSS-stable. Η μη ανεύρεση MSI-high περιπτώσεων, οφείλεται πιθανότατα στο μικρό μέγεθος δείγματος, καθώς στη βιβλιογραφία αποτελεί ως και το 20% των περιπτώσεων κολο-ορθικού καρκίνου[142].

Τα πλέον συχνά ελεγχόμενα γονίδια περιελάμβαναν το KRAS, το NRAS, το BRAF και το PIK3CA, που βρέθηκαν μεταλλαγμένα σε 25%, 0%, 5% και 10% των ασθενών, αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις είναι και οι πλέον καλά μελετημένες ως βιοδείκτες, και συνίσταται να ελέγχονται από τη διεθνή βιβλιογραφία [142, 519]. Ο έλεγχος φορτίου μεταλλάξεων, πραγματοποιήθηκε σε μια μόνο περίπτωση, όπου ανευρέθηκε χαμηλό φορτίο. Πράγματι, το TMB συνήθως χρησιμοποιείται ως προβλεπτικός δείκτης ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία, σε προθεραπευμένους ασθενείς, και δεν έχει ενταχθεί ακόμη στην πρώτη γραμμή του μοριακού ελέγχου, άμα τη διαγνώσει [520]. Ωστόσο, φαίνεται να έχει και προγνωστική σημασία, καθώς από δεδομένα μεταanalύσεων, φαίνεται η ύπαρξη υψηλού φορτίου μεταλλάξεων να σχετίζεται με μείωση του κινδύνου θανάτου κατά 32% [520].

Σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία, το ήπαρ η συχνότερη εστία υποτροπής της νόσου (75% των ασθενών), ενώ υποτροπή στον πνεύμονα παρουσίασε το 15% των ασθενών [142], με 2 ή περισσότερες εστίες κατά την υποτροπή στο 60% των ασθενών.

Κατά την εμφάνιση της 1^{ης} υποτροπής νόσου, και μετέπειτα, το 25% των ασθενών έλαβε 2 γραμμές αντινεοπλασματικής θεραπείας, το 30% έλαβε 3 γραμμές θεραπείας, ενώ ακόμη 25% των ασθενών έλαβε πάνω από 3 επόμενες γραμμές θεραπείας. Είναι χαρακτηριστική η διεύρυνση της θεραπευτικής φαρέτρας του κολο-ορθικού καρκινώματος, κατά τις τελευταίες δεκαετίες, η οποία επιτρέπει τη μακροχρόνια θεραπεία των ασθενών, με αντίστοιχο θετικό αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής και στην επιβίωση [521].

Οι χρησιμοποιούμενες θεραπείες περιελάμβαναν αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα (cetuximab ή panitumumab) σε 45% των ασθενών, και αντιαγγειογενετική θεραπεία με bevacizumab ή ziv-aflibercept σε 65% των ασθενών. Η πλειοψηφία των ασθενών (45%) έλαβε ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνη, συγχρόνως ή διαδοχικά στο πλαίσιο της θεραπείας, ενώ 15% και 30% αυτών, έλαβαν μόνο οξαλιπλατίνη και μόνο ιρινοτεκάνη, αντίστοιχα. Η δυνατότητα εναλλαγής των ποικίλων αυτών

θεραπευτικών σχημάτων και ο συνδυασμός κυτταροτοξικής θεραπείας και βιολογικής στόχευσης, αποτελούν τη βάση του διευρυμένου θεραπευτικού πεδίου του κολο-ορθικού καρκινώματος [142,521].

Χαρακτηριστική επίσης είναι η εφαρμογή χειρουργικής εξαίρεσης, καθώς σε 70% των ασθενών επιχειρήθηκε η εξαίρεση τουλάχιστον 1 εκ των εστιών υποτροπής, άμεσα ή κατόπιν προεγχειρητικής θεραπείας. Το όφελος της χειρουργικής εξαίρεσης στην επιβίωση είναι γνωστό και από τη βιβλιογραφία [522, 523], καθώς φαίνεται ότι ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνωμα που υποβάλλονται σε χειρουργική εκτομή μεταστατικών εστιών έχουν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (από 29 σε 55 μήνες) και μεγαλύτερη ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (από 13 σε 21 μήνες) σε σχέση με τους ασθενείς που λαμβάνουν μόνο συστηματική χημειοθεραπεία. Παράλληλα, το βιοπτικό υλικό μπορεί να παρέχει προγνωστική πληροφορία κατά την εκτίμηση του βαθμού παθολογοανατομικής ανταπόκρισης, καθώς και να αποτελέσει βάση για επανάληψη του μοριακού ελέγχου [524].

Αξιοσημείωτο είναι το μεγάλο διάστημα συνολικής επιβίωσης των ασθενών, κυμαινόταν από 19 ως 113 μήνες, με διάμεση τιμή τους 63 μήνες (IQR: 37.5-79.5 μήνες). Αν και το μέγεθος του δείγματος είναι μικρό, επαληθεύεται η τάση παράτασης της επιβίωσης ακόμα και στο μεταστατικό κολο-ορθικό καρκίνωμα, καθώς η νόσος αντιμετωπίζεται τόσο με τοπικούς χειρισμούς όσο και με συστηματική αντινεοπλασματική θεραπεία, με κυτταροτοξικούς και στοχευτικούς παράγοντες[525]. Σε πρόσφατη ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, αναφέρεται πως η συνολική επιβίωση των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνωμα ήταν περίπου 23 μήνες για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν μεταξύ 2004 και 2012, με σταθερή παράταση στους 29 και 32 μήνες για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν κατά τα διαστήματα 2013-2015 και 2016-2019, αντίστοιχα, με το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης να ανέρχεται από 16% σε 26% κατά τις 2 τελευταίες δεκαετίες[525]. Μάλιστα, η μεταστασιεκτομή, η χορήγηση 3^{ης} γραμμής θεραπείας και η χορήγηση χημειοθεραπείας, φάνηκαν να επηρεάζουν θετικά την συνολική επιβίωση των ασθενών, γεγονός που καταδεικνύει το πραγματικό όφελος του συνδυασμού των διαθέσιμων θεραπευτικών στρατηγικών και η χορήγηση συστηματικής θεραπείας με όλους τους διαθέσιμους αντινεοπλασματικούς παράγοντες, εφόσον το επιτρέπει η κατάσταση του ασθενούς[525]. Πράγματι, και στον μικρό πληθυσμό της παρούσας μελέτης, με τη στιγμή της διάγνωσης να τοποθετείται μεταξύ 09/2012-05/2019, επιβεβαιώνεται πως η αξιοποίηση περισσότερων από 2 γραμμών θεραπείας, και οι μεταστασιεκτομές, οδήγησαν σε ιδιαίτερα υψηλή διάμεση επιβίωση, για το σύνολο του πληθυσμού.

Αξιολόγηση τοπικής λεμφοκυτταρικής διήθησης

Βασική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελεί η συνεχής ανοσοεπιτήρηση κάθε διαμερίσματος του οργανισμού καθώς και η κινητοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης και ανοσολογικής ανταπόκρισης, που επιτελούνται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού [526]. Σκοπός της ανοσολογικής επιτήρησης είναι η έγκαιρη ανίχνευση των νεοπλασματικών κυττάρων και η κινητοποίηση της ανοσολογικής ανταπόκρισης, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της ανάπτυξης της νεοπλασματικής εξεργασίας [526-528].

Η αλληλεπίδραση του κακοήθους νεοπλάσματος με τον οργανισμό του ξενιστή, περιλαμβάνει τρία στάδια: το στάδιο της εξουδετέρωσης, της ισορροπίας και της διαφυγής [527,528]. Στο στάδιο της εξουδετέρωσης το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή υπερτερεί της νεοπλασματικής ανάπτυξης και κατορθώνει την πρώιμη εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Στο στάδιο της ισορροπίας, η ανάπτυξη του νεοπλάσματος ελέγχεται ακόμα επαρκώς από το ανοσοποιητικό του ξενιστή, ωστόσο χωρίς να επιτυγχάνει πλήρη εξάλειψη της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Κατά το στάδιο της διαφυγής, το ανοσοποιητικό του ξενιστή αδυνατεί πλέον να περιορίσει την ανάπτυξη της νεοπλασίας, ενώ τα νεοπλασματικά κύτταρα επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται, καταλήγοντας στην κλινική εκδήλωση της νόσου και στην διάγνωση του ασθενούς [527,528].

Ακόμα και μετά το στάδιο της διαφυγής, η αλληλεπίδραση μεταξύ του ανοσοποιητικού του ξενιστή και του κακοήθους νεοπλάσματος συνεχίζει να εξελίσσεται δυναμικά, καθώς το ανοσοποιητικό παρεμβαίνει σε άλλοτε άλλο βαθμό στην ανάπτυξη της κακοήθους νεοπλασίας [526-528]. Η αναζήτηση δεικτών αξιολόγησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ ανοσοποιητικού ξενιστή και κακοήθους νεοπλασίας, είναι από τους βασικότερους πυλώνες της έρευνας κατά του καρκίνου τις τελευταίες δεκαετίες [142,527,528].

Υπάρχουν σήμερα εκτενώς αξιολογημένοι δείκτες ανοσογονικότητας, όπως η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας, η υπερέκφραση του PD-L1, το υψηλό φορτίο μεταλλάξεων του νεοπλασματικού DNA, οι οποίοι χρησιμοποιούνται τόσο στην κλινική έρευνα, όσο και στην κλινική πράξη, κατευθύνοντας σε σημαντικό βαθμό την επιλογή θεραπευτικής στρατηγικής [142,529,530]. Η έρευνα για την ανάδειξη πιο αξιόπιστων και δυνητικά ευρέως εφαρμόσιμων δεικτών συνεχίζει να βρίσκεται στο επίκεντρο της εργαστηριακής, κλινικής και μεταφραστικής έρευνας.

Η αξιολόγηση των διηθούντων T-λεμφοκυττάρων, ως δείκτης ανοσογονικότητας του όγκου, και κατά προέκταση ως προγνωστικός και προβλεπτικός δείκτης έχει αρχίσει να αξιολογείται συστηματικά, τις τελευταίες δεκαετίες [439-441]. Όπως και στην παρούσα έρευνα, η αξιολόγηση των TILs πραγματοποιείται αναδρομικά σε μονιμοποιημένα ιστικά δείγματα ασθενών, σε μπλοκ παραφίνης, σε τομές αιματοξυλίνης/ηωσίνης, ενώ η ανίχνευση λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών διενεργείται με την αξιοποίηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Η αξιολόγηση των TILs αποτελεί σημαντικό μέρος τόσο αναδρομικών όσο και προοπτικών μελετών, οι οποίες αφορούν τον κολο-ορθικό καρκίνο, τον καρκίνο του μαστού, το μελάνωμα και άλλα συμπαγή νεοπλάσματα [416-437].

Σύμφωνα με το consensus αξιολόγησης των TILs, που έχει προταθεί από το 2014 από τους Salgado et al. [439-441] μόνο τα στρωματικά TILs προσφέρουν προγνωστική πληροφορία, ενώ τα ενδοεπιθηλιακά δεν χρειάζεται να συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση. Εντούτοις, κρίθηκε σκόπιμο να καταμετρηθεί ο αριθμός και να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις τόσο για τα στρωματικά όσο και τα ενδοεπιθηλιακά TILs, όπως και για το σύνολο ανά τομή της βιοψίας, προκειμένου να διερευνηθεί κάθε πιθανότητα συσχέτισης της λεμφοκυτταρικής διήθησης με την κλινική έκβαση ή τη θεραπεία των ασθενών.

Ακολουθώντας τις βιβλιογραφικές συστάσεις, δεν διενεργήθηκε καταμέτρηση σε ιστικά δείγματα με σημαντικό βαθμό φθοράς, όπως και σε περιοχές νέκρωσης, ή στα όρια της τομής [439-441].

Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συγκέντρωση των TILs, υπολογίστηκε ως προς το εμβαδό της εκάστοτε αξιολογούμενης περιοχής, και όχι προς τον πληθυσμό των στρωματικών ή άλλων κυττάρων [439]. Με βάση αυτούς τους περιορισμούς, η αξιολόγηση των CD3, CD4, CD8 και FOXP3 λεμφοκυττάρων (στρωματικών και ενδοεπιθηλιακών), κατέστη εφικτή σε 11 από τους 20 ασθενείς (55% επί του συνόλου).

Η αναδρομική αξιολόγηση των TILs σε δείγματα συμμετεχόντων σε κλινική μελέτη, επίσης μπορεί να αποδώσει πολύτιμη πληροφορία, ωστόσο, στην περιγραφή των αποτελεσμάτων πρέπει να περιγράφονται και τα καταληκτικά σημεία της μελέτης, όπως και την περιγραφή των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών, των θεραπειών που έλαβαν, του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των TILs, καθώς και αναφορά της μεθοδολογίας καταμέτρησης των TILs [531,532].

Μελέτες σε ασθενείς με κακοήγη νεοπλασία έχουν αναδείξει την σημαντική συσχέτιση που υφίσταται μεταξύ της παρουσίας συγκεκριμένων υποπληθυσμών ανοσοκυττάρων και της κλινικής ανταπόκρισης των ασθενών [533,534]. Πιο συγκεκριμένα, ειδικά η ανοσολογική απόκριση που μεσολαβείται από τα T και B λεμφοκύτταρα, φαίνεται να είναι το πιο βασικό σημείο στην επαγωγή αποτελεσματικής και διαρκούς ανοσολογικής ανταπόκρισης [439-441]. Με βάση τα παραπάνω, η καταμέτρηση/αξιολόγηση των TILs στην περιοχή του όγκου έχει προταθεί ως σημαντικό παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό αλλά και ως σημαντικός βιοδείκτης, ενώ υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες μεθοδολογίες για τον υπολογισμό του ποσοστού της λεμφοκυτταρικής διήθησης [439-441, 533, 534].

Στον καρκίνο του μαστού, η εκτεταμένη διήθηση του όγκου από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, έχει συσχετιστεί με την επιβίωση των ασθενών καθώς και την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία [449, 535, 536]. Αντίθετα, η παρουσία κατασταλτικών/ρυθμιστικών CD4+ T-λεμφοκυττάρων (Tregs), φαίνεται να σχετίζεται άλλοτε με καλή και άλλοτε πτωχή κλινική έκβαση [437-539]. Ειδικά τα βοηθητικά CD4+ T-λεμφοκύτταρα, Th1, τα οποία λειτουργούν ως πηγή της σημαντικής κυτταροκίνης ιντερφερόνης-γ, έχουν συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση για τον ασθενή, ενώ τα Th2, έχουν βρεθεί να καταστέλλουν την ανοσολογική ανταπόκριση [523, 540, 541].

Η επίδραση των βοηθητικών Th17 ποικίλει ανάλογα με το όργανο προέλευσης και τον ιστολογικό τύπο του νεοπλασματος, ενώ ο ρόλος των διηθούντων B λεμφοκυττάρων παραμένει αμφιλεγόμενος [448,449]. Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκε η αξιολόγηση των ακόλουθων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών: CD8-κυτταροτοξικά, CD4-βοηθητικά/ρυθμιστικά, CD3-ώριμα λεμφοκύτταρα, FOXP3-ανοσοκατασταλτικά λεμφοκύτταρα, με ανοσοϊστοχημικούς δείκτες.

Αν και κατά η παρούσα εργασία δεν αφορά ασθενείς κλινικού πρωτοκόλλου, η αναδρομική ανάλυση περιλαμβάνει τόσο τα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών, και εξετάζει την πιθανή συσχέτιση με το βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης, ενώ περιγράφεται η μεθοδολογία της αξιολόγησης του υλικού και από πού προέρχεται, σύμφωνα με τα ισχύοντα βιβλιογραφικά πρότυπα [531]. Είναι ενδιαφέρον ότι, οι άρρενες ασθενείς, έτειναν να έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στρωματικών και συνολικών CD3 λεμφοκυττάρων, στην πρωτοπαθή εστία, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p -value=0.029 και για τις δύο περιπτώσεις), σε σχέση με τις γυναίκες (Βλ. Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2), και αντίστροφα, όλοι οι ασθενείς με υψηλόβαθμη διήθηση από CD3 λεμφοκύτταρα (τιμή υψηλότερη της διάμεσης) ήταν άνδρες.

Αυτή η στατιστικά σημαντική συσχέτιση επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της συγκέντρωσης των CD3 λεμφοκυττάρων, ως συνεχούς μεταβλητής, καθώς οι άρρενες ασθενείς βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στρωματικών και συνολικών CD3 λεμφοκυττάρων, σε σχέση με τις γυναίκες ασθενείς (p -values=0.021 και στις δύο περιπτώσεις). (Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2). Ο δείκτης CD3 εκφράζεται από τα ώριμα T-λεμφοκύτταρα, υψηλότερες συγκεντρώσεις των οποίων έχει σχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση [542]. Η συσχέτιση μεταξύ βιολογικού φύλου και λεμφοκυτταρικής διήθησης των νεοπλασμάτων, δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς, ωστόσο, η λειτουργία του ανοσοποιητικού επηρεάζεται με επιγενετικούς και ανοσοτροποποιητικούς μηχανισμούς από την επίδραση των ορμονών του φύλου, καθώς οι ορμόνες δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη μετραγραφή κομβικών γονιδίων για την ανοσολογική ανταπόκριση, ενώ μπορούν να προσδένονται σε υποδοχείς των κυττάρων του ανοσοποιητικού τροποποιώντας τη λειτουργία τους[543, 544]. Χαρακτηριστικά, σε μελέτη βιοψιών ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, η αναλογία εξαντλημένων, μη λειτουργικών CD8 κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, βρέθηκε αυξημένη στους άρρενες ασθενείς, ενώ η λειτουργικότητα των T-λεμφοκυττάρων φάνηκε να ατονεί υπό την επίδραση των ανδρογόνων [544]. Παρόλο που σύμφωνα με τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα η ανοσολογική ανταπόκριση των γυναικών είναι ισχυρότερη[543, 544], τα ευρήματά μας φαίνονται να υποστηρίζουν την ανοσολογική υπεροχή των ανδρών ασθενών, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ώριμων, CD3 T-λεμφοκυττάρων.

Διαπιστώθηκε επίσης μια οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση, μεταξύ των στρωματικών και συνολικών CD8 λεμφοκυττάρων με το βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος (p -values=0.046, και στις δύο περιπτώσεις). Φαίνεται ότι οι μετρίως διαφοροποιημένοι όγκοι τείνουν να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις sCD8 και tCD8, σε σχέση με τους όγκους μέτριας προς χαμηλής διαφοροποίησης (Συμπληρωματικοί πίνακες 1,2). Ανάλογη συσχέτιση, περιγράφεται και σε ασθενείς με καρκίνο μαστού[545], όπου τα καρκινώματα υψηλόβαθμης διαφοροποίησης (Grade 1), χαρακτηρίζονταν από υψηλότερο βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης, σε σχέση με τα μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης, ωστόσο, τα καταμετρούμενα λεμφοκύτταρα με την κλασική μικροσκόπηση, δεν ήταν ανεξάρτητος παράγοντας σχετιζόμενος με καλή διαφοροποίηση του καρκινώματος. Κατά την καταμέτρηση των λεμφοκυττάρων με μικροσκόπηση 2 φωτονίων, ο βαθμός λεμφοκυτταρικής διήθησης των καρκινωμάτων, αναδείχθηκε σε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα καλής διαφοροποίησης του νεοπλάσματος. Ενδεχομένως, λοιπόν, αξιολόγηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης με περισσότερο εξελιγμένες τεχνολογικά μεθόδους, να δύναται να διευκρινίσει συσχετίσεις που διαφαίνονται με

μικρότερο βαθμό σαφήνειας, με την κλασική καταμέτρηση όπως έχει προταθεί από το consensus του 2014 [339-441].

Σε έτερη μελέτη, παρατηρήθηκε μείωση του κινδύνου τοπικής υποτροπής κατά 66% σε ασθενείς με μερική μαστεκτομή και καρκίνο μαστού, σε νεοπλάσματα με υψηλό βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης. Μάλιστα, διαπιστώθηκε πως η ακτινοθεραπεία στο χειρουργημένο μαστό, μείωνε τον κίνδυνο της υποτροπής ιδίως στα νεοπλάσματα με χαμηλή συγκέντρωση λεμφοκυττάρων [546].

Όσον αφορά τον κολο-ορθικό καρκίνο, ανάλογη συσχέτιση TILs και ιστολογικού grade υποστηρίζεται από μελέτη 1034 ασθενών [547], που εφάρμοσε τις κατευθυντήριες οδηγίες του consensus του 2014 [339-441], προς καταμέτρηση TILs στην πρωτοπαθή εστία. Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με υψηλό ποσοστό λεμφοκυτταρικής διήθησης (55%-100%) στην πρωτοπαθή εστία κολο-ορθικού καρκινώματος, είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση, ενώ η υψηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση σχετιζόταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με χαμηλό grade (καλή διαφοροποίηση) όπως και χαμηλό στάδιο νόσου κατά TNM [547].

Επομένως, το πρωτόκολλο καταμέτρησης TILs, που έχει προταθεί για τον καρκίνο του μαστού, μπορεί να εφαρμοστεί στον κολο-ορθικό καρκίνο, και να επιβεβαιώσει τη συσχέτιση του βαθμού λεμφοκυτταρικής διήθησης με κλασικές κλινικές και παθολογο-ανατομικές παραμέτρους, όπως το grade του καρκινώματος. Ωστόσο, λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος, σε μελέτες όπως η παρούσα διατριβή, οι συσχετίσεις αυτές πρέπει να επαληθευθούν σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, προκειμένου να εδραιωθούν.

Δεν παρατηρήθηκαν επιπλέον σημαντικές συσχετίσεις, μεταξύ των υπό εξέταση κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τις συγκεντρώσεις των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD3, CD8 και FOXP3 (στρωματικά, ενδοεπιθηλιακά και συνολικά) (πίνακες 2.2.1 και 2.2.2).

Στην σχετική βιβλιογραφία, περιγράφεται ωστόσο ότι αυξημένη διήθηση από T ανοσοκατασταλτικά λεμφοκύτταρα που εκφράζουν το δείκτη FOXP3⁺ σχετίζεται με άλλους κακούς προγνωστικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, υψηλή συγκέντρωση FOXP3⁺ κυττάρων, στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς, HER2 θετικότητα, λεμφαδενικές μεταστάσεις κατά τη διάγνωση και χαμηλή διαφοροποίηση [535, 539, 548-550].

Αν και η αξιολόγηση των TILs και των υποπληθυσμών τους, έχει μελετηθεί εκτεταμένα, στην προαναφερθείσα βιβλιογραφία, οι περισσότερες μελέτες αφορούν είτε την πρωτοπαθή εστία του νεοπλάσματος [416-437] είτε δευτεροπαθείς εντοπίσεις του [455-468], χωρίς να διενεργείται συγκριτική μελέτη σε ζεύγη βιοψιών από τον ίδιο ασθενή. Πράγματι, ενδεχόμενη μεταβολή της λεμφοκυτταρικής διήθησης από την πρωτοπαθή στις δευτεροπαθείς εστίες, που θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την δυναμικά εξελισσόμενη αλληλεπίδραση όγκου και ξενιστή, δεν έχει, μέχρι στιγμής, διενεργηθεί συστηματικά.

Σε αυτό το πλαίσιο, κρίθηκε σκόπιμη η συγκριτική μελέτη της λεμφοκυτταρικής διήθησης, σε ζεύγη βιοψιών πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας, στους ασθενείς με διαθέσιμο υλικό, προκειμένου να

διαπιστωθούν τάσεις μεταβολής και να πραγματοποιηθεί συσχέτιση με την πρόγνωση των ασθενών, με αναδρομικό τρόπο.

Καθώς για τους περισσότερους ασθενείς το εργαστήριο όπου εξετάστηκε η αρχική βιοψία ήταν άλλο από αυτό του ΠΓΝΙ Ιωαννίνων, ζεύγη δεδομένων από την πρωτοπαθή εστία και από τουλάχιστον μία μεταστατική εστία, κατέστησαν διαθέσιμα σε 6 ασθενείς, για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς CD3 και FOXP3 και σε 7 ασθενείς για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς CD4 και CD8. Αυτό ενδεχομένως αναδεικνύει ένα πρακτικό κώλυμα στην συγκριτική αξιολόγηση πρωτοπαθούς και μεταστατικών εστιών, καθώς, η πρόσβαση στο υλικό δεν είναι πάντοτε εφικτή από κεντρικό εργαστήριο που μπορεί να υποστηρίξει ένα ερευνητικό πόνημα.

Όπως ήδη έχει περιγραφεί, στα περισσότερα δείγματα (4 εκ των 6; 66.7%) σημειώθηκε μειωμένη συγκέντρωση ενδοεπιθηλιακών iCD3 λεμφοκυττάρων στους μεταστατικούς όγκους, ενώ τα στρωματικά και τα συνολικά CD3 λεμφοκύτταρα, ήταν αυξημένα στα περισσότερα δείγματα μεταστατικών εστιών (5 εκ των 6; 53.3%). Ανάλογη τάση ακολούθησε και η μεταβολή των CD4 λεμφοκυττάρων, με υψηλά επίπεδα στρωματικών και συνολικών CD4 (5/7; 71.4%) και από μειωμένο πληθυσμό ενδοεπιθηλιακών CD4 λεμφοκυττάρων (4/7; 57.1%), στις μεταστατικές εστίες. Ακόμη περισσότερο, τα στρωματικά και συνολικά κυτταροτοξικά CD8 λεμφοκύτταρα, βρέθηκαν αυξημένα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία (p -value=0.031) (Γράφημα 2.3.3).

Φαίνεται λοιπόν, πως οι μεταστατικές εστίες, χαρακτηρίζονται από σημαντικό αυξημένο βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης, τόσο από κυτταροτοξικά όσο και βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, αλλά και από ώριμα, λειτουργικά λεμφοκύτταρα με έκφραση του δείκτη CD3. Αν και το αποτέλεσμα αυτό οφείλει να ερμηνεύεται με προσοχή, λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος ασθενών, ενδέχεται να αντανάκλα την κινητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, που λαμβάνει χώρα είτε παράλληλα με την εξέλιξη της νόσου, και της έκθεσης στο ανοσοποιητικό, είτε κατά τη χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, που, δύναται να επάγει ανοσολογική ανοσολογική ανταπόκριση, ενάντια στα καρκινικά κύτταρα.

Όσον αφορά τα ανοσοκατασταλτικά λεμφοκύτταρα, τα ενδοεπιθηλιακά FOXP3, βρέθηκαν αυξημένα σε 4 εκ των 6 όγκων στη μεταστατική εστία, ενώ τα συνολικά και στρωματικά FOXP3 βρέθηκαν αυξημένα στα μισά από τα δείγματα μεταστατικών εστιών σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία (Γράφημα 2.3.3). Θα μπορούσαμε, λοιπόν, να συμπεράνουμε την επαγωγή μηχανισμών διαφυγής από το ανοσοποιητικό, μέσω ενεργοποίησης των κατασταλτικών κυττάρων, καθώς εξελίσσεται η νόσος. Εξάλλου, είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα, δύνανται να εκκρίνουν κυτταροκίνες αλλά και μεταβολίτες που επάγουν τον εμπλουτισμό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου από κατασταλτικά λεμφοκύτταρα [551,552]. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά οφείλουν να ερμηνεύονται με προσοχή, όχι μόνο λόγω του μικρού αριθμού ασθενών, αλλά και λόγω της άλλοτε άλλης επίδρασης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην κλινική έκβαση του ασθενούς. Επί παραδείγματι, αν και, όπως ήδη αναφέρθηκε, τα καρκινώματα με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς, σχετίζονται με υψηλότερη διήθηση από ανοσοκατασταλτικά T λεμφοκύτταρα FOXP3, η υψηλή συγκέντρωση FOXP3 σε ορμονοαρνητικά καρκινώματα έχει βρεθεί να σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση [535].

Οι αντιθέσεις αυτές, υπογραμμίζουν τόσο την ανάγκη ανάπτυξης των κατάλληλων αλγορίθμων για την κλινικά αξιοποιήσιμη αξιολόγηση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος, όσο και την ανάγκη περιγραφής και διερεύνησης όσο το δυνατόν περισσότερων κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών, που μπορεί να παρεμβάλλονται ως συγχυτικοί παράγοντες [439-441, 535].

Στη σχετική βιβλιογραφία, περιγράφεται μελέτη 123 ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου[553], στους οποίους αξιολογήθηκε ο βαθμός λεμφοκυτταρικής διήθησης τόσο στην πρωτοπαθή εστία όσο και στις μεταστατικές εντοπίσεις, αν και βιοψτικό υλικό από μεταστατική εστία ήταν διαθέσιμο μόνο σε 15 περιπτώσεις, και προερχόταν από ηπατικές μεταστάσεις. Σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα, διαπιστώθηκε εντονότερη λεμφοκυτταρική διήθηση στο διηθητικό μέτωπο της πρωτοπαθούς εστίας, σε σύγκριση με τις δευτεροπαθείς εντοπίσεις, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Η χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, φάνηκε να αυξάνει το βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης στις δευτεροπαθείς εντοπίσεις, γεγονός που συνάδει με την ανοσογονική επίδραση των κυτταροτοξικών παραγόντων που χορηγούνται στο νεοεπικουρικό setting, και η οποία αποτέλεσε και το εφαλτήριο της παρούσας ερευνητικής διατριβής.

Σε έτερη μελέτη, αξιολογήθηκε ο βαθμός λεμφοκυτταρικής διήθησης σε πνευμονικές μεταστάσεις από κολο-ορθικό καρκίνωμα σε 57 ασθενείς, για 31 από τους οποίους υπήρχε διαθέσιμο υλικό και από την πρωτοπαθή εστία[554]. Όπως και στη δική μας έρευνα, αξιολογήθηκε με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικής χρώσης, η σύσταση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος από CD3+, CD8+, FoxP3+ και επιπλέον CD45RO+ TILs. Διενεργήθηκε επίσης μελέτη και συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών από τη στιγμή της μεταστασιεκτομής ως τον θάνατο ή την τελευταία εκτίμηση. Διαπιστώθηκε έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση από CD3+, CD8+, CD45RO+ και FoxP3+ TILs, τόσο στις πνευμονικές μεταστάσεις όσο και στην αντίστοιχη πρωτοπαθή εστία. Αν και δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, οι πνευμονικές μεταστάσεις, χαρακτηρίζονταν από υψηλότερη πυκνότητα CD3+, CD8+ και CD45RO+ TILs, ενώ δεν σημειώθηκε διαφορά για τα FOXP3 TILs. Υψηλόβαθμη διήθηση από FOXP3+ TILs στις μεταστατικές εστίες του πνεύμονα, όπως και χαμηλή συγκέντρωση CD8+ κυτταροτοξικών TILs, σχετίζονταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με χειρότερη πρόγνωση του ασθενούς, όσον αφορά την επιβίωση από τη στιγμή της μεταστασιεκτομής [554]. Σε συμφωνία με τα δικά μας δεδομένα, παρατηρείται αυξητική τάση των κυτταροτοξικών και ώριμων TILs στις μεταστατικές εστίες του πνεύμονα, ενώ, σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα που υποστηρίζουν επίσης αύξηση και των ανοσοκατασταλτικών TILs, στο μεταστατικό όγκο, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ πρωτοπαθών και πνευμονικών μεταστατικών εστιών [554].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η διάμεση περίοδος παρακολούθησης των ασθενών διήρκεσε 107 μήνες (95% CI 66.6-111, min-max: 19-113 months) και κατά τη διάρκεια της κατεγράφησαν 16 θάνατοι (80%). Σε αντίθεση με τα υπάρχουσες βιβλιογραφικές συσχετίσεις [416-437, 455-468, 550-554], δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στην πρωτοπαθή ή στη μεταστατική εστία (CD3, CD4, CD8, FOXP3, stromal, intratumoral, total) με τα εξεταζόμενα διαστήματα επιβίωσης των ασθενών, από τη διάγνωση ως την 1^η υποτροπή ή το θάνατο/τελευταία εκτίμηση, ή από την 1^η ως τη 2^η καταγεγραμμένη εξέλιξη νόσου (OS, PFS1, PFS2).

Η απουσία συσχέτισης μεταξύ της λεμφοκυτταρικής διήθησης και των επιβιώσεων των ασθενών, ενδέχεται να οφείλεται στο μικρό μέγεθος δείγματος, ή στην παρεμβολή συγχυτικών παραγόντων, όπως το φύλο και ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, που όπως συζητήθηκε ανωτέρω, φάνηκαν να σχετίζονται με τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς CD3 και CD8.

Ωστόσο, αποτελεί αξιοσημείωτο εύρημα το ότι, έστω και σε μικρό δείγμα ασθενών παρατηρείται παράλληλα αυξητική τάση των κυτταροτοξικών και ώριμων TILs στις μεταστατικές εστίες, σε σχέση με την πρωτοπαθή, και συνολικά μακρά διάμεση επιβίωση των ασθενών, η οποία ξεπερνά τα 5 έτη από τη στιγμή της διάγνωσης (διάμεση OS 63 μήνες, 95% CI 38-84), με το διάστημα ως την πρώτη αποτυχία της θεραπείας να υπερβαίνει το 1.5 έτος (διάμεσο PFS1 19 μήνες, 95% CI 14-36) και το διάστημα ως την 2^η καταγεγραμμένη εξέλιξη της νόσου να πλησιάζει το 1 έτος (διάμεσο PFS2 10 μήνες, 95% CI 7-38).

Το παραπάνω εύρημα καταδεικνύει αφενός τη δυναμική εξέλιξη της ανοσοεπιτήρησης, η οποία προστατεύει τον ξενιστή ακόμα και κατά την εξέλιξη της νόσου, αφετέρου την ανοσογόνο επίδραση της αντινεοπλασματικής θεραπείας, ακόμα και εν απουσία χορήγησης ανοσοθεραπείας, καθώς, ανοσοτροποποιητικά φαινόμενα όπως ο ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος λαμβάνουν χώρα υπό την επίδραση φαρμάκων όπως η οξαλιπλάτινα ή το cetuximab. Περαιτέρω ενίσχυση του ανοσοποιητικού με τη χορήγηση ανοσοθεραπείας, ακόμα και απουσία έκφρασης βιοδεικτών αποτελεσματικότητας όπως η μικροδορυφορική αστάθεια, το υψηλό φορτίο μεταλλάξεων και η έκφραση του PD-L1 υποδοχέα, ενδέχεται να είναι επωφελής για προθεραπευμένους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, και θα μπορούσε να αποτελεί αντικείμενο μελλοντικών αναδρομικών και προοπτικών μελετών. Στη δική μας ομάδα ασθενών, δε χορηγήθηκε σε καμία περίπτωση ανοσοθεραπεία, επομένως, η αύξηση των λεμφοκυττάρων και η επακόλουθη μακρά επιβίωση, οφείλεται στην εγγενή ανοσολογική απόκριση του ξενιστή αλλά και στην παράπλευρη ανοσοενισχυτική δράση, των κλασικών αντινεοπλασματικών παραγόντων.

Σε αντίθεση με τα παρόντα αποτελέσματα, σε προηγούμενη διδακτορική έρευνα που διενεργήθηκε στο ΠΓΝΙ Ιωαννίνων [555], όπου εξετάστηκε ο βαθμός λεμφοκυτταρικής διήθησης σε εγκεφαλικές μεταστάσεις 72 ασθενών, σε 9 από τους οποίους υπήρχε διαθέσιμη βιοψία και από την πρωτοπαθή εστία (5 με NSCLC, 2 με καρκίνο μαστού, 1 με νεφροκυτταρικό και 1 ασθενής με ουροθηλιακό καρκίνωμα), είχε διαπιστωθεί μείωση τόσο των CD8 όσο και των CD3 διηθούντων λεμφοκυττάρων στις εγκεφαλικές μεταστάσεις, με παράλληλη αύξηση των FOXP3 λεμφοκυττάρων, σε σύγκριση με την πρωτοπαθή εστία. Αυτό ενδέχεται να αντανακλά την παρεμβολή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού[556], που καθιστά το περιβάλλον του εγκεφαλικού παρεγχύματος ιδιαίτερα δυσπρόσιτο για τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενώ η αύξηση των ανοσοκατασταλτικών κυττάρων συνάδει με την πτωχή πρόγνωση των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις, ανεξαρτήτως πρωτοπαθούς εστίας. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη, οι περισσότερες εξεταζόμενες μεταστατικές εστίες προέρχονταν από το ήπαρ, ένα περιβάλλον που δύναται να είναι προσπελάσιμο από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Όπως και στην παρούσα εργασία, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της λεμφοκυτταρικής διήθησης στις εγκεφαλικές μεταστάσεις, ή στις πρωτοπαθείς εστίες, επί της συνολικής επιβίωσης των ασθενών, από τη στιγμή της διάγνωσης της πρωτοπαθούς εστίας, ή από τη στιγμή διαπίστωσης της επινέμησης του εγκεφάλου, ως το θάνατο του ασθενούς.

Συνολικά, παρόλο που η λεμφοκυτταρική διήθηση και η σύσταση των τοπικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών φαίνονται να είναι, επομένως, ιδιαίτερα σημαντικές παράμετροι για την έκβαση του ασθενούς, δεν έχει αναδειχθεί συγκεκριμένη στατιστικά σημαντική συσχέτιση, ούτως ώστε, να ενταχθεί η αξιολόγηση των υποπληθυσμών των TILs στις καθιερωμένες προγνωστικές/προβλεπτικές μεταβλητές. Αναδεικνύεται ανάγκη συστηματικής μελέτης, προκειμένου να διευκρινιστεί, αν η ένταση και η ποιότητα του λεμφοκυτταρικού διηθήματος, δύναται να κατευθύνει τις θεραπευτικές αποφάσεις.

Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις ασθενών

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του ασθενούς υπ' αριθμόν 2, ο οποίος παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση της πυκνότητας των στρωματικών CD8 λεμφοκυττάρων, στην ηπατική δευτεροπαθή εντόπιση (392/mm²), σε σχέση με την πρωτοπαθή εντόπιση στο αριστερό κόλον (140/mm²), μετά από 8 κύκλους του σχήματος FOLFOX, σε συνδυασμό με τον στοχευτικό, αντι-EGFR παράγοντα cetuximab. Αύξηση επίσης σημειώθηκε στην πυκνότητα των στρωματικών CD3 λεμφοκυττάρων (από 690/mm² σε 2140/mm²), και των στρωματικών CD4 κυττάρων (από 241/mm² σε 1101/mm²), με παράλληλη μικρή μείωση στα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα FOXP3 (από 37/mm² σε 20/mm²). Είναι αξιοσημείωτο ότι η συνολική επιβίωση του ασθενούς αυτού (72 μήνες) υπερέβη σημαντικά τη διάμεση επιβίωση (63 μήνες), παρά την ύπαρξη ηπατικής μετάστασης εκ διαγνώσεως, όπως και ότι υπό τη χορήγηση επικουρικής θεραπείας, παρέμεινε ελεύθερος υποτροπής για πάνω από 2 έτη. Σημειώνεται επίσης, ότι, παρά την περιορισμένη παθολογοανατομική ανταπόκριση στην νεοεπικουρική θεραπεία (tumor regression score 2), ο ασθενής είχε παρατεταμένο όφελος στην επιβίωση, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει στην ανοσολογική ανταπόκριση, όπως φαίνεται από την αύξηση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος στην ηπατική μεταστατική, εξαιρεθείσα εστία, σε σχέση με την πρωτοπαθή. Οι παρατηρήσεις αυτές, φαίνεται να υποστηρίζουν την ανοσογονική επίδραση τόσο της οξαλιπλατίνης[265], όσο και του cetuximab[263], μέσω του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, που λαμβάνει χώρα ανεξαρτήτως της ποικιλότητας των νεοαντιγόνων του όγκου.

Αντίθετα αποτελέσματα, διαφαίνονται στην περίπτωση της ασθενούς υπ' αριθμόν 1, στην οποία δε σημειώθηκε μεταβολή των CD8 διηθούντων λεμφοκυττάρων, στην ηπατική μεταστατική εστία, σε σχέση με την πρωτοπαθή, ακόμα και μετά από τη χορήγηση 4 κύκλων νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας με το σχήμα FOLFOX. Ωστόσο, η ασθενής παρουσίασε αύξηση των ώριμων στρωματικών CD3 λεμφοκυττάρων στις ηπατικές της εστίες (124/mm² σε 360/mm²), με παράλληλη εμφάνιση κατασταλτικών στρωματικών FOXP3 λεμφοκυττάρων (από 0 σε 16/mm²). Η ασθενής αυτή, είχε συνολική επιβίωση μικρότερη από τη διάμεση (36 μήνες), ενώ εμφάνισε την 1^η της υποτροπή 17 μήνες μετά την αρχική διάγνωση. Φαίνεται ότι και σε αυτήν την περίπτωση η οξαλιπλατίνη επέφερε ένα ανοσογόνο αποτέλεσμα (αύξηση CD3), ωστόσο, η ασθενής είχε πτωχότερη πρόγνωση, από τον ασθενή υπ' αριθμόν 1, ενδεχομένως λόγω και της ύπαρξης KRAS μετάλλαξης.

Στην περίπτωση του ασθενούς υπ' αριθμόν 4, η νεοεπικουρική θεραπεία με ιριντεκάνη, οξαλιπλατίνη και τον αντιαγγειογενετικό παράγοντα bevacizumab, χωρίς 5-FU/καπεσιταβίνη λόγω πτωχής ανοχής του ασθενούς, κατέστησε εξαιρεσιμες ηπατικές μεταστάσεις που διαπιστώθηκαν 10 μήνες κατόπιν της εξαίρεσης της πρωτοπαθούς εστίας στο αριστερό κόλον και της συμπληρωματικής θεραπείας με CAPOX. Κατά την αξιολόγηση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος, διαπιστώθηκε αύξηση στα στρωματικά CD3 και CD4 διηθούντα λεμφοκύτταρα (από 562/mm² σε 1343/mm² και από 34/mm² σε 536/mm²), χωρίς μεταβολές στα στρωματικά CD8, ενώ τα ενδοεπιθηλιακά CD8 χαρακτηριστικά μειώθηκαν στην ηπατική μετάσταση σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία (από 128/mm² σε 16/mm²). Όσον αφορά τα ανοσοκατασταλτικά FOXP3, αυξήθηκαν στο στρώμα των μεταστάσεων από 29/mm² σε 88/mm²). Ο συγκεκριμένος ασθενής είχε πτωχή πρόγνωση, παρά την ανοσοδιέγερση που πέτυχε να

επάγει η αντινεοπλασματική θεραπεία, εν μέρει λόγω της ύπαρξης και KRAS μετάλλαξης, αλλά και λόγω της πτωχής ανοχής στην φθοριοουρακίλη, που δεν επέτρεψε την χορήγηση του βασικού αυτού κυτταροτοξικού παράγοντα (OS 19 μήνες, χρόνος από την εμφάνιση της υποτροπής στο ήπαρ ως το θάνατο 3 μήνες). Χαρακτηριστικό είναι, πως ο ασθενής απεβίωσε πολύ σύντομα μετά την πρώτη υποτροπή στο ήπαρ, παρά τη χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας. Με δεδομένη την επαγόμενη από την αντινεοπλασματική θεραπεία ανοσοδιέγερση, η οποία εύκολα διαπιστώνεται από την αξιολόγηση των ώριμων διηθούντων CD3 λεμφοκυττάρων στις μεταστάσεις του ήπατος, κατά την 1^η υποτροπή, και την πτωχή ανοχή στην κλασική χημειοθεραπεία με βάση τη φθοριοουρακίλη, θα μπορούσε να χορηγηθεί ως θεραπεία διάσωσης η ανοσοθεραπεία, παρά την απουσία βιοδεικτών ανοσογονικότητας όπως η μικροδορυφορική αστάθεια και το φορτίο μεταλλάξεων, σε περιπτώσεις όπως αυτή.

Στην περίπτωση της ασθενούς υπ' αριθμόν 6, με καρκίνωμα με πρωτοπαθή εντόπιση στο δεξιό κόλον, επί της ειλεοτυφλικής βαλβίδας, με σύγχρονη διήθηση του λεπτού εντέρου κατά τη διάγνωση, χαρακτηριστική είναι η υψηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση στο βιοπτικό υλικό της διάγνωσης, για τους πληθυσμούς στρωματικών CD8, CD3, CD4 (55 και 144/mm², 330 και 804/mm², 68 και 94/mm², στο υλικό της ειλεοτυφλικής βαλβίδας και στο υλικό του κατά συνέχεια ιστού διηθημένου λεπτού εντέρου, αντίστοιχα), χωρίς να έχει προηγηθεί νεοεπικουρική αγωγή. Κατά την υποτροπή στο σημείο της εντερικής αναστόμωσης, 3 έτη μετά την εξαίρεση της πρωτοπαθούς και την επικουρική χημειοθεραπεία με CAPOX, παρατηρείται κατακόρυφη πτώση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των στρωματικών CD8, CD3, CD4 (12/mm², 31/mm² και 6/mm², αντίστοιχα), ενώ και για τα στρωματικά FOXP3 παρατηρείται μείωση, από 175/mm² στο κατά συνέχεια διηθούμενο λεπτό έντερο κατά την αρχική εξαίρεση, σε 16/mm² στην εστία της υποτροπής επί της αναστόμωσης. Παρά την περιορισμένη ανοσολογική ανταπόκριση, που μπορεί εν μέρει να οφείλεται και στο περιβάλλον της εντόπισης, επί μετεγχειρητικών αλλοιώσεων, που, ενδέχεται λόγω ίνωσης να παρεμποδίζουν την λεμφοκυτταρική διήθηση, η ασθενής παρέμεινε εν ζωή για ακόμα 3 έτη μετά την εντερεκτομή προς αντιμετώπιση της τοπικής υποτροπής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ασθενής δεν μπόρεσε να λάβει συστηματική αντινεοπλασματική θεραπεία, πέραν της αρχικής επικουρικής με CAPOX, λόγω γενικής κατάστασης, ωστόσο, η συνολική της επιβίωση ξεπέρασε τη διάμεση (84 μήνες). Από ανάλογες περιπτώσεις διαπιστώνεται ότι η λεμφοκυτταρική διήθηση δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει την έκβαση του ασθενούς, και πρέπει να συναξιολογείται σε συνδυασμό με έτερες κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους.

Χαρακτηριστική περίπτωση με ιδιαίτερα μακρά επιβίωση, που υπερέβη την περίοδο της περακολούθησης (113+ μήνες), είναι ο ασθενής υπ' αριθμόν 9. Από την ανοσοϊστοχημική μελέτη, παρουσιάζει αύξηση των στρωματικών CD8, CD3 και CD4 TILs στην εστία υποτροπής στο ήπαρ, που εμφανίστηκε 18 μήνες μετά την εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας στο αριστερό κόλον (από 91 σε 274/mm², από 978 σε 1023/mm² και από 144 σε 302/mm², αντίστοιχα). Παράλληλα, παρατηρείται πτώση των FOXP3 λεμφοκυττάρων στην ηπατική εστία, σε σχέση με την πρωτοπαθή, από 175 σε 76/mm². Μεταξύ της εκτομής της πρωτοπαθούς εστίας και της εμφάνισης υποτροπής στο ήπαρ, ο ασθενής είχε λάβει επικουρική χημειοθεραπεία με CAPOX. Τα σχετικά ευρήματα που αναδεικνύουν την αύξηση λεμφοκυτταρικής διήθησης στην εστία της υποτροπής, συνάδουν με την ανοσογόνο επίδραση

της οξαλιπλατίνας, η οποία μάλιστα φαίνεται να διαρκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής θεραπείας. Αξιοσημείωτο είναι πως παρά την ταχεία υποτροπή νόσου στο ήπαρ (18 μήνες), μετά από εκτομή της ηπατικής εστίας και επακόλουθη κυτταροτοξική και αντιαγγειογενετική θεραπεία, ο ασθενής παραμένει ελεύθερος προόδου νόσου κατά το τέλος της περιόδου παρακολούθησης (PFS2 36+ μήνες). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αναδεικνύεται η σημασία της κινητοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, που ενδεχομένως ενισχύονται και από την ανοσοτροποποιητική επίδραση της αντινεοπλασματικής θεραπείας, προστατεύει επί μακρόν τον ασθενή από περαιτέρω εξέλιξη της νόσου. Σε αντίστοιχες περιπτώσεις, η ανοσοθεραπεία θα μπορούσε να δοκιμασθεί στο πλαίσιο κλινικής μελέτης, ως θεραπεία συντήρησης, κατόπιν επιτυχημένης αντιμετώπισης της υποτροπής, ιδίως σε περιστατικά όπου η υψηλόβαθμη λεμφοκυτταρική διήθηση, αναδεικνύει την ενεργότητα του ανοσοποιητικού του ξενιστή ενάντια στον όγκο.

Τέλος, η ασθενής υπ' αριθμόν 10, είχε συνολική επιβίωση μόλις 28 μήνες, παρά την νεοεπικουρική θεραπεία με FOLFOXIRI και bevacizumab, και την επακόλουθη χειρουργική εξαίρεση τόσο της πρωτοπαθούς εστίας όσο και της πλήρως υποστραφείσας ηπατικής δευτεροπαθούς εντόπισης. Αν και ζεύγος βιοψιών δεν ήταν διαθέσιμο για την ασθενή, είναι άξιο αναφοράς ότι στην εξαιρεθείσα εστία μετά από νεοεπικουρική θεραπεία, είχε συγκέντρωση CD8 στρωματικών κυττάρων υψηλότερη της διάμεσης τιμής (167/mm² έναντι 112/mm²), πυκνότητα στρωματικών CD3 χαμηλότερη της διάμεσης τιμής (312/mm² έναντι 430/mm²), και πυκνότητα στρωματικών FOXP3 κυττάρων υψηλότερη της διάμεσης τιμής (83/mm² έναντι 37/mm²). Φαίνεται ότι, μεταξύ άλλων, η έκβαση του ασθενούς επηρεάζεται από όλους τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς, και ότι η παρουσία ώριμων CD3 καθώς και ανοσοκατασταλτικών λεμφοκυττάρων ασκούν εξίσου ή και περισσότερο σημαίνουσα επιρροή στην ανάπτυξη της νεοπλασίας, σε σχέση με τα κυτταροτοξικά CD8 λεμφοκύτταρα.

Περιορισμοί της παρούσας ερευνητικής εργασίας

Η παρούσα ερευνητική εργασία υπόκειται σε ορισμένους περιορισμούς. Πρώτον, το δείγμα ασθενών που συμπεριελήφθησαν είναι μικρό, περιλαμβάνοντας 20 ασθενείς συνολικά, και 11 ασθενείς στους οποίους κατέστη δυνατή η αξιολόγηση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε τομές του βιοπτικού υλικού. Ιδιαίτερα για την αξιολόγηση της διαφοροποίησης της λεμφοκυτταρικής διήθησης μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν κατέστη εφικτή η πρόσβαση σε υλικό και από τις δύο εντοπίσεις του νεοπλάσματος, κατά κύριο λόγο επειδή το υλικό βρισκόταν σε άλλο εργαστήριο.

Λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος, οι παρατηρούμενες στατιστικές συσχετίσεις, οφείλουν να ερμηνεύονται με επιφύλαξη, ενώ η εξαγωγή βάσιμων επιστημονικά συμπερασμάτων είναι δυνατή μόνο κατόπιν επαλήθευσης της ανάλυσης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Παράλληλα, ενδέχεται να υφίστανται στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, τις οποίες δε μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε, επίσης λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών.

Δεύτερον, η αξιολόγηση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, διενεργήθηκε σε τομές αιματοξυλίνης/ηωσίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες που προτάθηκαν κατά το πρότυπο του καρκίνου του μαστού [439-441]. Δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος αξιολόγησης των TILs στον κολο-ορθικό καρκίνο, ή με το σκοπό ανίχνευσης μεταβολών μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και των δευτεροπαθών εστιών, σε συγκριτική μελέτη όπως η παρούσα, ενώ περιορισμένη είναι η βιβλιογραφία σχετικά με την διερεύνηση τέτοιων διακυμάνσεων του λεμφοκυτταρικού διηθήματος. Επομένως, η επαρκής τεκμηρίωση της ερευνητικής μεθοδολογίας που ακολουθείται στην παρούσα εργασία, έγκειται στην περαιτέρω εφαρμογή σε ανεξάρτητες ομάδες ασθενών, προκειμένου να εδραιωθεί η αξιοπιστία της, και η κλινική σημασία των εξαγόμενων συμπερασμάτων.

Τρίτον, κατά την αξιολόγηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης, προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, με την κινητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, ως ένδειξη ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, υπό την επίδραση αντινεοπλασματικών παραγόντων. Μολαταύτα, η αύξηση ή μείωση της κινητοποίησης του ανοσοποιητικού δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στη χορήγηση ή μη αντινεοπλασματικής θεραπείας με ανοσογόνο δράση. Η διακύμανση της ανοσοεπιτήρησης και η ανάπτυξη ικανότητας ανοσοδιαφυγής από τα κύτταρα του όγκου επηρεάζεται από ποικίλες μεταβλητές που περιλαμβάνουν κομβικές ογκογόνες μεταλλάξεις (π.χ. KRAS), το συνολικό φορτίο μεταλλάξεων, την εγγενή ανοσογονικότητα του ξενιστή, κλινικούς παράγοντες (φύλο, ηλικία), το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (grade) και το περιβάλλον όπου αναπτύσσονται δευτεροπαθείς εντοπίσεις (ήπαρ, πνεύμονας, έντερο). Οι μεταβλητές αυτές μπορούν να παρεμβάλλονται ως συγχυτικοί παράγοντες, κατά την προσπάθεια διερεύνησης της ανοσογονικότητας της αντινεοπλασματικής θεραπείας.

Τέταρτον, ακόμα και κατά τον εντοπισμό αύξησης της λεμφοκυτταρικής διήθησης, κατόπιν χορήγησης αντινεοπλασματικών παραγόντων, για τους οποίους υπάρχουν ενδείξεις στη βιβλιογραφία ότι μπορούν να προκαλούν ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, δεν μπορούμε να συμπεράνουμε με ασφάλεια ότι έχει λάβει χώρα ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος, ούτε να γνωρίζουμε το μέγεθος συμμετοχής του στην

επαγωγή της τοπικής ανοσολογικής απόκρισης. Προκειμένου να διαπιστωθεί η επαγωγή του συγκεκριμένου φαινομένου με μεγαλύτερο βαθμό βεβαιότητας, θα μπορούσε να διενεργηθεί αναζήτηση των χαρακτηριστικών μοριακών προτύπων που σχετίζονται με το φαινόμενο, σε βιοπτικό υλικό ασθενών, παράλληλα με την αξιολόγηση της πυκνότητας των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, όπως της καλρετικουλίνης [557-559], του HMGB1, και του ATP[559-561]. Δυστυχώς, η ανίχνευση των συγκεκριμένων μοριακών προτύπων σε βιοπτικό υλικό ασθενών είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς αφενός η καλρετικουλίνη πρέπει να διακρίνεται σε μεμβρανική και κυτταροπλασματική προκειμένου να αξιολογείται σωστά, αφετέρου τα μόρια HMGB1 και ATP απελευθερώνονται εξωκυττάρια, και ενδέχεται να είναι ως και αδύνατο να ανιχνευθούν σε μονιμοποιημένες τομές[557-561].

Συμπεράσματα

Ο κολο-ορθικός καρκίνος αποτελεί ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα νεοπλάσματα, με αυξανόμενη μάλιστα επίπτωση και θνησιμότητα σε ηλικίες και μικρότερες των 50 ετών, κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Ο συνδυασμός των κλασικών κυτταροτοξικών θεραπειών με την στοχευτική, αντι-EGFR θεραπεία και την αντιαγγειογενετική αγωγή, έχει διευρύνει σημαντικά τη θεραπευτική φαρέτρα, προσφέροντας σημαντικό όφελος επιβίωσης στους ασθενείς. Ωστόσο, η αναζήτηση νέων θεραπευτικών στρατηγικών είναι συνεχής.

Η είσοδος της ανοσοθεραπείας, με τους αναστολείς σημείων ανοσολογικού ελέγχου, άλλαξε για πάντα το θεραπευτικό πεδίο της ογκολογίας, σε πολλούς συμπαγείς όγκους, όπως το μελάνωμα, το νεφροκυτταρικό και ουροθηλιακό καρκίνωμα, ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και ο πιο πρόσφατα τα καρκινώματα του ανώτερου πεπτικού και του μαστού. Η χορήγηση ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του παχέος εντέρου, αφορά κυρίως τα καρκινώματα που φέρουν μικροδορυφορική αστάθεια, ή, από τη δεύτερη γραμμή θεραπείας και μετά, καρκινώματα με υψηλό φορτίο μεταλλάξεων.

Όσον αφορά τα κολο-ορθικά καρκινώματα τα οποία δεν χαρακτηρίζονται από τους συγκεκριμένους δείκτες ανοσογονικότητας, η δυνατότητα χορήγησης ανοσοθεραπείας παραμένει ανεξερεύνητο πεδίο. Η παρατήρηση ότι, βασικά φάρμακα για την αντιμετώπιση του κολο-ορθικού καρκίνου, όπως η οξαλιπλάτινα και τα αντι-EGFR στοχευτικά αντισώματα, μπορούν να επάγουν τοπική και συστηματική ανοσολογική διέγερση, με μη αντιννοεξαρτώμενο τρόπο, όπως με την επαγωγή του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, μπορεί να λειτουργήσει ως έναυσμα χορήγησης ανοσοθεραπείας, σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο, χωρίς υψηλό φορτίο νέο-αντιγόνων.

Θελήσαμε να διερευνήσουμε την τοπική ανοσοδιέγερση και τις μεταβολές της, σε σχέση με τη χορήγηση αντινεοπλασματικής θεραπείας, σε ιστικά παρασκευάσματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, προερχόμενα από την πρωτοπαθή και τις δευτεροπαθείς εστίες. Καθώς τα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο, ανιχνεύονται δυσχερώς σε βιοπτικό υλικό ασθενών, επιλέξαμε να αξιολογήσουμε τα διηθούντα λεμφοκύτταρα, με την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών δεικτών.

Αν και τα ευρήματά μας οφείλουν να ερμηνεύονται με προσοχή, λόγω του μικρού δείγματος ασθενών και διαθέσιμων κύβων παραφίνης, παρατηρείται αύξηση των κυτταροτοξικών αλλά και των ώριμων CD3 λεμφοκυττάρων που διηθούν τις μεταστατικές εστίες. Το εύρημα αυτό αντικατοπτρίζει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού του ξενιστή ενάντια στον όγκο κατά την εξέλιξη της νόσου, με ή χωρίς την ενισχυτική επίδραση της αντινεοπλασματικής θεραπείας. Παρατηρήσαμε επίσης, αύξηση και των ανοσοκατασταλτικών FOXP3 κυττάρων, εύρημα το οποίο δεν πρέπει να ερμηνεύεται πάντα ως σημείο ανάπτυξης ανοσοδιαφυγής. Η συμμετοχή FOXP3 λεμφοκυττάρων στο λεμφοκυτταρικό διήθημα του όγκου μπορεί να υπάγεται στο πλαίσιο διατήρησης της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να αποφεύγεται η άσκοπη ενεργοποίηση του.

Δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της λεμφοκυτταρικής διήθησης, κανενός από τους εξεταζόμενους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς με την επιβίωση των ασθενών. Μολαταύτα, είναι αξιοσημείωτο ότι η τάση αύξησης κυτταροτοξικών και ώριμων Τ λεμφοκυττάρων, στις δευτεροπαθείς εστίες, συμβαδίζει με σχετικά μακρά διάμεση επιβίωση, που χαρακτηρίζει αυτή την ομάδα ασθενών (63 μήνες).

Τέλος, παρατηρήσαμε ότι τα δείγματα των ανδρών ασθενών, καθώς και τα μέτρια διαφοροποιημένα νεοπλάσματα, παρουσίαζαν υψηλότερο βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης, σε σχέση με τα δείγματα των γυναικών, όπως και σε σχέση με τα μέτριας προς χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα. Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει τη σημασία διερεύνησης των κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών, ως πιθανών συγχυτικών παραγόντων. Τέτοια χαρακτηριστικά ενδέχεται να παρεμβάλλονται στην αξιολόγηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης και της επίδρασής της στην κλινική έκβαση.

Κατά την εξέλιξη της νόσου, τόσο στον κολο-ορθικό καρκίνο όσο και σε κάθε συμπαγές νεόπλασμα, η αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή με τα καρκινικά κύτταρα εξελίσσεται συνεχώς. Όση πληροφορία και να μπορεί να εξαχθεί από τη στατική αξιολόγηση του λεμφοκυτταρικού διηθήματος σε μία μόνο εντόπιση του νεοπλάσματος (πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή), δεν αντικατοπτρίζει τη διακύμανση της ανοσολογικής απόκρισης καθώς μεταβάλλεται στο χώρο και στο χρόνο.

Η αξιολόγηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης κατά τις επαναληπτικές βιοψίες, που διενεργούνται είτε στο πλαίσιο μεταστασιεκτομής, ιδιαίτερα συχνής πρακτικής στην αντιμετώπιση του κολο-ορθικού καρκίνου, είτε στο πλαίσιο λήψης υλικού προς περεταίρω μοριακή εξέταση του όγκου, ενέχει τη δυνατότητα δυναμικής παρακολούθησης της ανοσολογικής απόκρισης, και της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να διαφεύγουν. Η επαναληπτική αξιολόγηση της λεμφοκυτταρικής διήθησης μπορεί να αποβεί μια επωφελής στρατηγική, η οποία χρήζει διερεύνησης σε προοπτικές μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.

Ειδικότερα, στην εποχή της ανοσοθεραπείας η αναζήτηση βιοδεικτών για την επιλογή των ασθενών που μπορούν να αποκομίσουν το μέγιστο όφελος από τη χορήγηση της, εξακολουθεί να αποτελεί κρίσιμο ερώτημα. Η ανίχνευση της αυξανόμενης ανοσολογικής διέγερσης, ακόμα και σε προχωρημένη νόσο, υπό την επίδραση μη ανοσοθεραπευτικών, ωστόσο, ανοσογόνων αντινεοπλασματικών παραγόντων, μπορεί να αναδειχθεί σε αξιόλογο εφελκτήριο της ανοσοθεραπείας, ως θεραπείας διάσωσης ή συντήρησης, ακόμα και όταν απουσιάζουν οι καθιερωμένοι δείκτες ανοσογονικότητας όπως το φορτίο μεταλλάξεων ή η μικροδορυφορική αστάθεια.

Επίμετρο 1

ΑΔΑ: 687Α46906Η-Λ0Α

INFORMATICS
DEVELOPMENT
AGENCY

Digitally signed by
INFORMATICS
DEVELOPMENT
AGENCY
Date: 2020.04.23
Time: 10:00:00
EEST
Reason: Approved

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ ΤΟΥ ΑΡΙΘ. 23/29-4-2020 (Θ. 27) ΠΡΑΚΤΙΚΟΥ ΤΟΥ Δ.Σ. ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΘΕΜΑ 27: «Έγκριση διεξαγωγής μελέτης στο πλαίσιο εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής της ειδικευόμενης Παθολογικής Ογκολογίας κ.Γαζούλη Ιωάννας »

Τίθεται υπόψη του Δ.Σ. η αριθμ. πρωτ. 10457/24-2020 εισήγηση του Αναπλ. Διοικητή κ. Κωνσταντίνου Χολέβα που έχει ως εξής:

- ΣΧΕΤ: α) Αριθμ. Πρωτ. Ε.Σ. 186/08-04-2020 έγγραφο του Ε.Σ.
β) Άρθρο 38 του Ν.2519/97 (ΦΕΚ 165/21-8-97 τ. Α') «Ανάπτυξη και εκσυγχρονισμός του ΕΣΥ, οργάνωση των Υγειονομικών υπηρεσιών, ρυθμίσεις για το φάρμακο και άλλες διατάξεις».
γ) Παρ. 2 του άρθρου 41 του Ν. 3528/2007 (ΦΕΚ 26/9-2-2007 τ. Α') «Κύρωση του Κώδικα Κατάστασης Δημοσίων Πολιτικών Διοικητικών Υπαλλήλων και Υπαλλήλων Ν.Π.Δ.Δ.»
δ) αριθμ. Δ3(α)/οικ.36809/03-06-2019 (ΦΕΚ 2015/03-06-2019τ.Β')

Σας θέτουμε υπόψη το ανωτέρω α) σχετ και σας κάνουμε γνωστό ότι το Ε.Σ. με την αριθμ. **5/26-03-2020 (Θ. 18)** απόφασή του και αφού έλαβε υπόψη τη σύμφωνη γνώμη της **Επιστημονικής** Επιτροπής Έρευνας, **εγκρίνει** τη διεξαγωγή της μελέτης, Διδακτορικής διατριβής της κ.Γαζούλη Ι. Ειδικευόμενης Παθολογικής Ογκολογίας, που υπεβλήθη προς έγκριση στο Επιστημονικό Συμβούλιο από το Δ/ντή της Ογκολογικής Κλινικής κ.Πενθερουδάκη Γεώργιο.

Η μελέτη έχει τίτλο: «Διερεύνηση επαγωγής του ανοσολογικού κυτταρικού θανάτου (ICD) από στοχευτικά και κυτταροτοξικά αντινεοπλασματικά φάρμακα σε συμπαγείς όγκους και In vivo μελέτη βιοδεικτών ICD σε ασθενείς» και θα διεξαχθεί στην Ογκολογική κλινική σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του νοσοκομείου μας, υπό την επίβλεψη του Δ/ντή της Ογκολογικής Κλινικής κ.Πενθερουδάκη Γ.

Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί στο πλαίσιο εκπόνησης διδακτορικής διατριβής της κ.Γαζούλη Ιωάννας Ειδικευόμενης Παθολογικής Ογκολογίας, με τριμελή επιτροπή τους: Πενθερουδάκη Γεώργιο Καθηγητή Ογκολογίας επιβλέπων, Γούσια Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας μέλος και Παππά Περικλή Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας μέλος.

Ο προβλεπόμενος αριθμός ασθενών, των οποίων θα μελετηθούν τα στοιχεία προβλέπεται να είναι 50.

Η έναρξη της μελέτης θα γίνει μετά από τις σχετικές εγκρίσεις και η διάρκειά της αναμένεται να είναι πέντε (3) έτη.

Εξετάστηκαν και εγκρίνονται:

1. Το Πρωτόκολλο της έρευνας
2. Το Έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης ασθενούς

Το Επιστημονικό Συμβούλιο αποδέχεται τη σχετική γραπτή διαβεβαίωση του κυρίου Ερευνητή ότι ισχύουν τα παρακάτω:

1. Ο ερευνητής και οι συνεργάτες του έχουν την εξειδίκευση, την εμπειρία και την δυνατότητα διεξαγωγής της μελέτης.

ΑΔΑ: 687Α46906Η-Λ0Α

Ονοματεπώνυμο, Ιδιότητα	Χρόνος απασχόλησης στη μελέτη σε σχέση με το χρόνο εργασίας στο Νοσοκομείο (%)
1 Γαζούλη Ιωάννα Ειδικευόμενη Παθολογικής Ογκολογίας Υποψήφια Διδάκτορας	Εκτός ωραρίου εργασίας

2. Το κέντρο διαθέτει τον αριθμό εκείνο των ασθενών από τους οποίους θα επιλεγούν οι κατάλληλοι για συμμετοχή στη μελέτη στο χρονικό διάστημα που προβλέπεται από τη μελέτη.
3. Το κέντρο διαθέτει την υλικοτεχνική υποδομή που προβλέπεται στο πρωτόκολλο της μελέτης ώστε να παρέχει τη δυνατότητα διεξαγωγής και ολοκλήρωσης της μελέτης εντός του προβλεπόμενου χρόνου.

Από τη διεξαγωγή της μελέτης δεν θα υπάρξει καμία οικονομική επιβάρυνση του Νοσοκομείου μας.

Το ως άνω πρωτόκολλο είναι πλήρες και καλύπτει τους κανόνες ηθικής και δεοντολογίας. Το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου μας αποφασίζει για την διενέργεια κλινικών μελετών λαμβάνοντας υπόψη τις ισχύουσες αρχές διακήρυξης του Ελσίνκι και της Ορθής Κλινικής πρακτικής (GCP) και η σύνθεσή του καλύπτει τις απαιτήσεις της Ορθής κλινικής πρακτικής.

Το Ερευνητικό πρωτόκολλο θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην αριθμ. Δ3(α) οικ. 36809/03-06-2019 (ΦΕΚ 2015/Τβ/03-06-2019) Υπουργική απόφαση.

Εισηγούμαστε:

Την έγκριση διεξαγωγής μελέτης στο πλαίσιο εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής της ειδικευόμενης Παθολογικής Ογκολογίας κ.Γαζούλη Ιωάννας.

Το Δ.Σ. μετά από διαλογική συζήτηση αποφασίζει ομόφωνα

1. Δέχεται την παραπάνω εισήγηση ως έχει.
2. Σημειώνεται ότι η μελέτη πρέπει να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 2016/679 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 27ης Απριλίου 2016, για την προστασία των φυσικών προσώπων έναντι της επεξεργασίας των δεδομένων προσωπικού χαρακτήρα και για την ελεύθερη κυκλοφορία των δεδομένων αυτών, όπως τέθηκε σε ισχύ από την 25^η Μαΐου 2018

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ
ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΣΙΚΑΡΗΣ

Ο ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ
Κ. ΧΟΛΕΒΑΣ

ΤΑ ΜΕΛΗ
Ν. ΤΖΑΜΠΟΥΡΑΣ
Γ. ΦΛΟΥΔΑΣ
Η. ΖΙΩΓΑΣ
Χ. ΧΑΡΙΣΗΣ
Δ. ΣΟΥΛΙΩΤΗΣ

Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ
ΠΑΠΑΦΩΤΗ ΣΤΕΛΛΑ

Ακριβές απόσπασμα
Η Γραμματέας Δ.Σ.

ΠΑΠΑΦΩΤΗ ΣΤΕΛΛΑ

Επίμετρο 2

In vitro διερεύνηση της επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου

Κυτταροκαλλιέργεια

Κατά την έναρξη της παρούσας ερευνητικής εργασίας, επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε την επαγωγή του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, σε κυτταρικές σειρές σε συνθήκες στείρας κυτταροκαλλιέργειας.

Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν 2 κύτταρικές σειρές ανθρώπινου κολο-ορθικού καρκινώματος με γνωστή υπερέκφραση του EGFR υποδοχέα, αρνητικές για τις μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, τα κύτταρα DiFi και τα κύτταρα Caco2 [264]. Η κυτταρική σειρά Caco2 προέρχεται κατεψυγμένα κύτταρα του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώ η κυτταρική σειρά DiFi ήταν ευγενική χορηγία του Alberto Bardelli και της Carlotta Cancelliere.

Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί σε in vitro διερεύνηση της επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, υπό την επίδραση κυτταροτοξικών παραγόντων και του anti-EGFR μονοκλωνικού αντισώματος cetuximab.

Οι κυτταρικές σειρές DiFi και Caco2, καλλιεργήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε τρυβλία διαμέτρου 90mm, σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό με προσθήκη 10% βόειου ζωμού (Fetal Bovine Serum, FBS) 10% και 1% αντιβιοτικού (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Για την καλλιέργεια των DiFi χρησιμοποιήθηκε gibco F-12 Nutrient Mix 1X, ενώ τα Caco2 καλλιεργήθηκαν με Dulbeccos modified Eagle's Medium-high glucose.

Ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν κατόπιν 2 πλύσεων με PBS (Phosphate-buffered saline) και επώασης με θρυψίνη για 2 λεπτά κατά μέσο όρο. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερη δυσκολία στην ανακαλλιέργεια των κυττάρων DiFi, καθώς ο χρειαζόταν επώαση με τη θρυψίνη για χρονικό διάστημα ως και 3-4 λεπτά, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα. Αυτό ενδεχεται να επηρεάζει εξωκυττάριους υποδοχείς, όπως ο EGFR, λόγω της πρωτεολυτικής επίδρασης της θρυψίνης.

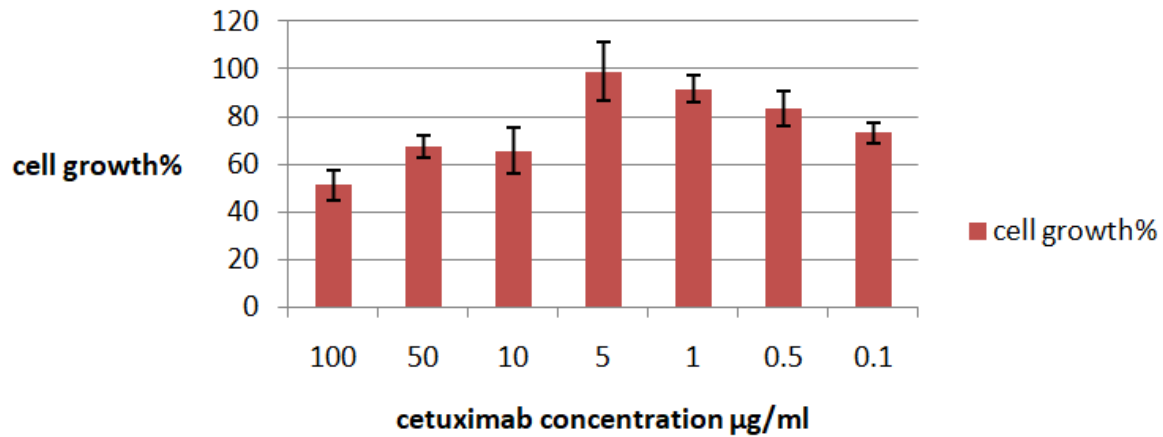
Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του αντι-EGFR παράγοντα cetuximab στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης (Sulforhodamine B assay, SRB). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, στρώσαμε κύτταρα από αμφότερες τις κυτταρικές σειρές σε βοθρία των 100μl, σε πιάτα των 96 βοθρίων. Είχε προηγηθεί αποκόλληση των κυττάρων προς μέτρηση από τα τρυβλία επώασης με το cetuximab, με τη χρήση θρυψίνης, και παραγωγή κυτταρικού διαλύματος. Τα κύτταρα καταμετρήθηκαν με τη χρήση αιματοκυττόμετρου Neubauer, με τοποθέτηση 5000 κυττάρων σε θρεπτικό υλικό όγκου 90μl κάθε βοθρίο των 100μl.

Ακολούθως προσθέσαμε 10μl διαλύματος cetuximab (erbitux, inj. Sol. 2mg/ml, 50ml), ούτως ώστε να επιτευχθούν τελικές συγκεντρώσεις: 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 μg/ml. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν καθιερωμένες συγκεντρώσεις του cetuximab για in vitro μελέτη, ούτως ώστε να αντικατοπτρίζονται οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου in vivo στον ανθρώπινο οργανισμό, ωστόσο οι επιλεχθείσες συγκεντρώσεις βρίσκονται εντός του αναφερόμενου εύρους της σχετικής βιβλιογραφίας [264, 562,563].

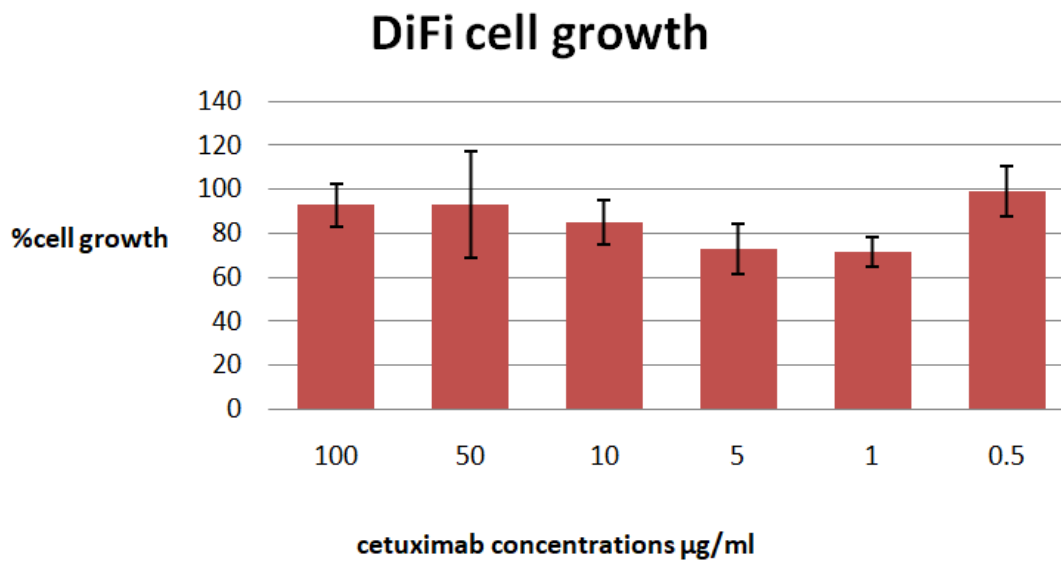
Ακολούθησε επώαση στους 37.2 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Μετά το τέλος της περιόδου επώασης, ακολουθεί επεξεργασία με 50% τριχλωρικό οξύ προς μονιμοποίηση του κυτταρικού πληθυσμού και ξέπλυμα με νερό. Αφού τα δείγματα στεγνώσουν για 12 περίπου ώρες, προστίθεται σουλφοροδαμίνη 0.4% σε 1% διάλυμα οξικού οξέος, και στη συνέχεια γίνεται πλύση με 1% οξικό οξύ. Μετά από εξάτμιση του οξικού οξέος, προστίθεται διάλυμα Tris 10mM και γίνεται ανάγνωση της κασέτας από τον μετρητή στα 510nm.

Από τις δοκιμασίες αυτές δεν είχαμε ομοιογενή αποτελέσματα, καθώς η κυτταροτοξικότητα του cetuximab δεν φάνηκε να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης στο διάλυμα των κυττάρων (Βλ. Γράφημα 7.1 και 7.2) Ειδικά για τα κύτταρα DiFi, ο περιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης δεν σχετιζόταν με τη συγκέντρωση του φαρμάκου, ενώ η κυτταροτοξικότητα του cetuximab και στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς φαινόταν περιορισμένη. Ειδικά για τη σειρά DiFi, αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί και σε καταστροφή του EGFR υποδοχέα, κατόπιν της παρατεταμένης επώασης με θρυψίνη, εξαιτίας της δυσκολίας στην αποκόλληση των κυττάρων.

caco2 p21 cetuximab 24 h



Γράφημα 7.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης (SRB), κατόπιν επώασης με cetuximab σε συγκέντρωση 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Παρατηρείται μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου (0.1, 0.2 έναντι 5 $\mu\text{g/ml}$) ενώ εφάμιλλη κυτταροτοξικότητα φαίνεται να χαρακτηρίζει τις 3 υψηλότερες συγκεντρώσεις (100, 50 και 10 $\mu\text{g/ml}$). Δεν παρατηρείται μηδενισμός της κυτταρικής ανάπτυξης για καμία συγκέντρωση, καθώς η κυτταρική ανάπτυξη είναι για όλες τις συγκεντρώσεις ανώτερη του 40%.



Γράφημα 7.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης (SRB), κατόπιν επώασης με cetuximab σε συγκέντρωση 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Ο βαθμός της κυτταρικής ανάπτυξης δε φαίνεται να επηρεάζεται από την αυξανόμενη συγκέντρωση του φαρμάκου.

Κυτταρομετρία ροής, FACS

Προσπαθήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση 2 διαφορετικών συγκεντρώσεων cetuximab, στην κυτταρική καλλιέργεια, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Επιλέχθηκαν οι δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις, 50 και 100μg/ml, οι οποίες επέδειξαν την υψηλότερη κυτταροτοξικότητα κατά την δοκιμασία σουλφοροδαμίνης, όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

Ελλείψει επαρκούς ποσότητας αντιδραστηρίου, ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε μόνο για την κυτταρική σειρά DiFi.

Προκειμένου να διαχωρήσουμε τα κύτταρα σε ζωντανά, νεκρά και σε κύτταρα σε πρώιμο ή όψιμο στάδιο απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική διαχωρισμού κυττάρων με φθορισμό (FACS, fluorescence-activated cell sorting). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε χρώση annexin V για τη διάκριση των αποπτωτικών κυττάρων, και Propidium Iodide (PI) για τη διάκριση των νεκρών κυττάρων. Η ανεξίτη συνδέεται στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, ενώ το PI συνδέεται στο DNA του πυρήνα, χωρίς να μπορεί να εισέλθει σε ζώντα κύτταρα με άθικτη μεμβράνη.

Για την κυτταρομετρία ροής, αρχικά επιστρώσαμε σε πιάτο 6 θέσεων, σε συγκέντρωση 430.000 κυττάρων ανά θέση. Κατόπιν 24ωρης επώασης, προσθέσαμε cetuximab σε συγκέντρωση 50 και 100μg/ml. Στις θέσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως controls, προστέθηκε PBS(1X) αντί για cetuximab. Μετά από επώαση για 24 ώρες με το φάρμακο, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και έγιναν 1-2 πλύσεις με PBS, και ακολούθησε προσθήκη διαλύματος θρυψίνης για αποκόλληση των κυττάρων από τα βοηθία επίστρωσης, για 1-2 λεπτά.

Κατόπιν προσθήκης 3-4mL PBS(1X) ανά θέση, πραγματοποιήθηκε συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος σε σωλήνα Corning (15mL) και φυγοκέντρωση για 5min στα 2.500 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα 500μL Annexin Binding Buffer/Corning, και κατόπιν 100μL από το εναιώρημα μεταφέρθηκαν στα σωληνάκια της κυτταρομετρίας, με προσθήκη 5μL διαλύματος Fluorochrome Conjugated Annexin V ανά σωληνάκι. Επίσης, προστέθηκαν 10μL διαλύματος PI και ακολούθησε ήπια ανάδευση με πιπέτα.

Τα κυτταρικά εναιωρήματα επώαστηκαν επί 20-30min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου, και κατόπιν προστέθηκαν 300-400μL διαλύματος Annexin Binding Buffer καθώς και 300-400μL PBS σε κάθε σωληνάκι.

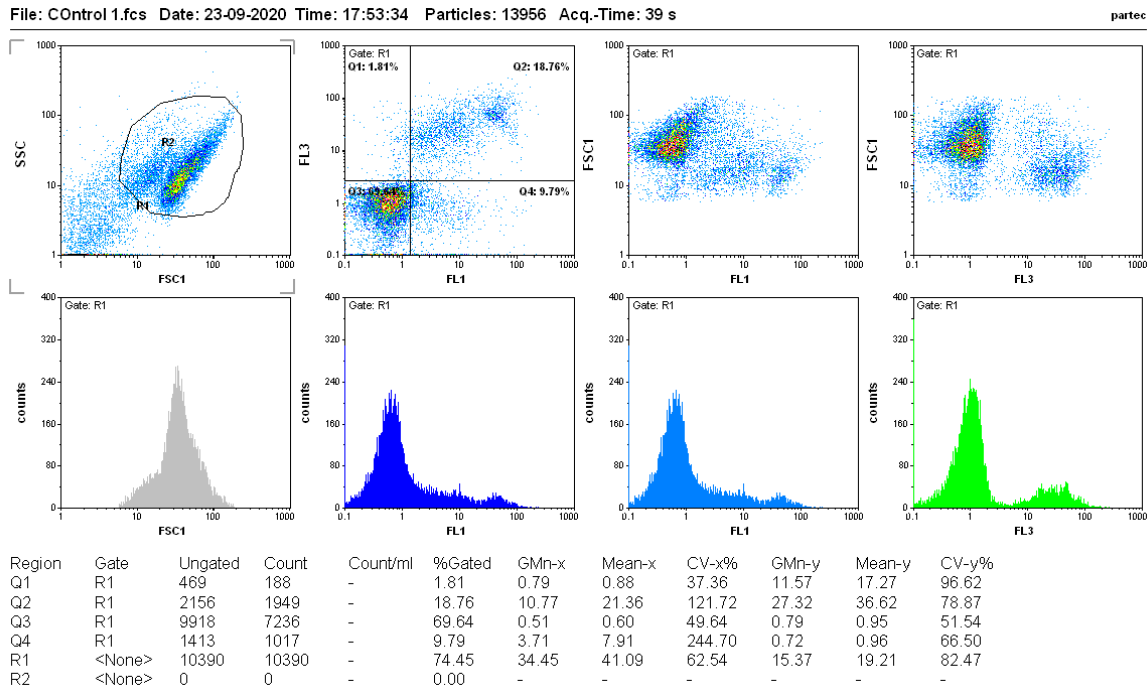
Στις εικόνες 7.3, 7.4 και 7.5, φαίνονται τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για τα κύτταρα DiFi, καθώς και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους στον πίνακα 7.6.

Αντίθετα με τα αναμενόμενα αποτελέσματα, φαίνεται ότι το ποσοστό των νεκρών κυττάρων που απεικονίζονται στο τεταρτημόριο 1 (Q1, πρόσληψη PI), είναι υψηλότερο (1.81%) για τα controls, σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με cetuximab.

Ωστόσο, το ποσοστό των ζώντων κυττάρων (αρνητικά για ανεξίτη και για PI), που εντοπίζονται στο τεταρτημόριο 3(Q3), είναι 69% για τα controls, ενώ κυμαίνεται από 42 ως 48% για τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις του cetuximab, εύρημα το οποίο υποστηρίζει την κυτταροτοξικότητα του φαρμάκου. Δεν παρατηρείται όμως ποσοτική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του φαρμάκου.

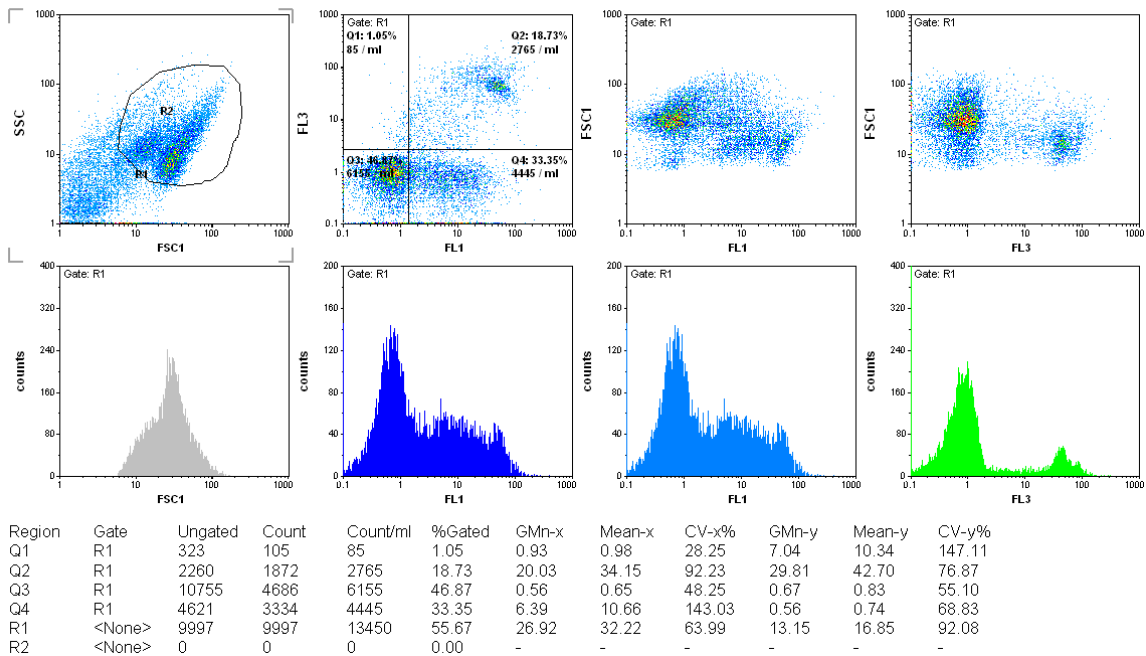
Όσον αφορά τα κύτταρα σε όψιμο (Q2) αλλά και πρώιμο στάδιο απόπτωσης (Q4), το μικρότερο ποσοστό ανιχνεύεται στα δείγματα controls. Η αναλογία των κυττάρων σε όψιμη απόπτωση είναι

μεγαλύτερη στα 100μg/ml cetuximab σε σχέση με την αναλογία που μετρήθηκε για τη συγκέντρωση 50μg/ml. Το αντίστροφο ισχύει για τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, τα οποία είναι αναλογικά περισσότερα στη χαμηλότερη συγκέντρωση cetuximab.

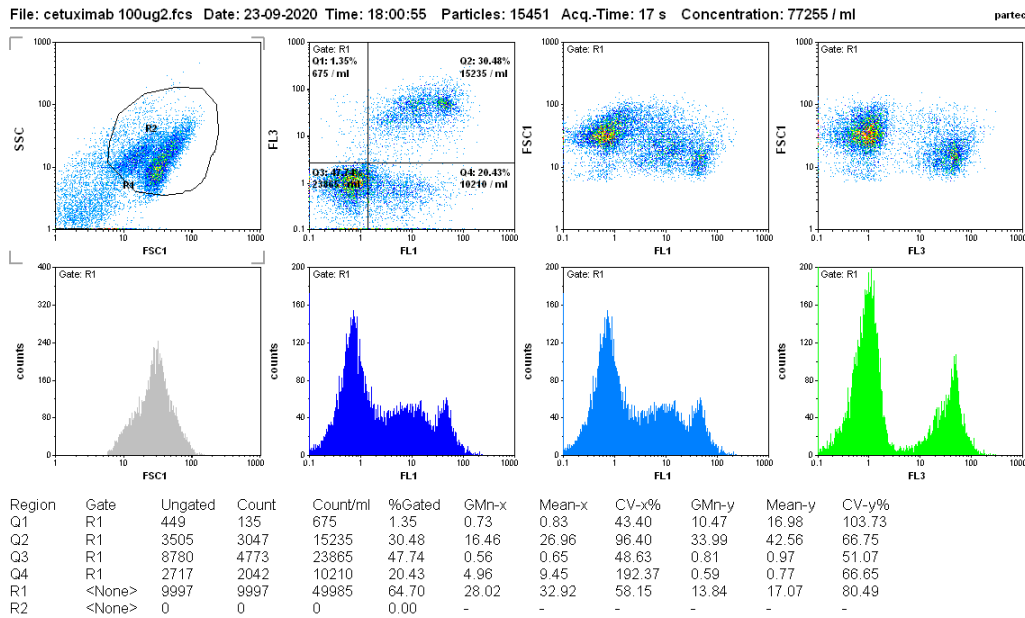


Εικόνα 7.3. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής DiFi για την ομάδα ελέγχου (controls) χωρίς προσθήκη cetuximab. FL1: annexin V, FL3:PI. Τα περισσότερα κύτταρα εντοπίζονται στο 4ημόριο 3, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή πρόσληψη και των δύο χρωστικών. Πράγματι, το ποσοστό ζώντων κυττάρων είναι υψηλότερο στις καλλιέργειες όπου απουσιάζει το cetuximab.

File: cetuximab50ug1.fcs Date: 23-09-2020 Time: 18:04:15 Particles: 17959 Acq-Time: 62 s Concentration: 24280 / ml partec



Εικόνα 7.4. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής DiFi υπό την επίδραση συγκέντρωσης 50μg/ml cetuximab. Η επώαση έγινε για 24 ώρες. FL1: annexin V, FL3:PI. Τα περισσότερα κύτταρα εντοπίζονται στο 4ημόριο 3, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή πρόσληψη και των δύο χρωστικών (ζώντα κύτταρα). Πράγματι, το ποσοστό ζώντων κυττάρων ξεπερνά αυτό των αποπτωτικών κυττάρων (Q2, Q4), ακόμα και σε συγκέντρωση cetuximab 50μg/ml, ενώ το ποσοστό νεκρών κυττάρων είναι ιδιαίτερα χαμηλό (Q1, υψηλή πρόσληψη PI). Σε αυτή τη συγκέντρωση, φαίνεται να επικρατούν τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα(Q2), σε σχέση με τα κύτταρα σε πρώιμη απόπτωση (Q4).



Εικόνα 7.5. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής DiFi υπό την επίδραση συγκέντρωσης 100μg/ml cetuximab. Η επώαση έγινε για 24 ώρες. FL1: annexin V, FL3:PI. Τα περισσότερα κύτταρα εντοπίζονται στο 4ημόριο 3, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή πρόσληψη και των δύο χρωστικών (ζώντα κύτταρα). Πράγματι, το ποσοστό ζώντων κυττάρων ξεπερνά αυτό των αποπτωτικών κυττάρων (Q2, Q4), ακόμα και σε συγκέντρωση cetuximab 100μg/ml, ενώ το ποσοστό νεκρών κυττάρων είναι ιδιαιτέρως χαμηλό (Q1, υψηλή πρόσληψη PI). Σε αυτή τη συγκέντρωση cetuximab, επικρατούν τα κύτταρα σε όψιμο αποπτωτικό στάδιο (Q2, πρόσληψη ανεξίνης και PI) σε σχέση με τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Q4, πρόσληψη ανεξίνης με χαμηλή πρόσληψη PI).

Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής/FACS, για τα κύτταρα DiFi

	Q1(dead cells)	Q2 (late apoptosis)	Q3 (live cells)	Q4 (early apoptosis)
Control 1	1.81%	18.76%	69.64%	9.79%
Cetuximab 100ug/ml 1	0.84%	24.12%	48.62%	26.42%
Cetuximab 100ug/ml 1	1.35%	30.48%	47.74%	20.43%
Cetuximab 50ug/ml	1.05%	18.73%	47.87%	33.35%
Cetuximab 50ug/ml	0.28%	22.76%	42.92%	34.03%

Ανίχνευση καλρετικιουλίνης με τη μέθοδο Western blot

Κάναμε χρήση της μεθόδου Western Blot, για την ανίχνευση της καλρετικιουλίνης. Κατόπιν καλλιέργειας κυττάρων της σειράς Caco2, και επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις cetuximab για 24 ώρες (0, 10, 50, 100μg/ml), έγινε απομόνωση και εξαγωγή πρωτεϊνών, με την εφαρμογή διαλύματος Mastermix/RIPA buffer (3ml NaCl, 5ml Tris pH8, 0.4ml EDTA pH8, 1 ml SDS 10%, 10ml NaDOC, 10ml Triton-X, 10ml γλυκερόλης).

Κατόπιν μέτρησης των πρωτεϊνών με BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), διενεργήθηκε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών που είχαν εξαχθεί από κάθε κυτταρική καλλιέργεια.

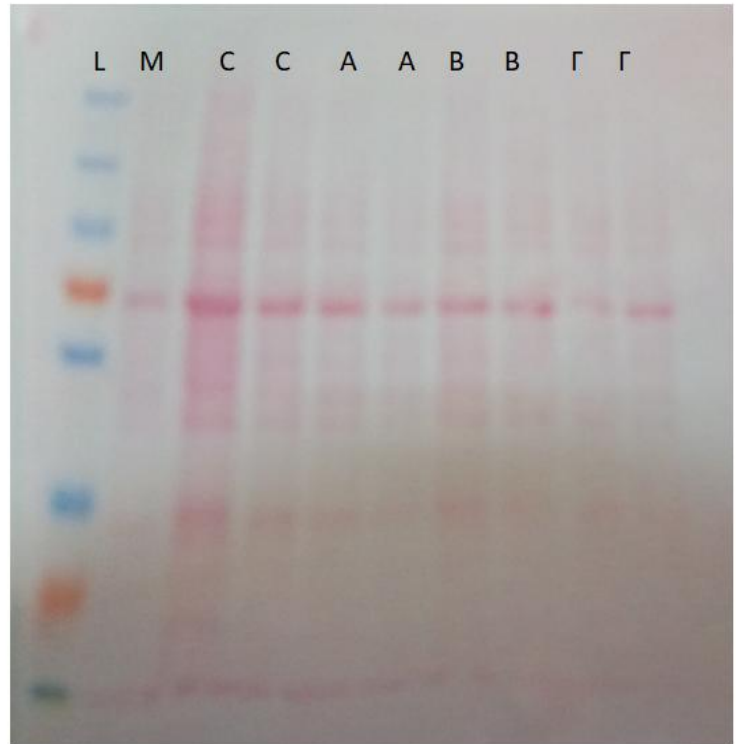
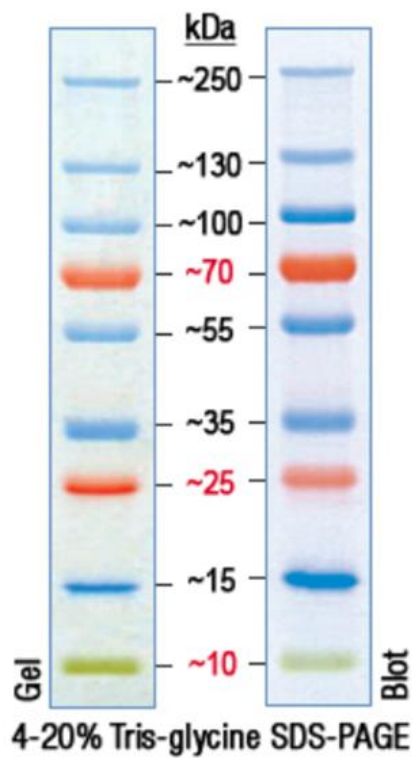
Κατόπιν, διενεργήθηκε Western blot με μεταφορά των πρωτεϊνών που διαχωρήστηκαν κατά μοριακό βάρος, σε φύλλα κυτταρίνης.

Στην εικόνα 7.7, φαίνεται η αποτύπωση της καλρετικιουλίνης με χρώση Poinceau (Εικ. 7.7) . Από το μοριακό βάρος του δείκτη, διακρίνεται η μπάντα της καλρετικιουλίνης περίπου στα 60kDa.

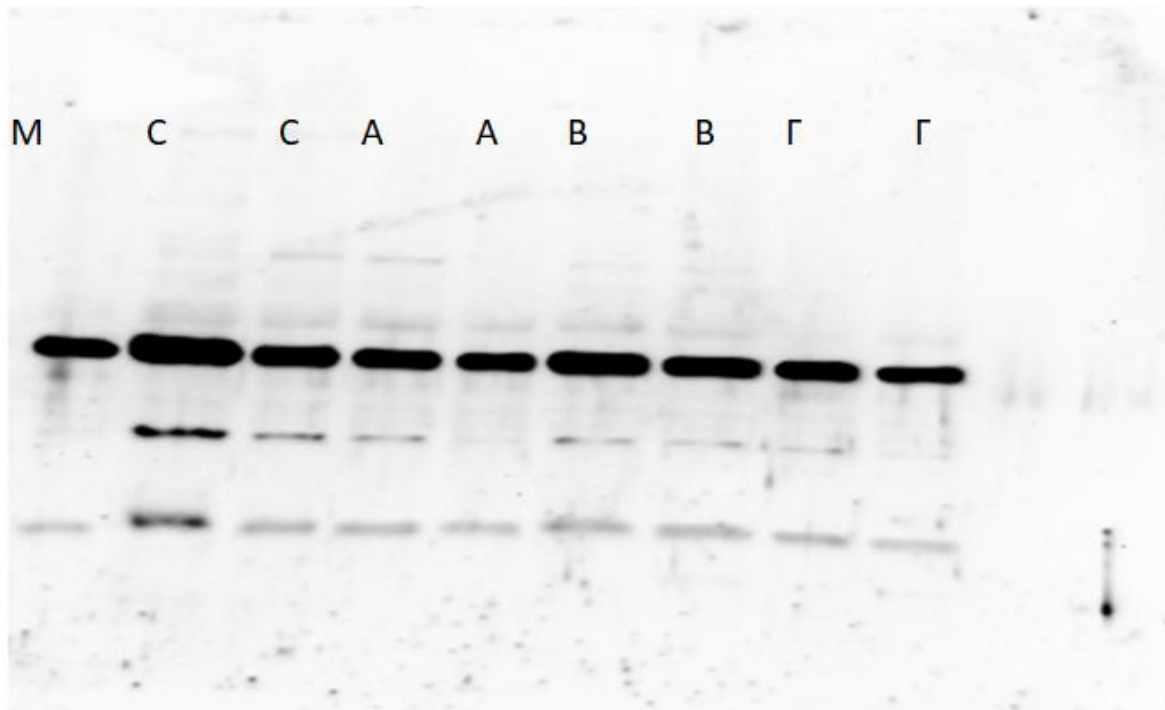
Τα φύλλα κυτταρίνης επώαστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της καλρετικιουλίνης και δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς. Ακολούθησε εμφάνιση της καλρετικιουλίνης, με τη χρήση της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Ταυτοποιήθηκε η παρουσία της καλρετικιουλίνης, (Βλ. εικόνα 7.8).

Η ισχυρότερη μπάντα καλρετικιουλίνης εντοπίζεται στις καλλιέργειες control, ενώ φαίνεται να ελαττώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του cetuximab, από τα 10 στα 100μg/ml, χωρίς όμως να ακολουθεί ομοιογενή διακύμανση.

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder



Εικόνα 7.7. Εντοπισμός της καλρετικουλίνης (~60kDa) με χρώση Poinceau, παρατείνεται χρωματική κλίμακα για τα μοριακά βάρη. Με σειρά από τα αριστερά προς τα δεξιά, βλέπουμε την κλίμακα (Ladder, L), τον δείκτη (Marker, M) και την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου κυτταροκαλλιέργειας Caco2, κατόπιν επώασης με cetuximab σε συγκέντρωση 0 (Control, C), 10μg/ml (A), 50μg/ml (B), 100μg/ml (Γ). Δίνεται η εντύπωση σταδιακής μείωσης της έντασης της μπάντας της καλρετικουλίνης, με την αυξανόμενη συγκέντρωση cetuximab.



Εικόνα 7.8. Εντοπισμός της καλρετικουλίνης (~60kDa) με Western blot, απότύπωση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Παρατίθεται χρωματική κλίμακα για τα μοριακά βάρη. Με σειρά από τα αριστερά προς τα δεξιά, βλέπουμε τον δείκτη (Marker, M) και την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου κυτταροκαλλιέργειας Caco2, κατόπιν επώασης με cetuximab σε συγκέντρωση 0 (Control, C), 10μg/ml (A), 50μg/ml (B), 100μg/ml (Γ). Η μπάντα της καλρετικουλίνης εντονότερη στην καλλιέργεια χωρίς cetuximab, ωστόσο παρατηρείται ευδιάκριτα ως και στα 100μg/ml του φαρμάκου.

Συμπεράσματα εργαστηριακών πειραμάτων

Θελήσαμε να διερευνήσουμε την επαγωγή του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου σε *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων ανθρώπινου κολο-ορθικού καρκίνου.

Ως αρχικό υπό διερεύνηση επαγωγέα του φαινομένου, επιλέχθηκε το αντι-EGFR μονοκλωνικό αντίσωμα cetuximab, και εφαρμόστηκε σε κυτταρικές σειρές με EGFR υπερέκφραση, ωστόσο χωρίς απευαισθητοποιείς μεταλλάξεις (KRAS, BRAF).

Αντιμετωπίσαμε δυσκολίες στην ανακαλλιέργεια των κυττάρων DiFi, τα οποία χρειαζόνταν παρατεταμένη επώαση με θρυψίνη, η οποία ίσως να αλλοίωσε την σύσταση των εξωμεμβρανικών υποδοχέων EGFR.

Ακολουθήσαμε δοκιμασία κυτταροτοξικότητας ενός εύρους συγκεντρώσεων του φαρμάκου, χωρίς να έχουμε ωστόσο ομοιογενή αποτελέσματα, συσχέτισης της αυξανόμενης συγκέντρωσης του φαρμάκου με το βαθμό της κυτταροτοξικότητας. Αυτό μπορεί να οφείλεται αφενός μεν σε αστοχία τεχνικής ή υλικού, αλλά και στο μηχανισμό δράσης του cetuximab, ένα όχι άμεσα κυτταροτοξικό φάρμακο, αλλά περισσότερο ανασταλτικό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Προσπαθήσαμε να απομονώσουμε ένα από τα σημαντικά μόρια στη σηματοδότηση του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, την καλρετικουλίνη. Αν και επιτύχαμε στην απομόνωση της πρωτεΐνης, δεν παρατηρήσαμε σαφή συσχέτιση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμάκου με μείωση ή αύξηση της ποσότητας της καλρετικουλίνης που απομονώθηκε. Επιπλέον, η απομόνωση της καλρετικουλίνης κατόπιν διάσπασης των κυττάρων με το διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τόσο την ενδοκυττάρια όσο και την μεμβρανική καλρετικουλίνη. Γνωρίζουμε όμως, ότι μόνο η καλρετικουλίνη που προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια του θνήσκοντος κυττάρου, αποτελεί σηματοδότη του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου. Επομένως, απομόνωση της καλρετικουλίνης με Western blot, κατόπιν διάσπασης των κυττάρων της καλλιέργειας, είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, παρατηρήθηκε μείωση των ζώντων κυττάρων στις καλλιέργειες που είχαν επωαστεί με cetuximab, σε σχέση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Ωστόσο, το ποσοστό των νεκρών κυττάρων παρέμεινε μικρό, παρά την προσθήκη του cetuximab. Είναι ενδιαφέρον ότι η υψηλότερη συγκέντρωση του cetuximab οδήγησε σε υψηλότερη αναλογία όψιμων /πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων, ενώ το αντίστροφο παρατηρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση.

Από τα παραπάνω φαίνεται η επίδραση του cetuximab στην ανάπτυξη των κυττάρων και στην έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών, χωρίς ωστόσο να τεκμηριώνεται η επαγωγή του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου.

Συνολικά, μπορούμε να αποκομίσουμε κάποιες ενδείξεις επαγωγής του ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου, από τα εργαστηριακά ευρήματα, χωρίς όμως να μπορούμε να τεκμηριώσουμε επαρκώς το φαινόμενο *in vitro*.

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο κολο-ορθικός καρκίνος αποτελεί μια από τις πλέον συχνά εμφανιζόμενες κακοήθειες. Ο συνδυασμός κυτταροτοξικών και στοχευτικών θεραπειών έχει επιφέρει σημαντικό όφελος στην επιβίωση και την ποιότητα ζωής των ασθενών, τις τελευταίες δεκαετίες. Φάρμακα όπως το cetuximab και η οξαλιπλατίνη, που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου, φαίνεται πως έχουν τη δυνατότητα ενίσχυσης της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή ενάντια στα νεοπλασματικά κύτταρα, μέσω του φαινομένου του ανοσολογικού κυτταρικού θανάτου (Immunogenic Cell Death, ICD). Η επαγωγή του συγκεκριμένου φαινομένου δεν έχει μελετηθεί συστηματικά σε ασθενείς.

Σκοπός: Διερεύνηση της μεταβολής της ανοσολογικής απόκρισης, κατά τη διάρκεια της θεραπείας, και αναζήτηση σχετικών βιοδεικτών, σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο.

Μέθοδος: Έγινε αναδρομική μελέτη 20 περιστατικών ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνωμα, με βιοπτικό υλικό από 1 ως 2 εστίες κολο-ορθικού καρκινώματος. Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των διηθούντων λεμφοκυττάρων (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs), καθώς και των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD3+, CD8+, CD4+ και FOXP3+, τόσο στην πρωτοπαθή όσο και στις δευτεροπαθείς εστίες.

Αποτελέσματα: Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του ανδρικού φύλου με την αυξημένη συγκέντρωση στρωματικών και συνολικών CD3+ κυττάρων, καθώς και μεταξύ καλύτερου βαθμού διαφοροποίησης του νεοπλάσματος και διήθησης από CD8+ κύτταρα, στην πρωτοπαθή εστία. 95% των ασθενών έλαβαν έλαβαν οξαλιπλατίνη σε κάποια γραμμή θεραπείας, ενώ 15% και 45% αυτών έλαβαν cetuximab ως νεοεπικουρική/επικουρική και συστηματική θεραπεία, αντίστοιχα. Για τους ασθενείς με διαθέσιμα ζεύγη βιοψιών από την πρωτοπαθή και δευτεροπαθή εστία, διαπιστώθηκε αυξητική τάση των στρωματικών και συνολικών CD8+, CD3+, CD4+ αλλά και FOXP3+ λεμφοκυττάρων, στην δευτεροπαθή εστία, σε σχέση με την πρωτοπαθή. Η συνολική επιβίωση των ασθενών ήταν 63 μήνες (95% CI 38-84). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης κανενός από τους εξεταζόμενους πληθυσμούς TILs, στην πρωτοπαθή ή στις δευτεροπαθείς εστίες, με τη συνολική επιβίωση ή την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση των ασθενών.

Συμπεράσματα: Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να αυξάνεται κατά την εξέλιξη της νόσου και τη χορήγηση αντινεοπλασματικών θεραπειών, αν και χωρίς εμφανή μεταβολή της επιβίωσης από την αυξημένη τοπική λεμφοκυτταρική διήθηση στις νεοπλασματικές εστίες. Η ανοσοενισχυτική επίδραση κλασικών στοχευτικών και κυτταροτοξικών παραγόντων, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εφαλτήριο για τη χορήγηση της ανοσοθεραπείας, ως θεραπεία διάσωσης ή συντήρησης, ιδιαίτερα σε ασθενείς που δεν εκφράζουν τους καθιερωμένους δείκτες ανοσογονικότητας.

Abstract

Introduction: Colorectal cancer is one of the most frequently encountered malignancies. Both cytotoxic and targeted antineoplastic treatments, have prolonged survival and ameliorated quality of life of affected patients. Agents very often employed against colorectal cancer, such as oxaliplatin and cetuximab, may also enhance host's immunogenicity, by inducing Immunogenic Cell Death (ICD). ICD induction in patients has not yet been systematically studied.

Aim: To investigate changes in local immune response, during antineoplastic treatment, and research for relative biomarkers, in colorectal cancer patients.

Methods: A retrospective study of 20 colorectal cancer patient cases, with available tissue material from 1 to 2 tumor sites. Tissue material was evaluated for density of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs), as well as CD3+, CD8+, CD4+ and FOXP3+ subpopulations, both in primary and metastatic tumor sites.

Results: A significant association was shown between increased stromal and total CD3+ TILs density and male sex, as well as between better differentiated neoplasms and stromal/total CD8+ TILs concentration, regarding the primary tumor site. 95% of patients received oxaliplatin as perioperative and/or systematic treatment, while 15% and 45% of patients received neoadjuvant/adjuvant and systematic treatment with cetuximab, respectively. For patients with available tissue material from both primary and secondary tumor sites, we observed an increased concentration of stromal and total CD8+, CD3+, CD4+ and FOXP3+ TILs, in the secondary cancer sites, compared to the primary site. Median overall survival was 63 months (95% CI 38-84). No association between TILs subpopulations in the primary or secondary tumor site and patient overall or progression free survival was found.

Conclusions: Immune system activation may increase during disease course, and in parallel with the antineoplastic treatment administration, although increased in local immune infiltration did not seem to affect patient survival. Immune enhancing effect of broadly used cytotoxic and targeted agents, may serve a background for immunotherapy administration, as salvage or maintenance treatment, especially in patients whose tumors do not express established immunotherapy biomarkers.

Βιβλιογραφία

1. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/>
2. Centers for Disease Control and Prevention. Available from: <https://gis.cdc.gov/>
3. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24(Suppl 6):vi64–vi72.
4. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25(Suppl 3):iii1–iii9.
5. Bailey CE, Hu CY, You YN, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975–2010. *JAMA Surg.* 2015;150(1):17–22.
6. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70:145–64.
7. Weinberg BA, Marshall JL, Salem ME. The growing challenge of young adults with colorectal cancer. *Oncology (Williston Park).* 2017;31:381–9.
8. Bonelli L, Martines H, Conio M, et al. Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large bowel: A case-control study. *Int J Cancer.* 1988;41(4):513–7.
9. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, et al. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 1998;128:900–5.
10. Quintero E, Carrillo M, Leoz ML, et al. Risk of advanced neoplasia in first-degree relatives with colorectal cancer: A large multicenter cross-sectional study. *PLoS Med.* 2016;13(5):e1002008.
11. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919–32.
12. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: A cohort study. *Lancet Oncol.* 2011;12:49–55.
13. Rumilla K, Schowalter KV, Lindor NM, et al. Frequency of deletions of EPCAM (TACSTD1) in MSH2-associated Lynch syndrome cases. *J Mol Diagn.* 2011;13:93–9.
14. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: A literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet.* 2012;49(3):151–7.
15. National Comprehensive Cancer Network. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. NCCN Guidelines Version 2.2023. Available from: <https://www.nccn.org/>
16. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(2):385–98.
17. Grover S, Kastrinos F, Steyerberg EW, et al. Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas. *JAMA.* 2012;308:485–92.
18. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology.* 2000;119:1447–53.
19. Boland CR, Idos GE, Durno C, et al. Diagnosis and management of cancer risk in the gastrointestinal hamartomatous polyposis syndromes: Recommendations from the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2022;162:2063–85.

20. Latchford AR, Neale K, Phillips RK, et al. Juvenile polyposis syndrome: A study of genotype, phenotype, and long-term outcome. *Dis Colon Rectum*. 2012;55:1038–43.
21. Campos FG, Figueiredo MN, Martinez CA. Colorectal cancer risk in hamartomatous polyposis syndromes. *World J Gastrointest Surg*. 2015;7(3):25–32.
22. Medina Pabón MA, Babiker HM. A review of hereditary colorectal cancers. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.
23. Mai PL, Best AF, Peters JA, et al. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer*. 2016;122:3673–81.
24. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013;24(6):1207–22.
25. Cheng J, Chen Y, Wang X, et al. Meta-analysis of prospective cohort studies of cigarette smoking and the incidence of colon and rectal cancers. *Eur J Cancer Prev*. 2015;24(1):6–15.
26. De Bruijn KM, Arends LR, Hansen BE, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg*. 2013;100(11):1421–9.
27. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, et al. Colorectal cancer association with metabolic syndrome and its components: A systematic review with meta-analysis. *Endocrine*. 2013;44(3):634–47.
28. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, et al. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;145(1):166–75.e8.
29. Amin MB, Edge SB, Greene F, et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer International Publishing; 2017.
30. Hari DM, Leung AM, Lee JH, et al. *AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer: Do the complex modifications improve prognostic assessment?* *J Am Coll Surg*. 2013;217:181–90.
31. Chu QD, Zhou M, Medeiros K, et al. Positive surgical margins contribute to the survival paradox between patients with stage IIB/C (T4N0) and stage IIIA (T1-2N1, T1N2a) colon cancer. *Surgery*. 2016;160:1333–43.
32. Kim MJ, Jeong SY, Choi SJ, et al. Survival paradox between stage IIB/C (T4N0) and stage IIIA (T1-2N1) colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22:505–12.
33. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010;28:264–71.
34. Franko J, Shi Q, Goldman CD, et al. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: A pooled analysis of North Central Cancer Treatment Group phase III trials N9741 and N9841. *J Clin Oncol*. 2012;30:263–7.
35. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press; 2010. p. 134–46.
36. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153–73.

37. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:979–94.
38. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: A basis for checklists. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1016–25.
39. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, et al. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol.* 2012;65:381–8.
40. Kang H, O’Connell JB, Maggard MA, et al. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum.* 2005;48:1161–8.
41. Leopoldo S, Lorena B, Cinzia A, et al. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: Clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:1429–39.
42. Chen JS, Hsieh PS, Chiang JM, et al. Clinical outcome of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the colon. *Chang Gung Med J.* 2010;33:51–7.
43. Makino T, Tsujinaka T, Mishima H, et al. Primary signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: Report of eight cases and review of 154 Japanese cases. *Hepatogastroenterology.* 2006;53:845–9.
44. Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, et al. Medullary carcinoma of the large intestine: A population-based analysis. *Int J Oncol.* 2010;37:901–7.
45. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol.* 2001;159:2239–48.
46. Birbeck KF, Macklin CP, Tiffin NJ, et al. Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Ann Surg.* 2002;235:449–57.
47. Liebig C, Ayala G, Wilks J, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5131–7.
48. Quah HM, Chou JF, Gonen M, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum.* 2008;51:503–7.
49. Lee VWK, Chan KF. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer. *Pathol Res Pract.* 2018;214:402–7.
50. Romiti A, Roberto M, Marchetti P, et al. Study of histopathologic parameters to define the prognosis of stage II colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2019;34:905–13.
51. Basile D, Broudin C, Emile JF, et al. Tumor budding is an independent prognostic factor in stage III colon cancer patients: A post-hoc analysis of the IDEA-France phase III trial (PRODIGE-GERCOR). *Ann Oncol.* 2022;33:628–37.
52. Muller S, Chesner IM, Egan MJ, et al. Significance of venous and lymphatic invasion in malignant polyps of the colon and rectum. *Gut.* 1989;30:1385–91.
53. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002;40:403–39.
54. McGregor DK, Wu TT, Rashid A, et al. Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:712–8.

55. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, et al. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:303–10.
56. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2004;17:1392–9.
57. Seo AN, Kwak Y, Kim DW, et al. HER2 status in colorectal cancer: Its clinical significance and the relationship between HER2 gene amplification and expression. *PLoS One*. 2014;9:e98528.
58. Fusco N, Bosari S. HER2 aberrations and heterogeneity in cancers of the digestive system: Implications for pathologists and gastroenterologists. *World J Gastroenterol*. 2016;22:7926–37.
59. Zhao P, Li L, Jiang X, et al. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol*. 2019;12:54.
60. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, 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;20(20):5322–30.
61. Nilbert M, Planck M, Fernebro E, et al. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer*. 1999;35(6):942–5.
62. Hitchins MP, Ward RL. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 2009;46(12):793–802.
63. Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, et al. The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2013;12(2):175–80.
64. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers*. 2004;20(4–5):269–76.
65. Woods MO, Williams P, Careen A, et al. A new variant database for mismatch repair genes associated with Lynch syndrome. *Hum Mutat*. 2007;28(7):669–73.
66. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073–87.e3.
67. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919–32.
68. Yamamoto H, Imai K, Perucho M. Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *J Gastroenterol*. 2002;37(3):153–63.
69. Cicek MS, Lindor NM, Gallinger S, et al. Quality assessment and correlation of microsatellite instability and immunohistochemical markers among population- and clinic-based colorectal tumors results from the Colon Cancer Family Registry. *J Mol Diagn*. 2011;13(3):271–81.
70. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet*. 2009;41(1):112–7.
71. Huth C, Kloor M, Voigt AY, et al. The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Mod Pathol*. 2012;25(6):911–6.
72. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, et al. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem*. 2014;60(9):1192–9.
73. Zheng K, Wan H, Zhang J, et al. A novel NGS-based microsatellite instability (MSI) status classifier with 9 loci for colorectal cancer patients. *J Transl Med*. 2020;18:215.

74. Marques AC, Ferraro-Peyret C, Michaud F, et al. Improved NGS-based detection of microsatellite instability using tumor-only data. *Front Oncol.* 2022;12:969238.
75. Li X, Yao X, Wang Y, et al. MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One.* 2013;8(3):e59064.
76. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21:1350–6.
77. Llosa NJ, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015;5:43–51.
78. Son J, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature.* 2013;496:101–5.
79. Kamphorst JJ, et al. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:8882–7.
80. Ying H, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 2012;149:656–70.
81. Tran B, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2011;117:4623–32.
82. Gavin PG, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6531–41.
83. Popovici V, et al. Context-dependent interpretation of the prognostic value of BRAF and KRAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:43.
84. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer.* 2006;42:2212–21.
85. Yoo PS, Lopez-Soler RI, Longo WE, et al. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clin Colorectal Cancer.* 2006;6:202–7.
86. Muratore A, Zorzi D, Bouzari H, et al. Asymptomatic colorectal cancer with unresectable liver metastases: immediate colorectal resection or upfront systemic chemotherapy? *Ann Surg Oncol.* 2007;14:766–70.
87. Vauthey JN, Zorzi D, Pawlik TM. Making unresectable hepatic colorectal metastases resectable—does it work? *Semin Oncol.* 2005;32:118–22.
88. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol.* 2005;16:1311–9.
89. Airley R. Cancer Chemotherapy: Basic Science to the Clinic. John Wiley & Sons; 2009. p. 76.
90. Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(2):85–104.
91. Poon MA, O'Connell MJ, Wieand HS, et al. Biochemical modulation of fluorouracil with leucovorin: confirmatory evidence of improved therapeutic efficacy in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1991;9(11):1967–72.
92. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, et al. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res.* 2000;6(4):1205–18.

93. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicol In Vitro*. 2006;20(2):163–75.
94. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:2006–12.
95. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *Br J Cancer*. 2011;105:58–64.
96. Tournigand C, Cervantes A, Figer A, et al. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer—a GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2006;24(3):394–400.
97. Adam R, Delvart V, Pascal G, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg*. 2004;240:644–57; discussion 657–48.
98. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol*. 2005;16:1311–9.
99. Delaunoy T, Alberts SR, Sargent DJ, et al. Chemotherapy permits resection of metastatic colorectal cancer: experience from Intergroup N9741. *Ann Oncol*. 2005;16:425–9.
100. Kishi Y, Zorzi D, Contreras CM, et al. Extended preoperative chemotherapy does not improve pathologic response and increases postoperative liver insufficiency after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:2870–6.
101. Bilchik AJ, Poston G, Curley SA, et al. Neoadjuvant chemotherapy for metastatic colon cancer: a cautionary note. *J Clin Oncol*. 2005;23:9073–8.
102. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004;22:229–37.
103. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol*. 2005;23:4866–75.
104. Cremolini C, Antoniotti C, Rossini D, et al. Upfront FOLFOXIRI plus bevacizumab and reintroduction after progression versus mFOLFOX6 plus bevacizumab followed by FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer (TRIBE2): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2020;21:497–507.
105. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007;25:1670–6.
106. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, et al. FOLFOXIRI vs FOLFIRI as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer*. 2006;94:798–805.
107. Han K, Peyret T, Marchand M, et al. Population pharmacokinetics of bevacizumab in cancer patients with external validation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(2):341–51.

108. Ramakrishnan S, Anand V, Roy S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9(2):142–60.
109. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3706–12.
110. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil/leucovorin with fluorouracil/leucovorin alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:60–5.
111. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, et al. FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials. *Clin Colorectal Cancer*. 2013;12:145–51.
112. Qu CY, Zheng Y, Zhou M, et al. Value of bevacizumab in treatment of colorectal cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015;21:5072–80.
113. Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2009;14(1):22–8.
114. Cervantes A, Adam R, Roselló S, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023;34(1):10–32.
115. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):52.
116. Scaltriti M, Baselga J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5268–72.
117. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers*. 2021;13(11):2748.
118. Ali R, Wendt M. The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression. *Sig Transduct Target Ther*. 2017;2:16042.
119. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*. 2005;1:2005.0010.
120. Mokhtari M, Ardestani MM, Movahedipour M. An immunohistochemical study of EGFR expression in colorectal cancer and its correlation with lymph nodes status and tumor grade. *J Res Med Sci*. 2012;17(8):741–4.
121. Vallbohmer D, Lenz HJ. Epidermal growth factor receptor as a target for chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer*. 2005;5 Suppl 1:S19–27.
122. Mc Kay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumors and lymph node metastases. *Eur J Cancer*. 2002;38:2258–64.
123. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007;357:2040–8.
124. Yan Q, Guo K, Feng G, et al. Association between the overexpression of Her3 and clinical pathology and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(37):e12317.

125. Yazdi MH, Faramarzi MA, Nikfar S, Abdollahi M. A comprehensive review of clinical trials on EGFR inhibitors such as cetuximab and panitumumab as monotherapy and in combination for treatment of metastatic colorectal cancer. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2015;7(4):134–44.
126. European Medicines Agency (EMA). Erbitux 5 mg/mL solution for infusion. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_en.pdf
127. European Medicines Agency (EMA). Vectibix 20 mg/mL concentrate for solution for infusion. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vectibix-epar-product-information_en.pdf
128. Lievre A, Bachatte J-B, Blige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26:374–9.
129. Amado IG, Wolf M, Peters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1626–34.
130. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023–34.
131. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007;96(8):1166–9.
132. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170:17–33.
133. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 2013;93:269–309.
134. Zhu G, Pei L, Xia H, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2021;20:143.
135. Ji J, Wang C, Fakhri M. Targeting KRASG12C-mutated advanced colorectal cancer: research and clinical developments. *Onco Targets Ther*. 2022;15:747–56.
136. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:5705–12.
137. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomized clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012;48:1466–75.
138. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015;51:587–94.
139. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2014;53(7):852–64.
140. Kopetz S, Grothey A, et al. Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAF V600E-mutated colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1632–43.
141. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomised trials. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1713–29.

142. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer Version 3.2024. www.nccn.org
143. Chen D, Li L, Zhang X, et al. FOLFOX plus anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody is an effective first-line treatment for patients with RAS-wild left-sided metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(10):e0097.
144. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011;22(7):1535–46.
145. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2011–9.
146. Piessevaux H, Buyse M, Schlichting M, et al. Use of early tumor shrinkage to predict long-term outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2013;31(30):3764–75.
147. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, 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;28(31):4697–705.
148. Douillard JY, Siena S, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(7):1346–55.
149. Carrato A, Abad A, et al. First-line panitumumab plus FOLFOX4 or FOLFIRI in colorectal cancer with multiple or unresectable liver metastases: a randomised, phase II trial (PLANET-TTD). *Eur J Cancer*. 2017;81:191–202.
150. Modest DP, Martens UM, et al. FOLFOXIRI plus panitumumab as first-line treatment of RAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomized, open-label, phase II VOLFI study (AIO KRK0109). *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3401–11.
151. Samalin E, Mazard T, et al. Triplet chemotherapy plus cetuximab as first-line treatment in RAS wild-type metastatic colorectal carcinoma patients. *Ann Oncol*. 2019;30(Suppl 4):iv26–iv27.
152. Hu H, Wang K, et al. Modified FOLFOXIRI with or without cetuximab as conversion therapy in patients with RAS/BRAF wild-type unresectable liver metastases colorectal cancer: the FOCULM multicenter phase II trial. *Oncologist*. 2021;26(1):e90–e98.
153. Price TJ, Peeters M, Kim TW, et al. ASPECCT: a randomized, multicenter, open-label, phase 3 study of panitumumab versus cetuximab for previously treated wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49:18.
154. Wadlow RC, Hezel AF, Abrams TA, et al. Panitumumab in patients with KRAS wild-type colorectal cancer after progression on cetuximab. *Oncologist*. 2012;17(1):14.
155. Bridgewater JA, Pugh SA, Maishman T, et al.; New EPOC investigators. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis (New EPOC): long-term results of a multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21:398–411.

156. Llosa NJ, Cruise M, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015;5(1):43–51.
157. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology.* 2008;134(4):988–97.
158. Roudko V, Bozkus CC, Orfanelli T, et al. Shared immunogenic poly-epitope frameshift mutations in microsatellite unstable tumors. *Cell.* 2020;183(6):1634–49.e17.
159. Rospo G, Lorenzato A, Amirouchene-Angelozzi N, et al. Evolving neoantigen profiles in colorectal cancers with DNA repair defects. *Genome Med.* 2019;11:42.
160. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1506–12.
161. Rajan A, Kim C, et al. Nivolumab, anti-programmed death-1 (PD-1) monoclonal antibody immunotherapy: role in advanced cancers. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(9):2219–31.
162. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):6958–62.
163. Scapin G, Yang X, et al. Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(12):953–8.
164. Kumar S, Ghosh S, et al. Preclinical characterization of dostarlimab, a therapeutic anti-PD-1 antibody with potent activity to enhance immune function in in vitro cellular assays and in vivo animal models. *MAbs.* 2021;13(1):1954136.
165. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(3):727–42.
166. Azarov I, Helmlinger G, Kosinsky Y, Peskov K. Elaborating on anti CTLA-4 mechanisms of action using an agent-based modeling approach. *Front Appl Math Stat.* 2022;8:993581.
167. Wolchok JD, Saenger Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist.* 2008;13(Suppl 4):2–9.
168. André T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(23):2207–18.
169. S, Gricar J, Ledezne JM, Overman MJ, Lonardi S. First-line nivolumab plus low-dose ipilimumab for microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: the phase II CheckMate 142 study. *J Clin Oncol.* 2022 Jan 10;40(2):161-170.
170. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): results of an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18:1182–91.
171. Berton D, Banerjee SN, Curigliano G, et al. Antitumor activity of dostarlimab in patients with mismatch repair-deficient/microsatellite instability–high tumors: a combined analysis of two cohorts in the GARNET study. *J Clin Oncol.* 2021;39(15_suppl):2564.
172. Sillo TO, Beggs AD, Morton DG, Middleton G. Mechanisms of immunogenicity in colorectal cancer. *Br J Surg.* 2019;106(10):1283–97.
173. Dietmaier S, Lenz HJ, Van Cutsem E, Hofstädter F. Detection of microsatellite instability by real-time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest.* 2001;81(10):1453–6.

174. Kim N, Kim SM, Lee BJ, et al. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer patients with a plasma-based real-time PCR analysis. *Front Pharmacol*. 2021;12:758830.
175. Jang M, Kwon Y, Kim H, et al. Microsatellite instability test using peptide nucleic acid probe-mediated melting point analysis: a comparison study. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1218.
176. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:5248–57.
177. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002;123:1804–11.
178. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, et al. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*. 2010;5:e9393.
179. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of primary resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer with misdiagnosis of microsatellite instability or mismatch repair deficiency status. *JAMA Oncol*. 2019;5(4):551–5.
180. Niu B, Ye K, Zhang Q, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(7):1015–6.
181. Ratovomanana T, Cohen R, et al. Performance of next-generation sequencing for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer with deficient DNA mismatch repair. *Gastroenterology*. 2021;161(3):814–26.e7.
182. Johansen AFB, Kassentoft CG, Knudsen M, et al. Validation of computational determination of microsatellite status using whole exome sequencing data from colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2019;19(1):971.
183. Kautto EA, Bonneville R, Miya J, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget*. 2017;8:7452–63.
184. da Silva SIO, Domingos TA, Kupper BEC, De Brot L, Aguiar Junior S, Carraro DM, Torrezan GT. Amplicon-based NGS test for assessing MLH1 promoter methylation and its correlation with BRAF mutation in colorectal cancer patients. *Exp Mol Pathol*. 2023 Apr;130:104855.
185. Wang J, Li R, Li J, Yi Y, Liu X, Chen J, Zhang H, Lu J, Li C, Wu H, Liang Z. Comprehensive analysis of oncogenic fusions in mismatch repair deficient colorectal carcinomas by sequential DNA and RNA next generation sequencing. *J Transl Med*. 2021 Oct 17;19(1):433.
186. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002;20:1043–1048.
187. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Nov 15;8(11):20988–21000.
188. Hu H, Cai W, Wu D, et al. Ultra-mutated colorectal cancer patients with POLE driver mutations exhibit distinct clinical patterns. *Cancer Med*. 2021 Jan;10(1):135–142.
189. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(20):3219–3226.

190. Taieb J, Shi Q, Pederson L, Alberts S, et al. Prognosis of microsatellite instability and/or mismatch repair deficiency stage III colon cancer patients after disease recurrence following adjuvant treatment: results of an ACCENT pooled analysis of seven studies. *Ann Oncol.* 2019 Sep 1;30(9):1466-1471.
191. Diaz LA Jr, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomized, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2022 May;23(5):659-670.
192. Yoshino T, Andre T, Kim TW, et al. Pembrolizumab in Asian patients with microsatellite-instability-high/mismatch-repair-deficient colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2023 Mar;114(3):1026-1036.
193. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol.* 2020 Jan 1;38(1):11-19.
194. O'Neil BH, Wallmark JM, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One.* 2017 Dec 28;12(12):e0189848.
195. Haag GM, Springfield C, Grün B, Apostolidis L, Zschäbitz S, Dietrich M, Berger AK, Weber TF, Zoernig I, Schaaf M, Waberer L, Müller DW, Al-Batran SE, Halama N, Jaeger D. Pembrolizumab and maraviroc in refractory mismatch repair proficient/microsatellite-stable metastatic colorectal cancer - The PICCASSO phase I trial. *Eur J Cancer.* 2022 May;167:112-122.
196. Kuang C, Park Y, Augustin RC, Lin Y, Hartman DJ, Seigh L, Pai RK, Sun W, Bahary N, Ohr J, Rhee JC, Marks SM, Beasley HS, Shuai Y, Herman JG, Zarour HM, Chu E, Lee JJ, Krishnamurthy A. Pembrolizumab plus azacitidine in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer: a single-arm phase 2 trial and correlative biomarker analysis. *Clin Epigenetics.* 2022 Jan 6;14(1):3.
197. Fountzilas C, Bajor DL, Mukherjee S, Saltzman J, Witkiewicz AK, Maguire O, Minderman H, Nambiar R, Rosenheck HR, Knudsen ES, Muhitch JB, Abrams SI, Wang C, Hutson AD, Attwood K, Hicks KA, Jurcevic JA, Kalinski P, Iyer R, Boland PM. Phase Ib/II Study of Cetuximab plus Pembrolizumab in Patients with Advanced RAS Wild-Type Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2021 Dec 15;27(24):6726-6736.
198. Kim DW, Tan E, Zhou JM, Schell MJ, Martinez M, Yu J, Carballido E, Mehta R, Strosberg J, Imanirad I, Kim RD. A phase 1/2 trial of ibrutinib in combination with pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2021 May;124(11):1803-1808.
199. Yarchoan M, Huang CY, Zhu Q, Ferguson AK, Durham JN, Anders RA, Thompson ED, Rozich NS, Thomas DL 2nd, Nauroth JM, Rodriguez C, Osipov A, De Jesus-Acosta A, Le DT, Murphy AG, Laheru D, Donehower RC, Jaffee EM, Zheng L, Azad NS. A phase 2 study of GVAX colon vaccine with cyclophosphamide and pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient advanced colorectal cancer. *Cancer Med.* 2020 Feb;9(4):1485-1494.
200. Kim RD, Kovari BP, et al. A phase I/Ib study of regorafenib and nivolumab in mismatch repair proficient advanced refractory colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2022 Jul;169:93-102.

201. Khan M, Du K, Ai M, Wang B, Lin J, Ren A, Chen C, Huang Z, Qiu W, Yuan Y, Tian Y. PD-L1 expression as biomarker of efficacy of PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in metastatic triple negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2023 Mar 6;14:1060308.
202. Dolled-Filhart M, Locke D, Murphy T, et al. Development of a prototype immunohistochemistry assay to measure programmed death ligand-1 expression in tumor tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:1259–1266.
203. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677–704.
204. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–264.
205. Shan T, Chen S, Wu T, Yang Y, Li S, Chen X. PD-L1 expression in colon cancer and its relationship with clinical prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 May 1;12(5):1764-1769.
206. Noh BJ, Kwak JY, Eom DW. Immune classification for the PD-L1 expression and tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2020;20:58.
207. Wang HB, Yao H, Li CS, Liang LX, Zhang Y, Chen YX, Fang JY, Xu J. Rise of PD-L1 expression during metastasis of colorectal cancer: Implications for immunotherapy. *J Dig Dis*. 2017;18:574–581.
208. Li Y, He M, Zhou Y, Yang C, Wei S, Bian X, Christopher O, Xie L. The prognostic and clinicopathological roles of PD-L1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol*. 2019 Feb 28;10:139.
209. Li Y, Liang L, Dai W, Cai G, Xu Y, Li X, Li Q, Cai S. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2016 Aug 24;15(1):55.
210. Drieser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, Zlobec I, Eppenberger-Castori S, Tzankov A, Rosso R, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49:2233–2242.
211. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500:415–421.
212. Brown SD, Warren RL, et al. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res*. 2014;24:743–750.
213. Buttner R, Longshore JW, Lopez-Rios F, Merkelbach-Bruse S, Normanno N, Rouleau E, Penault-Llorca F. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements. *ESMO Open*. 2019;4:e000442.
214. Fenizia F, Wolstenholme N, et al. Tumor mutation burden testing: a survey of the International Quality Network for Pathology (IQN Path). *Virchows Arch*. 2021 Dec;479(6):1067-1072.
215. U.S. Food & Drug Administration. Package Insert. Pembrolizumab injection for intravenous use. 2022. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/125514s133lbl.pdf. Accessed February 10, 2023.
216. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker

- analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* 2020;21:1353-1365.
217. Meiri E, Garrett-Mayer E, Halabi S, et al. Pembrolizumab (P) in patients (Pts) with colorectal cancer (CRC) with high tumor mutational burden (HTMB): Results from the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study [abstract]. *J Clin Oncol.* 2020;38:133.
 218. Hogg M, Johansson E. DNA polymerase ϵ . *Subcell Biochem.* 2012;62:237-57. doi: 10.1007/978-94-007-4572-8_13. PMID: 22918589.
 219. Rayner E, van Gool IC, Palles C, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(2):71-81.
 220. Hu H, Cai W, Wu D, et al. Ultra-mutated colorectal cancer patients with POLE driver mutations exhibit distinct clinical patterns. *Cancer Med.* 2021 Jan;10(1):135-142.
 221. Li HD, Cuevas I, Zhang M, et al. Polymerase-mediated ultramutagenesis in mice produces diverse cancers with high mutational load. *J Clin Invest.* 2018;128(9):4179-4191.
 222. Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, Mazzarella L. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges. *J Immunother Cancer.* 2019;7:183.
 223. Wang F, Zhao Q, Wang YN, et al. Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types. *JAMA Oncol.* 2019;5(10):1504.
 224. Domingo E, Freeman-Mills L, et al. Somatic POLE proofreading domain mutation, immune response, and prognosis in colorectal cancer: a retrospective, pooled biomarker study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2016 Nov;1(3):207-216.
 225. Hino H, Shiomi A, Kusuhara M, et al. Clinicopathological and mutational analyses of colorectal cancer with mutations in the POLE gene. *Cancer Med.* 2019 Aug;8(10):4587-4597.
 226. Taieb J, Karoui M, Basile D. How I treat stage II colon cancer patients. *ESMO Open.* 2021 Aug;6(4):100184.
 227. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2018 Mar 29;378(13):1177-1188.
 228. van Rooijen KL, Derksen JWG, Verkooijen HM, et al. Translation of IDEA trial results into clinical practice: Analysis of the implementation of a new guideline for colon cancer. *Int J Cancer.* 2022 Oct 15;151(8):1270-1279.
 229. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021 Jan;22(1):29-42.
 230. Conroy T, Bosset JF, Etienne PL, et al. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX and preoperative chemoradiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer (UNICANCER-PRODIGE 23): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021;22:702-715.
 231. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(1):61-69.
 232. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncol Immunology.* 2014;3(9):e955691.

233. Gebremeskel S, Johnston B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget*. 2015;6(39).
234. Wang Q, Ju X, Wang J, Fan Y, Ren M, Zhang H. Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies. *Cancer Lett*. 2018;438:17-23.
235. Zhou J, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med*. 2019;23(8):4854-4865.
236. Howe C, Garstka M, Al-Balushi M, et al. Calreticulin-dependent recycling in the early secretory pathway mediates optimal peptide loading of MHC class I molecules. *EMBO J*. 2009;28(23):3730-3744.
237. Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, Del Cid N. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol*. 2013;34(1):13-21.
238. Wijeyesakere S, Bedi S, Huynh D, Raghavan M. The C-Terminal Acidic Region of Calreticulin Mediates Phosphatidylserine Binding and Apoptotic Cell Phagocytosis. *J Immunol*. 2016;196(9):3896-3909.
239. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007;13(1):54-61.
240. Zhang J, Han X, Lin Y. Dissecting the regulation and function of ATP at the single-cell level. *PLoS Biol*. 2018;16(12):e3000095.
241. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*. 2009;15(10):1170-1178.
242. Michaud M, Sukkurwala AQ, Martins I, et al. An autophagy-dependent anticancer immune response determines the efficacy of melanoma chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2014;3(4):e944047.
243. He SJ, Cheng J, Feng X, et al. The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(38):64534-64550.
244. Bell CW, Jiang W, Reich CF, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(6):C1318-C1325.
245. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-342.
246. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol*. 2006;176(1):12-15.
247. Shiratsuchi A, Rose DM, Whitlock BB, et al. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol*. 2004;172(4):2039-2047.
248. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13(9):1050-1059.
249. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, et al. eIF2 α phosphorylation as a biomarker of immunogenic cell death. *Semin Cancer Biol*. 2015;33:86-93.

250. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6):670-684.
251. Ito A, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol Immunother.* 2001;50(10):515-522.
252. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 2005;123(2):321-334.
253. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* 2012;31(5):1062-1079.
254. Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, et al. Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and β 2 integrins. *J Biol Chem.* 2012;287(17):13731-13742.
255. Sprooten J, Laureano RS, et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in oncology. *Oncoimmunology.* 2023;12(1):2219591.
256. Rodrigues MC, Morais JAV, Ganassin R, Oliveira GRT, Costa FC, Morais AAC, Silveira AP, Silva VCM, Longo JPF, Muehlmann LA. An overview on immunogenic cell death in cancer biology and therapy. *Pharmaceutics.* 2022;14(1):14.
257. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene.* 2010;29(4):482-491.
258. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13(1):54-61.
259. Chang CL, Hsu YT, Wu CC, et al. Immune mechanism of the antitumor effects generated by bortezomib. *J Immunol.* 2012;189(6):3209-3220.
260. Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, et al. Cocksackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2012;72(10):2609-2621.
261. Sanovic R, Verwanger T, Hartl A, Krammer B. Low dose hypericin-PDT induces complete tumor regression in BALB/c mice bearing CT26 colon carcinoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011;8(4):291-296.
262. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 2009;28(5):578-590.
263. Pozzi C, Cuomo A, et al. The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nat Med.* 2016;22(6):624-631.
264. Chang X, Bian M, Liu L, Yang J, Yang Z, Wang Z, Lu Y, Liu W. Induction of immunogenic cell death by novel platinum-based anticancer agents. *Pharmacol Res.* 2022;187:106556.
265. Limagne E, Thibaudin M, Nuttin L, et al. Trifluridine/Tipiracil plus Oxaliplatin improves PD-1 blockade in colorectal cancer by inducing immunogenic cell death and depleting macrophages. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(12):1958-1969.
266. Wang W, Wu L, Zhang J, Wu H, Han E, Guo Q. Chemoimmunotherapy by combining oxaliplatin with immune checkpoint blockades reduced tumor burden in colorectal cancer animal model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(1):1-7.

267. Grasselly C, Denis M, Bourguignon A, et al. The antitumor activity of combinations of cytotoxic chemotherapy and immune checkpoint inhibitors is model-dependent. *Front Immunol.* 2018;9:2100.
268. Liu P, Chen J, Zhao L, Hollebecque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. PD-1 blockade synergizes with oxaliplatin-based, but not cisplatin-based, chemotherapy of gastric cancer. *Oncoimmunology.* 2022;11:2093518.
269. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2021;398(10294):27-40.
270. Clynes R. Antitumor antibodies in the treatment of cancer: Fc receptors link opsonic antibody with cellular immunity. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2006;20(4):585-612.
271. Kalergis AM, Ravetch JV. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195(12):1653-1659.
272. Correale P, Botta C, Cusi MG, et al. Cetuximab ± chemotherapy enhances dendritic cell-mediated phagocytosis of colon cancer cells and ignites a highly efficient colon cancer antigen-specific cytotoxic T-cell response in vitro. *Int J Cancer.* 2012;130(7):1577-1589.
273. Herter S, Birk MC, Klein C, Gerdes C, Umana P, Bacac M. Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol.* 2014;192(5):2252-2260.
274. García-Foncillas J, Sunakawa Y, Aderka D, et al. Distinguishing features of cetuximab and panitumumab in colorectal cancer and other solid tumors. *Front Oncol.* 2019;9:849.
275. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, et al. Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences antitumor cellular immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22(21):5229-5237.
276. Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, et al. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol.* 2010;184(1):512-520.
277. Xu Q, Chen C, Chen G, Chen W, Zhou D, Xie Y. Significance of calreticulin as a prognostic factor in endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(6):8999-9008.
278. Fucikova J, Becht E, Iribarren K, Goc J, Remark R, Damotte D, Alifano M, Devi P, Biton J, Germain C, et al. Calreticulin expression in human non-small cell lung cancers correlates with increased accumulation of antitumor immune cells and favorable prognosis. *Cancer Res.* 2016;76(7):1746-1756.
279. Vaksman O, Davidson B, Tropé C, Reich R. Calreticulin expression is reduced in high-grade ovarian serous carcinoma effusions compared with primary tumors and solid metastases. *Hum Pathol.* 2013;44(12):2677-2683.
280. Du XL, Hu H, Lin DC, Xia SH, Shen XM, Zhang Y, Luo ML, Feng YB, Cai Y, Xu X, et al. Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl).* 2007;85(9):863-875.

281. Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, Kuo ML, Chen CN, Lai DM, Hsieh LJ, Wang BT, Tsao PN, Lee H, et al. Calreticulin expression in neuroblastoma—a novel independent prognostic factor. *Ann Oncol*. 2005;16(2):314-321.
282. You SY, Rui W, Chen ST, Chen HC, Liu XW, Huang J, Chen HY. Process of immunogenic cell death caused by disulfiram as the anti-colorectal cancer candidate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;513(4):891-897.
283. Combès E, Andrade AF, Tosi D, et al. Inhibition of Ataxia-Telangiectasia Mutated and RAD3-Related (ATR) Overcomes Oxaliplatin Resistance and Promotes Antitumor Immunity in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(11):2933-2946.
284. He C, Duan X, Guo N, Chan C, Poon C, Weichselbaum RR, Lin W. Core-shell nanoscale coordination polymers combine chemotherapy and photodynamic therapy to potentiate checkpoint blockade cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2016;7:12499.
285. Schaer DA, Geeganage S, et al. The Folate Pathway Inhibitor Pemetrexed Pleiotropically Enhances Effects of Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(23):7175-7188.
286. Qin J, Kunda NM, Qiao G, et al. Vaccination With Mitoxantrone-Treated Primary Colon Cancer Cells Enhances Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Clinical Responses in Colorectal Liver Metastases. *J Surg Res*. 2019;233:57-64.
287. Cirone M, Lotti LV, Granato M, et al. Sourcing the immune system to induce immunogenic cell death in Kras-colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2019;121(9):768-775.
288. Vancsik T, Kovago C, Kiss E, Papp E, Forika G, Benyo Z, Meggyeshazi N, Krenacs T. Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *J Cancer*. 2018;9(1):41-53.
289. Laengle J, Stift J, Bilecz A, Wolf B, Beer A, et al. DNA damage predicts prognosis and treatment response in colorectal liver metastases superior to immunogenic cell death and T cells. *Theranostics*. 2018;8(12):3198-3213.
290. Aoto K, Mimura K, Okayama H, et al. Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2017;39(1):151-159.
291. Lau TS, Chan LKY, Man GCW, et al. Paclitaxel Induces Immunogenic Cell Death in Ovarian Cancer via TLR4/IKK2/SNARE-Dependent Exocytosis. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(8):1099-1111.
292. Xie L, Xia L, Klaiber U, et al. Effects of neoadjuvant FOLFIRINOX and gemcitabine-based chemotherapy on cancer cell survival and death in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2019;10(68):7276-7287.
293. Kang R, Xie Y, Zhang Q, et al. Intracellular HMGB1 as a novel tumor suppressor of pancreatic cancer. *Cell Res*. 2017;27(7):916-932.
294. Huang CY, Chiang SF, et al. Cytosolic high-mobility group box protein 1 (HMGB1) and/or PD-1+ TILs in the tumor microenvironment may be contributing prognostic biomarkers for patients with locally advanced rectal cancer who have undergone neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(4):551-562.
295. Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, et al. Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2012;72(16):3967-3976.

296. Bains SJ, Abrahamsson H, et al. Immunogenic cell death by neoadjuvant oxaliplatin and radiation protects against metastatic failure in high-risk rectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(3):355-364.
297. Exner R, Sachet M, et al. Prognostic value of HMGB1 in early breast cancer patients under neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Med.* 2016;5(9):2350-2358.
298. Arnold T, Michlmayr A, et al. Plasma HMGB-1 after the initial dose of epirubicin/docetaxel in cancer. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(3):286-291.
299. Tanabe Y, Tsuda H, et al. Pathological features of triple-negative breast cancers that showed progressive disease during neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Sci.* 2017;108(7):1520-1529.
300. Tavassol F, Kokemüller H, et al. Effect of neoadjuvant chemoradiation and postoperative radiotherapy on expression of heat shock protein 70 (HSP70) in head and neck vessels. *Radiat Oncol.* 2011;6:81.
301. Ji F, Lv R, Zhao T. A correlation analysis between tumor imaging changes and p-AKT and HSP70 expression in tumor cells after osteosarcoma chemotherapy. *Oncol Lett.* 2017;14(6):6749-6753.
302. Farkas R, Pozsgai E, et al. Correlation between tumor-associated proteins and response to neoadjuvant treatment in patients with advanced squamous-cell esophageal cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(5):1769-1775.
303. Bria E, Furlanetto J, et al. Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: heat shock protein 90 overexpression, Ki67 proliferative index, and topoisomerase II- α co-amplification as predictors of pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab and docetaxel. *Clin Breast Cancer.* 2015;15(1):16-23.
304. Nadin SB, Sottile ML, et al. Prognostic implication of HSPA (HSP70) in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19(4):493-505.
305. Pires LA, Hegg R, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(6):557-564.
306. Lanki M, Seppänen H, Mustonen H, Hagström J, Haglund C. Toll-like receptor 1 predicts favorable prognosis in pancreatic cancer. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219245.
307. Economopoulou P, Koutsodontis G, Strati A, Kirodimos E, Giotakis E, Maragoudakis P, Prikas C, Papadimitriou N, Perisanidis C, et al. Surrogates of immunologic cell death (ICD) and chemoradiotherapy outcomes in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Oral Oncol.* 2019;94:93-100.
308. Stoetzer OJ, Fersching DM, Salat C, et al. Circulating immunogenic cell death biomarkers HMGB1 and RAGE in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy. *Tumour Biol.* 2013;34(1):81-90.
309. Inoue Y, Hazama S, Suzuki N, et al. Cetuximab strongly enhances immune cell infiltration into liver metastatic sites in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2017;108(3):455-460.
310. Benkhelifa S, Rafa H, et al. Aberrant up-regulation of iNOS/NO system is correlated with an increased abundance of Foxp3+ cells and reduced effector/memory cell markers expression during colorectal cancer: immunomodulatory effects of cetuximab combined with chemotherapy. *Inflammopharmacology.* 2019;27(4):685-700.

311. Jie HB, Schuler PJ, Lee SC, et al. CTLA-4⁺ regulatory T cells increased in cetuximab-treated head and neck cancer patients suppress NK cell cytotoxicity and correlate with poor prognosis. *Cancer Res.* 2015;75(11):2200-2210.
312. Maréchal R, De Schutter J, et al. Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 2010;10:340.
313. Wang L, Wei Y, Fang W, Lu C, Chen J, Cui G, Diao H. Cetuximab enhanced the cytotoxic activity of immune cells during treatment of colorectal cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(3):1038-1050.
314. Nabholz JM, Abrial C, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1570-1577.
315. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
316. Allen BM, Hiam KJ, Burnett CE, Venida A, DeBarge R, TenVooren I, Marquez DM, Cho NW, Carmi Y, Spitzer MH. Systemic dysfunction and plasticity of the immune macroenvironment in cancer models. *Nat Med.* 2020;26(7):1125-1134.
317. Thommen DS, Schumacher TN. T cell dysfunction in cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(4):547-562.
318. Pruneri G, Vingiani A, Denkert C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *Breast.* 2018;37:207-214.
319. Whitford P, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocyte activation and tumour cell MHC class I and II expression in breast cancer patients. *Cancer Lett.* 1992;61(2):157-164.
320. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2873-2892.
321. Whiteside TL. Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S272-S283.
322. Fregni G, Perier A, Avril MF, Caignard A. NK cells sense tumors, course of disease and treatments: consequences for NK-based therapies. *Oncoimmunology.* 2012;1(1):38-47.
323. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2021;124(2):359-367.
324. Poncette L, Bluhm J, Blankenstein T. The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors. *Curr Opin Immunol.* 2022;74:18-24.
325. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunity.* 2017;47(5):820-833.
326. Vacca P, Munari E, Tumino N, Moretta F, Pietra G, Vitale M, et al. Human natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer: friends or foes? *Immunol Lett.* 2018;201:14-19.
327. Brazin KN, Mallis RJ, Das DK, Feng Y, Hwang W, Wang JH, et al. Structural features of the $\alpha\beta$ TCR mechanotransduction apparatus that promote pMHC discrimination. *Front Immunol.* 2015;6:441.
328. Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(11):1023–1033.
329. Ngoenkam J, Schamel WW, Pongcharoen S. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor-CD3 complex. *Immunology.* 2018;153(1):42–50.

330. Garcia KC, Scott CA, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature*. 1996;384(6605):577–581.
331. Gao G, Tormo J, Gerth U, et al. Crystal structure of the complex between CD8 alpha-alpha and HLA-A2. *Nature*. 1997;387(6633):630–634.
332. Williams CM, Schonnesen AA, et al. Normalized synergy predicts that CD8 co-receptor contribution to T cell receptor (TCR) and pMHC binding decreases as TCR affinity increases in human viral-specific T cells. *Front Immunol*. 2017;8:894.
333. Bettini ML, Guy C, Dash P et al. Membrane association of the CD3ε signaling domain is required for optimal T cell development and function. *J Immunol*. 2014;193(1):258–267.
334. Furlan G, Minowa T, Hanagata N, Kataoka-Hamai C, Kaizuka Y. Phosphatase CD45 both positively and negatively regulates T cell receptor phosphorylation in reconstituted membrane protein clusters. *J Biol Chem*. 2014;289(41):28514–28525.
335. Zumerle S, Molon B, Viola A. Membrane rafts in T cell activation: a spotlight on CD28 costimulation. *Front Immunol*. 2017;8:1467.
336. Basu R, Whitlock BM, Husson J et al. Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing. *Cell*. 2016;165(1):100–110.
337. Gordy C, He YW. Endocytosis by target cells: an essential means for perforin- and granzyme-mediated killing. *Cell Mol Immunol*. 2012;9(1):5–6.
338. Fu Q, Fu TM, Cruz AC et al. Structural basis and functional role of intramembrane trimerization of the Fas/CD95 death receptor. *Mol Cell*. 2016;61(4):602–613.
339. Hendry S, Salgado R, et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235–251.
340. Khazen R, Müller S, Gaudenzio N, Espinosa E, Puissegur MP, Valitutti S. Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat Commun*. 2016;7:10823.
341. Dornmair K, Goebels N, Weltzien HU, Wekerle H, Hohlfield R. T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *Am J Pathol*. 2003;163(4):1215–1226.
342. Shevchenko I, Bazhin AV. Metabolic checkpoints: novel avenues for immunotherapy of cancer. *Front Immunol*. 2018;9:1816.
343. Wang E, Shibutani M, et al. Abundant intratumoral fibrosis prevents lymphocyte infiltration into peritoneal metastases of colorectal cancer. *PLoS One*. 2021;16(7):e0255049.
344. Vodnala SK, Eil R, Kishton RJ, et al. T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. *Science*. 2019;363(6434):eaau0135.
345. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727–742.
346. Joller N, Kuchroo VK. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;410:127–156.
347. Amatore F, Gorvel L, Olive D. Inducible co-stimulator (ICOS) as a potential therapeutic target for anti-cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(4):343–351.

348. Bethmann D, Feng Z, Fox BA. Immunoprofiling as a predictor of patient's response to cancer therapy—promises and challenges. *Curr Opin Immunol*. 2017;45:60–72.
349. Grywalska E, Pasiarski M, Góźdz S, Roliński J. Immune-checkpoint inhibitors for combating T-cell dysfunction in cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:6505–6524.
350. Angelosanto JM, Blackburn SD, Crawford A, Wherry EJ. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J Virol*. 2012;86(15):8161–8170.
351. Li H, van der Leun AM, Yofe I et al. Dysfunctional CD8 T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma. *Cell*. 2019;176(4):775–789.
352. Spits H, Artis D, Colonna M et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):145–149.
353. Kanno Y, Vahedi G, Hirahara K, Singleton K, O'Shea JJ. Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:707–731.
354. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646–655.
355. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(3):274–280.
356. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:317–334.
357. Reiner SL, Sallusto F, Lanzavecchia A. Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*. 2007;317(5834):622–625.
358. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529–542.
359. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17(10):1290–1297.
360. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708–712.
361. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 2001;410(6824):101–105.
362. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol*. 2009;10(5):524–530.
363. Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrancois L, Farber DL. Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J Immunol*. 2011;187(11):5510–5514.
364. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:443–473.
365. Zhang B, Kracker S, Yasuda T et al. Immune surveillance and therapy of lymphomas driven by Epstein-Barr virus protein LMP1 in a mouse model. *Cell*. 2012;148(5):739–751.

366. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS et al. Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med*. 2010;207(2):637–650.
367. Bogen B, Fauskanger M, Haabeth OA, et al. CD4⁺ T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68:1865–73.
368. Haabeth OAW, Hennig K, Fauskanger M, et al. CD4⁺ T-cell killing of multiple myeloma cells is mediated by resident bone marrow macrophages. *Blood Adv*. 2020;4:2595–2605.
369. Kammertoens T, Friese C, et al. Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature*. 2017;545:98–102.
370. Braumüller H, Wieder T, Brenner E, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 2013;494:361–5.
371. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, et al. CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18:635–47.
372. Schietinger A, Philip M, Liu RB, et al. Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the effector phase. *J Exp Med*. 2010;207:2469–77.
373. Bos R, Sherman LA. CD4⁺ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8⁺ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010;70:8368–77.
374. Arina A, Karrison T, Galka E, et al. Transfer of allogeneic CD4⁺ T cells rescues CD8⁺ T cells in anti-PD-L1-resistant tumors leading to tumor eradication. *Cancer Immunol Res*. 2017;5:127–36.
375. Duggleby R, Danby RD, Madrigal JA, et al. Clinical Grade Regulatory CD4⁺ T Cells (Tregs): Moving Toward Cellular-Based Immunomodulatory Therapies. *Front Immunol*. 2018;9:252.
376. Jarvis LB, Matyszak MK, Duggleby RC, et al. Autoreactive human peripheral blood CD8⁺ T cells with a regulatory phenotype and function. *Eur J Immunol*. 2005;35:2896–908.
377. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531–64.
378. Dinesh RK, Skaggs BJ, La Cava A, et al. CD8⁺ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmun Rev*. 2010;9:560–8.
379. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330–6.
380. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057–61.
381. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27:20–1.
382. Takahashi T, Kuniyasu Y, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998;10:1969–80.
383. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188:287–96.
384. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118:240–9.

385. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;175:4180–3.
386. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:1206–12.
387. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:762–74.
388. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol.* 2011;12:870–8.
389. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, et al. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34:2480–8.
390. Sitrin J, Ring A, Garcia KC, et al. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *J Exp Med.* 2013;210:1153–65.
391. Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, et al. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med.* 2013;210:1167–78.
392. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194:629–44.
393. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005;202:1075–85.
394. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* 2006;25:455–71.
395. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8:931–41.
396. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450:566–9.
397. Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 2006;7:83–92.
398. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, et al. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 2006;177:6780–6.
399. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204:1257–65.
400. Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007;204:1303–10.
401. Saleh R, Elkord E. Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer Lett.* 2019;457:168–79.
402. Burchell JT, Strickland DH, Stumbles PA. The role of dendritic cells and regulatory T cells in the regulation of allergic asthma. *Pharmacol Ther.* 2010;125:1–10.

403. Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*. 2013;39:61–73.
404. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167:1245–53.
405. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci Transl Med*. 2013;5:200ra116.
406. Williams JB, Horton BL, Zheng Y, et al. The EGR2 targets LAG-3 and 4-1BB describe and regulate dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med*. 2017;214:381–400.
407. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59:3128–33.
408. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163:5211–5218.
409. Tada Y, Togashi Y, Kotani D, et al. Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*. 2018;6:106.
410. Saito T, Nishikawa H, Wada H, et al. Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016;22:679–684.
411. Salama P, Phillips M, Grieu F, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:186–192.
412. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 2006;12:465–472.
413. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 2006;107:2866–2872.
414. Kim JH, Kim BS, Lee SK. Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. *Immune Netw*. 2020 Feb 11;20(1):e4.
415. Gögenur M, Balsevicius L, et al. Neoadjuvant intratumoral influenza vaccine treatment in patients with proficient mismatch repair colorectal cancer leads to increased tumor infiltration of CD8+ T cells and upregulation of PD-L1: a phase 1/2 clinical trial. *J Immunother Cancer*. 2023 May;11(5):e006774.
416. Davis EJ, Martin-Liberal J, et al. First-in-human phase I/II, open-label study of the anti-OX40 agonist INCAGN01949 in patients with advanced solid tumors. *J Immunother Cancer*. 2022 Oct;10(10):e004235.
417. Hubbard JM, Tőke ER, et al. Safety and Activity of PolyPEPI1018 Combined with Maintenance Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: an Open-Label, Multicenter, Phase Ib Study. *Clin Cancer Res*. 2022 Jul 1;28(13):2818-2829.
418. Jary M, Liu WW, Yan D, et al. Immune microenvironment in patients with mismatch-repair-proficient oligometastatic colorectal cancer exposed to chemotherapy: the randomized MIROX GERCOR cohort study. *Mol Oncol*. 2022 Jun;16(11):2260-2273.
419. Kawazoe A, Itahashi K, et al. TAS-116 (Pimipib), an Oral HSP90 Inhibitor, in Combination with Nivolumab in Patients with Colorectal Cancer and Other Solid Tumors: An Open-Label,

- Dose-Finding, and Expansion Phase Ib Trial (EPOC1704). *Clin Cancer Res.* 2021 Dec 15;27(24):6709-6715.
420. Cousin S, Cantarel C, Guegan JP, et al. Regorafenib-Avelumab Combination in Patients with Microsatellite Stable Colorectal Cancer (REGOMUNE): A Single-arm, Open-label, Phase II Trial. *Clin Cancer Res.* 2021 Apr 15;27(8):2139-2147.
 421. Liao P, Song K, et al. Propranolol Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Through Simultaneously Activating Autologous CD8+ T Cells and Inhibiting Tumor AKT/MAPK Pathway. *Clin Pharmacol Ther.* 2020 Sep;108(3):606-615.
 422. Toor SM, Murshed K, et al. Immune Checkpoints in Circulating and Tumor-Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in Colorectal Cancer Patients. *Front Immunol.* 2019 Dec 17;10:2936.
 423. Glaire MA, Domingo E, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes and colorectal cancer recurrence by tumour and nodal stage. *Br J Cancer.* 2019 Sep;121(6):474-482.
 424. Lim SH, Chua W, et al. Effect of neoadjuvant chemoradiation on tumor-infiltrating/associated lymphocytes in locally advanced rectal cancers. *Anticancer Res.* 2014 Nov;34(11):6505-13.
 425. Reissfelder C, Stamova S, et al. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *J Clin Invest.* 2015 Feb;125(2):739-51.
 426. Correale P, Rotundo MS, et al. Tumor infiltration by T lymphocytes expressing chemokine receptor 7 (CCR7) is predictive of favorable outcome in patients with advanced colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012 Feb 1;18(3):850-7.
 427. Suzuki H, Chikazawa N, et al. Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 May;59(5):653-61.
 428. Saberzadeh-Ardestani B, Foster NR, Lee HE, et al. Association of tumor-infiltrating lymphocytes with survival depends on primary tumor sidedness in stage III colon cancers (NCCTG N0147 [Alliance]). *Ann Oncol.* 2022 Nov;33(11):1159-1167.
 429. Liang YJ, Chen QY, et al. A phase II randomised controlled trial of adjuvant tumour-infiltrating lymphocytes for pretreatment Epstein-Barr virus DNA-selected high-risk nasopharyngeal carcinoma patients. *Eur J Cancer.* 2023 Sep;191:112965.
 430. Hall MS, Mullinax JE, Cox CA, et al. Combination Nivolumab, CD137 Agonism, and Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2022 Dec 15;28(24):5317-5329.
 431. Stenmark Tullberg A, et al. Combining histological grade, TILs, and the PD-1/PD-L1 pathway to identify immunogenic tumors and de-escalate radiotherapy in early breast cancer: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *J Immunother Cancer.* 2023 May;11(5):e006618.
 432. Futamura M, Ishihara K, et al. Neoadjuvant chemotherapy using nanoparticle albumin-bound paclitaxel plus trastuzumab and pertuzumab followed by epirubicin and cyclophosphamide for operable HER2-positive primary breast cancer: a multicenter phase II clinical trial (PerSeUS-BC04). *Breast Cancer.* 2023 Mar;30(2):293-301.
 433. Matikas A, Johansson H, et al. Survival Outcomes, Digital TILs, and On-treatment PET/CT During Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer: Results from the Randomized PREDIX HER2 Trial. *Clin Cancer Res.* 2023 Feb 1;29(3):532-540.

434. Kolberg-Liedtke C, Feuerhake F, et al. Impact of stromal tumor-infiltrating lymphocytes (sTILs) on response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative early breast cancer in the WSG-ADAPT TN trial. *Breast Cancer Res.* 2022 Sep 2;24(1):58.
435. Fernandez-Martinez A, Pascual T, et al. Prognostic and Predictive Value of Immune-Related Gene Expression Signatures vs Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Early-Stage ERBB2/HER2-Positive Breast Cancer: A Correlative Analysis of the CALGB 40601 and PAMELA Trials. *JAMA Oncol.* 2023 Apr 1;9(4):490-499.
436. Liu DHW, Kim YW, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and survival after adjuvant chemotherapy in patients with gastric cancer: post-hoc analysis of the CLASSIC trial. *Br J Cancer.* 2023 Jun;128(12):2318-2325.
437. Smith JD, Ludwig ML, et al. Tumor immune microenvironment alterations using induction cetuximab in a phase II trial of deintensified therapy for p16-positive oropharynx cancer. *Head Neck.* 2023 May;45(5):1281-1287.
438. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jan 1;28(1):105-13.
439. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):259-71.
440. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol.* 2017 Sep;24(5):235-251.
441. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol.* 2017 Nov;24(6):311-335.
442. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25:1536–1543.
443. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20:2773–2782.
444. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science.* 2011;332(6030):687–696.
445. Mao Y, Qu Q, Chen X, et al. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11:e0152500.

446. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, et al. The Prognostic and Predicting Roles of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Open Breast Cancer J.* 2014;6:9–19.
447. Yu X, Zhang Z, Wang Z, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol.* 2016;18:497–506.
448. Qi W, Huang X, Wang J. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cell Immunol.* 2013;285:18–22.
449. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:545–553.
450. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):611–618.
451. Vinayak S, Gray RJ, Adams S, et al. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG0105. *J Clin Oncol.* 2014;32:5s.
452. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive and Triple-Negative Primary Breast Cancers. *J Clin Oncol.* 2015;33:983–991.
453. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, et al. Prospective Validation of Immunological Infiltrate for Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Negative Breast Cancer – A Substudy of the Neoadjuvant GeparQuinto Trial. *PLoS One.* 2013;8:e79775.
454. West NR, Milne K, Truong PT, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R126.
455. Cimino-Mathews A, Ye X, Meeker A, et al. Metastatic triple-negative breast cancers at first relapse have fewer tumor-infiltrating lymphocytes than their matched primary breast tumors: a pilot study. *Hum Pathol.* 2013;44:2055–2063.
456. Ogiya R, Niikura N, Kumaki N, et al. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2016;107:1730–1735.
457. Sobottka B, Pestalozzi B, Fink D, et al. Similar lymphocytic infiltration pattern in primary breast cancer and their corresponding distant metastases. *Oncoimmunology.* 2016;5:e1153208.
458. Baine MK, Turcu G, Zito CR, et al. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. *Oncotarget.* 2015;6:24990–25002.
459. Mansfield AS, Aubry MC, Moser JC, et al. Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Ann Oncol.* 2016;27:1953–1958.
460. Ben-Avi R, Tlzhaki O, Simansky D, et al. Metastatic Lung Lesions as a Preferred Resection Site for Immunotherapy With Tumor Infiltrating Lymphocytes. *J Immunother.* 2016;39:218–222.
461. Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, et al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol.* 2015;28:1535–1544.

462. Luen S, Salgado R, Fox SB, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol.* 2017;18:52–62.
463. Bienkowski M, Preusser M. Prognostic role of tumour-infiltrating inflammatory cells in brain tumours: literature review. *Curr Opin Neurol.* 2015;28:647–658.
464. Berghoff AS, Fuchs E, Ricken G, et al. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with extent of brain edema and overall survival time in patients with brain metastases. *Oncoimmunology.* 2016;5:e1057388.
465. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014;515:568–571.
466. Halama N, Michel S, Kloor M, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2011;71:5670–5677.
467. Kwak Y, Koh J, Kim D-W, et al. Immunoscore encompassing CD3+ and CD8+ T cell densities in distant metastasis is a robust prognostic marker for advanced colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7:81778–81790.
468. West NR, Panet-Raymond V, Truong PT, et al. Intratumoral Immune Responses Can Distinguish New Primary and True Recurrence Types of Ipsilateral Breast Tumor Recurrences (IBTR). *Breast Cancer (Auckl).* 2011;5:105–115.
469. MacCarty WC. Principles of prognosis in cancer. *JAMA.* 1931;96:30–33.
470. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014;232:199–209.
471. Nowak JA, Hornick JL. Molecular Evaluation of Colorectal Adenocarcinoma: Current Practice and Emerging Concepts. *Surg Pathol Clin.* 2016;9:427–439.
472. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2008;10:13–27.
473. Umar CA, Boland R, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:261–268.
474. Alexander J, Watanabe T, Wu T, et al. Histopathological Identification of Colon Cancer with Microsatellite Instability. *Am J Pathol.* 2001;158:527–535.
475. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, et al. Phenotype of Microsatellite Unstable Colorectal Carcinomas: Well-differentiated and Focally Mucinous Tumors and the Absence of Dirty Necrosis Correlate with Microsatellite Instability. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:563–570.
476. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are a Marker for Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma. *Cancer.* 2001;91:2417–2422.
477. Jenkins MA, Hayashi S, O’Shea AM, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology.* 2007;133:48–56.
478. Joost P, Bendahl P, Halvarsson B, et al. Efficient and reproducible identification of mismatch repair deficient colon cancer: validation of the MMR index and comparison with other predictive models. *BMC Clin Pathol.* 2013;13:33.

479. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015 Jul;16(7):30.
480. Glaire MA, Domingo E, Vermeulen L, et al. POLE proofreading domain mutation defines a subset of immunogenic colorectal cancers with excellent prognosis. *Ann Oncol*. 2016;27:4600.
481. Rozek LS, Schmit SL, Greenson JK, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn's-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108.
482. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1986;39:585–589.
483. Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41:2645–2654.
484. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Colorectal Cancer. *Arch Surg*. 2012;147:366–371.
485. Richards CH, Flegg KM, Roxburgh CS, et al. The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;106:2010–2015.
486. Richards CH, Roxburgh CS, Powell AG, et al. The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50:309–319.
487. Vayrynen JP, Vornanen JO, Sajanti S, et al. An improved image analysis method for cell counting lends credibility to the prognostic significance of T cells in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2012;460:455–465.
488. Park JH, McMillan DC, Edwards J, et al. Comparison of the prognostic value of measures of the tumor inflammatory cell infiltrate and tumor-associated stroma in patients with primary operable colorectal cancer. *Oncol Immunology*. 2016;5:e1098801.
489. Pagès F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2654–2666.
490. Galon J, Pages F, Marincola FM, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*. 2012;10:205.
491. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:5944–5951.
492. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 20;29(6):610–618.
493. Bibeau F, Galon J, Mlecnik B, et al. Validation of the immunescore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *J Clin Oncol*. 2016;34(suppl):abstr 3500.
494. Fang L, Yao Y, Guan X, et al. China special issue on gastrointestinal tumors-Regulatory-immunescore-A novel indicator to guide precision adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2023 Dec 1;153(11):1904–1915.
495. Akce M, Farran B, Switchenko JM, et al. Phase II trial of nivolumab and metformin in patients with treatment-refractory microsatellite stable metastatic colorectal cancer. *J Immunother Cancer*. 2023 Oct;11(10):e007235.

496. Monge C, Xie C, Myojin Y, et al. Phase I/II study of PexaVec in combination with immune checkpoint inhibition in refractory metastatic colorectal cancer. *J Immunother Cancer*. 2023 Feb;11(2):e005640.
497. Lemech C, Dredge K, Bampton D, et al. Phase Ib open-label, multicenter study of pixatimod, an activator of TLR9, in combination with nivolumab in subjects with microsatellite-stable metastatic colorectal cancer, metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma and other solid tumors. *J Immunother Cancer*. 2023 Jan;11(1):e006136.
498. Cho H, Kim JE, Hong YS, et al. Comprehensive evaluation of the tumor immune microenvironment and its dynamic changes in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy: From the phase II ADORE study. *Oncoimmunology*. 2022 Nov 23;11(1):2148374.
499. Gül MO, Akyüz C, Özkara S. The effect of immunonutrition on tumor infiltrative T lymphocytes and regulatory T cells in rectal tumor patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy: a prospective randomized clinical study. *Turk J Med Sci*. 2022 Aug;52(4):1058–1066.
500. Dagenborg VJ, Marshall SE, Yaqub S, et al. Neoadjuvant chemotherapy is associated with a transient increase of intratumoral T-cell density in microsatellite stable colorectal liver metastases. *Cancer Biol Ther*. 2020 May 3;21(5):432-440.
501. Antoniotti C, Borelli B, Rossini D, et al. AtezoTRIBE: a randomised phase II study of FOLFOXIRI plus bevacizumab alone or in combination with atezolizumab as initial therapy for patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2020 Jul 22;20(1):683.
502. Randrian V, Pernot S, Le Malicot K, et al. FFCD 1709-SIRTCl phase II trial: Selective internal radiation therapy plus Xelox, Bevacizumab and Atezolizumab in liver-dominant metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis*. 2022 Jul;54(7):857-863.
503. Ciardiello D, Famiglietti V, Napolitano S, et al. Final results of the CAVE trial in RAS wild type metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab plus avelumab as rechallenge therapy: Neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival. *Clin Colorectal Cancer*. 2022 Jun;21(2):141-148.
504. Chen EX, Jonker DJ, Loree JM, et al. Effect of Combined Immune Checkpoint Inhibition vs Best Supportive Care Alone in Patients With Advanced Colorectal Cancer: The Canadian Cancer Trials Group CO.26 Study. *JAMA Oncol*. 2020 Jun 1;6(6):831-838.
505. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 29;14(7):1732.
506. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci*. 2019;9:97.
507. Gonzalez RS, Cates JMM, Washington K. Associations among histological characteristics and patient outcomes in colorectal carcinoma with a mucinous component. *Histopathology*. 2019 Feb;74(3):406-414.

508. Gonzalez RS. Medullary carcinoma. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumormedullary.html>. Accessed June 2, 2024.
509. Saito Y, Fujiwara Y, Miyamoto Y, et al. CD169+ sinus macrophages in regional lymph nodes do not predict mismatch-repair status of patients with colorectal cancer. *Cancer Med*. 2023 May;12(9):10199-10211.
510. Gonzalez RS, Washington K, Shi C. Current applications of molecular pathology in colorectal carcinoma. *Appl Cancer Res*. 2017;37:13.
511. Iivanainen S, Koivunen JP. Possibilities of Improving the Clinical Value of Immune Checkpoint Inhibitor Therapies in Cancer Care by Optimizing Patient Selection. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):556.
512. Gupta G, Borglum K, Chen H. Immunogenic Cell Death: A Step Ahead of Autophagy in Cancer Therapy. *J Cancer Immunol (Wilmington)*. 2021;3(1):47-59.
513. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, et al. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*. 2017 Jul 18;47(1):15-31.
514. Nelson MA, Ngamcherdtrakul W, Luoh SW, et al. Prognostic and therapeutic role of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Jun;40(2):519-536.
515. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, et al. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer*. 2016 Jul;62:132-137.
516. Hayashi M, Inoue Y, Komeda K, et al. Clinicopathological analysis of recurrence patterns and prognostic factors for survival after hepatectomy for colorectal liver metastasis. *BMC Surg*. 2010;10:27.
517. Foxtrot Collaborative Group. Feasibility of preoperative chemotherapy for locally advanced, operable colon cancer: the pilot phase of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012;13:1152-1160.
518. Chen ML, Chen JY, Hu J, et al. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 Mar 1;11(3):1431-1438.
519. Bayle A, Basile D, Garinet S, et al. Next-Generation Sequencing Targeted Panel in Routine Care for Metastatic Colon Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 17;13(22):5750.
520. Li Y, Ma Y, Wu Z. Tumor Mutational Burden Predicting the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*. 2021 Sep 29;12:751407.
521. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*. 2021 Feb 16;325(7):669-685.
522. Gulack BC, Nussbaum DP, Keenan JE, et al. Surgical resection of the primary tumor in stage IV colorectal cancer without metastasectomy is associated with improved overall survival compared with chemotherapy/radiation therapy alone. *Dis Colon Rectum*. 2016;59:299-305.
523. Chen CC, Chang SC, Chang YY, et al. Survival benefit of metastasectomy in first-line cetuximab therapy in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: a nationwide registry. *Am J Cancer Res*. 2023 Dec 15;13(12):6333-6345.
524. Kawasaki K, Hamamoto Y, Suzuki T, et al. Benefit of rebiopsy for deciding treatment strategy in rectal cancer: A case report. *Oncol Lett*. 2017 Sep;14(3):3697-3700.

525. Zeineddine FA, Zeineddine MA, Yousef A, et al. Survival improvement for patients with metastatic colorectal cancer over twenty years. *npj Precis Oncol.* 2023;7:16.
526. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother.* 2010;33:335-351.
527. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
528. Wilczyński JR, Nowak M. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. *Exp Suppl.* 2022;113:1-57.
529. Masucci GV, Cesano A, Hawtin R, et al. Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume I - pre-analytical and analytical validation. *J Immunother Cancer.* 2016;4:76.
530. Dobbin KK, Cesano A, Alvarez J, et al. Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume II - clinical validation and regulatory considerations. *J Immunother Cancer.* 2016;4:77.
531. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, et al. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2012;9:e1001216.
532. Loi S, Drubay D, Adams S, et al. Abstract S1-03: Pooled individual patient data analysis of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in primary triple negative breast cancer (TNBC) treated with anthracycline-based chemotherapy. *Cancer Res.* 2016;76:S1-03.
533. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, et al. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity.* 2013;39:11-26.
534. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2016;27:225-232.
535. Liu S, Foulkes WD, Leung S, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* 2014;16:432.
536. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;109:2705-2713.
537. Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24:5373-5380.
538. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 2009;69:2000-2009.
539. West NR, Kost SE, Martin SD, et al. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;108:155-162.
540. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123:2873-2892.

541. Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A, et al. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC Cancer*. 2010;10:604.
542. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, et al. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Med Res*. 2014 Sep;140(3):361-369.
543. Hussain T, Kallies A, Vasanthakumar A. Sex-bias in CD8+ T-cell stemness and exhaustion in cancer. *Clin Transl Immunology*. 2022 Aug 26;11(8):e1414.
544. Ning K, Peng Y, Jiang Y, et al. Sex differences in renal cell carcinoma: a single-cell analysis reveals exhausted CD8+ T-cells highly infiltrated in males. *Biol Sex Differ*. 2023 Sep 15;14(1):58.
545. Kang D, Wang C, Han Z, et al. Exploration of the relationship between tumor-infiltrating lymphocyte score and histological grade in breast cancer. *BMC Cancer*. 2024 Mar 7;24(1):318.
546. Stenmark Tullberg A, Sjöström M, Tran L, et al. Combining histological grade, TILs, and the PD-1/PD-L1 pathway to identify immunogenic tumors and de-escalate radiotherapy in early breast cancer: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *J Immunother Cancer*. 2023 May;11(5):e006618.
547. Fuchs TL, Sioson L, Sheen A, et al. Assessment of Tumor-infiltrating Lymphocytes Using International TILs Working Group (ITWG) System Is a Strong Predictor of Overall Survival in Colorectal Carcinoma: A Study of 1034 Patients. *Am J Surg Pathol*. 2020 Apr;44(4):536-544.
548. Shou J, Zhang Z, Lai Y, et al. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2016;16:687.
549. Jiang D, Gao Z, Cai Z, et al. Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2015;15:727.
550. Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod Pathol*. 2008;21:1527-1532.
551. Sarkar T, Dhar S, Sa G. Tumor-infiltrating T-regulatory cells adapt to altered metabolism to promote tumor-immune escape. *Curr Res Immunol*. 2021 Aug 28;2:132-141.
552. Laine A, Labiad O, Hernandez-Vargas H, et al. Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation. *Nat Commun*. 2021 Oct 28;12(1):6228.
553. Jakubowska K, Koda M, Kisielewski W, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in primary tumors of colorectal cancer and their metastases. *Exp Ther Med*. 2019 Dec;18(6):4904-4912.
554. Schweiger T, Berghoff AS, Glogner C, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte subsets and tertiary lymphoid structures in pulmonary metastases from colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2016 Oct;33(7):727-739.
555. Παπαδάκη Α. Μελέτη της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή σε πρωτοπαθείς όγκους και σε συνοδές μεταστάσεις στο ΚΝΣ σε ασθενείς με νεοπλασίες [doctoral thesis]. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Παθολογικός Τομέας, Ογκολογική Κλινική; 2022. Available from: <http://hdl.handle.net/10442/hedi/52634>.
556. Marchetti L, Engelhardt B. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. *Vasc Biol*. 2020 Mar 20;2(1):H1-H18.

- 557. Lwin Z, Guo C, Salim A, et al. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol*. 2010;23:1559-1566.
- 558. Kasikova L, Hensler M, Truxova I, et al. Calreticulin exposure correlates with robust adaptive antitumor immunity and favorable prognosis in ovarian carcinoma patients. *J Immunother Cancer*. 2019;7:312.
- 559. Ma Y, Yang H. In vitro Assays for the Detection of Calreticulin Exposure, ATP and HMGB1 Release upon Cell Death. *Bio-protocol*. 2016;6(24):e2076.
- 560. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med*. 2022;54:91-102.
- 561. Morciano G, Sarti A, Marchi S, et al. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat Protoc*. 2017;12:1542-1562.
- 562. Narvi E, Vaparanta K, Karrila A, et al. Different responses of colorectal cancer cells to alternative sequences of cetuximab and oxaliplatin. *Sci Rep*. 2018;8:16579.
- 563. Levy EM, Sycz G, Arriaga JM, et al. Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immun*. 2009;15(2):91-100.