



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

Μοριακός έλεγχος RAS μεταλλάξεων του καρκίνου παγκρέατος στο πλάσμα ασθενών με ανεγχείρητο παγκρεατικό καρκίνο με υγρή βιοψία και μελέτη RAS μεταλλάξεων, τροποποιητών RAS σηματοδότησης, ρύθμισης εξωκύττωσης νουκλεϊκών οξέων στον πρωτοπαθή όγκο και της κλωνικής αιμοποίησης.

Μια προοπτική μελέτη παρατήρησης

ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΓΚΟΥΡΑ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

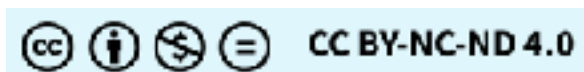
**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

Μοριακός έλεγχος RAS μεταλλάξεων του καρκίνου παγκρέατος στο πλάσμα ασθενών με ανεγχείρητο παγκρεατικό καρκίνο με υγρή βιοψία και μελέτη RAS μεταλλάξεων, τροποποιητών RAS σηματοδότησης, ρύθμισης εξωκύττωσης νουκλεϊκών οξέων στον πρωτοπαθή όγκο και της κλωνικής αιμοποίησης.

Μια προοπτική μελέτη παρατήρησης

**ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΓΚΟΥΡΑ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



Creative Commons

«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. Γκούρα Στεφανίας: 21-09-2018

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 876α/18-12-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

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

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

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 29-01-2019

«Μοριακός έλεγχος RAS μεταλλάξεων του καρκίνου παγκρέατος στο πλάσμα ασθενών με ανενεργό παγκρεατικό καρκίνο με υψηλή βιοψία και μελέτη RAS μεταλλάξεων, τροποποιητών RAS σηματοδότησης, ρύθμισης εξωκυττάρωσης νοκυκλικών οξέων στον πρωτοπαθή όγκο και της κλωνικής αιμοποίησης. Μια προοπτική μελέτη παρατήρησης.»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1001α/29-03-2022

Επιβλέπων:

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

Μέλη:

Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

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

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1139α/13-02-2025

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. Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κατσάνος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μαγκλάρα Αγγελική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Λιανός Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Παρασκευόπουλος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Ακτινολογίας με έμφαση στην Επεμβατική Ακτινολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 03-04-2025

Ιωάννινα 12-05-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κανεισιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Αικατερίνη Λαγού

Στην μνήμη της γιαγιάς μου, Νίκης,
που βιάστηκε να αρρωστήσει,
και δεν πρόλαβε τις στοχευτικές θεραπείες στην Ογκολογία.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Ιανουάριο του 2019 έως και τον Σεπτέμβριο του 2024. Συγκεκριμένα η Ογκολογική Κλινική, το Εργαστήριο Κλινικής Χημείας και το Παθολογοανατομικό Τμήμα, αποτέλεσαν τα τμήματα των οποίων οι επιστήμονες συνεργάστηκαν και βοήθησαν άοκνα, κατά τη διάρκεια δύσκολων και απαιτητικών χρόνων, (συμπεριλαμβανομένων και των ετών της πανδημίας COVID-19) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη αυτή, τους οποίους και επιθυμώ να ευχαριστήσω τον καθέναν ξεχωριστά.

Απευθύνω πρώτα τις ευχαριστίες μου στην **Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ)**, που στέκει πάντα αρωγός των νέων Ογκολόγων. Οφείλω πάρα πολλά, τόσο στην **Ελληνική Ακαδημία Ογκολογίας (ΕΑΚΟ)**, για την επιστημονική μου εξέλιξη, αλλά και για την υποστήριξη που έλαβα μέσω της υποτροφίας της ΕΟΠΕ για τα ερευνητικά προγράμματα. Δίχως αυτήν την πολύ σημαντική οικονομική στήριξη, θα ήταν δύσκολο να ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη.

Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή Ογκολογίας, **Δρ. Γεώργιο Πενθερουδάκη**, ο οποίος υπήρξε ο αρχικός επιβλέπων της παρούσας μελέτης και μου εμπιστεύθηκε το θέμα αυτό προκειμένου να ξεκινήσω την διδακτορική μου διατριβή.

Εκφράζω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον σημερινό Διευθυντή της Πανεπιστημιακής Ογκολογικής Κλινικής, Αναπληρωτή καθηγητή **Δρ. Davide Mauri**, που ανέλαβε επιβλέπων της παρούσας διατριβής, μετά τον κο Πενθερουδάκη, για την άριστη συνεργασία μας τόσο στο κλινικό και εκπαιδευτικό κομμάτι κατά την διάρκεια της ειδικότητάς μου, όσο και στο επιστημονικό κομμάτι, καθώς η συμβολή του υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής **Δρ. Άννα Γούσια**, η συμβολή και η καθοδήγηση της οποίας υπήρξε πολύτιμη κατά την διάρκεια της διεξαγωγής και ολοκλήρωσης της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο διαδραμάτισε έναν από τους πιο σημαντικούς ρόλους, στη συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων.

Ευχαριστώ ξεχωριστά και την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής **Δρ. Ευαγγελή Λάμπρη**, που με υποστήριξε θερμά και πρόσφερε την βοήθειά της, σε όλα τα στάδια της διατριβής ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής.

Ξεχωριστές ευχαριστίες οφείλω στην Καθηγήτρια **Δρ. Αγγελική Μαγκλάρα**, για την άριστη συνεργασία μας στο σύνολο του ερευνητικού σκέλους της μελέτης. Η βαθιά γνώση και η αφοσίωσή της στο αντικείμενο των υγρών βιοψιών, άνοιξαν για μένα καινούργιους ορίζοντες στην έρευνα και στις δυνατότητες της σύγχρονης Ογκολογίας.

Ευχαριστώ και την **Δρ. Ελένη Μπαϊρακτάρη**, που ως Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.), υποστήριξε και διευκόλυνε με κάθε τρόπο την διεξαγωγή της έρευνας για την διδακτορική μου διατριβή.

Ξεχωριστές και ειλικρινείς ευχαριστίες οφείλω:

Στην **Δρ. Αναστασία Κουγιουμτζή**, που η παρουσία της υπήρξε κάτι περισσότερο από καθοριστική για την διεξαγωγή και την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι. και ιδιαιτέρως τον **κο Χρήστο Τζάλλα**, που με υποδέχθηκε και με βοήθησε να κάνω τα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, την **κα Πολυξένη Νίκου**, για την βοήθειά της στην συλλογή και την επεξεργασία των δειγμάτων. Τον **Δρ Πρόδρομο Σακάλογλου** και την **κα Κατερίνα Βλατάκη**, από το Εργαστήριο Κλινικής Χημείας για την συνεργασία μας, όπως επίσης και την **κα Κωνσταντίνα Γκρέπη** από το Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής για την μοριακή ανάλυση των δειγμάτων ιστού.

Στο διοικητικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Ογκολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Ι. και ιδιαιτέρως την **κα Δήμητρα Σταμούλη**, την **κα Αθανασία Μάντζιου**, την **Δρ. Ευαγγελία Τσελίκου**, την **κα Αμαλία Τσίτου**, καθώς και τον πρώην προϊστάμενο της Ογκολογικής Κλινικής **Δρ. Στέφανο Ζούμπα** και την νυν προϊσταμένη της Ογκολογικής Κλινικής **Δρ. Ελευθερία Τζαμάκου**, που ήταν πάντα παρούσες/παρόντες και αρωγοί σε όλη την προσπάθεια και στην διαδρομή μου στην Πανεπιστημιακή Ογκολογική Κλινική του Π.Γ.Ν.Ι.

Στο εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας **GENEKOR** και συγκεκριμένα τον επιστημονικό υπεύθυνο **Δρ. Γεώργιο Νασιούλα**, την **Δρ. Ειρήνη Παπαδοπούλου** και την **κα Κατερίνα Τσαντικίδη**, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ανάλυση των δειγμάτων.

Στον εξαίρετο συνάδελφο **Δρ. Χρήστο Φωκολώρο**, για την πολύτιμη βοήθεια του.

Στους συναδέλφους και συνειδικευόμενούς μου, **Δρ. Αλεξάνδρα Παπαδάκη**, **Δρ. Ιωάννα Γαζούλη**, **Δρ. Λεωνίδα Μαυροειδή** και **Δρ. Παναγιώτη Ντέλλα** για τη βοήθεια και για την υποστήριξη στα δύσκολα αλλά και πολύ παραγωγικά χρόνια που διανύσαμε.

Στον **Δρ. Ιωσήφ Σγουρό**, Επιστημονικό Υπεύθυνο της Ογκολογικής Κλινικής του Γ.Ο.Ν.Κ. “Οι Άγιοι Ανάργυροι” και την **Δρ. Αθηνά Χριστοπούλου**, Διευθύντρια της Ογκολογικής Κλινικής του νοσοκομείου “Άγιος Ανδρέας”, για την συμβολή τους με την αποστολή δειγμάτων ασθενών που συμπεριελήφθησαν στην παρούσα μελέτη.

Στην **κα Μίρκα Γόντικα**, που έχω το προνόμιο της φιλίας και της αγάπης της, για την επιμέλεια του κειμένου και για την υποστήριξη καθόλη την διάρκεια της συγγραφής της διατριβής μου.

Την **Β’ Ογκολογική Κλινική του Metropolitan Hospital**, που αποτελεί την επαγγελματική μου οικογένεια, από τον 07/2022, για την υποστήριξη και την ενθάρρυνση. Η άψογη συνεργασία, το επιστημονικό επίπεδο και το ήθος που διακρίνει τα στελέχη της, μου δίνει την δύναμη και το κίνητρο να εμπλουτίζω το επιστημονικό μου έργο.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στην **οικογένεια** και τους **στενούς μου φίλους** για την άνευ όρων υποστήριξη και την κατανόηση.

Εκφράζω τις πιο θερμές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους **ασθενείς** και τις **οικογένειές** τους, οι οποίοι, παρά τις δυσκολίες αυτής της αμείλικτης ασθένειας, έχουν το θάρρος και την γενναιοδωρία να συμμετέχουν και να συνεισφέρουν σε όλες τις μορφές της έρευνας. Είμαι ευγνώμων που έχω συναντήσει τον κάθε έναν τους ξεχωριστά και ελπίζω η έρευνα και η επιστήμη να τους επιστρέψει την γενναιοδωρία τους στο πολλαπλάσιο και να ανταμείψει τον αγώνα τους.

Ιδιαίτερως και ξεχωριστά ευχαριστώ τον διευθυντή μου, **Δρ. Επαμεινώνδα Σαμαντά**, που ήταν ο πρώτος που πίστεψε ότι θα ακολουθήσω επιτυχώς τον δρόμο της Ογκολογίας. Με υποστηρίζει από τα πρώτα μου βήματα ως ειδικευόμενης ιατρού στη Γ' Παθολογική Κλινική του Γ.Ο.Ν.Κ. "Οι Άγιοι Ανάργυροι μέχρι και την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Και τώρα με εμπιστεύεται ως συνεργάτη του. Αποτελεί, για εμένα, παράδειγμα ολοκληρωμένου ιατρού καθώς συνεχίζει εδώ και δεκαετίες το αδιάκοπο κλινικό του έργο καθημερινά στο πλευρό των ασθενών, ενώ παράλληλα προωθεί και ενισχύει την βασική και κλινική έρευνα. Μου δίδαξε ότι η έρευνα στην ιατρική ξεκινάει από το προσκέφαλο των ασθενών μας, από την καθημερινή μάχη στους θαλάμους των νοσοκομείων και τα αποτελέσματά της προορίζονται για την ανακούφιση και την θεραπεία τους. Αυτοί είναι οι βασικοί πυλώνες στους οποίους στηρίζω την πορεία και την εξέλιξή μου.

ANTI ΠΡΟΛΟΓΟΥ

“Doctors came to see her singly and in consultation, talked much in French, German, and Latin, blamed one another, and prescribed a great variety of medicines for all the diseases known to them, but the simple idea never occurred to any of them that they could not know the disease that Natasha was suffering from, no disease suffered by a live man can be known, for every living person has his own peculiarities and always has his own peculiar, personal, novel, complicated disease, unknown to medicine -- not a disease of the lungs, liver, skin, heart, nerves, and so on mentioned in medical books, but a disease consisting of one of the innumerable combinations of the maladies of those organs. This simple thought could not occur to the doctors (as it cannot occur to a wizard that he is unable to work his charms) because the business of their lives was to cure, and they received money for it and had spent the best years of their lives on that business. But above all that thought was kept out of their minds by the fact that they saw they were really useful [...] Their usefulness did not depend on making the patient swallow substances for the most part harmful (the harm was scarcely perceptible because they were given in small doses) but they were useful, necessary, and indispensable because they satisfied a mental need of the invalid and those who loved her -- and that is why there are, and always will be, pseudo-healers, wise women, homoeopaths, and allopaths. They satisfied that eternal human need for hope of relief, for sympathy, and that something should be done, which is felt by those who are suffering.”

Leo Tolstoy - War and Peace

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ (συνέχεια)

“ Οι γιατροί την επισκέπτονταν καθένας χωριστά και σε συμβούλια, έλεγαν πολλά στα γαλλικά, στα γερμανικά και στα λατινικά, κατέκριναν ο ένας τον άλλο, όριζαν τα πιο πολυποίκιλα φάρμακα για όλες τις γνωστές τους αρρώστιες. Όμως, από κανενός το μυαλό δεν περνούσε η απλούστατη σκέψη πως δεν μπορούσαν να ξέρουν την αρρώστια της Νατάσας, όπως δεν μπορούσαν να ξέρουν καμιά αρρώστια από εκείνες που βρίσκουν τους ανθρώπους. Γιατί κάθε άνθρωπος έχει τις δικές του ιδιότητες και πάντα πάσχει από μια ξέχωρη, καινούργια, δική του, σύνθετη κι άγνωστη στην ιατρική, αρρώστια, όχι αρρώστια των πνευμόνων, του συκωτιού, του δέρματος, της καρδιάς, των νεύρων κ.λπ., από εκείνες που περιλαμβάνει η ιατρική, μα αρρώστια που απαρτίζεται από έναν απ’ τους αναρίθμητους εκείνους συνδυασμούς παθήσεων αυτών των οργάνων. Η απλή αυτή σκέψη δεν μπορούσε να περάσει απ’ το μυαλό των γιατρών (έτσι όπως δεν μπορεί να περάσει απ’ το μυαλό του μάγου ότι δεν μπορεί να κάνει μάγια), γιατί η δουλειά τους ήταν να θεραπεύουν, γιατί γι’ αυτό πληρώνονται και γιατί στη δουλειά αυτή είχαν ξοδέψει τα καλύτερα χρόνια της ζωής τους. Μα, προπάντων, δεν μπορούσε η σκέψη αυτή να περάσει απ’ το μυαλό των γιατρών, γιατί έβλεπαν πως ήταν αναμφισβήτητα χρήσιμοι, και πραγματικά ήταν χρήσιμοι για όλους τους οικείους στο μέγαρο Ροστόβ. Ήταν χρήσιμοι όχι γιατί ανάγκαζαν την άρρωστη να καταπίνει βλαβερές τις περισσότερες φορές ουσίες (η βλάβη αυτή ήταν πολύ λίγο αισθητή, γιατί οι ουσίες της δίνονταν σε ελάχιστη ποσότητα), μα ήταν χρήσιμοι, απαραίτητοι, αναπόφευκτοι (ο λόγος που γι’ αυτόν υπάρχουν πάντα και δεν θα λείψουν ποτέ οι δήθεν θεράποντες, οι μάγοι, οι ομοιοπαθητικοί) γιατί ικανοποιούσαν την ψυχική ανάγκη της άρρωστης και των προσώπων που την αγαπούσαν. Ικανοποιούσαν εκείνη την αιώνια ανθρώπινη ανάγκη της ελπίδας για κάποια ανακούφιση, την ανάγκη της συμπόνιας και της απασχόλησης που δοκιμάζει κάθε άνθρωπος, όσο πάσχει.”

Λέων Τολστόι - Πόλεμος και Ειρήνη

μετάφραση από τα ρωσικά: Κοραλία Μακρή

εκδόσεις ΓΚΟΒΟΣΤΗ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	11
1.1 Ο Καρκίνος του Παγκρέατος.....	11
1.1.1 Γενικά και Επιδημιολογικά Στοιχεία.....	11
1.1.2 Παράγοντες Κινδύνου.....	15
1.1.3 Διαγνωστική Προσπέλαση και Σταδιοποίηση.....	16
1.1.3.1 Κλινική Εικόνα.....	16
1.1.3.2 Διαγνωστική Προσπέλαση.....	17
1.1.4 Ιστολογική Επιβεβαίωση - Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά.....	18
1.1.5 Σταδιοποίηση Καρκίνου Παγκρέατος.....	19
1.1.6 Διαχείριση Τοπικής - Τοπικά Εκτεταμένης Νόσου.....	21
1.1.6.1 Θεραπεία Εξαιρέσιμου Παγκρεατικού Καρκίνου.....	21
1.1.6.2 Ορισμός Ανεγχείρητης και Οριακά Εξαιρέσιμης Νόσου.....	22
1.1.7 Θεραπευτική Προσέγγιση.....	24
1.1.7.1 Επικουρική Θεραπεία Μετά από Χειρουργική Εξαίρεση.....	25
1.1.7.2 Θεραπεία Δυνητικά Εξαιρέσιμου Παγκρεατικού Καρκίνου.....	25
1.1.7.3 Θεραπεία Τοπικά Προχωρημένου Παγκρεατικού Καρκίνου.....	26
1.1.7.4 Θεραπεία Μεταστατικής Νόσου.....	26
1.1.7.5 Ασθενείς με Στοχευτικές Μεταλλάξεις.....	26
BRCA1/1 και PALB2.....	27

Όγκοι με Μικροδορυφορική Αστάθεια - Ανεπάρκεια Γονιδίων Επιδιόρθωσης της Διαδικασίας Ζευγοποίησης του DNA (MSI-h/dMMR).....	27
NTRK.....	28
Συντήξεις Γονιδίου RET.....	28
Μετάλλαξη BRAF V600E.....	29
Μετάλλαξη KRAS G12C.....	29
1.1.7.6 Ασθενείς Χωρίς Στοχευτικές Μεταλλάξεις.....	29
1.1.8 Καρκινικοί Δείκτες.....	33
1.1.9 Μοριακά Μονοπάτια και Βιοδείκτες.....	35
1.1.9.1 KRAS.....	36
1.1.9.2 Ογκοκατασταλτικά Γονίδια.....	38
p16/CDKN2A.....	38
TP53.....	39
SMAD4.....	39
1.1.9.3 Γονίδια Οικογενούς Παγκρεατικού Καρκίνου.....	40
Κύρια Γονίδια Ανεπάρκειας Ομόλογου Ανασυνδυασμού.....	40
BRCA2.....	40
BRCA1.....	40
PALB2.....	40
Μηχανισμός Δράσης.....	41
Άλλα Γονίδια Επιδιόρθωσης Ομόλογου Ανασυνδυασμού.....	41
STK11.....	41
Γονίδια Επιδιόρθωσης Βλαβών Ζευγοποίησης του DNA.....	42
Σύνδρομο Lynch.....	42
Άλλες Σωματικές Μεταλλάξεις με Μικρότερη Επίπτωση στον Παγκρεατικό Καρκίνο.....	43
1.1.10 Μοριακό Screening και Πρώιμη Ανίχνευση.....	43
1.2 Υγρές Βιοψίες.....	43
1.2.1 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα.....	47
1.2.2 cfDNA.....	49
1.2.3 ctDNA.....	51
1.2.4 Τρέχουσες Τεχνολογίες Ανίχνευσης του ctDNA.....	53
1.2.5 Κλινικές Εφαρμογές του ctDNA.....	57
1.2.6 Ο Ρόλος του ctDNA στον Παγκρεατικό Καρκίνο.....	58

1.2.7 Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς.....	60
ΣΚΟΠΟΣ.....	62
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
2.1 Κριτήρια Ένταξης Ασθενών.....	65
2.2 Συλλογή Δειγμάτων Ασθενών.....	66
2.3 Επεξεργασία Δειγμάτων και Απομόνωση cfDNA.....	67
2.3.1 Προετοιμασία του Πλάσματος - Απομόνωση.....	68
2.3.2 BEAMing Digital PCR.....	70
2.3.3 Next Generation Sequencing - NGS.....	72
2.3.4 Ανίχνευση KRAS μεταλλάξεων στον ιστό των ασθενών.....	76
2.4 Ανάλυση Κλινικών Δεδομένων.....	77
2.5 Στατιστική Ανάλυση.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	80
3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των Ασθενών και της Νόσου.....	80
3.2 Χαρακτηριστικά των Θεραπευτικών Σχημάτων και Στοιχεία Παρακολούθησης των Ασθενών.....	82
3.3 Σχεδιασμός Πάνελ Γονιδίων για Υγρή Βιοψία στον Παγκρεατικό Καρκίνο.....	83
3.4 Ανάλυση του Μοριακού Προφίλ των Ασθενών με τις Μεθόδους BEAMing Digital PCR και NGS, στο Πλάσμα και στον Ιστό.....	86
3.4.1 Ανίχνευση RAS Μεταλλάξεων με BEAMing Digital PCR στο Δείγμα του Πλάσματος Πριν την Έναρξη Θεραπείας.....	86
3.4.2 Ανίχνευση RAS Μεταλλάξεων με NGS στο Δείγμα του Πλάσματος Πριν την Έναρξη Θεραπείας.....	88
3.5 Ανίχνευση RAS Μεταλλάξεων στον Ιστό και Συμφωνία με την υγρή Βιοψία.....	90

3.6 Μεταβολή του Ποσοστού των RAS Μεταλλάξεων 4-6 Εβδομάδες Μετά την Έναρξη Θεραπείας.....	92
3.7 Δεδομένα Επιβίωσης.....	96
3.7.1 Διάστημα Ελεύθερο Προόδου Νόσου - PFS.....	96
3.7.2 Ολική Επιβίωση - OS.....	98
3.7.3 Συσχέτιση της Μεταβολής του Φορτίου Μεταλλάξεων με τα Απεικονιστικά Ευρήματα.....	101
3.7.4 Συσχέτιση της Μεταβολής του Φορτίου Μεταλλάξεων με τους Καρκινικούς Δείκτες CA 19-9 και CEA.....	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	113
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	116
ABSTRACT.....	119
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	121

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1: Κατανομή των μεταλλάξεων RAS που ανιχνεύθηκαν με BEAMing στο αρχικό δείγμα πλάσματος(N=33).....	87
Διάγραμμα 2: Κατανομή των KRAS και άλλων μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση του αρχικού δείγματος των ασθενών με NGS.....	89
Διάγραμμα 3: Μεταβολή του κλάσματος μεταλλαγμένων αλληλομόρφων KR2_12 πριν την έναρξη θεραπείας και 4-6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία.....	93
Διάγραμμα 4: Κατανομή των KRAS και άλλων μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση δείγματος των ασθενών με NGS, 4-6 εβδομάδες από την έναρξη θεραπείας.....	95
Διάγραμμα 5: mPFS 9 Vs. 11months, p-value 0,0002, HR:0.44 95%CI 0.26 to 0.74.....	97
Διάγραμμα 6: mPFS σε συσχέτιση με την μεταβολή του MAF (9 μήνες vs 9,8 μήνες vs 11 μήνες).....	98
Διάγραμμα 7: Probability of survival, p=0,0005 HR:0,43 και CI 95% 0.2566 to 0.7183.....	100
Διάγραμμα 8: Ολική επιβίωση των ασθενών σε σχέση με τον τρόπο μεταβολής του MAF.....	100
Διάγραμμα 9: Συσχέτιση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων με τα απεικονιστικά ευρήματα.....	101
Διάγραμμα 10: Συσχέτιση του απόλυτου αριθμού των μεταλλαγμένων σφαιριδίων με τα απεικονιστικά αποτελέσματα.....	102
Διάγραμμα 11: Συσχέτιση της μεταβολής του καρκινικού δείκτη CA 19-9 με την μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων.....	104
Διάγραμμα 12: Συσχέτιση της μεταβολής του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου με την μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων.....	105

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Γονίδια και Γενετικά Σύνδρομα που Σχετίζονται με Αυξημένο Κίνδυνο Παγκρεατικού Καρκίνου.....	16
Πίνακας 2: 8η Έκδοση Συστήματος Σταδιοποίησης για τον Παγκρεατικό Καρκίνο.....	20
Πίνακας 3: 8η έκδοση TNM για τον παγκρεατικό καρκίνο (UICC - Union for International Cancer Control).....	21
Πίνακας 4: Πρώτη φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό του πλάσματος.....	68
Πίνακας 5: Δεύτερη φυγοκέντρηση για απομάκρυνση οποιουδήποτε κυτταρικού τμήματος.....	69
Πίνακας 6: Βασικά Χαρακτηριστικά των Ασθενών της Μελέτης.....	81
Πίνακας 7: Προτεινόμενες γονιδιακές μεταλλαγές και hotspots για έλεγχο με υγρή βιοψία σε ασθενείς με προχωρημένο παγκρεατικό καρκίνο.....	84
Πίνακας 8: Προτεινόμενες γονιδιακές μεταλλαγές και hotspots για έλεγχο με υγρή βιοψία σε ασθενείς με προχωρημένο παγκρεατικό καρκίνο (συνέχεια).....	85
Πίνακας 9: Ανίχνευση RAS μεταλλάξεων στον ιστό.....	91

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Επίπτωση και θνησιμότητα παγκρεατικού καρκίνου παγκοσμίως. Στοιχεία από GLOBOCAN.....	11
Εικόνα 2: Διαδικασία μεταλλαγής από το φυσιολογικό παγκρεατικό κύτταρο σε διηθητικό αδеноκαρκίνωμα παγκρέατος.....	13
Εικόνα 3 : Επίπτωση, Θνησιμότητα και Επιπολασμός του Παγκρεατικού Καρκίνου ανά την Υφήλιο - The Global Cancer Observatory/ Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024.....	14
Εικόνα 4: Κατευθυντήριες Οδηγίες για τον μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο χωρίς στοχευτικές μεταλλάξεις (ESMO Guidelines).....	31
Εικόνα 5: Κατευθυντήριες Οδηγίες για τον μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο με στοχευτικές μεταλλάξεις (ESMO Guidelines).....	32
Εικόνα 6: Προεγχειρητικά επίπεδα CA 19-9 και συσχέτιση με την εξαιρεσιμότητα και την επιβίωση στον παγκρεατικό καρκίνο.....	34
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του RAS.....	37
Εικόνα 8: Σύγκριση χαρακτηριστικών της παραδοσιακής βιοψίας ιστού με την υγρή βιοψία.....	45
Εικόνα 9: CTCs. Μετάσταση, διαχωρισμός, ανίχνευση και εφαρμογή των CTCs.....	48
Εικόνα 10: Κύκλος ζωής cfDNA.....	50
Εικόνα 11: Κλινικές εφαρμογές ανάλυσης cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο.....	51
Εικόνα 12: Δείγμα αίματος πριν και μετά την φυγοκέντρηση.....	53
Εικόνα 13: Μέθοδοι NGS.....	56
Εικόνα 14: Ευαισθησία και ειδικότητα ctDNA με μεταλλάξεις στο KRAS, CA 19-9 και CEA στην ανίχνευση επιδείνωσης της νόσου.....	59
Εικόνα 15: Μεθοδολογία της Μελέτης.....	67
Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της ψηφιακής BEAMing PCR.....	71
Εικόνα 17: Απομόνωση Γενετικού Υλικού για Ανάλυση με NGS.....	73
Εικόνα 18: Oncomine Cell-Free Total Nucleic workflow.....	75
Εικόνα 19: Παράδειγμα επιδιόρθωσης λαθών με την τεχνολογία UMI.....	76

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AJCC	American Joint Cancer Committee
APC	Adenomatous Polyposis Coli Gene
ATM	Ataxia - Telangiaectasia Mutated Gene
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2 Gene
BCT	Blood Collection Tube
BEAMing	Beads - Emulsion - Amplification - Magnetics
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CAPP-Seq	Cancer Personalised Profiling by Deep Sequencing
CAPOX	Capecitabine/Oxaliplatin
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CEA	Carcinoembryonic Antigen
cfDNA	Cell-free Deoxyribonucleic Acid
CHA	Common Hepatic Artery
CI	Confidence Interval
CRC	Colorectal Cancer
CTCs	Circulating Tumour Cells
ctDNA	Circulating Tumour Deoxyribonucleic Acid
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein4
ddPCR	Droplet Digital Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dMMR	Deficient Mismatch Repair Gene
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
ERCP	Endoscopic Retrograde Cholangio-Pancreatography
ESMO	European Society for Medical Oncology
EUS	Endoscopic Ultra Sound
EVs	Extracellular Vesicles
FAMMM	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome
FDA	Food and Drug Administration
5-FU	5-Fluorouracil
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded

FOLFOX	Oxaliplatin/Leucovorin/Infusional 5-Fluorouracil
FOLFIRI	Irinotecan/Leucovorin/Infusional 5-Fluorouracil
FOLFIRINOX	Oxaliplatin/Irinotecan/Leucovorin/Infusional 5-FU
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
HRD	Homologous Repair Deficiency
HRR	Homologous Recombination Repair genes
ICGC	International Cancer Genome Consortium
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma virus gene
LoD	Limit of Detection
MAF	Mutant Allele Fraction
MCN	Mucinous Neoplasms
mFOLFIRINOX	Modified FOLFIRINOX
MLH1	MutL Protein Homolog 1 gene
MMR	Mismatch Repair
MRCP	Magnetic Resonance Cholangiopancreatography
MRD	Minimal Residual Disease
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
mtDNA	Mitochondrial DNA
MSI	MicroSatellite Instability
MUTYH	MutY DNA glycosylase gene
NALIRIFOX	Liposomal Irinotecan/Leucovorin/5-FU
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Next Generation Sequencing
NPA	Negative Percent Agreement
NTRK	Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase gene
OPA	Overall Percent Agreement
ORR	Overall Response Rate
OS	Overall Survival
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PARPi	Poly-ADP Ribose Polymerase inhibitor
PD	Progressive Disease

PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PET-CT	Positron Emission Tomography - Computed Tomography
PFS	Progression-Free Survival
PLN	Positive Lymph Node
PPA	Positive Percent Agreement
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
PR	Partial Response
PS	Performance Status
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RET	Rearranged during Transfection
R0	Microscopically margin-negative surgical resection
SMA	Superior Mesenteric Artery
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
SNV	Single Nucleotide Variant
STK11	Serine/Threonine Kinase 11 gene
TAM-Seq	Targeted Amplicon Sequencing
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TNM	Tumor-Node-Metastasis system
TPA	Tissue Plasminogen Activator antigen
TPS	Tissue Polypeptide Specific antigen
TP53	Tumor Suppressor gene
UICC	Union for International Cancer Control
UMI	Unique Molecular Identifiers
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
WT	Wild Type

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

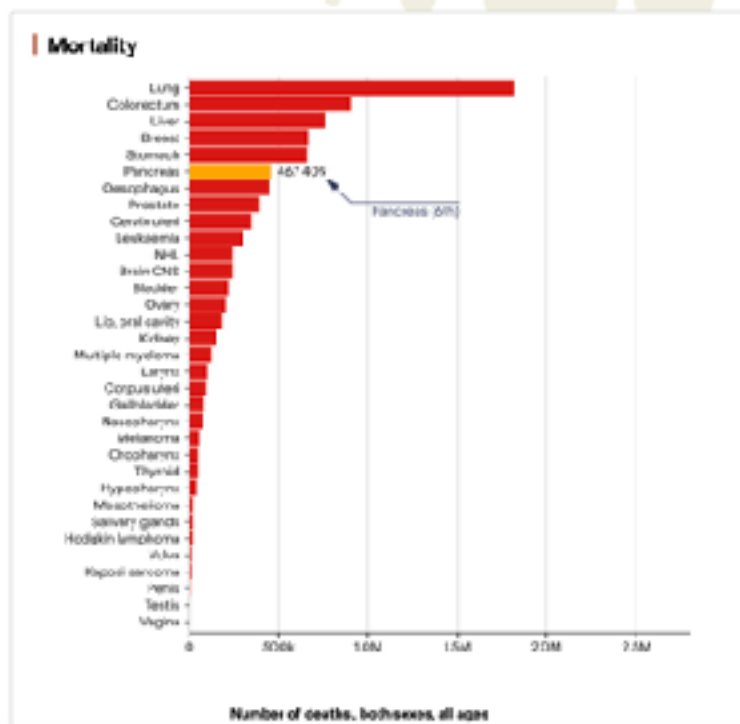
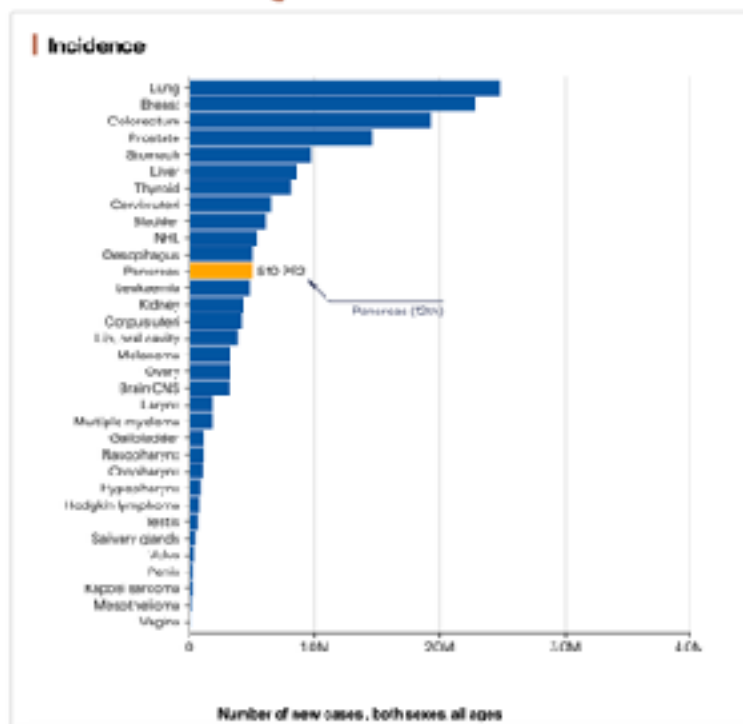
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

1.1.1 Γενικά και επιδημιολογικά στοιχεία

Ο παγκρεατικός καρκίνος αφορά το καρκίνωμα που προέρχεται από τα κύτταρα των πόρων του παγκρέατος, γνωστό ως αδеноκαρκίνωμα των πόρων του παγκρέατος. Αποτελεί μία εξαιρετικά επιθετική μορφή καρκίνου με υψηλή θνητότητα, καθιστώντας το την 4η αιτία θανάτου από καρκίνο στις ΗΠΑ. Στην Ελλάδα, βάσει των στοιχείων της GLOBOCAN του 2022, ο καρκίνος του παγκρέατος καταλαμβάνει την 11η θέση σε επίπτωση και στα δύο φύλα, ενώ αποτελεί επίσης την 4η αιτία θανάτου από καρκίνο και στα δύο φύλα. [1]

Cancer site ranking



Εικόνα 1: Επίπτωση και θνησιμότητα του παγκρεατικού καρκίνου παγκοσμίως. Στοιχεία από GLOBOCAN [1]

Το πάγκρεας είναι ένα σύνθετο ενδοκοιλιακό - οπισθοπεριτοναϊκό όργανο, που βρίσκεται ακριβώς όπισθεν του στομάχου και σε άμεση επαφή με μείζονες αγγειακές δομές και με τον χοληδόχο πόρο.

Η ονομασία του αποδίδεται στον Ρούφο τον Εφέσιο (περίπου το 100 μ.Χ.), από τις λέξεις “Παν” και “Κρέας” (“Όλο Κρέας”), καθώς το όργανο αυτό, δεν φέρει οστέινες ή χόνδρινες δομές. Για πολλούς αιώνες η λειτουργία του δεν ήταν γνωστή καθώς ούτε στην αρχαιότητα, αλλά ούτε και οι μεταγενέστεροι ανατόμοι και ερευνητές δεν είχαν καταφέρει να το συνδέσουν με λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού και με αντίστοιχες παθήσεις. Ως τις αρχές του 20ού αιώνα, χαρακτηριζόταν ως ο “ερημίτης της κοιλιάς”, λόγω του γεγονότος ότι σπάνια διενεργούνταν χειρουργικές επεμβάσεις σε αυτό [2,3].

Το πάγκρεας είναι ένας μεικτός αδένας με ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα. Τα κύτταρα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος παράγουν, πρώτον τα παγκρεατικά υγρά που περιέχουν τα ένζυμα της πέψης, τα οποία παράγονται στα κυψελιδικά κύτταρα, και δεύτερον διττανθρακικό νάτριο από τα κύτταρα των πόρων, το οποίο χρησιμεύει για την εξουδετέρωση του pH του στομάχου.

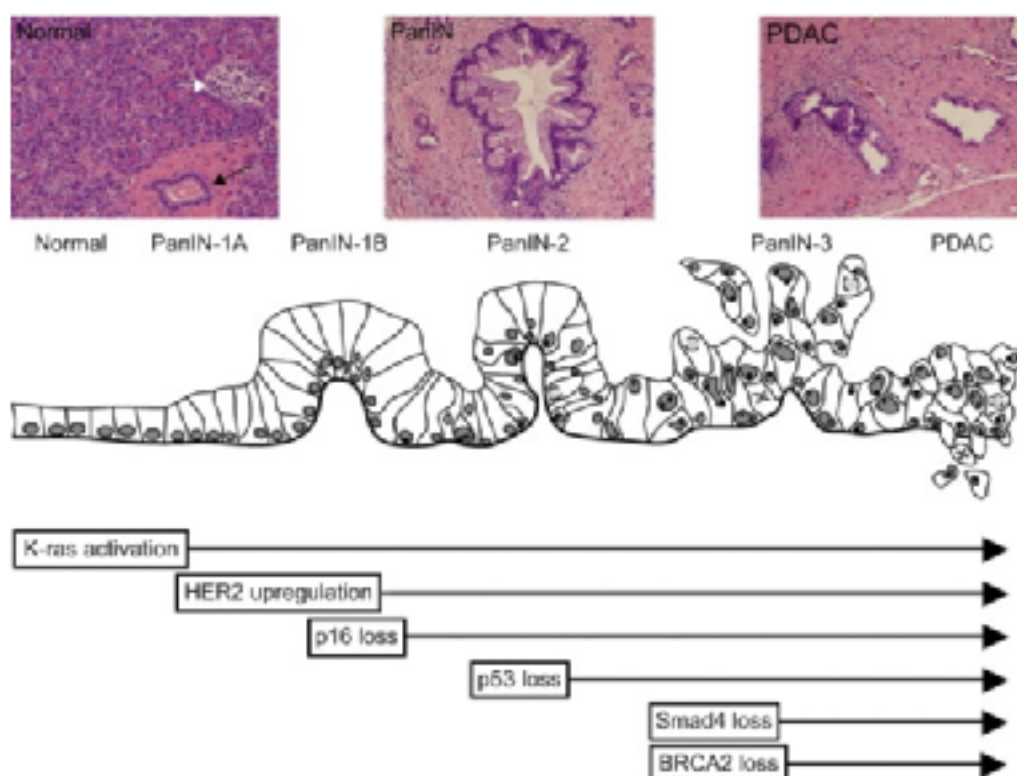
Η πλειοψηφία των κυττάρων του παγκρέατος (~ 95%) είναι κυψελοειδή, ενώ μόνο το 2% αποτελούν τα κύτταρα των πόρων και ακόμη μικρότερο ποσοστό τα ενδοκρινή κύτταρα. Τα τελευταία διατάσσονται στα διασπαρμένα νησίδια του Langerhans, που διεγείρονται και εκκρίνουν ινσουλίνη και γλυκαγόνο, ρυθμίζοντας έτσι την ομοιοστασία της γλυκόζης [4].

Στο πάγκρεας αναπτύσσονται διάφορα είδη καλοηθών και κακοήθων νεοπλασιών. Οι νεοπλασίες του παγκρέατος μπορεί να προέρχονται από κύτταρα των πόρων, κύτταρα των αδενοκυψελών ή από τα νησιδιακά κύτταρα. Επιπλέον κάποια νεοπλάσματα προέρχονται και από τα αρχέγονα κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν μεικτούς όγκους όπως το παγκρεατοβλάστωμα.

Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, διαγιγνώσκονται με τον ιστολογικό τύπο του αδενοκαρκινώματος των πόρων του παγκρέατος, που αποτελεί το 85-90% όλων των παγκρεατικών νεοπλασμάτων [5]. Άλλοι λιγότερο συχνοί υπότυποι του πορογενούς παγκρεατικού καρκίνου περιλαμβάνουν ενδεικτικά το μυελοειδές καρκίνωμα του παγκρέατος, το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα, το κολλοειδές καρκίνωμα, το καρκίνωμα χαμηλής συνοχής, το αδενοπλακώδες καρκίνωμα, τα πλακώδη, τα κυσταδενοκαρκινώματα και τα γιγαντοκυτταρικά καρκινώματα, ενώ πιο σπάνια είναι τα καρκινώματα που εξορμώνται από τα κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος και αφορούν τα

κυψελιδικά καρκινώματα. Από το πάγκρεας επίσης εξορμώνται και διάφοροι νευροενδοκρινείς όγκοι όπως ινσουλινώματα και γλυκαγονώματα, νευροενδοκρινείς όγκοι καλής διαφοροποίησης και νευροενδοκρινή καρκινώματα [219].

Οι πρώτες ενδείξεις παγκρεατικής δυσπλασίας φέρουν τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της παγκρεατικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (pancreatic intraepithelial neoplasia - PanINs). Οι περιοχές με PanIN 1A και PanIN 1B αλλοιώσεις φέρουν ελάχιστες μοριακές μεταλλαγές. Οι περιοχές με PanIN 2 αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από πυρηνική ατυπία, ενώ στις περιοχές με PanIN 3 αλλοιώσεις αναγνωρίζεται υψηλή δυσπλασία και άτυπη πορογενής υπερπλασία με σοβαρή ατυπία. Οι PanIN 3 αλλοιώσεις αντιστοιχούν σε καρκινώματα *in situ* και είναι πρόδρομοι του διηθητικού καρκινώματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2

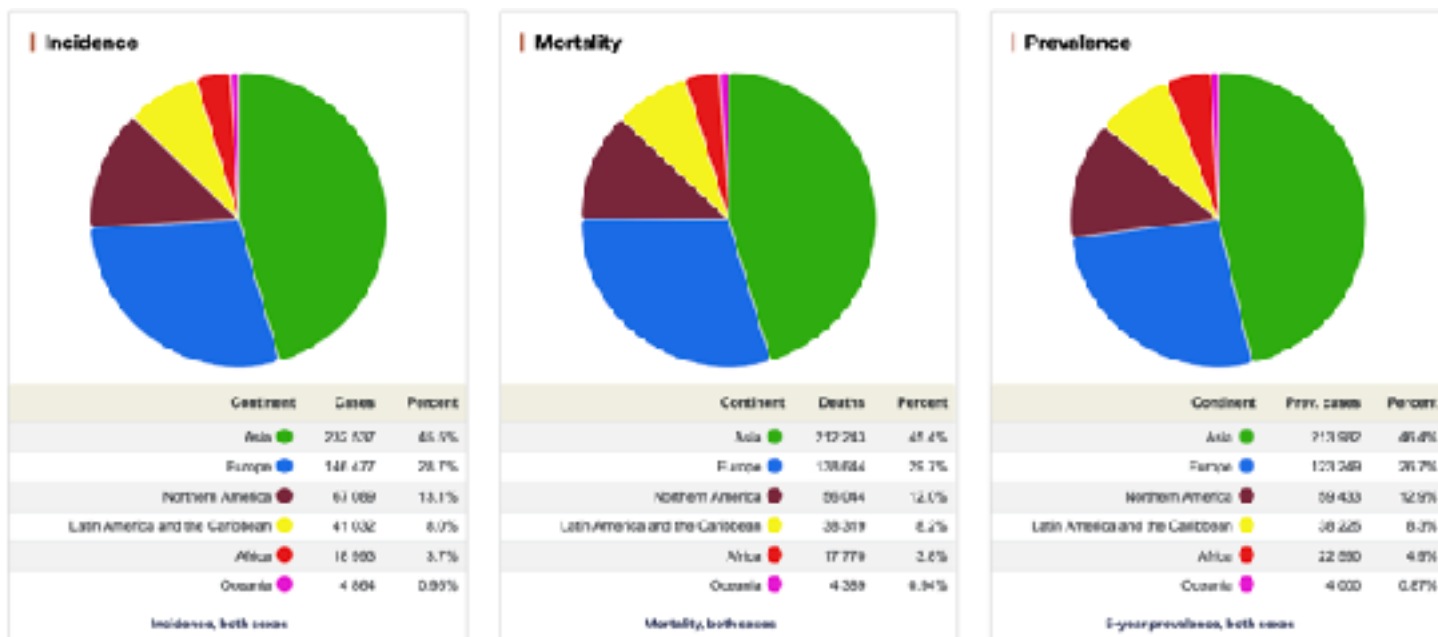


Εικόνα 2: Διαδικασία μεταλλαγής από το φυσιολογικό παγκρεατικό κύτταρο σε διηθητικό αδenoκαρκίνωμα παγκρέατος

Παγκοσμίως, ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελεί την 6η αιτία θανάτου από καρκίνο [6]. Η επίπτωση και η θνησιμότητα του καρκίνου του παγκρέατος έχουν την

τάση να αυξάνονται κάθε χρόνο. Η επίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου είναι συχνότερη στους άνδρες (5,5 ανά 100000) σε σχέση με τις γυναίκες (4,0 ανά 100000). Σημαντική αύξηση της επίπτωσης παρατηρείται επίσης στις μεγαλύτερες ηλικίες, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 70 έτη. Η εμφάνιση της νόσου είναι σπάνια πριν την ηλικία των 45 ετών. Επίσης, η επίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου ποικίλλει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή. Η υψηλότερη επίπτωση καταγράφεται στους πληθυσμούς με υψηλό εισόδημα και συγκεκριμένα στην Βόρεια Αμερική, στην περιοχή Ασίας - Ειρηνικού, όπως επίσης και στην Δυτική και Κεντρική Ευρώπη. Αντίθετα η Νότια Ασία και η Ανατολική και Κεντρική Υποσαχάρια Αφρική, καταγράφουν την χαμηλότερη επίπτωση. (Εικόνα 2) [7], [8].

Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαφορά φαίνεται να διαδραματίζει η αυξημένη έκθεση σε παράγοντες οι οποίοι αποδεδειγμένα αυξάνουν την επίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου, όπως το κάπνισμα, οι διατροφικές συνήθειες και τα ποσοστά παχυσαρκίας. Είναι πιθανό ένα μέρος αυτής της διαφοράς να οφείλεται και στην έλλειψη διαγνωστικών μέσων που παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες.



Εικόνα 3 : Επίπτωση, Θνησιμότητα και Επιπολασμός του Παγκρεατικού Καρκίνου ανά την Υφήλιο - The Global Cancer Observatory/ Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024

1.1.2 Παράγοντες κινδύνου

Η μεγάλη πλειοψηφία των παγκρεατικών καρκινωμάτων (>80%), οφείλεται σε σποραδικές σωματικές μεταλλάξεις. Μόνο ένα μικρό ποσοστό οφείλεται σε κληρονομούμενες γαμετικές μεταλλάξεις. Ο οικογενής παγκρεατικός καρκίνος ορίζεται από την ύπαρξη τουλάχιστον δύο συγγενών πρώτου βαθμού με καρκίνο παγκρέατος και υπολογίζεται από 4% - 10% όλων των περιπτώσεων. Παραλλαγές του γονιδίου BRCA2, αποτελούν τις πιο συχνές γενετικές μεταλλαγές που ανιχνεύονται στον οικογενή παγκρεατικό καρκίνο. Στον Πίνακα 1 απεικονίζονται και άλλα γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται με παγκρεατικό καρκίνο. [100]

Στον σποραδικό παγκρεατικό καρκίνο, μείζονες παράγοντες κινδύνου αποτελούν το κάπνισμα, η λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και παράγοντες που σχετίζονται με τις διατροφικές συνήθειες όπως η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, η αυξημένη πρόσληψη αλκοόλ, η περιορισμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, το αυξημένο σωματικό βάρος, η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2. [149,150]

Η χρόνια παγκρεατίτιδα αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου για τον παγκρεατικό καρκίνο, ανεξάρτητα από την αιτία της (κατάχρηση αλκοόλ, κάπνισμα, γενετικές μεταλλαγές). Πολλοί από τους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τον παγκρεατικό καρκίνο, είναι δυνητικά τροποποιήσιμοι, παρέχοντας έτσι μια μοναδική ευκαιρία για πρωτογενή πρόληψη σε μία δύσκολη νόσο με εξαιρετικά υψηλή θνητότητα.

Πίνακας 1: Γονίδια και Γενετικά Σύνδρομα που Σχετίζονται με Αυξημένο Κίνδυνο Παγκρεατικού Καρκίνου [100]

Γονίδιο	Σχετιζόμενο Σύνδρομο Προδιάθεσης
ATM	Οικογενής Καρκίνος Μαστού
BRCA1, BRCA2	Κληρονομούμενος Καρκίνος Μαστού και Ωοθηκών
GDKN2A	Σύνδρομο FAMMM
Γονίδια Επιδιόρθωσης Βλαβών Ζευγοποίησης MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Σύνδρομο Lynch
PALB2	Οικογενής Καρκίνος Μαστού
PRSS1, SPINK1	Οικογενής Παγκρεατίτιδα
STK11	Σύνδρομο Peutz - Jeghers
TP53	Σύνδρομο Li-Fraumeni
APC, MUTYH	Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση

1.1.3 Διαγνωστική Προσπέλαση και Σταδιοποίηση

Κλινική εικόνα

Τα συνηθέστερα συμπτώματα που αρχικά εμφανίζονται στους ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο είναι: επιγαστρικό άλγος, άλγος ράχης, ίκτερος και υπέρχρωση ούρων, ανορεξία, απώλεια βάρους και στεατόρροια. Κατά την κλινική εξέταση, τα συνήθη σημεία που ανευρίσκονται είναι ίκτερος, ηπατομεγαλία, καχεξία, σημείο Courvoisier, επιγαστρική μάζα και ασκίτης [9]. Αλλά κλινικά σημεία είναι επίσης η λεμφαδενοπάθεια Virchow's και η εύρεση του σημείου Sister Mary Joseph's.

Η αρχική εκδήλωση των σημείων και συμπτωμάτων διαφέρει ανάλογα με την εντόπιση του όγκου. Το 60-70% των καρκινωμάτων εντοπίζονται στην κεφαλή του παγκρέατος, ενώ το 20-25% στο σώμα - ουρά. Συγκριτικά με τους όγκους που εντοπίζονται στο σώμα και στην ουρά του οργάνου, οι όγκοι που εντοπίζονται στην παγκρεατική κεφαλή πιο συχνά παρουσιάζονται με ίκτερο, στεατόρροια και απώλεια βάρους. [10]

Ο πόνος είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα, ακόμη και εάν η μάζα του παγκρέατος είναι μικρότερη από 2 εκ. [11]. Επίσης σημαντικό κλινικό σημείο μπορεί να αποτελεί και η πρόσφατη εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη, που συμβαίνει περίπου στο 20-25% των ασθενών [12].

Διαγνωστική Προσπέλαση

Οι ασθενείς που παρουσιάζονται με συμπτώματα ύποπτα για παγκρεατικό καρκίνο, θα πρέπει να υποβάλλονται σε μια σειρά διαγνωστικών εξετάσεων. Η αξονική τομογραφία κοιλίας με χορήγηση ενδοφλέβιου σκιαγραφικού και πρωτόκολλο παγκρέατος (για την λεπτομερή σκιαγράφιση των αγγειακών δομών), αποτελεί την απεικόνιση εκλογής. Η απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία επιλέγεται σε περιπτώσεις που υπάρχουν ύποπτες ηπατικές εστίες που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Μετά την αρχική απεικόνιση, όπου διαπιστώνεται η νόσος στο πάγκρεας, ακολουθεί απεικονιστική σταδιοποίηση με αξονική θώρακος προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν δευτεροπαθών εντοπίσεων και να γίνει η ορθή σταδιοποίηση της νόσου. Η σταδιοποίηση με PET-CT δεν είναι απαραίτητη, εκτός από τις περιπτώσεις που υπάρχουν αμφίβολα ευρήματα στην συμβατική απεικόνιση. [13]

Μία άλλη βασική μέθοδος για την απεικόνιση και λήψη βιοψίας είναι η ενδοσκοπική υπερηχογραφία (Endoscopic Ultra Sound - EUS). Η ενδοσκοπική υπερηχογραφία με ή χωρίς λήψη βιοψίας με λεπτή βελόνα, αποτελεί μία από τις βασικές μεθόδους για την διάγνωση και αξιολόγηση των παθολογικών ευρημάτων του παγκρέατος. Η μέθοδος έχει μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια από την αξονική τομογραφία και το PET-CT στην αναγνώριση παγκρεατικών καρκίνων σε πρώιμο στάδιο. Ως διαγνωστική μέθοδος για τον παγκρεατικό καρκίνο, το EUS αγγίζει σε ευαισθησία το 99%, ακόμη και για μικρούς όγκους των 2-3 εκατοστών, ενώ η αντίστοιχη ευαισθησία για την αξονική τομογραφία φτάνει το 55%. Επίσης το EUS έχει πολύ υψηλή αρνητική προβλεπτική αξία και μπορεί αξιόπιστα να αποκλείσει την ύπαρξη παγκρεατικού καρκίνου. Τα ποσοστά επιπλοκών που μπορεί να προκύψουν από το EUS είναι χαμηλά, της τάξης του 1-3%. Το EUS έχει αποδειχθεί ανώτερο από την πολυπαραμετρική αξονική για τον καθορισμό του μεγέθους του όγκου (T) στην σταδιοποίηση της νόσου, με μικρότερο ρίσκο να υπερεκτιμήσει το (T), γεγονός που εάν συμβεί μπορεί πιθανά να αποκλείσει μια ομάδα ασθενών από πιθανή χειρουργική εξαίρεση. Η ακρίβεια για τη σταδιοποίηση

των λεμφαδένων με χρήση EUS κυμαίνεται από 64% - 82%. Σε ανεγχείρητους παγκρεατικούς καρκίνους το EUS μπορεί να διαδραματίσει θεραπευτικό ρόλο με διάφορους τρόπους, όπως αντιμετώπιση του καρκινικού πόνου με αποκλεισμό του κοιλιακού πλέγματος, αποσυμφόρηση των χοληφόρων σε περιπτώσεις αποφρακτικού ικτέρου καθώς και ως μέσο υποβοήθησης της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας. [142]

Η Ενδοσκοπική Παλίνδρομη Χολαγγειοπαγκρεατογραφία (ERCP), είναι η εξέταση που προτείνεται σε περιπτώσεις απόφραξης των χοληφόρων που χρήζουν αποσυμφόρησης με την τοποθέτηση ενδοπρόθεσης (stent), ενώ παράλληλα μπορεί να πραγματοποιηθεί και η λήψη βιοψίας ή κυτταρολογικής εξέτασης, προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση του νεοπλάσματος. Η Μαγνητική Παλίνδρομη Χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP), αποτελεί εναλλακτική απεικόνιση, σε περίπτωση αδυναμίας διενέργειας ERCP, ή όταν η ERCP δεν είναι διαγνωστική. [14]. Η MRCP στερείται της δυνατότητας θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Οι ασθενείς πρέπει επίσης να υποβάλλονται και σε εργαστηριακό έλεγχο, ο οποίος περιλαμβάνει έλεγχο τρανσαμινασών, χολερυθρίνης, αμυλάσης και λιπάσης ορού, αλλά και έλεγχο αιματολογικών δεικτών και νεφρικής λειτουργίας. Πολύ σημαντικό βήμα κατά την αρχική διερεύνηση και διάγνωση αποτελεί και ο έλεγχος των καρκινικών δεικτών, ιδίως του καρκινικού αντιγόνου 19-9 (CA 19-9) και δευτερευόντως του καρκινοεμβρυικού αντιγόνου (CEA). Η μέτρηση της τιμής των καρκινικών δεικτών αποτελεί σημαντική παράμετρο κατά την παρακολούθηση των ασθενών και τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων. Αποτελούν επίσης σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες [15].

1.1.4 Ιστολογική Επιβεβαίωση - Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά

Τα παγκρεατικά καρκινώματα προέρχονται τόσο από την εξωκρινή όσο και από την ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Παρόλα αυτά, περίπου το 95%, αναπτύσσονται στην εξωκρινή μοίρα, από το επιθήλιο των πόρων, τα κυψελοειδή κύτταρα ή τον συνδετικό ιστό. Μόνο το 2% των όγκων της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος είναι καλοήγη. Ο πιο συχνός τύπος παγκρεατικού καρκίνου είναι το αδενοκαρκίνωμα των πόρων, που αντιστοιχεί περίπου στο 80% όλων των

παγκρεατικών καρκινωμάτων. Μικροσκοπικά αυτά τα νεοπλάσματα ποικίλλουν από καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα, έως πτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα. Το καρκίνωμα των πόρων του παγκρέατος τυπικά προκαλεί μια έντονη αντίδραση του στρώματος. [145]

Άλλοι ιστολογικοί υπότυποι του παγκρεατικού καρκίνου, όπως το αδеноπλακώδες, χαρακτηρίζονται από πτωχότερη πρόγνωση. Αντίθετα, τα παγκρεατικά κυψελιδικά καρκινώματα, έχουν ελαφρώς καλύτερη πρόγνωση από το αδеноκαρκίνωμα των πόρων. [146] Όσον αφορά τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα και τα νευροενδοκρινή καρκινώματα του παγκρέατος είναι τα δεύτερα σε συχνότητα νεοπλάσματα που αφορούν το πάγκρεας. [147]

Η ιστολογική επιβεβαίωση είναι απαραίτητη προκειμένου να τεθεί η διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου. Η βιοψία λαμβάνεται είτε κατά τη διάρκεια της ERCP, είτε κατά την διάρκεια του EUS, είτε διαδερμικά. Η διαδερμική βιοψία συνήθως, διενεργείται είτε υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση, είτε υπό καθοδήγηση αξονικού τομογράφου. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της κάθε μεθόδου εξαρτάται από το μέγεθος του όγκου και την εμπειρία του ιατρού που λαμβάνει την βιοψία. Αναφορικά με τη βιοψία υπό υπέρηχο και υπό αξονικό τομογράφο η ευαισθησία κυμαίνεται μεταξύ 80%-90% και 98%-100% αντίστοιχα [21].

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της διάγνωσης από βιοψία μέσω ενδοσκοπικού υπερήχου (EUS), ξεπερνά το 90% [22].

1.1.5 Σταδιοποίηση Καρκίνου Παγκρέατος

Το προτεινόμενο σύστημα σταδιοποίησης για τον παγκρεατικό καρκίνο είναι η 8η έκδοση του συστήματος TNM, που βασίζεται στην αξιολόγηση των τριών παραμέτρων: Όγκος - Λεμφαδένας - Μετάσταση (Tumor - Node - Metastasis - TNM System), της Αμερικανικής Μεικτής Επιτροπής για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer - AJCC). Χρησιμοποιείται κατά την αρχική διάγνωση για τον καθορισμό της έκτασης της νόσου, την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης αλλά και ως εργαλείο πρόβλεψης της πρόγνωσης, ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Η τρέχουσα 8η έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης για τον

παγκρεατικό καρκίνο, καθιερώθηκε βασιζόμενη στα παθολογοανατομικά δεδομένα ασθενών με χειρουργικά εξαιρεθέντα παγκρεατικό καρκίνο. Οι παρακάτω πίνακες απεικονίζουν τα χαρακτηριστικά της τελευταίας έκδοσης του συστήματος σταδιοποίησης. [35]

Πίνακας 2: 8η Έκδοση Συστήματος Σταδιοποίησης για τον Παγκρεατικό Καρκίνο
Συντομογραφίες: PLN - positive lymph node (θετικός λεμφαδένας), CA - celiac axis (κοιλιακό πλέγμα), SMA - superior mesenteric artery (άνω μεσεντέρια αρτηρία), CHA - common hepatic artery (κοινή ηπατική αρτηρία) [144]

American Joint Committee on Cancer 8th Edition Staging System for Pancreatic Cancer.

T	Primary Tumor	N	Number of Regional PLNs	Stage	T	N	M
T1	≤2 cm	N0	0	IA	1	0	0
T2	>2 cm, ≤4 cm	N1	1 to 3	IB	2	0	0
T3	>4 cm	N2	≥4	IIA	3	0	0
T4	CA, SMA, and/or CHA invasion			IIIB	1-3	1	0
				III	4	Any	0
					Any	2	
				IV	Any	Any	1

Πίνακας 3: 8η έκδοση TNM για τον παγκρεατικό καρκίνο (UICC - Union for International Cancer Control) [210]

Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1, T2, T3	N1	M0
III	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	Any N	M0
IV	Any T	Any N	M1

1.1.6 Διαχείριση Τοπικής - Τοπικά Εκτεταμένης Νόσου

1.1.6.1 Θεραπεία Εξαιρέσιμου Παγκρεατικού Καρκίνου

Η χειρουργική εξαίρεση είναι η μόνη θεραπευτική προσέγγιση που μπορεί να οδηγήσει δυνητικά σε ίαση. Μετά την ολοκλήρωση της απεικονιστικής διερεύνησης, μόνο οι ασθενείς με υψηλή πιθανότητα πλήρους εξαίρεσης του συνόλου του φορτίου της νόσου, επί υγιών ορίων (R0 εκτομή - ορίζεται η απουσία καρκινικών κυττάρων εντός 1 χιλιοστού από κάθε χειρουργικό όριο), είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για απευθείας χειρουργική εξαίρεση.

1.1.6.2 Ορισμός Ανεγχείρητης και Οριακά Εξαιρέσιμης Νόσου

Γενικά τα παγκρεατικά καρκινώματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξαιρέσιμα, οριακά εξαιρέσιμα και ανεγχείρητα, ανάλογα με την σχέση τους με τις γειτονικές δομές και με την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Ένα παγκρεατικό καρκίνωμα είναι εξ' ορισμού ανεγχείρητο εάν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις στο ήπαρ, στο περιτόναιο, στο επίπλουν, σε απομακρυσμένους λεμφαδένες και σε οποιοδήποτε εξω-περιτοναϊκό όργανο.

Ένας παγκρεατικός όγκος χαρακτηρίζεται ως τοπικά μη εξαιρέσιμος συνήθως λόγω αγγειακής διήθησης, κυρίως της άνω μεσεντέριας αρτηρίας. Παρόλο που οι πρακτικές σχετικά με την εξαιρεσιμότητα των όγκων του παγκρέατος διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων κέντρων, πολλοί χειρουργοί θεωρούν ένα παγκρεατικό καρκίνωμα ως τοπικά εκτεταμένο ή ανεγχείρητο εάν υπάρχει ενθυλάκωση (περισσότερο από το μισό της περιφέρειας του αγγείου) της άνω μεσεντέριας αρτηρίας, της κοιλιακής αρτηρίας, της ηπατικής αρτηρίας, ή εάν υπάρχει απόφραξη - διήθηση της άνω μεσεντέριας φλέβας ή της συμβολής της άνω μεσεντέριας φλέβας, χωρίς να έχει αναπτυχθεί το κατάλληλο παράπλευρο δίκτυο, άνωθεν ή κάτωθεν του όγκου, προκειμένου να γίνει ανακατασκευή του αγγείου κατά το χειρουργείο.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες του Εθνικού Ολοκληρωμένου Δικτύου για τον Καρκίνο (National Comprehensive Cancer Network - NCCN), ορίζουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά ως ενδεικτικά μη εξαιρεσιμότητας: [148]

- Για όγκους κεφαλής παγκρέατος και αγκιστροειδούς απόφυσης:
 - Συμπαγής όγκος σε επαφή με την άνω μεσεντέρια αρτηρία >180 μοίρες.
 - Συμπαγής όγκος σε επαφή με τον κοιλιακό άξονα >180 μοίρες.
 - Συμπαγής όγκος σε επαφή με τον πρώτο κλάδο της άνω μεσεντέριας αρτηρίας για τη νήστιδα.
 - Αδυναμία ανακατασκευής της άνω μεσεντέριας φλέβας ή της πυλαίας φλέβας λόγω εμπλοκής του όγκου ή απόφραξης - διήθησης.
 - Επαφή με τον εγγύς αποχετευτικό κλάδο της νήστιδας προς την άνω μεσεντέρια φλέβα.

- Για όγκους σώματος και ουράς παγκρέατος:

- Συμπαγής όγκος σε επαφή με την άνω μεσεντέρια αρτηρία ή τον κοιλιακό άξονα >180 μοίρες.
- Συμπαγής όγκος με συμμετοχή του κοιλιακού άξονα και αρτηριακή συμμετοχή.
- Αδυναμία ανακατασκευής της άνω μεσεντέριας φλέβας ή της πυλαίας φλέβας λόγω εμπλοκής του όγκου ή απόφραξης - διήθησης.

Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με ανεγχείρητη νόσο, αντιμετωπίζονται με λήψη χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Σχετικά με τον ορισμό του οριακά εξαιρέσιμου παγκρεατικού καρκίνου, το NCCN ορίζει τα παρακάτω κριτήρια: [148]

- Για όγκους κεφαλής παγκρέατος και αγκιστροειδούς απόφυσης:

- Συμπαγής όγκος σε επαφή με την άνω μεσεντέρια φλέβα ή την πυλαία φλέβα >180 μοίρες που προκαλεί ανωμαλία του περιγράμματος της φλέβας ή θρόμβωση, αλλά με κατάλληλο εγγύς και άπω παράπλευρο αγγειακό δίκτυο προς τον όγκο, το οποίο θα επιτρέπει την πλήρη εξαίρεση και την ανακατασκευή της φλέβας.
- Συμπαγής όγκος σε επαφή με την κάτω κοίλη φλέβα.
- Συμπαγής όγκος σε επαφή με την κοινή ηπατική αρτηρία, χωρίς επέκταση στον κοιλιακό άξονα ή στον διχασμό της ηπατικής αρτηρίας, που να επιτρέπει την ασφαλή και πλήρη εξαίρεση με δυνατότητα ανακατασκευής του αγγείου.
- Συμπαγής όγκος σε επαφή με την άνω μεσεντέρια αρτηρία <180 μοίρες.
- Συμπαγής όγκος σε επαφή με δομή που παρουσιάζει ανατομική παραλλαγή (π.χ. επικουρική δεξιά ηπατική αρτηρία, αντικατάσταση δεξιάς ηπατικής αρτηρίας, αντικατάσταση κοινής ηπατικής αρτηρίας) και το ποσοστό επαφής με τον όγκο

•

- Για όγκους σώματος - ουράς παγκρέατος:
 - Συμπαγής όγκος σε επαφή με τον κοιλιακό άξονα <180 μοίρες.
 - Συμπαγής όγκος σε επαφή με τον κοιλιακό άξονα >180 μοίρες, χωρίς την συμμετοχή της αορτής και της γαστροδωδεκαδακτυλικής αρτηρίας ώστε να επιτρέπεται η τροποποιημένη επέμβαση Appleby.

Οι περισσότεροι από τους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με οριακά εξαιρεσιμη νόσο, παραπέμπονται προκειμένου να λάβουν νεοεπικουρική χημειοθεραπεία, πριν από την χειρουργική επέμβαση.

1.1.7 Θεραπευτική Προσέγγιση

Οι ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος διαγιγνώσκονται στην πλειοψηφία τους όταν η νόσος είναι ήδη μεταστατική, εξαιτίας της επιθετικής βιολογικής του συμπεριφοράς και των άτυπων κλινικών συμπτωμάτων και σημείων που συνήθως δεν εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της νόσου. Η μόνη θεραπευτική παρέμβαση που μπορεί να οδηγήσει στην ίαση είναι η χειρουργική εξαίρεση. Παρόλα αυτά μόνο το 15% - 20% των ασθενών έχουν εξαιρεσιμη νόσο στη διάγνωση (με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω). Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται είτε με τοπικά προχωρημένα, είτε με μεταστατική νόσο. Εφόσον τεθεί η διάγνωση με ιστολογική επιβεβαίωση, καθορίζεται η έκταση της νόσου με απεικονιστικές εξετάσεις και ολοκληρωθούν οι εργαστηριακές και μοριακές εξετάσεις, πρέπει να ληφθεί η απόφαση για έναρξη θεραπείας πρώτης γραμμής, σε ασθενείς με ανεγχείρητη και μεταστατική νόσο. Όλες οι αποφάσεις για τις θεραπευτικές παρεμβάσεις ανεξαρτήτως σταδίου νόσου θα πρέπει να λαμβάνονται στα πλαίσια Ογκολογικού Συμβουλίου.

1.1.7.1 Επικουρική Θεραπεία Μετά από Χειρουργική Εξαίρεση

Η μελέτη ESPAC-1 έδωσε τα πρώτα δεδομένα ότι η επικουρική χημειοθεραπεία, μετά από πλήρη χειρουργική εξαίρεση, μπορεί να έχει όφελος επιβίωσης στον καρκίνο του παγκρέατος [151]. Τα αποτελέσματα της μελέτης CONKO-001, ήταν τα πρώτα που καθιέρωσαν τη χρήση της γεμισιταβίνης ως επικουρική χημειοθεραπεία συγκρινόμενη με την παρακολούθηση [152]. Μερικά χρόνια αργότερα ακολούθησε η μελέτη ESPAC-04, από την οποία αναδείχθηκε ο συνδυασμός καπεσιταβίνης - γεμισιταβίνης ως η βέλτιστη επικουρική θεραπεία έναντι της μονοθεραπείας με γεμισιταβίνη [153].

Η επικουρική θεραπεία εκλογής, που χρησιμοποιείται στην καθημερινή κλινική πρακτική για τους ασθενείς με πολύ καλή γενική κατάσταση, καθιερώθηκε από την μελέτη PRODIGE/CCTG PA.6, με το σχήμα mFOLFIRINOX (oxaliplatin, irinotecan, leucovorin, 5FU). Εναλλακτική επιλογή για ασθενείς με ήπια επηρεασμένη κλινική εικόνα συνεχίζει να αποτελεί ο συνδυασμός καπεσιταβίνης - γεμισιταβίνης. [154, 155]

1.1.7.2 Θεραπεία Δυνητικά Εξαιρέσιμου Παγκρεατικού Καρκίνου

Για τον δυνητικά εξαιρέσιμο παγκρεατικό καρκίνο υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την χορήγηση προεγχειρητικής θεραπείας έναντι της απευθείας χειρουργικής εξαίρεσης [156]. Η χορήγηση προεγχειρητικής θεραπείας προσδίδει όφελος στους ασθενείς αυξάνοντας τα ποσοστά της πλήρους χειρουργικής εξαίρεσης (R0 εκτομές), βοηθά στην αναγνώριση του πληθυσμού των ασθενών που θα ωφεληθούν από τη χειρουργική εξαίρεση καθώς με τη χορήγηση χημειοθεραπείας μπορεί να εκτιμηθεί η βιολογική συμπεριφορά της νόσου, ενώ φαίνεται ότι δυνητικά υπάρχει όφελος και στην ολική επιβίωση αυτών των ασθενών.

Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που αποτελούν θεραπείες εκλογής για την προεγχειρητική θεραπεία στον παγκρεατικό καρκίνο είναι το σχήμα FOLFIRINOX (oxaliplatin, irinotecan, leucovorin, 5FU), και το σχήμα gemcitabine - nab-paclitaxel. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύγχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία, αν και έχει φανεί από μελέτες ότι η προσθήκη της ακτινοθεραπείας στο

FOLFIRINOX δεν προσέθεσε όφελος στους ασθενείς, σε σχέση με τη χορήγηση θεραπείας μόνο με FOLFIRINOX [157, 158].

1.1.7.3 Θεραπεία Τοπικά Προχωρημένου Παγκρεατικού Καρκίνου

Ο τοπικά προχωρημένος παγκρεατικός καρκίνος αντιπροσωπεύει ένα φάσμα περιπτώσεων. Στο 30% - 40% των ασθενών, ο όγκος είναι ανεγχείρητος εξαιτίας αγγειακής συμμετοχής. Στην τοπικά προχωρημένη νόσο έχει ρόλο η εισαγωγική θεραπεία ή θεραπεία μετατροπής προκειμένου να υποσταδιοποιηθεί η νόσος και να καταστεί χειρουργήσιμη. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι με τη χρήση εισαγωγικής θεραπείας αυξάνεται το ποσοστό R0 εκτομών καθώς και η ολική επιβίωση. Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την ομάδα των ασθενών είναι το FOLFIRINOX και το gemcitabine - nab-paclitaxel χωρίς σημαντικές διαφορές στην αποτελεσματικότητα [159,160].

1.1.7.4 Θεραπεία Μεταστατικής Νόσου

Στους ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος ο στόχος της θεραπείας είναι η παράταση της επιβίωσης και η ανακούφιση των συμπτωμάτων. Για την επιλογή της θεραπείας λαμβάνονται υπόψη η γενική κατάσταση του ασθενή (Performance Status - Eastern Cooperative Oncology Group - EGO C PS), οι συννοσηρότητες, τα εργαστηριακά ευρήματα (όπως π.χ. η τιμή της χολερυθρίνης του ορού) και το φορτίο της νόσου.

1.1.7.5 Ασθενείς με Στοχευτικές Μεταλλάξεις.

Στους ασθενείς που φέρουν οδηγούς μεταλλάξεις, πέραν της κλασικής χημειοθεραπείας υπάρχει η δυνατότητα χορήγησης στοχευτικών θεραπευτικών παραγόντων. Οι κυριότερες μεταλλάξεις και οι αντίστοιχες θεραπευτικές επιλογές περιγράφονται στη συνέχεια.

BRCA1/2 ΚΑΙ PALB2

Για τους ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 και PALB2 (σωματικές και γαμετικές), προτείνεται θεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό και ακολούθως θεραπεία συντήρησης με PARP αναστολείς. Το χημειοθεραπευτικό σχήμα που συνήθως χορηγείται είναι το FOLFIRINOX, ενώ ως εναλλακτική επιλογή για ασθενείς με συννοσηρότητες προτείνεται ο συνδυασμός cisplatin - gemcitabine.

Οι όγκοι με ανεπάρκεια στα γονίδια του ομόλογου ανασυνδυασμού, όπως τα BRCA1/2 και PALB2, είναι ευαίσθητοι σε χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν πλατινούχα παράγωγα (οξαλιπλάτινα ή σισπλατίνα), τα οποία προκαλούν περαιτέρω βλάβες στο DNA [36,37]. Συγκεκριμένα οι PARP αναστολείς οδηγούν σε μη επιδιορθώσιμες βλάβες σχάσης της διπλής έλικας του DNA και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή και ως “συνθετική θνησιμότητα” (synthetic lethality), κατά την οποία δύο συνθήκες εάν συμβούν σε δεδομένη στιγμή συνδυαστικά, μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο, αλλά η καθεμιά από αυτές εάν συμβεί μεμονωμένα, δεν μπορεί να επιφέρει αυτό το αποτέλεσμα [38,39].

Από τα δεδομένα τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών σε ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 και PALB2, έχει φανεί ότι η χορήγηση PARP αναστολέων ως θεραπεία συντήρησης, μετά από ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό, βελτιώνει το διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου. Τα εγκεκριμένα φάρμακα για αυτήν την κατηγορία των ασθενών είναι το olaparib και το rucaparib [40,41].

Όγκοι με μικροδορυφορική αστάθεια - ανεπάρκεια γονιδίων επιδιόρθωσης της διαδικασίας ζευγοποίησης του DNA (MSI-h/dMMR)

Η συχνότητα των παγκρεατικών καρκίνων MSI-h/dMMR, υπολογίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 2%. Για τους ασθενείς με μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο που ο όγκος τους χαρακτηρίζεται ως MSI-h/dMMR, έχει βρεθεί ότι η χορήγηση ανοσοθεραπείας προσδίδει περισσότερες και μακροχρόνιες ανταποκρίσεις σε σχέση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας. Συγκεκριμένα, από δεδομένα μιας τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης συστήνεται η χορήγηση

pembrolizumab, ενός anti-PD-1 αναστολέα [42]. Δεδομένα στον συγκεκριμένο πληθυσμό, υπάρχουν επίσης και από τη χορήγηση του συνδυασμού nivolumab/ipilimumab (anti-PD-1/anti-CTLA4 αναστολείς αντίστοιχα) [43].

NTRK (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase) - Συντήξη Γονιδίου Νευροτροφικού Υποδοχέα Τυροσινικής Κινάσης

Οι συντήξεις του γονιδίου NTRK είναι σπάνιες στον παγκρεατικό καρκίνο καθώς απαντώνται σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Για ασθενείς με μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, των οποίων οι όγκοι είναι θετικοί για συντήξεις του NTRK, προτείνεται η έναρξη θεραπείας με αναστολείς τυροσινικής κινάσης που στοχεύουν το NTRK, όπως το entrectinib, το larotrectinib και το repotrectinib. Μελέτες έχουν δείξει σημαντική βελτίωση στην ανταπόκριση και στη διάρκεια της ανταπόκρισης με τη χορήγηση αυτών των στοχευτικών φαρμάκων σε σχέση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας [44,45].

Συντήξεις του Γονιδίου RET

Για τους ασθενείς που φέρουν συντήξεις στο γονίδιο RET, συστήνεται η έναρξη θεραπείας με εκλεκτικούς αναστολείς του RET, καθώς βελτιώνουν σε μεγάλο βαθμό την ανταπόκριση και τη διάρκειά της σε σχέση με την κλασική χημειοθεραπεία. Οι συντήξεις του RET είναι πολύ σπάνιες και αφορούν λιγότερο από το 1% των ασθενών με καρκίνο παγκρέατος. Η προτεινόμενη θεραπεία για τους ασθενείς αυτούς είναι ο εκλεκτικός αναστολέας του RET selipercatinib, όπως προκύπτει από τα δεδομένα της μελέτης LIBRETTO-001 [46].

Μετάλλαξη BRAF-V600E.

Σε ασθενείς με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος που φέρουν τη μετάλλαξη BRAF-V600E, συστήνεται να ξεκινούν με συνδυασμό χημειοθεραπείας, όπως οι ασθενείς που δεν φέρουν κάποια στοχευτική μετάλλαξη. Σε ασθενείς που δεν είναι υποψήφιοι για χημειοθεραπεία ή σε περίπτωση αποτυχίας της χημειοθεραπείας, προτείνεται ο συνδυασμός αναστολέα BRAF με αναστολέα MEK και συγκεκριμένα ο συνδυασμός dabrafenib και trametinib, ο οποίος έχει δείξει ικανοποιητική αποτελεσματικότητα σε αυτόν τον πληθυσμό [47].

Μετάλλαξη KRAS G12C

Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS και συγκεκριμένα την μετάλλαξη KRAS G12C, συστήνεται η χορήγηση χημειοθεραπείας ως θεραπεία πρώτης γραμμής και σε περίπτωση επιδείνωσης συστήνεται η χορήγηση θεραπείας με ειδικά στοχευτικά μόρια όπως το sotorasib και το adagrasib [48,49].

Συνήθως στον παγκρεατικό καρκίνο ανευρίσκεται η μετάλλαξη KRAS G12D.

1.1.7.6 Ασθενείς Χωρίς Στοχευτικές Μεταλλάξεις

Η πλειοψηφία των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, δεν έχουν στοχευτικές μεταλλάξεις. Σε αυτή την ομάδα των ασθενών, εφόσον το επιτρέπουν αφενός η κλινική τους κατάσταση (ECOG PS 0-1) και αφετέρου οι τιμές του εργαστηριακού ελέγχου (π.χ. τιμή χολερυθρίνης, ηπατική λειτουργία, νεφρική λειτουργία) προτείνεται η χορήγηση χημειοθεραπείας.

Από τα δεδομένα της τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης PRODIGE 4, το σχήμα FOLFIRINOX στην πρώτη γραμμή θεραπείας βελτίωσε την επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου (PFS) [50] και έτσι αποτελεί πλέον την θεραπεία εκλογής στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Πρόσφατα εγκρίθηκε η χρήση του συνδυασμού NALIRIFOX ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τον μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, βάσει των αποτελεσμάτων της τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης NAPOLI-3. Στο σχήμα αυτό

χρησιμοποιείται η λιποσωματική ιρινοτεκάνη, αντί της κλασικής μορφής της ιρινοτεκάνης. Η λιποσωματική ιρινοτεκάνη είναι μια μορφή ιρινοτεκάνης που περικλείεται σε ένα λιπιδικό κυστίδιο διπλού στρώματος, γνωστό ως λιπόσωμα. Η λιποσωματική μορφή παρατείνει τα επίπεδα της ιρινοτεκάνης στο πλάσμα, που έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη έκθεση στον ενεργό μεταβολίτη της ιρινοτεκάνης SN-38, οδηγώντας σε αυξημένη αντικαρκινική δραστηριότητα [184, 185]. Η θεραπεία αυτή προσέδωσε όφελος τόσο στην συνολική επιβίωση (OS), όσο και στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS) [51].

Μία άλλη επιλογή θεραπείας αποτελεί ο συνδυασμός gemcitabine - nab-paclitaxel, όπως προκύπτει από τα δεδομένα της μελέτης MPACT. Το σχήμα αυτό αποτελεί εναλλακτική επιλογή θεραπείας σε ασθενείς που για οποιοδήποτε λόγο δεν μπορούν να λάβουν τους συνδυασμούς FOLFIRINOX ή NALIRIFOX, ή έχουν υποτροπιάσει κατά τη διάρκεια ή σε διάστημα μικρότερο των 6 μηνών από τη λήξη της επικουρικής θεραπείας με τον συνδυασμό mFOLFIRINOX [52].

Σε ασθενείς με ήπια επηρεασμένη γενική κατάσταση (ECOG PS 2) και συννοσηρότητες, αποδεκτό σχήμα θεραπείας αποτελεί ο συνδυασμός gemcitabine - nab-paclitaxel με τροποποιημένο δοσολογικό σχήμα. Άλλες επιλογές θεραπείας αποτελούν συνδυασμοί θεραπείας με βάση τις φθοριοπυριμιδίνες και συγκεκριμένα με τα σχήματα FOLFOX, CAPOX, FOLFIRI [53,54,55].

Επιπλέον στους ασθενείς με επηρεασμένη γενική κατάσταση, άλλες επιλογές θεραπείας που προτείνονται είναι η μονοθεραπεία με κάποια από τα φάρμακα γεμισιταβίνη, καπεσιταβίνη και συνδυασμός φθοριοουρακίλης με λευκοβορίνη [56,57,58].

Σχετικά με τη θεραπεία δεύτερης γραμμής, σε ασθενείς χωρίς στοχευτικές μεταλλάξεις, οι επιλογές καθορίζονται από τον συνδυασμό θεραπείας που έλαβαν στην πρώτη γραμμή. Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης NAPOLI-1, στους ασθενείς που έλαβαν πρώτης γραμμής θεραπεία με σχήματα βασισμένα στην γεμισιταβίνη, ο συνδυασμός της λιποσωματικής ιρινοτεκάνης με φθοριοουρακίλη και λευκοβορίνη έδειξε βελτίωση στην ολική επιβίωση, στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου και στην αντικειμενική ανταπόκριση [186].

Αντίστοιχα, οι ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία πρώτης γραμμής με το σχήμα FOLFIRINOX, μπορούν να ακολουθήσουν θεραπεία δεύτερης γραμμής με τον συνδυασμό gemcitabine - nab-paclitaxel, καθώς τα αποτελέσματα της τυχαιοποιημένης, φάσης 3 μελέτης PRODIGE 65 - UCGI 36 - GEMPAX UNICANCER, έδειξαν σημαντική βελτίωση στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου και στις

αντικειμενικές ανταποκρίσεις [187]. Στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται σχηματικά οι κατευθυντήριες οδηγίες την Ευρωπαϊκής Εταιρείας Παθολογικής Ογκολογίας (European Society of Medical Oncology - ESMO) για τον παγκρεατικό καρκίνο, με και χωρίς στοχευτικές μεταλλάξεις.

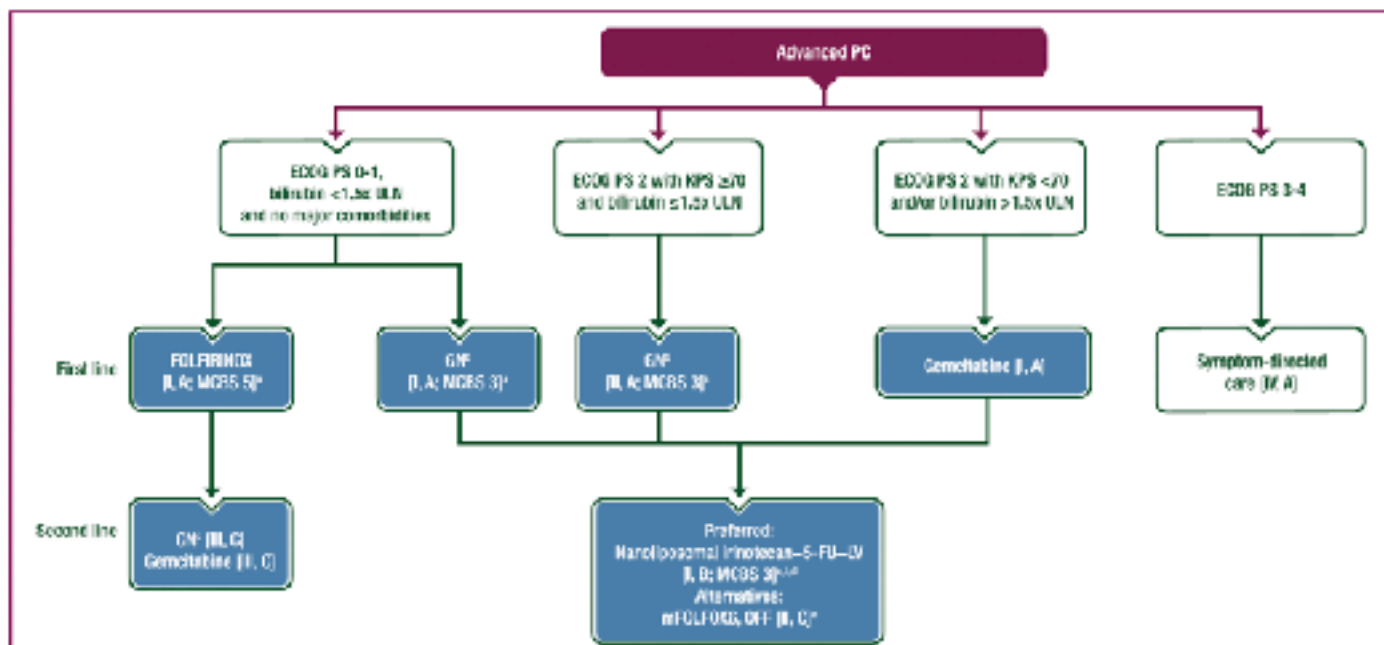


Figure 3. Systemic treatment of advanced PC.

Purple: general categories or stratification; blue: systemic anticancer therapy; white: other aspects of management.

5-FU, 5-fluorouracil; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration; FOLFIRINOX, leucovorin–5-fluorouracil–irinotecan–oxaliplatin; GN, gemtadine–nab-paclitaxel; KPS, Karnofsky performance status; MCB5, ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale; LV, leucovorin; mFOLFIRINOX, modified leucovorin–5-fluorouracil–oxaliplatin; OFF, oxaliplatin–fluorouracil–leucovorin; PC, pancreatic cancer; PS, performance status; ULN, upper limit of normal.

¹⁰⁰ESMO-MCBS v1.1¹⁰⁰ was used to calculate scores for new therapies/indications approved by the EMA or FDA. The scores have been calculated by the ESMO-MCBS Working Group and validated by the ESMO Guidelines Committee [<https://www.esmo.org/guidelines/esmo-mcb5/esmo-mcb5-evaluation-forms>].

¹⁰¹EMA and FDA approved in metastatic PC only (not advanced PC).

¹⁰²Not EMA or FDA approved as second-line therapy.

¹⁰³Only in patients with, or who have recovered to, ECOG PS 0-1.

¹⁰⁴If not given previously.

Εικόνα 4: Κατευθυντήριες Οδηγίες για τον μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο χωρίς στοχευτικές μεταλλάξεις (ESMO Guidelines)

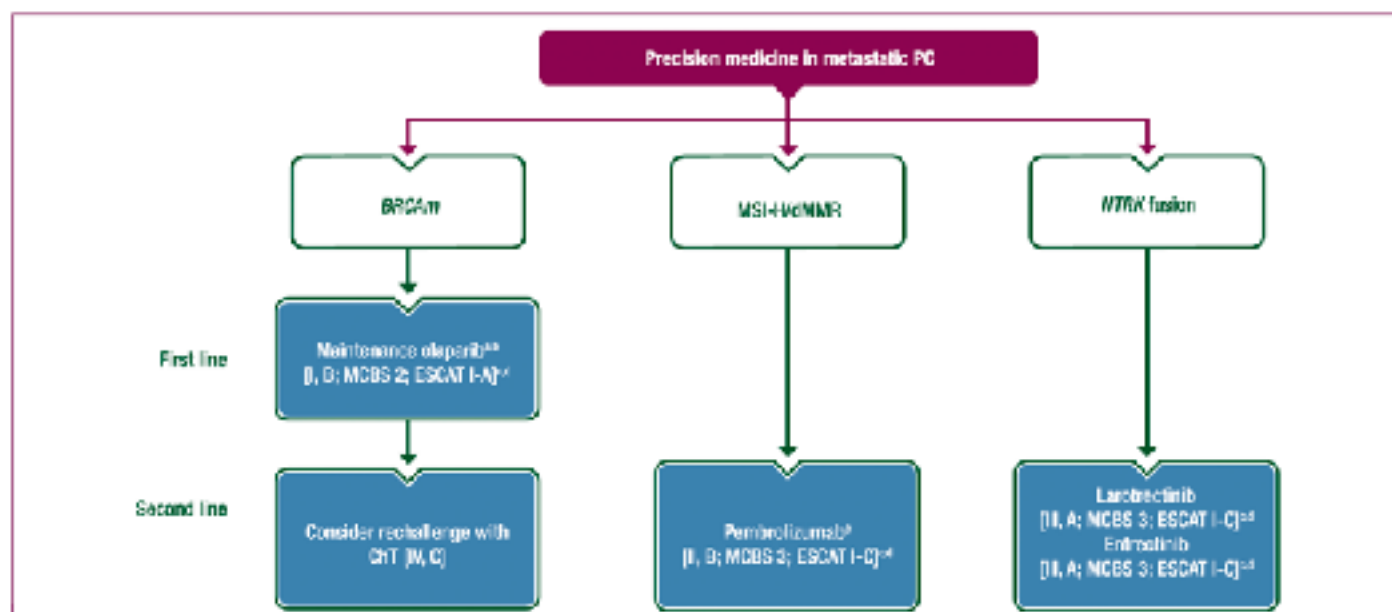


Figure 4. Precision medicine in metastatic PC.

Purple: general categories or stratification; blue: systemic anticancer therapy; white: other aspects of management.

CMT, chemotherapy; dMMR, mismatch repair deficient; EMA, European Medicines Agency; ESCAT, ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets; FDA, Food and Drug Administration; g, germline; MCBS, ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale; MSI-H, microsatellite instability-high; m, mutated; PC, pancreatic cancer.

¹EMA and FDA approved in patients with metastatic PC and gBRCA mutations.

²For patients whose disease is stable or responsive to platinum-based CMT.

³ESMO-MCBS v1.1¹⁰² was used to calculate scores for new therapies/indications approved by the EMA or FDA. The scores have been calculated by the ESMO-MCBS Working Group and validated by the ESMO Guidelines Committee (<https://www.esmo.org/guidelines/esmo-mcbs/esmo-mcbs-evaluation-forms>).

⁴ESCAT scores apply to alterations from genomically-driven analyses only. These scores have been defined by the guideline authors and validated by the ESMO Translational Research and Precision Medicine Working Group.¹⁰³ See Supplementary Table S10, available at <https://doi.org/10.1016/j.jannonc.2023.08.009> for more information on ESCAT scores.

⁵FDA approved; not EMA approved as a dMMR/MSI-H tumour-agnostic indication but for specific tumour types [excludes PC].

Εικόνα 5: Κατευθυντήριες Οδηγίες για τον μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο με στοχευτικές μεταλλάξεις (ESMO Guidelines)

1.1.8 Καρκινικοί δείκτες

Το καρκινικό αντιγόνο CA 19-9 (Cancer Antigen 19-9 or Carbohydrate Antigen 19-9 or Sialylated Lewis CA 19-9) είναι ένα σύμπλοκο γλυκοπρωτεΐνης υψηλού μοριακού βάρους και αποτελεί τροποποιημένο αντιγόνο της ομάδας αίματος Lewis. Ανιχνεύεται σε εμβρυϊκούς ιστούς (σιελογόνους και δακρυϊκούς αδένες, αναπνευστική οδός, πάγκρεας, ήπαρ, στόμαχος, έντερο) και στον ενήλικα σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα επιθηλιακά κύτταρα του παγκρέατος, των σιελογόνων αδένων, του στομάχου, του ήπατος, του βλεννογόνου της ουροδόχου κύστεως και του πνεύμονα. Το καρκινικό αντιγόνο 19-9 ανευρίσκεται, εκτός του ορού, και σε άλλα βιολογικά υγρά όπως το παγκρεατικό, το γαστρικό και το αμνιακό υγρό, στα ούρα, στη σίελο, το μητρικό γάλα και την τραχηλική βλέννη.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα του CA 19-9 για τον παγκρεατικό καρκίνο κυμαίνεται από 70%-92% και 68%-92% αντίστοιχα. Η ευαισθησία φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του όγκου. Τα επίπεδα του CA 19-9 έχουν επίσης χαμηλή ειδικότητα στους ικτερικούς ασθενείς. Η απόφραξη του χοληδόχου πόρου που προκαλεί υπερχολερυθριναιμία, αυξάνει τα επίπεδα του CA 19-9, κάτι που δυσκολεύει την αξιολόγηση των ασθενών με ίκτερο [16, 17].

Σχετικά με την χρήση του CA 19-9, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που επιβεβαιώνουν τον προβλεπτικό χαρακτήρα του. Συγκεκριμένα, ο βαθμός αύξησης του CA 19-9 (τόσο στη διάγνωση, όσο και στη μετεγχειρητική περίοδο) σχετίζεται με την μακροχρόνια επιβίωση. Όσον αφορά ασθενείς με δυνητικά εξαιρεσιμη νόσο, τα προεγχειρητικά επίπεδα του CA 19-9 βοηθούν στην πρόβλεψη ύπαρξης μικροσκοπικής νόσου μη ανιχνεύσιμης απεικονιστικά, στην πιθανότητα πλήρους εξαίρεσης (R0) και στην πρόβλεψη της μακροπρόθεσμης έκβασης. Ως εκ τούτου, τα επίπεδα του CA 19-9 συχνά συνυπολογίζονται μαζί με τα κριτήρια εξαιρεσιμότητας της νόσου για την βέλτιστη επιλογή των ασθενών που είναι υποψήφιοι για χειρουργική εξαίρεση. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα ως δείκτης εξαιρεσιμότητας [18,19,20]. Επιπλέον, η μέτρηση των επιπέδων του CA 19-9 στον ορό, αποτελεί χρήσιμο δείκτη κατά την παρακολούθηση των ασθενών, τόσο μετεγχειρητικά, όσο και κατά τη λήψη χημειοθεραπείας για την προχωρημένη και τη μεταστατική νόσο στον καρκίνο του παγκρέατος. Φαίνεται ότι η αύξηση του CA 19-9 συνήθως προηγείται της απεικονιστικής επιδείνωσης της νόσου, όμως η επιβεβαίωση της επιδείνωσης γίνεται με τα αποτελέσματα των απεικονιστικών εξετάσεων. (Εικόνα 6).

Εκτός από τον καρκίνο του παγκρέατος τα επίπεδα του δείκτη παρατηρούνται αυξημένα και σε άλλες κακοήθειες εξεργασίες του γαστρεντερικού σωλήνα και μη, όπως στον καρκίνο των ωοθηκών και του παχέος εντέρου. Τέλος, οι τιμές του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 δεν αυξάνονται στο 10% των ατόμων της Καυκάσιας φυλής (5% του γενικού πληθυσμού) με αρνητικό Lewis-φαινότυπο, παρά την ύπαρξη μεγάλων παγκρεατικών όγκων. [137,138]

Από τους υπόλοιπους δείκτες το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) έχει περιορισμένη ευαισθησία και ειδικότητα (58% και 75% αντίστοιχα) στη διάγνωση του καρκίνου του παγκρέατος, όπως και οι καρκινικοί δείκτες CA242, το πολυπεπτιδικό αντιγόνο ιστών (TPA) και το ειδικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο (TPS) [139, 140, 141].

CA 19-9 (U/mL)	Number of patients	Resectability (%)	R0 resection (%)	Survival after resection		Survival if unresectable
				5- year (%)	Median (months)	Median (months)
<5	99	73.7	48.6	21.9	26.8	10.1
5 to <37	281	79.7	52.7	27.2	28.5	9.1
37 to <100	216	83.3	46.9	19.1	26.9	8.6
100 to <250	247	82.2	42.1	16.8	22.5	5.4
250 to <500	204	72.1	37.0	8.3	20.1	9.2
500 to <1000	184	67.4	44.7	7.0	15.4	8.9
1000 to <2000	126	61.1	32.5	0.0	12.0	6.8
2000 to <4000	92	45.7	31.0	0.0	12.3	6.2
≥4000	94	38.3	27.8	0.0	14.4	7.2
		$p < 0.0001$	$p = 0.0009$		$p < 0.0001$	$p = 0.065$

Εικόνα 6: Προεγχειρητικά επίπεδα CA 19-9 και συσχέτιση με την εξαιρεσιμότητα και την επιβίωση στον παγκρεατικό καρκίνο

Από μία μελέτη των Hartwig W. και λοιπών, όπως φαίνεται στην εικόνα, τα προεγχειρητικά επίπεδα του CA 19-9, σχετίζονται με την εξαιρεσιμότητα και την επιβίωση. Στην μελέτη συμμετείχαν 1106 ασθενείς με εξαιρεσιμο και 437 ασθενείς με μη εξαιρεσιμο καρκίνο παγκρέατος. Το ποσοστό R0 εκτομών, υπολογίστηκε μόνο από τους ασθενείς με εξαιρεσιμη νόσο. Σε ανάλυση που συμπεριέλαβε το σύνολο των ασθενών (με εξαιρεσιμη και μη εξαιρεσιμη νόσο), η R0 εκτομή επιτεύχθηκε μόνο στο 15,4% του πληθυσμού. [143]

1.1.9 Μοριακά Μονοπάτια και Βιοδείκτες

Το αδενοκαρκίνωμα των πόρων του παγκρέατος, είναι μία νόσος που προκαλείται τόσο από κληρονομούμενες παθογενετικές μεταλλάξεις, όσο και από επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Δεδομένα από τις ομάδες International Cancer Genome Consortium (ICGC) και The Cancer Genome Atlas (TCGA), έχουν συμβάλει τα μέγιστα στην κατανόηση της γενετικής του παγκρεατικού καρκίνου [23,24].

Οι μοριακές μεταλλάξεις που συνήθως ανιχνεύονται στα παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

1. Ογκογονίδια

Ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως το KRAS

2. Ογκοκατασταλτικά Γονίδια

Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως TP53, p16/CDKN2A και SMAD4

3. Γονίδια επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA

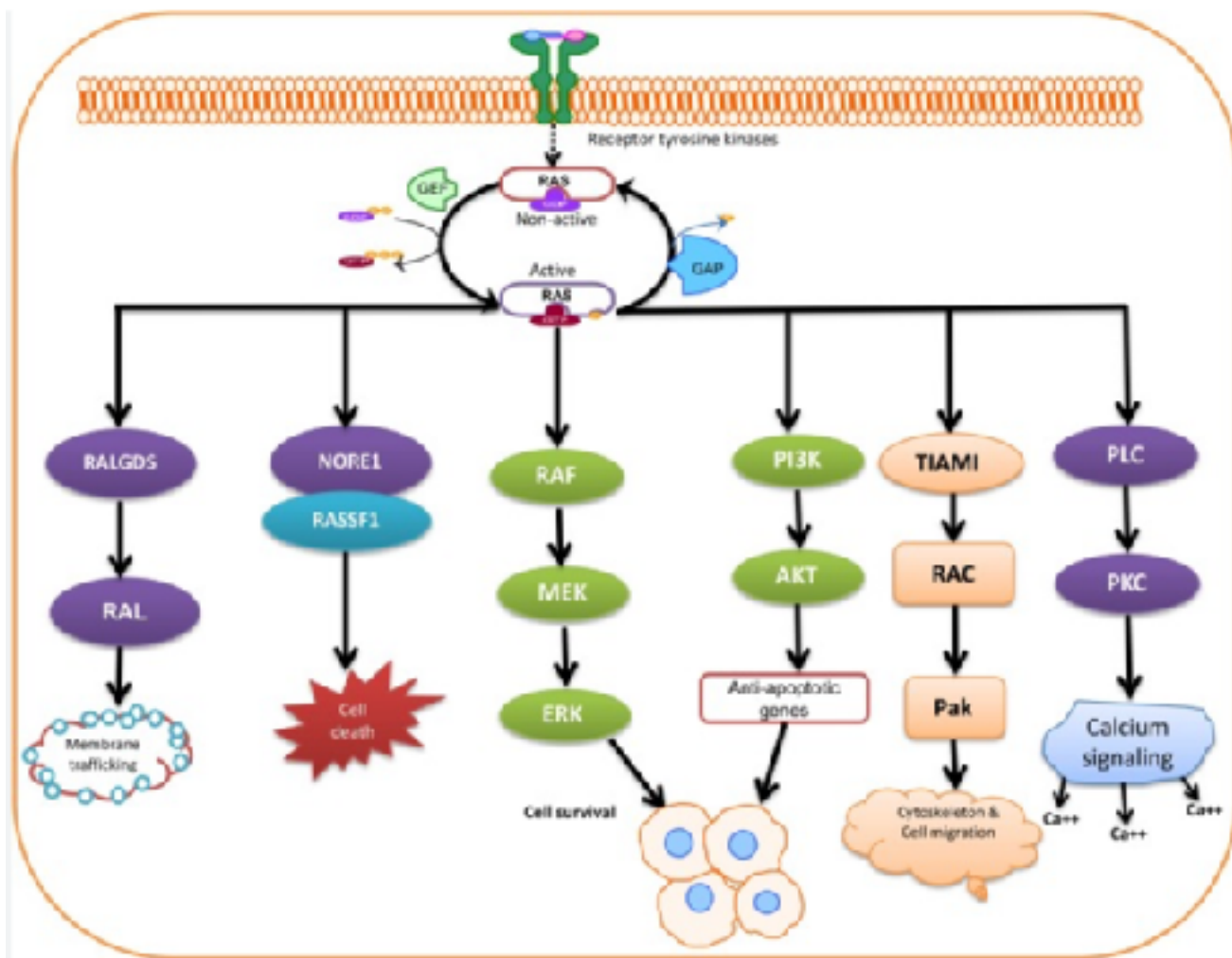
Μεταλλάξεις στα γονίδια που ελέγχουν την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, όπως τα γονίδια επιδιόρθωσης λανθασμένα ζευγοποιημένων βάσεων του DNA - Mismatch Repair Genes, MMR (π.χ. MLH1, MSH2, MSH6), και τα γονίδια ανεπάρκειας του ομόλογου ανασυνδυασμού - Homologous Repair Deficiency - HRD (π.χ. BRCA1/2, PALB2)

Οι περισσότερες από αυτές τις γενετικές μεταβολές αντιπροσωπεύουν κλινικά σημαντικές μεταλλάξεις, αλλά ορισμένες αποτελούν επιβλαβείς παθογενετικές γαμετικές αλλαγές σε άτομα με κληρονομική προδιάθεση για παγκρεατικό καρκίνο [25,26].

1.1.9.1 KRAS

Το γονίδιο KRAS, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12p, είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στον παγκρεατικό καρκίνο. Αυτό το γονίδιο είναι το ανθρώπινο ομόλογο που απομονώθηκε πρώτη φορά από τον ιό Kirsten Rat Sarcoma Virus, στον οποίο οφείλει και το όνομά του. Οι σωματικές μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων βρίσκεται στο κωδικόνιο 12, οδηγούν στην παθολογική ενεργοποίηση του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδίου.

Η πρωτεΐνη K-RAS είναι μία GTP-άση, μία τάξη ενζύμων που μετατρέπουν την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) σε διφωσφορική γουανοσίνη (GDP). Με αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη KRAS λειτουργεί ως διακόπτης που ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια ελέγχοντας την έκφραση του καταρράκτη των γονιδίων, [27], όπως φαίνεται και στην εικόνα 7 [28].



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του RAS [28]

Πάνω από το 90% των παγκρεατικών καρκίνων φέρουν κάποια σημαντική μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS. Αυτές οι μεταλλάξεις φαίνεται ότι παρουσιάζονται πολύ νωρίς στη διαδικασία της παγκρεατικής καρκινογένεσης, όπως υποδηλώνει η παρουσία τους σε μη διηθητικές προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του KRAS έχουν βρεθεί σε IPMNs, σε αλλοιώσεις ενδοεπιθηλιακής παγκρεατικής νεοπλασίας (PanINs), καθώς και σε μη διηθητικά βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα (MCNs) [29].

Καθώς οι μεταλλάξεις του KRAS είναι τόσο συχνές και εμφανίζονται νωρίς στην παγκρεατική καρκινογένεση, αποτελούν έναν πολύ σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων έγκαιρης ανίχνευσης. Παρόλο που παλαιότερα

θεωρούνταν ένας στόχος για τον οποίο δύσκολα μπορούσε να βρεθεί στοχευτική θεραπεία, πλέον υπάρχουν δεδομένα για στοχευτικές θεραπείες σε παγκρεατικά καρκινώματα που φέρουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου [30].

1.1.9.2 Ογκοκατασταλτικά Γονίδια

Στον παγκρεατικό καρκίνο έχει παρατηρηθεί απώλεια λειτουργίας σε διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Για να απωλέσει τη λειτουργία του ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, πρέπει να απενεργοποιηθούν και τα δύο αντίγραφα του. Αυτό μπορεί να συμβεί με έναν από τους τρεις παρακάτω μηχανισμούς:

1. Απώλεια ετεροζυγωτίας
2. Ομόζυγη απαλοιφή
3. Υπερμεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που απενεργοποιούνται σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις παγκρεατικών καρκίνων είναι τα εξής: p16/CDKN2A, TP53, SMAD4 [24].

p16/CDKN2A

Το γονίδιο p16/ αναστολέας 2A κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης στο χρωμόσωμα 9p, είναι απενεργοποιημένο σωματικά σχεδόν σε όλους τους παγκρεατικούς καρκίνους (σε ποσοστό περίπου 95%) [23,24,188]. Οι περισσότερες από αυτές τις απενεργοποιητικές σωματικές μεταλλάξεις, οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της p16, του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδίου CDKN2A.

Η απενεργοποίηση του γονιδίου p16/CDKN2A είναι σημαντική στον παγκρεατικό καρκίνο για πολλούς λόγους:

- Η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου καταργεί ένα σημαντικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου σε αυτούς τους όγκους.

- Κληρονομούμενες παθολογικές μεταλλαγές στο γονίδιο p16/CDKN2A είναι μία από τις αιτίες του συνδρόμου Οικογενούς Μελανώματος και Άτυπων Πολλαπλών Σπίλων (Familial Atypical Multiple Mole Melanoma - FAMMM) [189,190].
- Οι ομόζυγες απαλοιφές που απενεργοποιούν το γονίδιο p16/CDKN2A συχνά απενεργοποιούν και ένα γειτονικό γονίδιο, το MTAP. Υπάρχουν δεδομένα από κυτταρικές σειρές που υποδεικνύουν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου MTAP σε μερικούς παγκρεατικούς καρκίνους θα μπορούσε θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά [191,192].

TP53

Το γονίδιο TP53 στο χρωμόσωμα 17p, είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στις ανθρώπινες κακοήθεις νεοπλασίες, συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού καρκίνου. Το γονίδιο TP53 είναι απενεργοποιημένο σε ποσοστό 75% - 85% στους παγκρεατικούς καρκίνους. Η απενεργοποίηση του TP53 καταργεί δύο πολύ σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες: τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) σε απάντηση της καταστροφής του DNA [24].

SMAD4

Το γονίδιο SMAD4, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q, είναι απενεργοποιημένο στο 50% περίπου των περιπτώσεων παγκρεατικού καρκίνου. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου SMAD4 δρα στην μεταβίβαση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Η απενεργοποίηση του SMAD4 στον παγκρεατικό καρκίνο είναι σημαντική για τους εξής λόγους:

α) Η ανοσοϊστοχημεία για την παρουσία ή την απουσία του SMAD4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υποδείξει το πάγκρεας ως πιθανή πρωτοπαθή εστία σε περιπτώσεις δύσκολης διαφορικής διάγνωσης ή σε περιπτώσεις καρκίνων με άγνωστη προέλευση (καρκίνος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας).

β) Η απώλεια της έκφρασης του SMAD4 σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά απομακρυσμένων μεταστάσεων και με φτωχότερη πρόγνωση. Για τον λόγο αυτό

είναι πιθανό στο μέλλον να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα για λήψη θεραπευτικών αποφάσεων [31, 32].

1.1.9.3 Γονίδια Οικογενούς Παγκρεατικού Καρκίνου

Οι ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο που φέρουν γαμετικές παθογενετικές μεταλλάξεις ανέρχονται σε ποσοστό περίπου 20%.

Κύρια Γονίδια Ανεπάρκειας Ομόλογου Ανασυνδυασμού

BRCA2

Οι γαμετικές παθογενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2 στο χρωμόσωμα 13q, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο παγκρεατικού καρκίνου. Υπολογίζεται ότι ο κίνδυνος εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου στους φορείς γαμετικών μεταλλάξεων στο BRCA2 είναι 3,5-10 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Το γεγονός αυτό, το κατατάσσει σε έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κληρονομικού παγκρεατικού καρκίνου [198,199,200].

BRCA1

Οι γαμετικές παθογενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1, επίσης προδιαθέτουν στην εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου, αλλά ο κίνδυνος είναι σαφώς μικρότερος από ότι στο γονίδιο BRCA2 [199,200]

PALB2

Το γονίδιο PALB2 στο χρωμόσωμα 16p, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σύνδεσης για το BRCA2 [201]. Οι γαμετικές παθογενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο PALB2 είναι γνωστό ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό περίπου 3%, σε άτομα με οικογενή παγκρεατικό καρκίνο. Υπολογίζεται ότι οι γαμετικές μεταλλάξεις στο PALB2, αυξάνουν τον κίνδυνο παγκρεατικού καρκίνου κατά 15 φορές, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό [202,203].

Μηχανισμός Δράσης

Οι γαμετικές μεταλλάξεις στα κύρια γονίδια επιδιόρθωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού (BRCA1, BRCA2, PALB2), ανιχνεύονται σε ποσοστό 3% έως 5% των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο. Όλα τα κύτταρα είναι εξοπλισμένα με μηχανισμούς που επιβλέπουν και επιδιορθώνουν το DNA από λανθασμένες μεταλλάξεις. Τα γονίδια επιδιόρθωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination Repair Genes - HRR), επιδιορθώνουν τις βλάβες της διπλής έλικας που δημιουργούνται κατά την διαδικασία διακλωνικής διασταύρωσης του DNA. Για τον λόγο αυτό, οι παγκρεατικοί καρκίνοι με μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 και PALB2, έχουν ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι οι συγκεκριμένοι όγκοι είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στη θεραπεία με πλατινούχα παράγωγα και με PARP αναστολείς [204].

Άλλα Γονίδια Επιδιόρθωσης του Ομόλογου Ανασυνδυασμού

Άλλες γαμετικές ή σωματικές μεταλλάξεις που ανήκουν στην ομάδα γονιδίων επιδιόρθωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού και σχετίζονται με τον παγκρεατικό καρκίνο συμπεριλαμβάνουν τα εξής: ATM, BAP1, BARD1, BLM, BRIP1, CHEK2, FAM175A, FANCA, FANCC, NBN, RAD50, RAD51, RAD51C, RTEL1 [209].

STK11

Το γονίδιο κινάσης σερίνης/θρεονίνης 11 (STK11), στο χρωμόσωμα 19p, κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζει την πολικότητα των κυττάρων και λειτουργεί σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Οι γαμετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο STK11, σχετίζονται με το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS), ένα αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο στο οποίο τα άτομα που προσβάλλονται αναπτύσσουν αμαρτωματώδεις πολύποδες στον γαστρεντερικό σωλήνα, αμαρτωματώδεις κηλίδες στα χείλη και στο βλεννογόνο των χειλιών, καθώς και μια ποικιλία γαστρεντερικών κακοηθειών [205]

Οι ασθενείς με σύνδρομο PJS, έχουν εξαιρετικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου, με έναν συνολικό δια βίου κίνδυνο που ανέρχεται στο 36%

[206,207]. Επιπλέον, περιγράφονται και σωματικές STK11 μεταλλάξεις, σε ποσοστό που ανέρχεται περίπου στο 4% των ασθενών, ειδικά σε όσους αναπτύσσουν καρκίνο παγκρέατος παράλληλα με ύπαρξη αλλοιώσεων IPMN [208].

Γονίδια Επιδιόρθωσης Βλαβών Ζευγοποίησης του DNA (DNA Mismatch Repair Genes)

Τα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών ζευγοποίησης του DNA φέρουν μεταλλάξεις σε ποσοστό περίπου 2% - 3% των παγκρεατικών καρκίνων [23,24,193].

Σύνδρομο Lynch

Τα γονίδια επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA και συγκεκριμένα τα MLH1, MSH2, MSH6, είναι γνωστά για τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στην παθογένεση του κολοορθικού καρκίνου, ιδίως στο σύνδρομο Lynch (Σύνδρομο Οικογενούς Κολοορθικού Καρκίνου χωρίς Πολύποδες - HNPCC). Οι ασθενείς με σύνδρομο Lynch φέρουν γαμετικές παθογενετικές μεταλλαγές σε γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA και έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διάφορων ειδών καρκίνου στο γαστρεντερικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού καρκίνου [194].

Τα παγκρεατικά καρκινώματα με απενεργοποιημένα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, είναι σημαντικό να αναγνωρίζονται για τους εξής λόγους:

- Όλοι οι ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο που έχουν MSI-H/dMMR όγκους, θα πρέπει να υποβάλλονται σε περαιτέρω έλεγχο και γενετική συμβουλευτική, ανεξαρτήτως ηλικίας, για την πιθανότητα ύπαρξης συνδρόμου Lynch [195].
- Οι παγκρεατικοί καρκίνοι με μικροδορυφορική αστάθεια, έχουν ελαφρώς καλύτερη πρόγνωση από τα τυπικά παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα [196].
- Οι παγκρεατικοί καρκίνοι με μικροδορυφορική αστάθεια, εμφανίζουν πιθανά μικρότερη ανταπόκριση στους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς, ειδικά στην φθοριοουρακίλη, όπως συμβαίνει και με τους καρκίνους του παχέος εντέρου και του ορθού, ιδίως στην επικουρική θεραπεία [197]. Αντίθετα, οι όγκοι που φέρουν μικροδορυφορική αστάθεια εμφανίζουν σημαντικές και μακροχρόνιες ανταποκρίσεις σε αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η πεμπρολιζουμάμπη.

Άλλες Σωματικές Μεταλλάξεις με Μικρότερη Επίπτωση στον Παγκρεατικό Καρκίνο

Εκτός από τα γονίδια που περιγράφηκαν παραπάνω και έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον παγκρεατικό καρκίνο, έχουν καταγραφεί και άλλα, λιγότερο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια τα οποία είναι τα εξής: *AKT1, AIB1, ALK4, ARID1A, AXIN1, BRAF, CDH1, CDK4, CTNNB1, EP300, EPHA3, ERBB2, FBXW7, FGFR1, GATA6, GNAS, MAP2K4, MKK4, MLL3, MYB, MYC, NOTCH1, NRG1, PBRM1, PIK3CA, ROBO2, SMARCA2, SMARCA4, TGFBR2*. [24]

1.1.10 Μοριακό Screening και Πρώιμη Ανίχνευση

Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο παγκρέατος διαγιγνώσκονται όταν η νόσος τους βρίσκεται ήδη σε μεταστατικό στάδιο. Όμως ακόμη και εάν διαγνωστεί σε πρωιμότερο στάδιο, όπου η νόσος είναι εξαιρεσιμη, η πρόγνωση του διηθητικού καρκινώματος του παγκρέατος παραμένει πτωχή. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητο ένα διαγνωστικό τεστ υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας που να ανιχνεύει πρώιμα τον παγκρεατικό καρκίνο, προκειμένου οι ασθενείς να υποβάλλονται σε θεραπευτικές παρεμβάσεις με σκοπό την ίαση. Διάφορες τεχνικές μπορούν να ανιχνεύσουν μεταλλαγμένα γονίδια συμπεριλαμβανομένων και των σπάνιων μεταλλάξεων. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, χρησιμοποιώντας τεχνικές που ανιχνεύουν το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA του όγκου [33, 34].

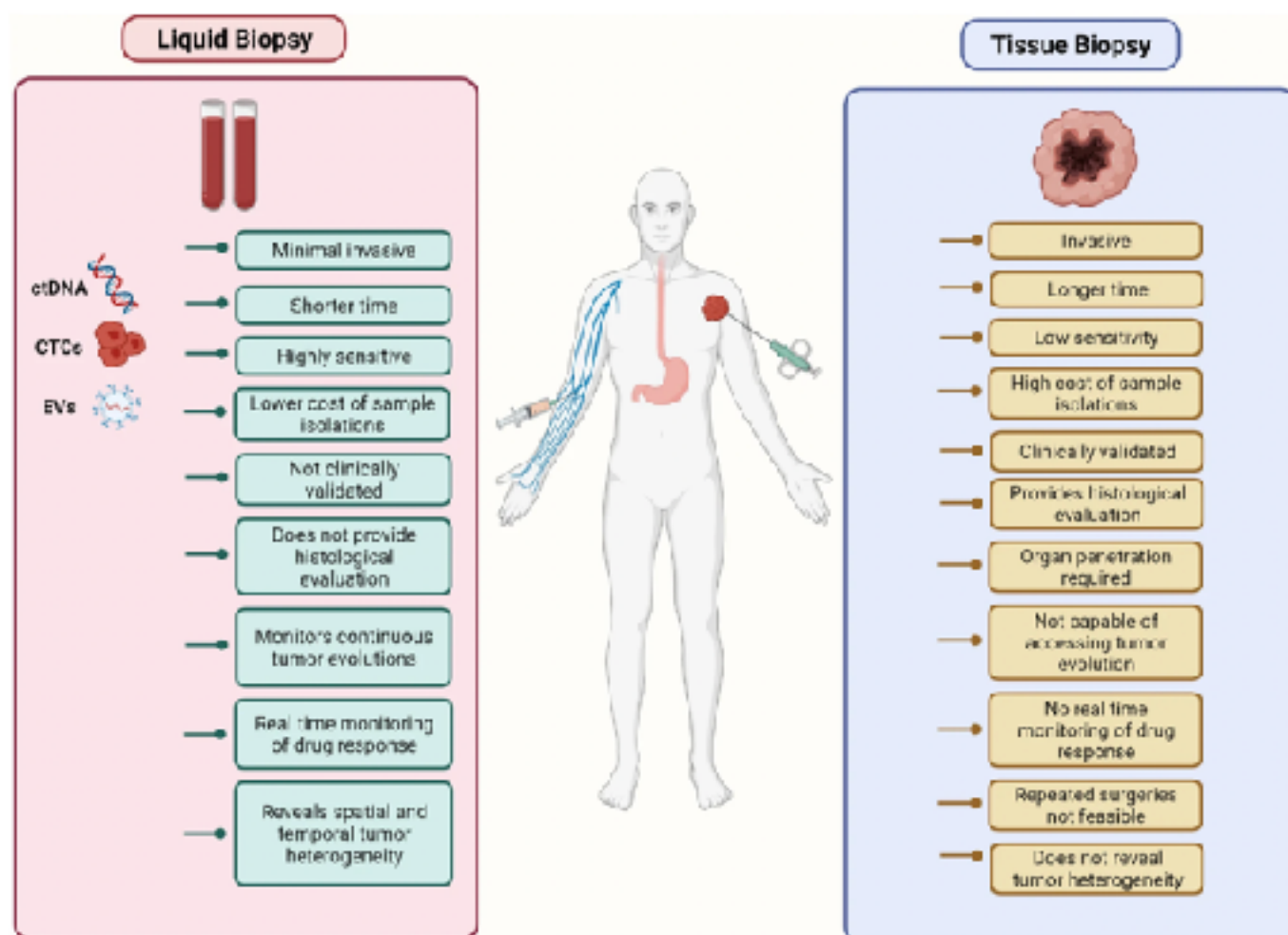
1.2 Υγρές Βιοψίες

Ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου στον γενικό πληθυσμό παγκοσμίως. Όπως έχει ήδη περιγραφεί, ο παγκρεατικός είναι μία από τις πιο θανατηφόρες μορφές καρκίνου. Η πρώιμη ανίχνευση και η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας με τη χρήση βιοδεικτών, μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωση των ασθενών και να αυξήσει την επιβίωση, συμβάλλοντας παράλληλα και στην βελτίωση της ποιότητας ζωής.

Μέχρι στιγμής, η απόλυτα ενδεδειγμένη μέθοδος διάγνωσης του καρκίνου είναι η παθολογοανατομική εξέταση της βιοψίας του ιστού. Παρόλα αυτά, η βιοψία ιστού δεν είναι πάντα δυνατό να ληφθεί, το υλικό σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι κατάλληλο για επεξεργασία και επιπλέον λόγω του ότι αποτελεί μια παρεμβατική μέθοδο διάγνωσης, η διενέργειά της μπορεί να εγκυμονεί κινδύνους για τον ασθενή. Για όλους τους ανωτέρω λόγους δεν είναι εύκολο να επαναλαμβάνεται [59].

Την τελευταία δεκαετία, έχει ξεκινήσει η χρήση μη επεμβατικών ή ελάχιστα επεμβατικών τεχνικών, προκειμένου να ξεπεραστούν οι δυσκολίες και οι περιορισμοί της βιοψίας ιστού. Η υγρή βιοψία είναι μία ελάχιστα επεμβατική τεχνική, η οποία μέσω της λήψης περιφερικού αίματος ή άλλων βιολογικών υγρών (ούρα, κόπρανα, σίελος), μπορεί να ανιχνεύσει μοριακές μεταλλαγές, καρκινικά κύτταρα και μεταβολίτες. Οι υγρές βιοψίες δίνουν ένα στιγμιότυπο της νόσου, τόσο από την πρωτοπαθή εστία, όσο και από τις μεταστατικές εστίες, την ίδια χρονική στιγμή. Η λήψη τους είναι εύκολη, και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τη συλλογή επαναλαμβανόμενων και διαδοχικών δειγμάτων για την εύρεση βιοδεικτών που συμβάλλουν στην πρόιμη ανίχνευση υποτροπής και στην τροποποίηση της θεραπευτικής προσέγγισης στο πλαίσιο της προσωποποιημένης ιατρικής (personalised medicine).

Διάφοροι μοριακοί βιοδείκτες μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική της υγρής βιοψίας και συγκεκριμένα τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα του όγκου (Circulating Tumor Cells - CTCs), το κυκλοφορούν DNA του όγκου (Circulating Tumour DNA - ctDNA), τα προερχόμενα από τον όγκο εξωκυττάρια κυστίδια (Tumor-Derived Extracellular Vesicle - EVs) και το ελεύθερο κυκλοφορούν RNA (Circulating-Free RNA - cfRNA) [60]. Στην Εικόνα 8 απεικονίζονται σχηματικά οι βασικές διαφορές μεταξύ της βιοψίας ιστού και της υγρής βιοψίας.



Εικόνα 8: Σύγκριση χαρακτηριστικών της παραδοσιακής βιοψίας ιστού με την υγρή βιοψία [60]

Η ανάπτυξη της υγρής βιοψίας ξεκίνησε το 1869 από τον Αυστραλό ιατρό Thomas Ashworth, ο οποίος βρήκε κύτταρα παρόμοια με τα καρκινικά στο αίμα ενός ανθρώπου που είχε αποβιώσει από καρκίνο. Ακολούθησαν σταδιακά η ανακάλυψη των μη συζευγμένων νουκλεϊκών οξέων στο πλάσμα και των εξωσωμάτων, των ελεύθερων κυκλοφορούντων κυττάρων και του ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA [61,62].

Το 1977, η ομάδα του ερευνητή Leon, ανακάλυψε ότι τα επίπεδα του ελεύθερου DNA στο πλάσμα ήταν σε σημαντικό βαθμό περισσότερο αυξημένα σε ανθρώπους που νοσούσαν από καρκίνο συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό. Έτσι οδηγήθηκαν σταδιακά στη διαμόρφωση της υπόθεσης ότι η ύπαρξη ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA σχετίζεται με την παρουσία καρκινικών όγκων [63].

Το 1998, απομονώθηκαν για πρώτη φορά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs). Επίσης το 1994 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR), για την ανίχνευση των πρώτων KRAS μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cell-free DNA - cfDNA), από το πλάσμα ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, τα οποία ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την ανάλυση του ιστού [64].

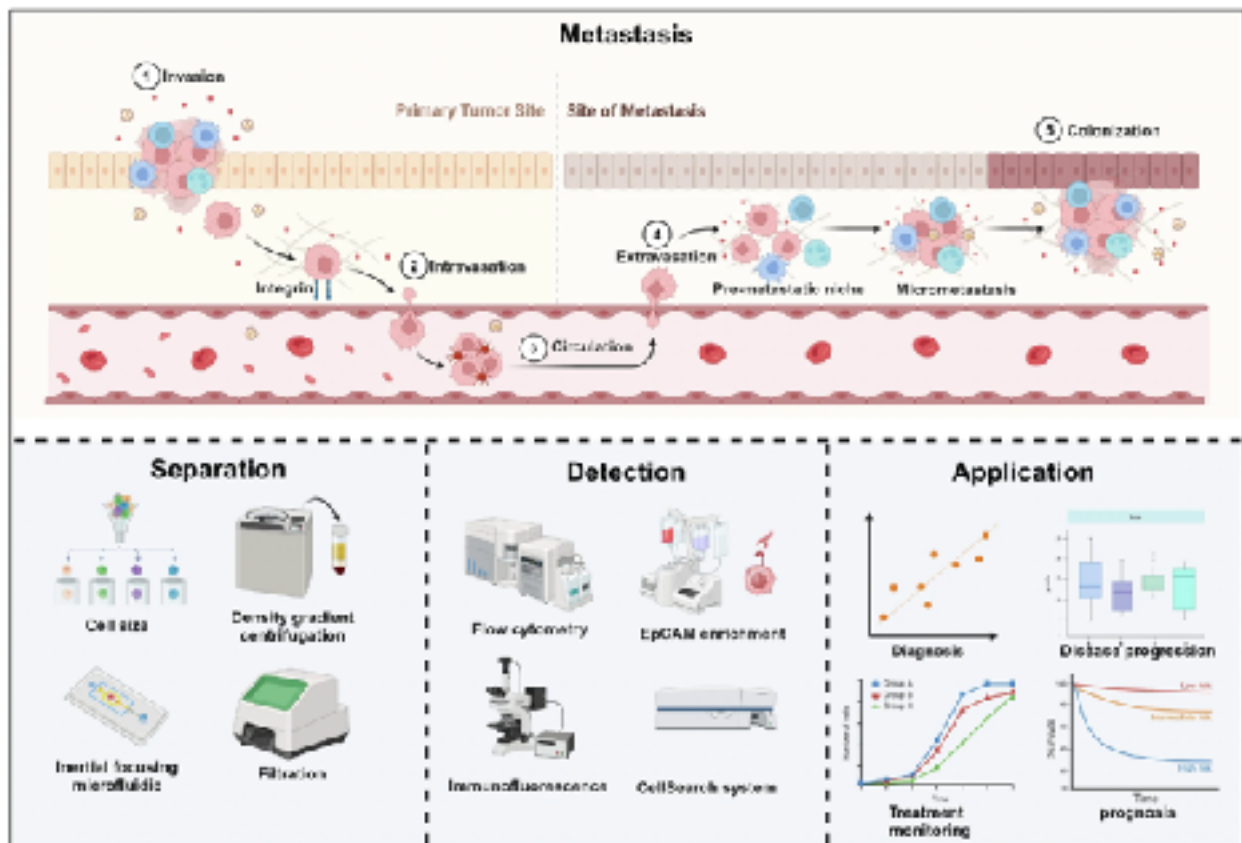
Το 2008 ο Diehl F. και η ομάδα του χρησιμοποίησαν την τεχνική BEAMing PCR για να ανιχνεύσουν μεταλλαγμένες περιοχές σε γονίδια όπως τα *TP53*, *APC*, *KRAS* και το *PIK3CA*, από το πλάσμα ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Από την συγκεκριμένη έρευνα βρέθηκε ότι το ποσοστό των ctDNA μεταλλάξεων μεταβαλλόταν κατά τη διάρκεια της θεραπείας και ότι το είδος της μεταβολής (αύξηση ή μείωση) σχετιζόταν αντίστοιχα με την μεταβολή του φορτίου της νόσου και με τη μεταβολή του καρκινικού δείκτη CEA [65].

Το 2014 εγκρίθηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency - EMA), η χρήση ctDNA για την ανίχνευση EGFR μεταλλάξεων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Έκτοτε έχουν εγκριθεί και άλλα πάνελ για χρήση στην καθημερινή κλινική πρακτική σε διάφορους όγκους. Δεν υπάρχει όμως, μέχρι στιγμής, διαθέσιμο κάποιο εγκεκριμένο πάνελ για υγρή βιοψία στον καρκίνο του παγκρέατος.

1.2.1 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα - Circulating Tumour Cells - CTCs

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, είναι κύτταρα που απελευθερώνονται από τον πρωτοπαθή όγκο και τις μεταστατικές εστίες στο αίμα και στην λέμφο και έτσι κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα. Τα CTCs είναι αρκετά σπάνια στο περιφερικό αίμα. Έχει υπολογιστεί ότι σε ένα εκατομμύριο λευκοκύτταρα ανευρίσκεται περίπου 1 CTC και τα περισσότερα πεθαίνουν στη συστηματική κυκλοφορία σε διάστημα μίας - δυόμιση ωρών.

Από διάφορες μελέτες έχει φανεί ότι υψηλά επίπεδα CTCs σχετίζονται με μείωση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής και της ολικής επιβίωσης [67]. Τα CTCs αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους βιοδείκτες που προκύπτουν από την χρήση υγρής βιοψίας, καθώς φαίνεται ότι διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μεταστατικής νόσου. Όμως λόγω της σπανιότητάς τους στο περιφερικό αίμα, είναι απαραίτητη η χρήση πολύ ευαίσθητων μεθόδων για την ανίχνευση τους. Από τις διάφορες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των CTCs, η μόνη εγκεκριμένη από τον FDA είναι η μέθοδος CellSearch [68]



Εικόνα 9: CTCs. Διαδικασία Μετάστασης, διαχωρισμός, ανίχνευση και εφαρμογή των CTCs [60].

1.2.2 cfDNA

Το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA αναφέρεται στα εξωκυττάρια μόρια DNA, που μπορεί να προέρχονται από οποιονδήποτε τύπο κυττάρων και ανιχνεύεται στα σωματικά υγρά. Περιγράφηκε πρώτη φορά το 1948 σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο [60], αλλά η ανίχνευσή του σε ασθενείς με καρκίνο και η σύνδεσή του με το φορτίο της νόσου έγινε 30 χρόνια αργότερα [61-63].

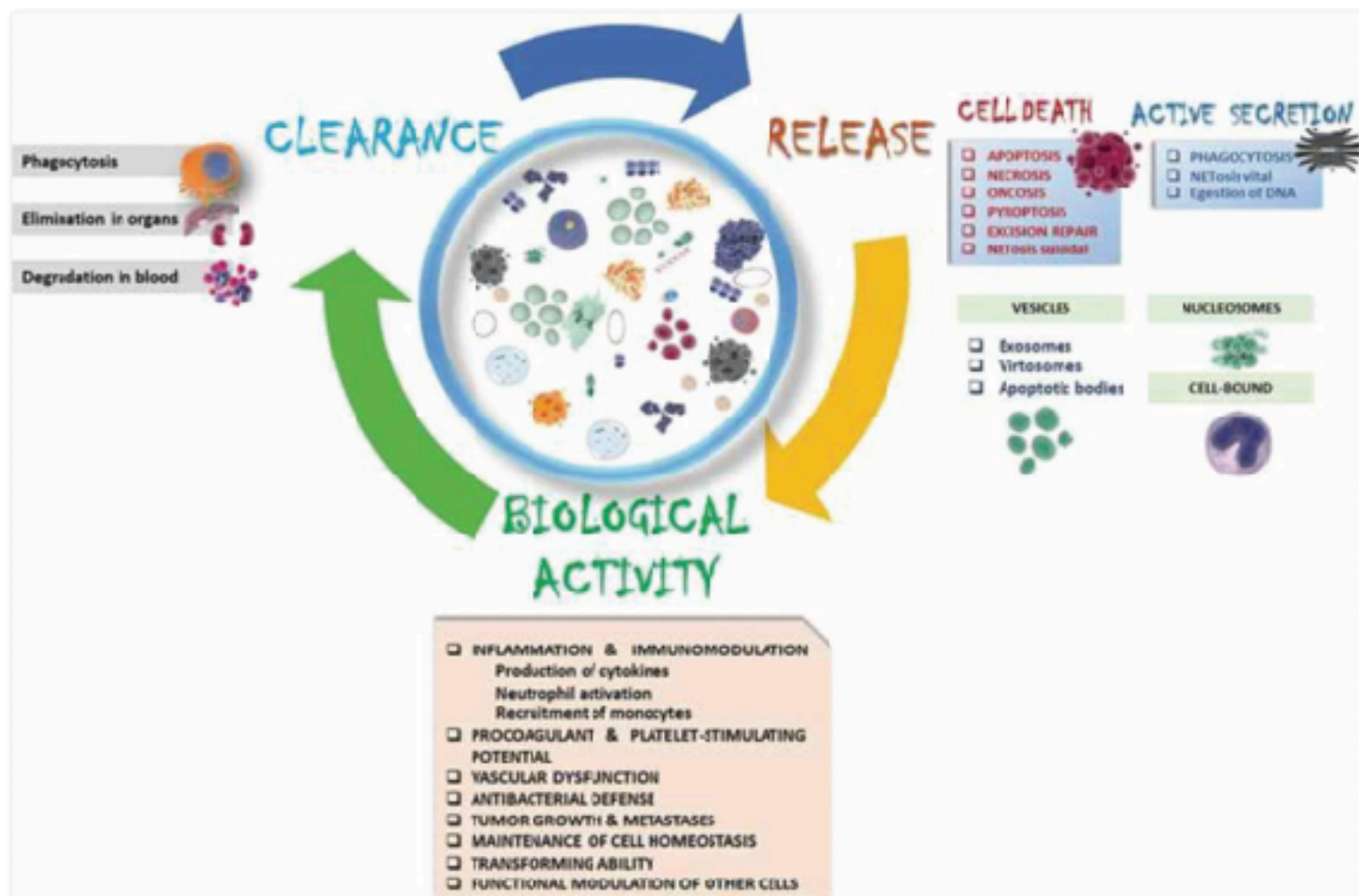
Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα αυξημένα επίπεδα cfDNA δεν αποτελούν ειδικό δείκτη για τις κακοήθειες. Ανιχνεύονται επίσης σε έγκυες γυναίκες και σε μεταμοσχευμένους ασθενείς [69]. Ακόμη αυξημένα επίπεδα cfDNA μπορεί να βρεθούν σε φυσιολογικές καταστάσεις (π.χ. άσκηση) και σε μη νεοπλασματικές παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, ο σακχαρώδης διαβήτης, το τραύμα, η σήψη και η μυοκαρδιακή ισχαιμία [70].

Η ακριβής προέλευση του cfDNA αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα ερώτηση προς διερεύνηση τόσο στον καρκίνο, όσο και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η ταυτοποίηση της προέλευσης θα οδηγούσε στην άμεση σύνδεση με τον πάσχοντα ιστό. Σε αναλύσεις cfDNA στο γονιδίωμα υγιών ανθρώπων, βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό προερχόταν από την αιμοποιητική σειρά (55% προγονικά κύτταρα λευκής σειράς - 30% ερυθράς σειράς). Στους ασθενείς με καρκίνο το μεγαλύτερο μέρος του cfDNA προερχόταν από τον πρωτοπαθή όγκο [71].

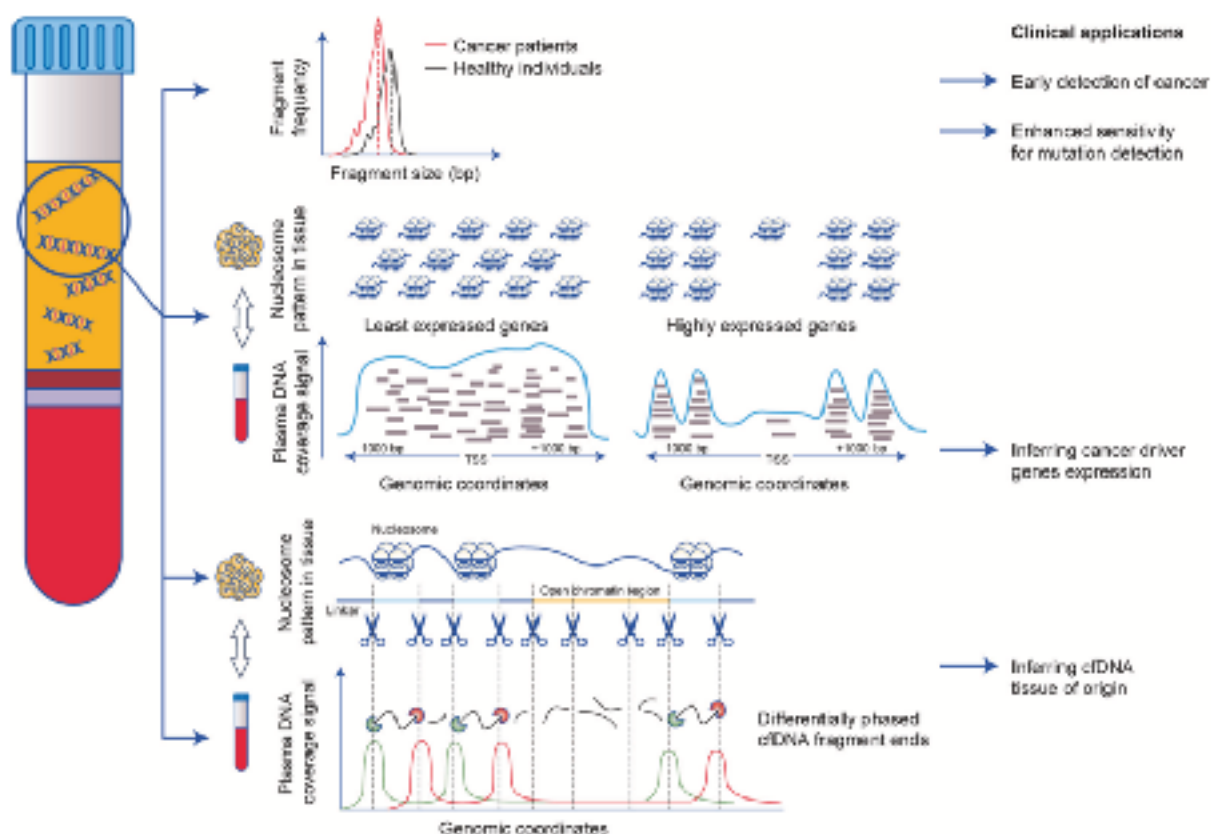
Το εκτιμώμενο μέγεθος του cfDNA κυμαίνεται από 40-200 ζεύγη βάσεων και μπορεί να φτάσει σε μέγεθος και τα 1000 ζεύγη βάσεων. Το μέγεθος αυτών των τμημάτων οφείλεται στα διαφορετικά μήκη του DNA στα νουκλεοσώματα. Αυτό είναι χαρακτηριστικό της διάσπασης από κασπάσες, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο μέρος του cfDNA, τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης.

Μεγαλύτερα τμήματα DNA (>10kb), θεωρείται ότι προέρχονται από κυτταρικό θάνατο λόγω νέκρωσης π.χ. από κύτταρα σε νεκρωμένα τμήματα του όγκου, ενώ μικρότερα τμήματα DNA (<100bp), είναι εμπλουτισμένα με cfDNA, mtDNA και βακτηριακό DNA [73,74].

Ο εκτιμώμενος χρόνος ημίσειας ζωής του cfDNA στην αιματική κυκλοφορία κυμαίνεται από μερικά λεπτά ως 1-2 ώρες. Η ιδιότητα του αυτή το καθιστά πολύ σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της δυναμικής αλλαγής μια παθολογικής κατάστασης σε πραγματικό χρόνο, μέσω της μέτρησης της μεταβολής του φορτίου του.



Εικόνα 10: Κύκλος ζωής cfDNA [74]



Εικόνα 11: Κλινικές εφαρμογές ανάλυσης cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο [76]

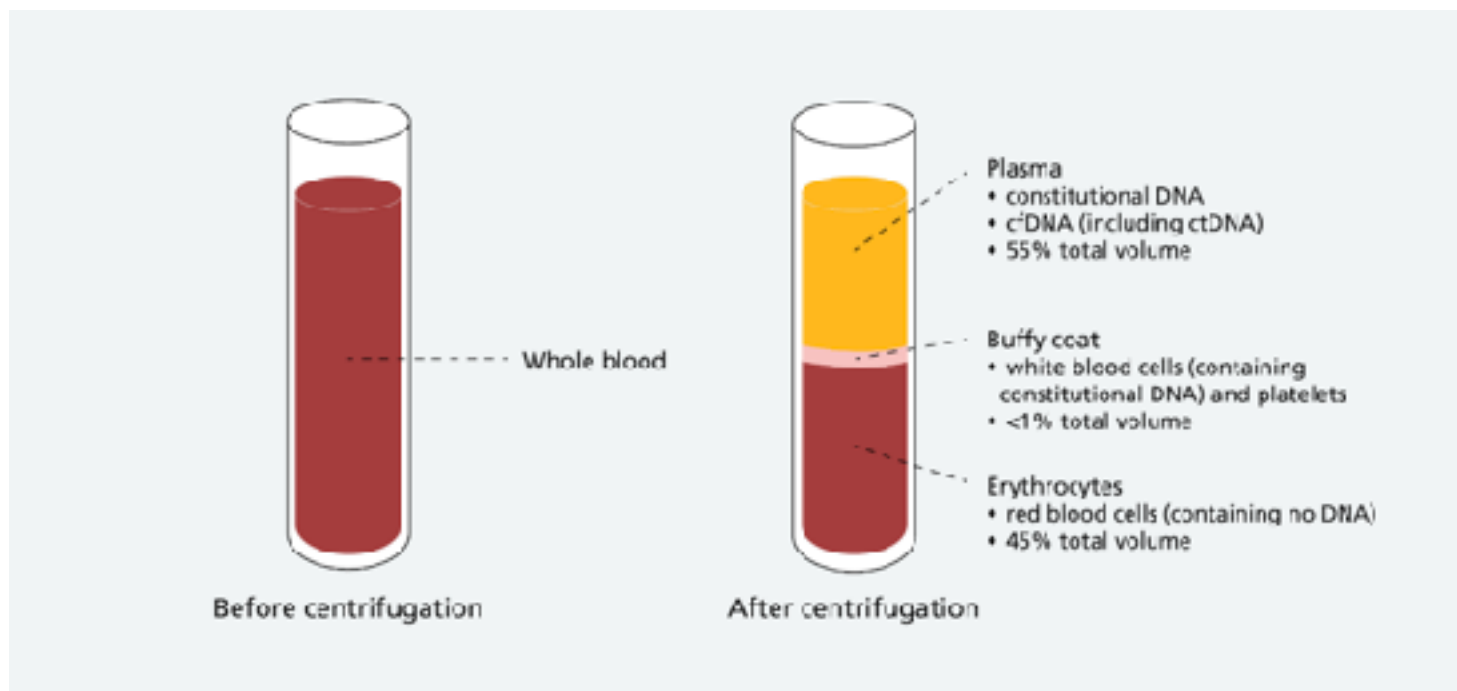
1.2.3 ctDNA

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) μπορεί να εξαχθεί από το περιφερικό αίμα και προέρχεται από τον όγκο. Είναι ένα κλάσμα του cfDNA. Το ctDNA αποτελεί ένα μικρό μέρος του cfDNA, που υπολογίζεται περίπου σε 0,1% - 1% του συνολικού cfDNA, του οποίου η φυσιολογική τιμή στο πλάσμα κυμαίνεται μεταξύ 10-100ng/ml [77]. Το ctDNA απελευθερώνεται στο αίμα ασθενών με καρκίνο μέσω απόπτωσης, νέκρωσης ή με απευθείας απελευθέρωση στην κυκλοφορία [221]. Θεωρείται, ότι το DNA εισέρχεται στο πλάσμα ως αποτέλεσμα λύσης κυττάρων κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της συστηματικής κυκλοφορίας, αποδόμησης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ή καταστροφής μικρομεταστάσεων του όγκου [220, 222]. Παρά την αρχική λογική της υπόθεσης της κυτταρικής λύσης, η θεωρία αυτή δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένη, καθώς ακόμη και σε προχωρημένα στάδια νόσου, η ποσότητα του κυκλοφορούντος DNA στο πλάσμα υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη που θα μπορούσε να προκύψει αποκλειστικά

από τη μάζα των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Εκτός από τη λύση των κυττάρων, η απόπτωση έχει προταθεί ως πιθανή πηγή του κυκλοφορούντος DNA, βάσει διαφόρων παρατηρήσεων. Το DNA που ανιχνεύεται στο πλάσμα ή τον ορό συχνά εμφανίζει ένα πρότυπο τύπου «σκάλας» (ladder pattern), παρόμοιο με εκείνο που παρατηρείται στα αποπτωτικά κύτταρα κατά την ηλεκτροφόρηση. Ωστόσο, το φαινόμενο της ενεργού απελευθέρωσης DNA από κύτταρα θα μπορούσε επίσης να παράγει πρότυπο τύπου «σκάλας» κατά την ηλεκτροφόρηση. Μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως τα λεμφοκύτταρα, και κυτταρικές σειρές όπως η HL-60, απελευθερώνουν στην κυκλοφορία ένα σύμπλοκο νουκλεοπρωτεΐνης στο πλαίσιο ενός ομοιοστατικού συστήματος, στο οποίο το πρόσφατο DNA που σχηματίστηκε, είναι αυτό που κατά προτίμηση απελευθερώνεται στην κυκλοφορία [223,224]. Έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι το ctDNA μεταφέρεται μέσω πρόσληψης από αποπτωτικά σωμάτια που απελευθερώνονται από καρκινικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα γενετικές αλλαγές στα κύτταρα του ξενιστή, προωθώντας έτσι τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την μετάσταση [78].

Επίσης τα επίπεδα ctDNA στο πλάσμα, διαφέρουν ανάλογα με το φορτίο της νόσου, το στάδιο και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Εκτός από την ποσοτικοποίηση, οι κλινικές εφαρμογές του ctDNA στην ιατρική ακριβείας επιτρέπουν και την ανάλυση παραλλαγών του ctDNA στο πλάσμα. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το μήκος του ctDNA διαφέρει από το μήκος του cfDNA. Από μετρήσεις σε ασθενείς με καρκίνο, το μήκος του ctDNA ενδεικτικά καταγράφηκε μεταξύ 20-50 ζευγών βάσεων, δηλαδή αρκετά βραχύτερο από το cfDNA [65, 79].

Οι γενετικές μεταλλάξεις που μπορεί να ανιχνευθούν από το ctDNA αντικατοπτρίζουν την ετερογένεια του όγκου και μπορεί να είναι σημειακές μεταλλάξεις, εισαγωγές, απαλοιφές, διακύμανση αριθμού αντιγράφων, σύντηξη γονιδίων και άλλες μεταλλάξεις όπως ενισχύσεις και αντιμεταθέσεις. Από την ανάλυση του πλάσματος μπορεί να ανιχνευθούν τόσο γαμετικές όσο και σωματικές μεταλλάξεις. Ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο επιτυγχάνεται με ανάλυση ζεύγους δειγμάτων (από τον ίδιο ασθενή) από το πλάσμα και τη λευκή στιβάδα (buffy coat) όπως φαίνεται στην εικόνα.



Εικόνα 12: Δείγμα αίματος πριν και μετά την φυγοκέντρηση

Κατά τη φυγοκέντρηση ενός δείγματος αίματος επιτυγχάνεται διαχωρισμός σε τρία συστατικά: πλάσμα, λευκή στιβάδα, ερυθροκύτταρα. Το πλάσμα περιέχει τόσο γαμετικό όσο και σωματικό DNA, ενώ η λευκή στιβάδα περιέχει DNA που προέρχεται από τα λεμφοκύτταρα. Τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν και να συγκριθούν για να καθοριστεί ποιες μεταλλαγές προέρχονται από το DNA που εξήχθη από το πλάσμα και ποιες προέρχονται από τον όγκο [80].

1.2.4 Τρέχουσες Τεχνολογίες Ανίχνευσης ctDNA

Τα δεδομένα που προκύπτουν από διάφορες πηγές για την ανάλυση του ctDNA είναι ετερογενή και αυτό αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για τη χρήση του στην κλινική πρακτική, καθώς οι μέθοδοι συλλογής των δειγμάτων, απομόνωσης του ctDNA και της τελικής ανάλυσης δεν έχουν ακόμη τυποποιηθεί. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στην ποσότητα και την ποιότητα του ctDNA, θα πρέπει να αποδίδονται μόνο στις βιολογικές μεταβολές που συνοδεύουν τον όγκο και όχι σε τεχνουργήματα (artefacts) που προκύπτουν εξαιτίας διαφορών κατά την δειγματοληψία. Ως εκ τούτου, η χρήση του δεν έχει ακόμη καθιερωθεί στην καθημερινή κλινική πρακτική καθώς χρήζει περαιτέρω επικύρωσης.

Για την ανάλυση του ctDNA υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι προσέγγισης. Ο πρώτος εστιάζει στην ανάλυση βάσει στοχευτικών μεταλλάξεων όπως συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος που λειτουργούν ως “περιοχές αυξημένης μεταλλαξογένεσης” (Hotspots) μιας μεταλλαγής σε συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Ο δεύτερος αφορά ευρύτερη ανάλυση του γονιδιώματος του όγκου, και έτσι εκτός από την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών, παρέχει πληροφορίες για παραλλαγές νουκλεοτιδίων, διακυμάνσεις αριθμού αντιγράφων και χρωμοσωμικές μεταβολές.

Οι παρακάτω μοριακές τεχνικές περιλαμβάνονται μεταξύ εκείνων που έχουν αξιοποιηθεί για την ανάλυση του κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (cfDNA) και του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA): ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σταγονίδια (droplet digital PCR – ddPCR), τεχνολογία BEAMing (beads, emulsion, amplification, and magnetism), βαθιά αλληλούχιση επισημασμένων αμπλικονικών προϊόντων (Tagged-Amplicon Deep Sequencing – TAM-Seq), εξατομικευμένο γονιδιωματικό προφίλ καρκίνου μέσω βαθιάς αλληλούχισης (Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing – CAPP-Seq), αλληλούχιση με δισουλφιδική μετατροπή σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος (Whole Genome Bisulfite Sequencing – WGBS-Seq), αλληλούχιση εξώματος (Whole Exome Sequencing – WES) και αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing – WGS). Οι στοχευτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν: droplet digital polymerase reaction (ddPCR), beads, emulsion, amplification and magnetism (BEAMing), tagged - amplicon deep sequencing (TAM-seq), cancer personalised profiling by deep sequencing (CAPP-Seq). Αντίστοιχα η προσέγγιση που δεν εστιάζει σε οδηγούς μεταλλάξεις γίνεται με μεθόδους όπως το Whole Exome Sequencing (WES) και το Whole Genome Sequencing (WGS) [81].

Η ddPCR επιτυγχάνει ανίχνευση μεταλλάξεων σε επίπεδα χαμηλά έως και 0,01–1,0% του γονιδιωματικού φορτίου, καθιστώντας την ιδιαιτέρως κατάλληλη για την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων και την ποσοτικοποίηση της διακύμανσης αριθμού αντιγράφων. Ωστόσο, η εφαρμογή της περιορίζεται στην ανάλυση προκαθορισμένων και πλήρως χαρακτηρισμένων μεταλλάξεων. [82]

Η τεχνική BEAMing, η οποία συνδυάζει digital PCR με κυτταρομετρία ροής, αποτελεί επίσης μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και συγκριτικά οικονομική μέθοδο για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων. Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανιχνεύσει

γενωμικές μεταλλαγές σε ποσοστά έως και 0,01%, παρουσιάζοντας υψηλή συμφωνία με τα αποτελέσματα του μοριακού προφίλ του ιστού.

Η μέθοδος CAPP-Seq αξιοποιεί μεγάλες γονιδιωματικές βιβλιοθήκες και μοριακές αλληλουχίες συγκεκριμένου ασθενούς για τον εντοπισμό μεταλλάξεων που προέρχονται από τον όγκο στο ctDNA/cfDNA. Μέσω στατιστικής συσχέτισης καλά χαρακτηρισμένων γενετικών αλλοιώσεων με DNA ολιγονουκλεοτίδια, δύναται να εντοπίσει πολυμορφισμούς ειδικούς για κάθε ασθενή. Εμφανίζει δυνατότητα ανίχνευσης της ετερογένειας του νεοπλάσματος και έχει καταδείξει ικανότητα εντοπισμού νεοπλασματικού φορτίου προτού αυτό καταστεί εμφανές με απεικονιστικές τεχνικές. Μπορεί να ανιχνεύσει ευρύ φάσμα μεταλλάξεων, όπως εισαγωγές, διαγραφές, μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNVs), διακύμανση αριθμού αντιγράφων και γονιδιωματικές αναδιατάξεις, με εξαίρεση τις γονιδιακές συντήξεις. [81]

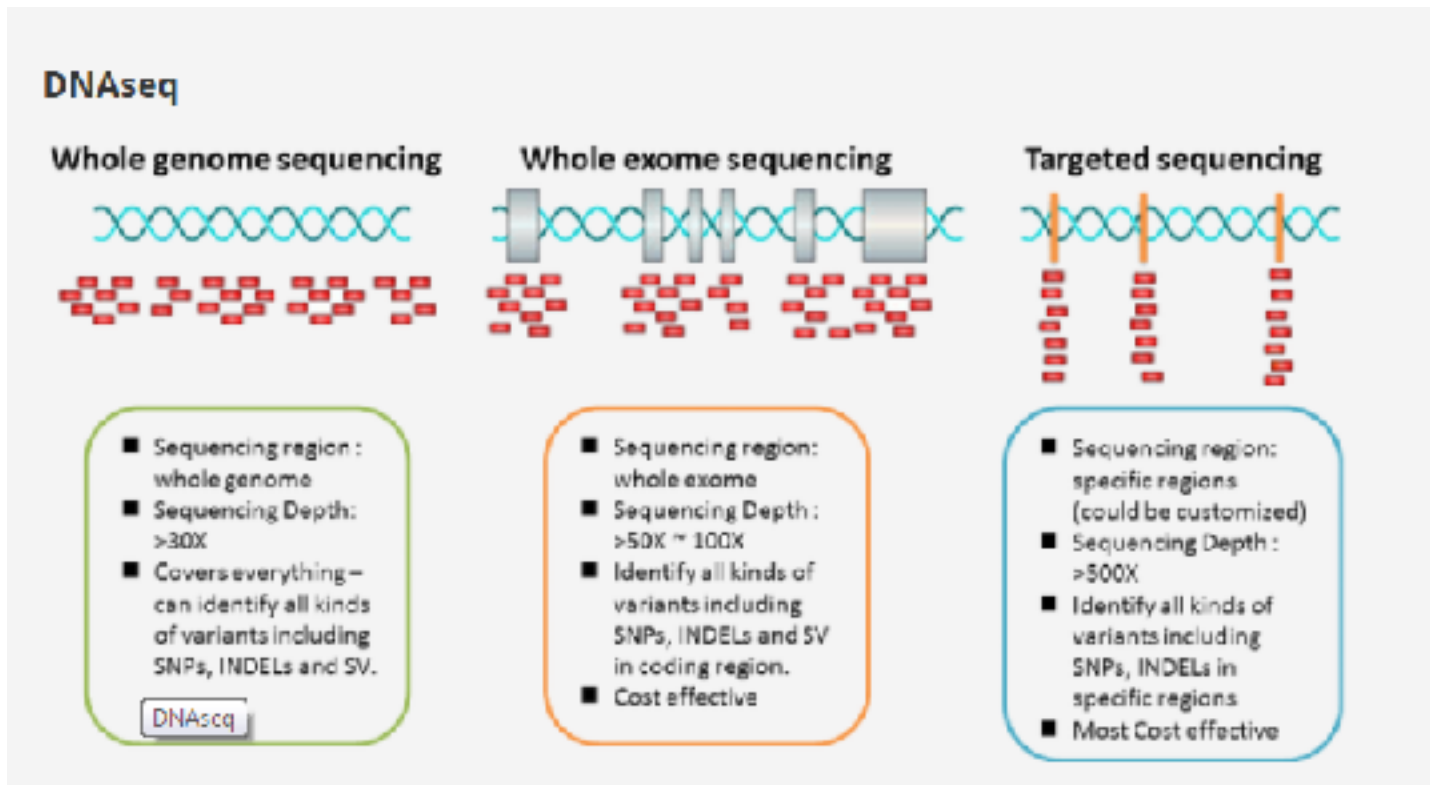
Η TAm-Seq προσφέρει υψηλή ευαισθησία (~97%) και ειδικότητα, με δυνατότητα ανίχνευσης γενωμικού υλικού σε συγκεντρώσεις έως και 2%. Μέσω επισημασμένων εκκινητών (primers), στοχεύει σε συγκεκριμένες γονιδιακές αλληλουχίες, επιτρέποντας μαζική παράλληλη αλληλούχιση εκατομμυρίων μορίων DNA. Παρά το πλεονέκτημα της υψηλής ροής αλληλούχισης και του μειωμένου κόστους, η τεχνική προϋποθέτει η αλληλουχία προς ανάλυση να είναι πλήρως χαρακτηρισμένη εκ των προτέρων.

Η αλληλούχιση του εξώματος (WES) επιτρέπει την ευρεία ανάλυση όλων των μεταλλαγμένων περιοχών του γονιδιώματος και συνεπώς τη δυνατότητα ταυτοποίησης πιθανών ογκογονιδίων και γονιδίων καταστολής όγκων. Αν και προσφέρει υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος, η ευαισθησία της υπολείπεται άλλων τεχνικών, καθώς περιλαμβάνει μόνο τις μεταλλαγές των εξωνίων.

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) καλύπτει πλήρως το γονιδίωμα, επιτρέποντας τον εντοπισμό τόσο γνωστών όσο και δυνητικά παθογονικών μεταλλάξεων, καθώς και μεταλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας. Αν και παρέχει την πληρέστερη εικόνα του γενετικού προφίλ ενός όγκου, η χρήση της περιορίζεται λόγω ζητημάτων διασφάλισης ποιότητας, δεοντολογικών προβληματισμών, αυξημένου κόστους και χρόνου ανάλυσης. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων απαιτεί εξειδικευμένα κέντρα βιοπληροφορικής και γενετικής.

Η WGBS-Seq θεωρείται η βέλτιστη πρότυπη μέθοδος για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA. Παρέχει δυνατότητα μέτρησης μεμονωμένων κυτοκίνων με εξαιρετικά υψηλή ακρίβεια. Παρόλο που μπορεί να εντοπίσει μερικώς

μεθυλιωμένες περιοχές σε καρκινικά κύτταρα, το DNA ενδέχεται να εμφανίζει διαφορετικό βαθμό αποδόμησης, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ευαισθησία της μεθόδου.



Εικόνα 13: Μέθοδοι NGS. Η στοχευμένη αλληλούχιση επιτρέπει στους ερευνητές και στους κλινικούς ιατρούς να επικεντρώσουν χρόνο, έξοδα και ανάλυση δεδομένων σε συγκεκριμένες περιοχές ενδιαφέροντος, επιτρέποντας την αλληλούχιση σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κάλυψης

1.2.5 Κλινικές Εφαρμογές του ctDNA

Η χρήση του ctDNA έχει προταθεί για μια σειρά εφαρμογών στην κλινική πρακτική που συμπεριλαμβάνουν:

- Πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου
- Ανάλυση μοριακού προφίλ και επιλογή στοχευτικής θεραπείας ανάλογα με το αποτέλεσμα
- Ανίχνευση ελάχιστης (μικροσκοπικής) υπολειπόμενης νόσου και παρακολούθηση για τυχόν υποτροπή της νόσου.
- Ανίχνευση μηχανισμών αντίστασης που πιθανά προκύπτουν από τη χορήγηση συστηματικής θεραπείας (χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία, στοχευτική θεραπεία)
- Χρήση ως προγνωστικός βιοδείκτης τόσο στην πρώιμη όσο και στην μεταστατική νόσο

Έχει φανεί ότι οι εφαρμογές του ctDNA σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η κλινική ανταπόκριση συσχετίζεται με μείωση των επιπέδων ctDNA που ανιχνεύονται στο αίμα. Αντίθετα αύξηση στα επίπεδα του ctDNA παρατηρείται σε περιπτώσεις επιδείνωσης της νόσου και φαίνεται να προηγείται της απεικονιστικής και κλινικής επιδείνωσης. Αυτός ο “λανθάνων” χρόνος πιθανότατα μπορεί να προσφέρει ένα παράθυρο ευκαιρίας για πρώιμη παρέμβαση και αλλαγή θεραπείας.

Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (minimal residual disease - MRD) αφορά σε μικροσκοπικά υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα μετά την ολοκλήρωση ριζικής θεραπείας (π.χ. χειρουργικής εξαίρεσης της νόσου). Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος δεν ανιχνεύεται απεικονιστικά ή κλινικά, αλλά μπορεί δυνητικά να προκαλέσει υποτροπή της νόσου. Επίσης η ανίχνευση MRD αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την μακροχρόνια έκβαση.

Στην μεταστατική νόσο, η διάρκεια ανταπόκρισης στις στοχευτικές θεραπείες είναι σε αρκετές περιπτώσεις περιορισμένη, λόγω της αναπόφευκτης ανάπτυξης μηχανισμών αντίστασης. Η παρακολούθηση με ctDNA ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της θεραπείας μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο πρώιμης ανίχνευσης μεταλλαγών που σχετίζονται με μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία. Έχει δειχθεί από μελέτες, ότι και στην μεταστατική νόσο υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων ctDNA και πτωχής πρόγνωσης.

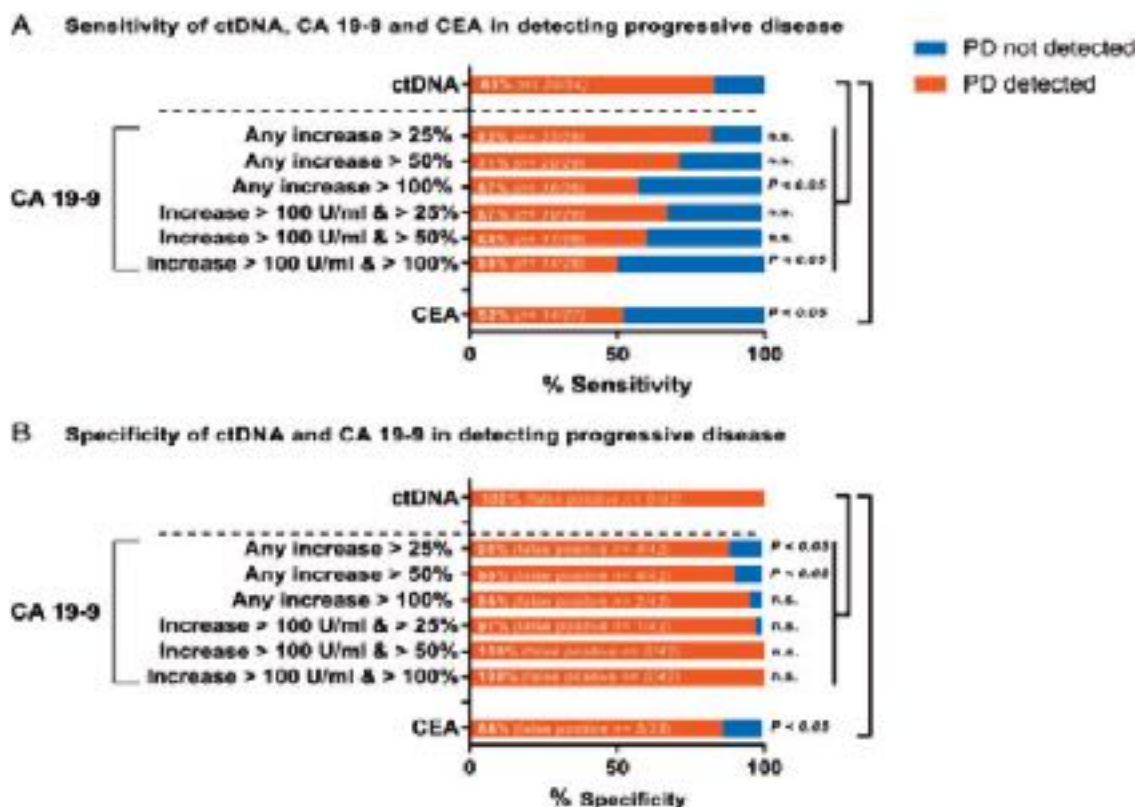
Το ctDNA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ταυτοποίησης του πρωτοπαθούς όγκου σε καρκίνους αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας [83, 84, 85].

1.2.6 Ο ρόλος του ctDNA στον παγκρεατικό καρκίνο

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο παγκρεατικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες γενετικές μεταλλάξεις (γαμετικές και σωματικές) που συμπεριλαμβάνουν συχνές μεταλλάξεις σε 4 οδηγά γονίδια: *TP53*, *KRAS*, *CDKN2A*, *SMAD4*. Λόγω της παρουσίας τους στο ctDNA του πλάσματος αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες τόσο στην πρόωμη όσο και στην προχωρημένη νόσο [24]. Οι μεταλλάξεις *KRAS* είναι πολύ συχνές στα κύτταρα του παγκρεατικού καρκίνου και συνοδεύονται με πτωχή πρόγνωση και αντοχή στην θεραπεία [86].

Η ανίχνευση μεταλλάξεων του *KRAS* στο ctDNA αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο καινούργιο βιοδείκτη για την προχωρημένη νόσο, επιτρέποντας την παρακολούθηση με μη επεμβατικό τρόπο της εξέλιξης της νόσου και την ανταπόκριση στην θεραπεία.

Μια μελέτη από τον Kruger και την ομάδα του, εξέτασε την προγνωστική αξία για την πρόωμη ανταπόκριση στη θεραπεία, κατά την διάρκεια των θεραπευτικών παρεμβάσεων σε ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος, χρησιμοποιώντας διαδοχικές μετρήσεις του *KRAS* στο ctDNA. Ο στόχος της μελέτης ήταν να διαπιστώσει εάν τα επίπεδα των μεταλλάξεων *KRAS* στο πλάσμα και οι μεταβολές που τις συνοδεύουν, μπορούν να παρέχουν πιο ακριβή δεδομένα για την πρόγνωση ενός ασθενή και για την ανταπόκριση του στη θεραπεία σε θέση με τους βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική, όπως οι καρκινικοί δείκτες CEA και CA 19-9 [87]. Η χημειοθεραπεία βασισμένη στην γεμισταβίνη, ήταν η πρώτη επιλογή για αυτούς τους ασθενείς. Η μελέτη ρίχνει σημαντικό φως στην δυνητική χρήση του *KRAS* μεταλλάξεων στην υγρή βιοψία ως βιοδείκτης ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία και στην παρακολούθηση κατά τη χορήγηση των διαφόρων θεραπειών σε ασθενείς με προχωρημένο παγκρεατικό καρκίνο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Ευαισθησία και ειδικότητα ctDNA με μεταλλάξεις στο *KRAS*, CA 19-9 και CEA στην ανίχνευση επιδείνωσης της νόσου (Α και Β) [87,88]

Σύμφωνα με τους συγγραφείς, οι *KRAS* μεταλλάξεις στο ctDNA, φαίνεται να αποτελούν έναν πιο ακριβή και στοχευμένο βιοδείκτη για τον τρόπο που η χημειοθεραπεία επηρεάζει την νόσο ενός ασθενή με μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των *KRAS* μεταλλάξεων χρησιμοποίησαν την τεχνική της digital-PCR.

Σε μία άλλη μελέτη από τον Hussung και την ομάδα του, περιοχές αυξημένης μεταλλαξογένεσης (Hotspots) στο *KRAS* ταυτοποιήθηκαν με ddPCR σε 25 ασθενείς με εξαιρετικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων τους, προέκυψε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ολικής επιβίωσης και διαστήματος ελεύθερου υποτροπής με την μεταβολή των μεταλλαγμένων αλληλίων (MAF: Mutant Allele Frequency = RAS mutant alleles/ RAS mutant + RAS wild type alleles) στο ctDNA, υιοθετώντας ένα πιο αυστηρό cut-off για το MAF (15 αντίγραφα/ml πλάσματος).

Συγκεκριμένα σε ασθενείς με αύξηση των επιπέδων ctDNA σε διάστημα εξαμήνου από το χειρουργείο, παρατηρήθηκε μείωση του διαστήματος ολικής επιβίωσης [89]. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανή μετεγχειρητική παρακολούθηση με επίπεδα ctDNA θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο, που υπερτερεί της παρακολούθησης με καρκινικούς δείκτες όπως το CA 19-9. Η χρήση ctDNA, θα μπορούσε να προβλέψει την πιθανή επιδείνωση της νόσου και κατ' επέκταση την ολική επιβίωση.

Επίσης από μία πρόσφατη μελέτη των P. Kirchweger et al, φάνηκε ότι σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος, η πτώση των επιπέδων ctDNA σε ποσοστό μεγαλύτερο του 57,9%, σε δείγμα που πάρθηκε 2 εβδομάδες μετά από το αρχικό δείγμα προ έναρξης θεραπείας, ήταν σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας ανταπόκρισης στη θεραπεία. Συσχετίστηκε επίσης με αυξημένη ολική επιβίωση και αύξηση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής [90].

Συνολικά ένας σημαντικός αριθμός μελετών αποδεικνύουν ότι το ctDNA, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βιοδείκτη με προβλεπτική και προγνωστική σημασία, τόσο στον πρώιμο όσο και στον τοπικά εκτεταμένο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την πρόγνωση και την ανταπόκριση στην θεραπεία, πρωιμότερα από τις συμβατικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική.

1.2.7 Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς - Next Generation Sequencing (NGS)

Η τεχνική αλληλούχισης επόμενης γενιάς, είναι μία τεχνική αλληλούχισης του DNA που χρησιμοποιεί παράλληλη αλληλούχιση πολλαπλών τμημάτων του DNA, και έχει το πλεονέκτημα ανάλυσης πολλών τμημάτων, σε αντίθεση με τις τεχνικές PCR, και κατά συνέπεια ανίχνευση πολλαπλών γονιδιακών μεταβολών σε λιγότερο χρόνο και με μικρότερο κόστος. Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί διάφορες πλατφόρμες NGS. Βασικό προπαρασκευαστικό στάδιο αποτελεί η προετοιμασία των δειγμάτων, συνήθως με την μορφή “βιβλιοθήκης”. Κατά την διάρκεια της προετοιμασίας, το DNA του ασθενή απομονώνεται, αποκαθαίρεται, ενισχύεται και τμηματοποιείται. Τα δεδομένα αλληλούχισης δημιουργούνται σε αυτά τα μικρά τμήματα DNA και τα ηλεκτρονικά αποτελέσματα αντιστοιχίζονται σε μία αλληλουχία ή γονιδίωμα αναφοράς. Η αναθεωρημένη έκδοση του ανθρώπινου γονιδιώματος

αναφοράς, GRCh38, δημοσιεύτηκε από το Εθνικό Κέντρο για την Βιοτεχνολογική Καινοτομία (National Center for Biotechnology Innovation - NCBI), στις 24 Δεκεμβρίου 2013 [91,92,93].

Το NGS, όπως αναλυτικά περιγράφηκε, χρησιμοποιείται είτε για ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing), ή ανάλυση του εξώματος (whole exome sequencing), είτε για στοχευμένα γονιδιακά πάνελ. Τα τελευταία είναι αυτά που συνήθως χρησιμοποιούνται στην υγρή βιοψία.

Τα γονιδιακά πάνελ παρέχουν πληροφορίες για μια συγκεκριμένη κατηγορία γονιδίων. Περιλαμβάνουν συνήθως 10 έως 200 γονίδια. Τα στοχευμένα πάνελ σε πολλές περιπτώσεις είναι προτιμότερα από την ανάλυση του εξώματος, λόγω του σημαντικά μικρότερου κόστους, της μικρότερης πιθανότητας ανίχνευσης μεταλλαγών χωρίς γνωστή κλινική σημασία και του μεγαλύτερου βάθους κάλυψης (αριθμός ανεξάρτητων “διαβασμάτων” μιας περιοχής του DNA). Η ακρίβεια για τα στοχευμένα NGS πάνελ ξεπερνά το 95% [94,95].

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε με την προοπτική να μελετηθεί η χρήση της υγρής βιοψίας σε έναν πολύ δύσκολα διαχειρίσιμο καρκίνο, όπως είναι ο παγκρεατικός καρκίνος, προσβλέποντας στην περαιτέρω διερεύνηση ενός σύγχρονου εργαλείου που μπορεί να παρέχει πολύτιμα δεδομένα για την βέλτιστη θεραπευτική αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου. Συγκεκριμένα οι στόχοι της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι οι εξής:

A) Να ελεγχθεί η επίπτωση, η ειδικότητα και ευαισθησία των μεταλλάξεων *KRAS* και *NRAS* στο πλάσμα ασθενών με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος, με χρήση της ευαίσθητης τεχνικής ψηφιακής PCR - BEAMing Digital PCR

B) Να ελεγχθεί η προγνωστική (για έκβαση) και προβλεπτική (για RECIST ORR) χρησιμότητα της παρουσίας των μεταλλάξεων *KRAS* και *NRAS* στο κυκλοφορούν DNA του όγκου

Γ) Να ελεγχθεί η προγνωστική (για έκβαση) και προβλεπτική (για RECIST ORR) χρησιμότητας, με BEAMing Digital PCR, των μεταβολών του φορτίου μεταλλάξεων στο πλάσμα, πριν και 4 - 6 εβδομάδες μετά την έναρξη συστηματικής θεραπείας και η συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους, (μεταβολή κλινικής εικόνας, απεικονιστική ανταπόκριση βάσει των κριτηρίων RECIST, συσχέτιση με τη μεταβολή των καρκινικών δεικτών CA 19-9 και CEA), με αναδρομική ανάλυση.

Δ) Να μελετηθεί η συμφωνία του RAS status στο πλάσμα με την ανωτέρω μέθοδο με το RAS status στον ιστό (πρωτοπαθές αδеноκαρκίνωμα παγκρέατος ή μεταστατική εστία από αδеноκαρκίνωμα παγκρέατος) με συμβατικές μεθόδους (RT - PCR).

Ε) Να ελεγχθεί η επίπτωση, η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανίχνευσης μεταλλάξεων στο πλάσμα ασθενών με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος με χρήση της τεχνικής αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS), για προσδιορισμό μεταλλάξεων *KRAS* αλλά και άλλων μοριακών μεταλλαγών που σχετίζονται με το παγκρεατικό καρκίνο. Επίσης να ελεγχθεί εάν το φορτίο και το είδος των μεταλλάξεων μεταβάλλεται με την χορήγηση χημειοθεραπείας καθώς και εάν η παρουσία μίας ή περισσότερων μεταλλάξεων έχουν προβλεπτικό χαρακτήρα ανταπόκρισης ή αντίστασης στη θεραπεία και

προγνωστικό ρόλο σχετιζόμενο με την επιβίωση (OS) και το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS).

ΣΤ) Να ελεγχθεί η προγνωστική (για έκβαση) και προβλεπτική (για RECIST ORR) χρησιμότητας της παρουσίας των μεταλλάξεων *KRAS* και άλλων μοριακών μεταλλαγών που θα προκύψουν από την χρήση ευρύτερου μοριακού πάνελ γονιδίων με τη χρήση NGS

Ζ) Να γίνει συσχέτιση των μεταβολών του φορτίου μεταλλάξεων *KRAS* και των υπόλοιπων μεταλλάξεων που θα προκύψουν από την ανάλυση με NGS στο πλάσμα με κλινικές παραμέτρους, (μεταβολή κλινικής εικόνας, απεικονιστική ανταπόκριση βάσει των κριτηρίων RECIST, συσχέτιση με τη μεταβολή των καρκινικών δεικτών CA 19-9 και CEA), με αναδρομική ανάλυση.

Συνολικά με την παραγωγή προοπτικών ερευνητικών δεδομένων υγρών βιοψιών για τον παγκρεατικό καρκίνο, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί να συμβάλλει στον σχεδιασμό μοντέλων που θα επιτρέπουν ακριβέστερες και πιο εξειδικευμένες επιλογές φαρμακευτικής και υγειονομικής περίθαλψης για τον κάθε ασθενή με ανεγχείρητο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο. Η χρήση υγρών βιοψιών θα διευκολύνει την ανάδειξη των ασθενών με τη μέγιστη πιθανότητα ωφέλειας από τα υψηλού κόστους και όχι άμοιρα παρενέργειών στοχευτικά φάρμακα, επιτρέποντας σημαντική εξοικονόμηση πόρων στα ασφαλιστικά ταμεία, σε μια εποχή μεγάλης οικονομικής δυσχέρειας. Επιπλέον, τα δεδομένα για τον βαθμό συμφωνίας των μεταλλάξεων RAS μεταξύ ιστικού υλικού πρωτοπαθούς εστίας/μεταστάσεων και πλάσματος θα ενισχύσουν τη θέση των υγρών βιοψιών στην παρακολούθηση των ασθενών, έναντι των “παραδοσιακών” μέσων (απεικόνιση, καρκινικοί δείκτες), καθιστώντας το ctDNA πολύτιμο προγνωστικό ή/και προβλεπτικό βιοδείκτη για τον παγκρεατικό καρκίνο.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κριτήρια Ένταξης Ασθενών

Στην μελέτη συμμετείχαν ενήλικες ασθενείς με διάγνωση ανεγχείρητου και μεταστατικού καρκίνου παγκρέατος μετά από ενημέρωση και ενυπόγραφη συγκατάθεση. Τα κριτήρια ένταξης στην μελέτη ήταν τα ακόλουθα:

- Ασθενείς που έχουν συμπληρώσει το 18ο έτος της ηλικίας τους.
- Ιστολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση αδενοκαρκινώματος των πόρων του παγκρέατος.
- Κλινικά και απεικονιστικά επιβεβαιωμένη διάγνωση ανεγχείρητης ή/και μεταστατικής νόσου.
- Υπογεγραμμένο έντυπο ενημερωμένης συγκατάθεσης από τους ασθενείς, στο οποίο, εκτός των άλλων, δηλώνουν ότι είναι διαθέσιμοι και ικανοί να τηρήσουν τις απαιτήσεις του πρωτοκόλλου παρατήρησης, συμπεριλαμβανομένων των τακτικών επισκέψεων και τη λήψη αιμοληψιών όπως ορίζεται από το πρωτόκολλο.
- Διαθέσιμο δείγμα ιστού μονιμοποιημένου με φορμαλίνη από τη βιοψία του πρωτοπαθούς όγκου ή κάποιας μεταστατικής εστίας.
- Ασθενείς με μετρήσιμη νόσο βάσει απεικονιστικής αξιολόγησης με χρήση των απεικονιστικών κριτηρίων RECIST έκδοση 1.1 [96]
- Ασθενείς με PS κατά ECOG 0-2 κατά τη διάγνωση. [97], [98]
- Ασθενείς με επαρκή λειτουργία μυελού των οστών.
- Ασθενείς με επαρκή νεφρική και ηπατική λειτουργία
- Ασθενείς που μπορούν να λάβουν αντικαρκινική θεραπεία σύμφωνα με την κρίση του θεράποντα ογκολόγου τους.

2.2 Συλλογή Δειγμάτων Ασθενών

Η μελέτη ξεκίνησε και διεξήχθη από την Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων σε συνεργασία με την Γ' Παθολογική Κλινική του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς “Άγιοι Ανάργυροι” και την Ογκολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Πατρών “Ο Άγιος Ανδρέας”. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο που παρακολουθούνταν από τα ογκολογικά τμήματα αυτών των νοσοκομείων και οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης, όπως αυτά περιγράφονται στην παράγραφο 2.1

Η μελέτη έλαβε έγκριση από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και από τις αντίστοιχες επιστημονικές επιτροπές των συνεργαζόμενων νοσοκομείων.

Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε από την Μονάδα Υγρής Βιοψίας του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τα δείγματα από τους ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων υποβαλλόταν άμεσα σε επεξεργασία από το εργαστήριο, ενώ τα δείγματα από τα δύο συνεργαζόμενα νοσοκομεία αποστέλλονταν με κατάλληλη συσκευασία και με τις απαραίτητες προβλεπόμενες συνθήκες στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων για περαιτέρω επεξεργασία.

Σε όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη, το πρώτο δείγμα αίματος συλλέχθηκε κατά τη διάγνωση της ανεγχείρητης ή/και μεταστατικής νόσου αμέσως πριν από τη χορήγηση οποιουδήποτε χημειοθεραπευτικού σχήματος. Το δεύτερο δείγμα αίματος, όπως ορίζεται από το πρωτόκολλο της μελέτης, συλλέχθηκε 4 - 6 εβδομάδες μετά την έναρξη της χημειοθεραπείας, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15. Μετά την υπογραφή του εντύπου ενημερωμένης συγκατάθεσης συλλέγονταν 20ml φλεβικού περιφερικού αίματος σε κάθε μία από τις δύο αιμοληψίες. Το αίμα συλλεγόταν σε δύο φιαλίδια των 10ml τύπου BD Vacutainer K2 EDTA με καπάκι Lavender Hemogard, είτε σε ειδικά φιαλίδια τύπου Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes (BCT)

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Διάγνωση/
Προ θεραπείας 1^η γραμμής

4-6 εβδομάδες θεραπείας



Πλάσμα : Έλεγχος για 34 μεταλλάξεις στα εξόνια 2, 3 και 4 των γονιδίων *KRAS/NRAS* μέσω ψηφιακής PCR- BEAMing- OncoBEAM™ RAS CRC kit (Sysmex Inostics)

Ιστός: Έλεγχος για 7 μεταλλάξεις στα εξόνια 2 και 3 του γονιδίου *KRAS* μέσω Allele specific RT-PCR -cobas *KRAS* mutation test (Roche)

Ορός: Προσδιορισμός του δείκτη CA19-9 μέσω του συστήματος UniCel™ DXI 800 Access Immunoassay System (Beckman Coulter)

Εικόνα 15: Μεθοδολογία της μελέτης

2.3 Επεξεργασία Δειγμάτων και Απομόνωση ctDNA

Αρχικά, τα δείγματα υποβαλλόταν σε επεξεργασία για τον διαχωρισμό του πλάσματος και την απομόνωση του ctDNA. Στην συνέχεια, σε μια ομάδα ασθενών έγινε ανάλυση του ctDNA με τη χρήση της μεθόδου BEAMing Digital PCR, από την οποία καθοριζόταν η κατάσταση του γονιδίου RAS ως μεταλλαγμένο ή μη μεταλλαγμένο. Στην περίπτωση που ανιχνευόταν μεταλλάξεις του RAS, ακολουθούσε η ποσοτικοποίηση του RAS μεταλλαγμένου ctDNA, η οποία εκφράζεται ως κλάσμα μεταλλαγμένων αλληλομόρφων (Mutant Allele Fraction -

MAF). Ως Κλάσμα Μεταλλαγμένων Αλληλομόρφων ορίζεται το κλάσμα RAS μεταλλαγμένου ctDNA στον συνολικό πληθυσμό μεταλλαγμένου και μη μεταλλαγμένου ctDNA. Στην δεύτερη ομάδα ασθενών, η ανάλυση του ctDNA έγινε με τη μέθοδο Αλληλούχισης Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν αναλύονται στη συνέχεια.

2.3.1 Προετοιμασία του πλάσματος - Απομόνωση

Τα δείγματα των ασθενών υποβάλλονταν σε ειδική επεξεργασία με φυγοκέντρηση σε δύο βήματα προκειμένου να απομονωθεί το υπερκείμενο (πλάσμα). Τα δείγματα που συλλέγονταν στα φιαλίδια BD Vacutainer, φυγοκεντρούνταν εντός 4 ωρών από τη λήψη, ενώ τα δείγματα στα Streck φιαλίδια έπρεπε να φυγοκεντρηθούν εντός 72 ωρών.

Η πρώτη φυγοκέντρηση πραγματοποιούνταν στα 1600 g για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο πάγκου με ταλαντευόμενο κάδο και μηδενική επιβράδυνση. Σε αυτό το πρώτο στάδιο γινόταν ο διαχωρισμός του πλάσματος από τα έμμορφα συστατικά του αίματος όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. (Πίνακας 4)

Πίνακας 4. Πρώτη φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό του πλάσματος

Παράμετροι	BD Vacutainer K2 EDTA/ Streck Cell-Free DNA BCT
Ρότορας αιώρησης	Σταθερής γωνίας
Ταχύτητα (rcf)	1600
Χρόνος (λεπτά)	10
Επιβράδυνση	Μηδενική

Το υπερκείμενο από κάθε ένα από τα δύο φιαλίδια μεταφερόταν χειροκίνητα με αυτόματη πιπέτα, αφήνοντας περίπου 500uL από το υπερκείμενο προκειμένου να μην διαταραχθεί το κυτταρικό στρώμα. Το πλάσμα ελέγχονταν επισκοπικά και απορρίπτονταν σε περίπτωση ύπαρξης σημαντικής αιμόλυσης. Στην συνέχεια το

πλάσμα και από τα δύο φιαλίδια μεταφερόταν σε ένα φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 50 mL. Ακολούθως, γινόταν η δεύτερη φυγοκέντρηση στα 3000 g για τα δείγματα που είχαν τοποθετηθεί στα φιαλίδια BD Vacutainer και στα 6000 g για τα δείγματα που είχαν τοποθετηθεί σε φιαλίδια Streck. Η δεύτερη φυγοκέντρηση στο πλάσμα γινόταν για 10 λεπτά στην ίδια φυγόκεντρο σταθερής γωνίας. Με αυτό το δεύτερο βήμα εξασφαλιζόταν η απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών τμημάτων που είχαν παραμείνει μετά την πρώτη φυγοκέντρηση.

Πίνακας 5. Δεύτερη φυγοκέντρηση για απομάκρυνση οποιουδήποτε κυτταρικού τμήματος

Παράμετροι	BD Vacutainer K2 EDTA	Streck Cell-Free DNA BCT
Ρότορας αιώρησης	Σταθερής γωνίας	Σταθερής γωνίας
Ταχύτητα (rcf)	3000	6000
Χρόνος (λεπτά)	10	10
Επιβράδυνση	Μηδενική	Μηδενική

Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης το υπερκείμενο μεταφερόταν σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 15 mL με αυτόματη πιπέτα. Και σε αυτό το βήμα ήταν σημαντικό να μείνουν έως 300 μ L πλάσματος στον πυθμένα του φιαλιδίου προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δεν μεταφέρονται κυτταρικά υπολείμματα στο υπερκείμενο πλάσμα.

Έπειτα με την ηλεκτρική πιπέτα γινόταν ανάμειξη του δείγματος δέκα φορές για να ομογενοποιηθεί. Το επόμενο βήμα ήταν η διαίρεση του πλάσματος σε κρυογονικά φιαλίδια των 3,5 mL. Τα κρυογονικά φιαλίδια με το πλάσμα τοποθετούνταν στη συνέχεια σε όρθια θέση σε καταψύκτη βαθιάς κατάψυξης στους -80 βαθμούς Κελσίου για διάστημα 24 μηνών. Κάθε ένα από αυτά τα φιαλίδια αποψύχονταν πριν ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης DNA και περαιτέρω ανάλυσης.

Ένα επιπλέον βήμα κατά την απομόνωση του πλάσματος ήταν η συλλογή και φύλαξη της λευκής στιβάδας (buffy coat), από το δείγμα μετά την πρώτη φυγοκέντρηση. Πρόκειται για ένα συμπυκνωμένο εναιώρημα που σχηματίζεται μεταξύ των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος και περιλαμβάνει το μεγαλύτερο

ποσοστό των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Η λευκή στιβάδα μεταφερόταν με προσοχή με χειροκίνητη πιπέτα σε κρυογονικά φιαλίδια για φύλαξη στους -80 βαθμούς Κελσίου για μελλοντική επεξεργασία και ανάλυση.

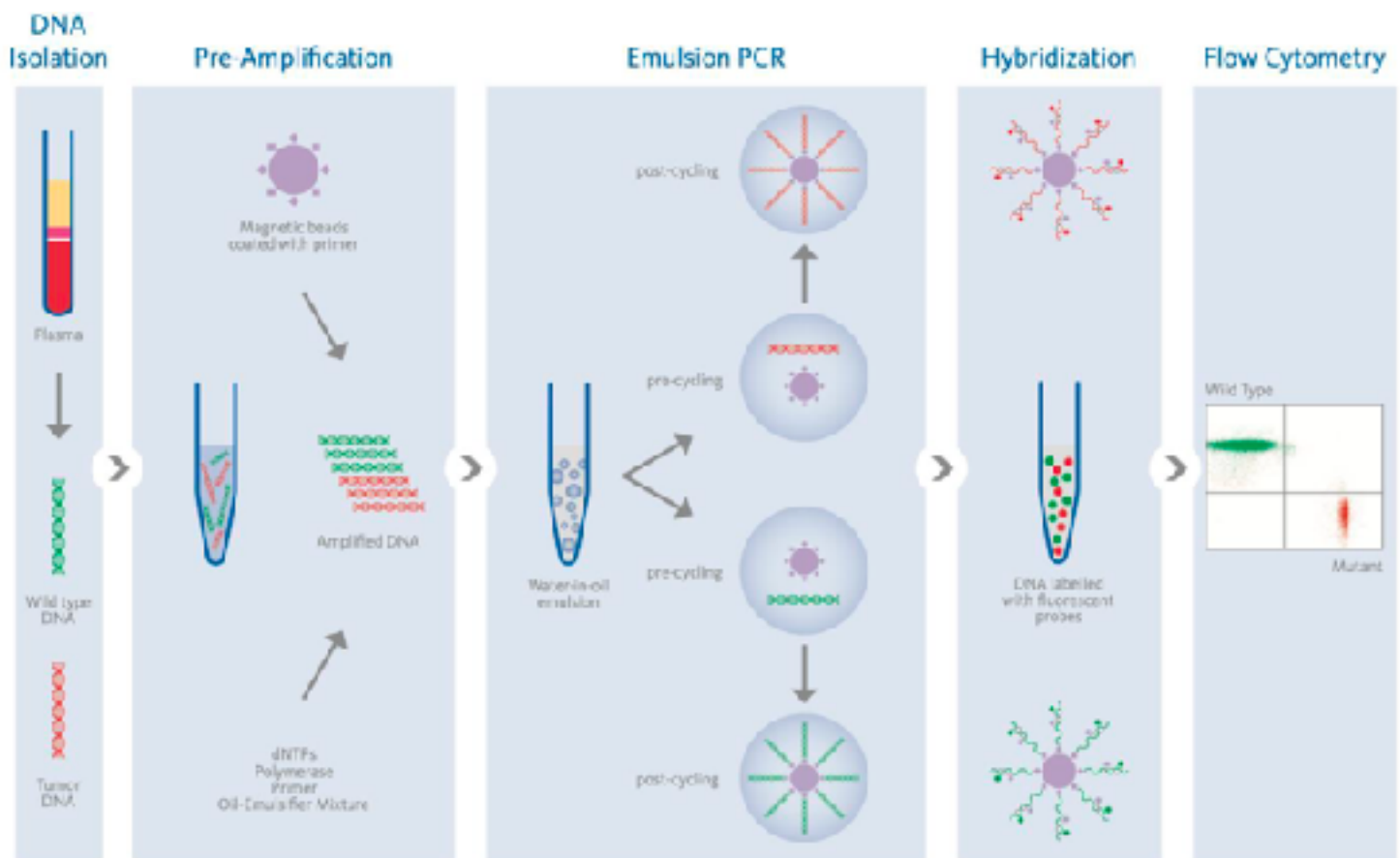
2. 3. 2 BEAMing Digital PCR

Η ανάλυση του DNA για την εύρεση τυχόν μεταλλάξεων στηρίζεται σε προηγμένες τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) υψηλής ευαισθησίας. Στην παρούσα μελέτη για την ανάλυση του ctDNA χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα OncoBEAM™ RAS CRC (Sysmex-Inostics), η οποία είναι μια επικυρωμένη πλατφόρμα ανάλυσης μεταλλάξεων του RAS, σε ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο. Τα δείγματα πλάσματος ελέγχθηκαν για 34 κλινικά σημαντικές μεταλλάξεις στα εξόνια 2, 3 και 4 των γονιδίων KRAS και NRAS στο ctDNA μέσω της ψηφιακής (digital) BEAMing PCR και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117 και 146.

Η εν λόγω μέθοδος –από τα αρχικά Beads (σφαιρίδια), Emulsion (γαλάκτωμα), Amplification (ενίσχυση), Magnetics (μαγνητική)– χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία και προσφέρει δυνατότητα ποσοτικοποίησης του μεταλλαγμένου DNA με ακρίβεια. Βασική αρχή της είναι η κλασματοποίηση του δείγματος με πολλαπλές αραιώσεις (φτάνοντας περίπου το 1 αντίγραφο DNA ανά κλάσμα) πριν την PCR, ανιχνεύοντας στη συνέχεια και καταγράφοντας με δυαδικό τρόπο το διαφορετικό σήμα κάθε κλάσματος, ανάλογα με το αν αυτό περιέχει μεταλλαγμένο ή μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Έτσι, ενισχύονται επιτυχώς και τα μόρια - στόχοι που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (της τάξης του 1:15.000) (όπως τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα DNA του όγκου), προσδίδοντας στη μέθοδο ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία και φέρνοντας την σε πρωτοποριακή θέση στον χώρο των υγρών βιοψιών.

Στην BEAMing, η κλασματοποίηση του δείγματος στηρίζεται στη δημιουργία γαλακτώματος τύπου “νερό σε έλαιο”. Μέσα σε αυτό, κάθε μόριο DNA πολλαπλασιάζεται ξεχωριστά και τα χιλιάδες πανομοιότυπα αντίγραφα που προκύπτουν προσδένονται σε μαγνητικά σφαιρίδια. Έπειτα τα μόρια DNA υβριδοποιούνται με ειδικούς ιχνηθέτες (για το μη μεταλλαγμένο ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, αντίστοιχα) και ακολουθεί ποιοτική και ποσοτική ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος αυτή, θεωρείται το “gold

standard” για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων σε ctDNA, καθώς έχει όριο ανίχνευσης 0,01% και έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες-ορόσημα και μεγάλες κλινικές δοκιμές για μεταστατικό κολορρθικό καρκίνο. Η χρήση της δεν έχει ελεγχθεί σε ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, και η ανάδειξη κατωφλίου (cut off) της δοκιμασίας για ασθενείς με ανεγχείρητο ή μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνωμα θα μπορούσε να προταθεί από την παρούσα μελέτη. Στην παρακάτω εικόνα αποδίδονται σχηματικά τα στάδια της ψηφιακής BEAMing PCR. (Εικόνα 16)



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της ψηφιακής BEAMing PCR. Η τεχνολογία της ψηφιακής BEAMing PCR συνδυάζει την PCR με δημιουργία γαλακτώματος με μαγνητικά σφαιρίδια και κυτταρομετρία ροής για ανίχνευση μεταλλαγμένων μορίων από το καρκινικό DNA. Η διαδικασία χωρίζεται σε πέντε βήματα. Αρχικά, το DNA απομονώνεται από το πλάσμα το οποίο περιέχει μεταλλαγμένους και μη μεταλλαγμένους πληθυσμούς DNA. Ακολουθεί το στάδιο της προ-ενίσχυσης, όπου ενισχύεται το τμήμα του DNA που περιέχει την ακολουθία ενδιαφέροντος. Στην συνέχεια στο μείγμα προστίθενται επικαλυμμένα μαγνητικά σφαιρίδια,

τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, πολυμεράση, εκκινητές και ένας ελαιώδης γαλακτοματοποιητής προκειμένου να δημιουργηθεί ένα γαλάκτωμα τύπου “νερό σε έλαιο” με πολλαπλά τμήματα. Το καθένα από αυτά περιέχει ένα επικαλυμμένο μαγνητικό σφαιρίδιο και ένα τμήμα DNA, το οποίο πολλαπλασιάζεται ακολουθώντας τους κύκλους της PCR με δημιουργία γαλακτώματος. Ακολουθεί το βήμα του υβριδισμού, όπου το ενισχυμένο DNA στα μαγνητικά σφαιρίδια ιχνηθετείται με φθορίζοντα σφαιρίδια. Στο τελικό βήμα με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής γίνεται ο διαχωρισμός του μεταλλαγμένου από το μη μεταλλαγμένο πληθυσμό DNA. [99]

2.3.3 Next Generation Sequencing - NGS

Με την χρήση του Oncomine™ Colon cfDNA επιτυγχάνεται η ανάλυση για την ανίχνευση μεταλλαγών στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA) που προέρχεται από όγκους του παχέως εντέρου καθώς και άλλων συναφών γαστρεντερικών όγκων. Πιο συγκεκριμένα, αναλύονται δεκατέσσερα γονίδια για περισσότερες από 240 μεταλλαγές (Γονίδια: *AKT1*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *FBXW7*, *GNAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *MAD4*, *TP53*, *APC*).

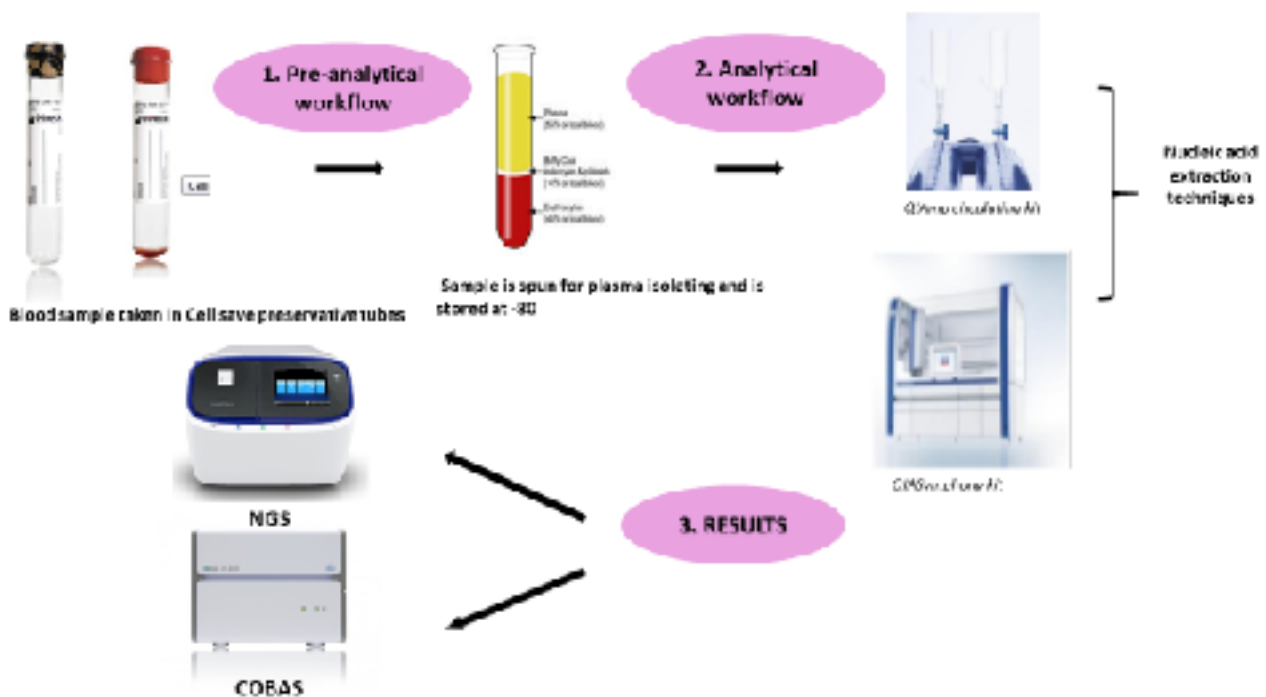
Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα επόμενης γενιάς Ion GeneStudio S5 Prime System (ThermoFisher). Το όριο ανίχνευσης των παραλλαγών της εξέτασης είναι 0,1%, με 90% ευαισθησία και >98% ειδικότητα για τα hotspots Single Nucleotide Variants (SNVs) και μεταλλάξεις με προσθήκες ή απαισιόφες (indels). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μέσω της τεχνολογίας αλληλούχισης “με ετικέτες” (tag sequencing), μπορεί να επιτευχθεί όριο ανίχνευσης (LoD) έως και 0,1%.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Απομόνωση του γενετικού υλικού από το πλάσμα με τη χρήση ειδικού της Qiagen kit.
- Ενίσχυση των γονιδίων στόχων με τη χρήση ειδικών παρεχόμενων από το χρησιμοποιούμενο kit, ανάμειξη των αντίστοιχων εκκινητών (Colon Cancer cfTNA Panel).
- Καθαρισμός με χρήση αιθανόλης 80% των ενισχυμένων προϊόντων και πρόσδεση των barcodes με τη βοήθεια ειδικού θερμικού πρωτοκόλλου.

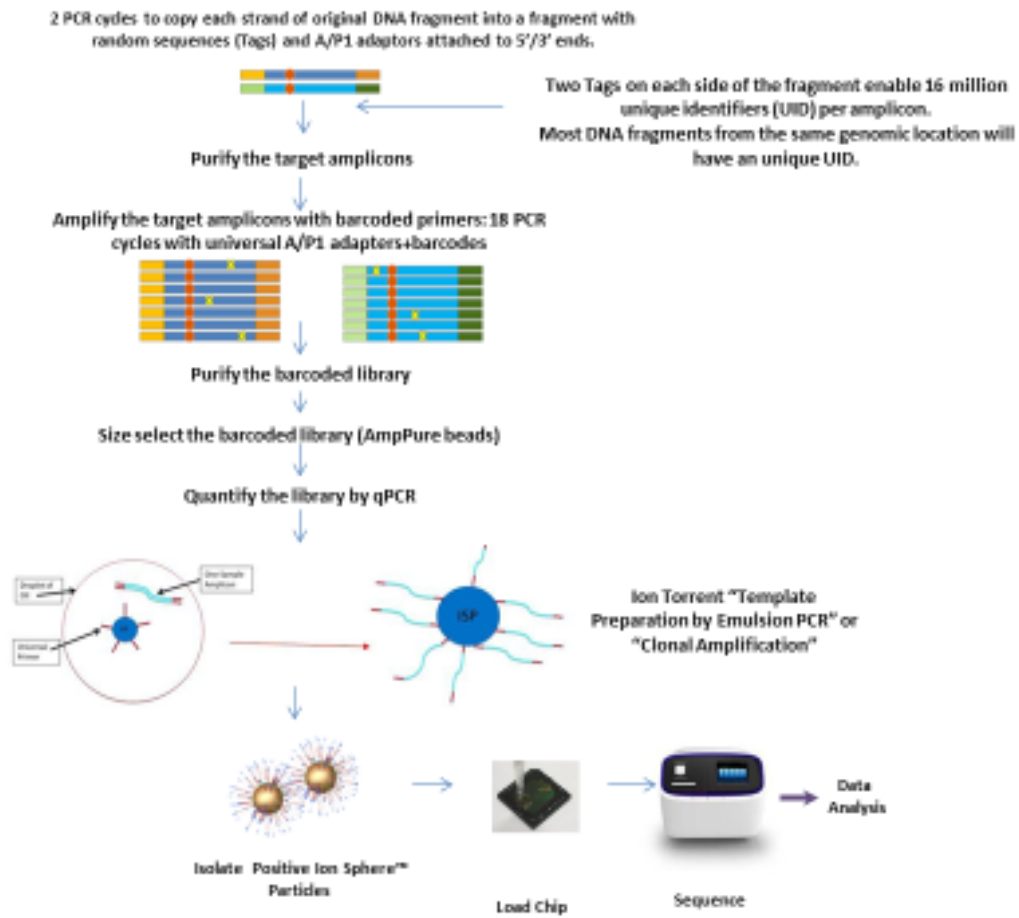
- Καθαρισμός της βιβλιοθήκης και ποσοτικοποίηση με τη χρήση του Ion Library TaqMan® Quantitation Kit.
- Χρησιμοποιήθηκε το Ion Chef™ System και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση με τη βοήθεια του Ion S5™ Sequencing Kit.
- Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του Ion Reporter Torrent Server.

Το κιτ που χρησιμοποιήθηκε, βασίζεται στην τεχνολογία UMI (Unique Molecular Identifier). Οι Μοναδικοί Μοριακοί Ανιχνευτές (UMIs) είναι ένας τύπος μοριακού ραβδωτού κώδικα, που παρέχει τη δυνατότητα διόρθωσης λαθών καθώς και αυξημένη ακρίβεια στην αλληλούχιση. Αυτοί οι μοριακοί ραβδωτοί κώδικες, είναι μικρές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται για να επισημάνουν με μοναδικό τρόπο κάθε μόριο σε μία βιβλιοθήκη δειγμάτων.

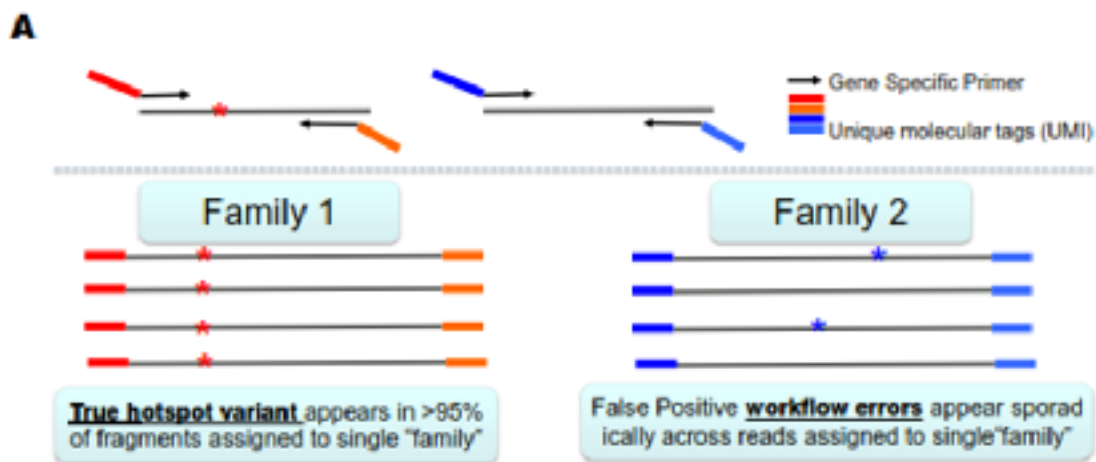


Εικόνα 17: Απομόνωση Γενετικού Υλικού για Ανάλυση με NGS. Τα δείγματα των υγρών βιοψιών παραλαμβάνονται από το εργαστήριο σε ειδικά φιαλίδια και στις κατάλληλες συνθήκες. Πραγματοποιούνται δύο φυγοκεντρήσεις των 10 λεπτών με

σκοπό την απομόνωση του πλάσματος στους -80 βαθμούς Κελσίου μέχρι τη στιγμή της απομόνωσης του γενετικού υλικού είτε με τη χρήση του QIA Symphony είτε με τη χρήση του QIAmp circulating kit (Qiagen).



Εικόνα 18: Oncomine Cell-Free Total Nucleic workflow



Εικόνα 19: Παράδειγμα επιδιόρθωσης λαθών με την τεχνολογία UMI

Επιδιόρθωση λαθών με τη χρήση της UMI τεχνολογίας.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

- Δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου πάνελ γονιδίων με ένα μόνο πείραμα
- Δυνατότητα επιδιόρθωσης λαθών
- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα

2.3.4 Ανίχνευση KRAS μεταλλάξεων στον ιστό των ασθενών

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για 7 μεταλλάξεις στα εξώνια 2 και 3 του γονιδίου *KRAS*. Αρχικά ένας εξειδικευμένος παθολογοανατόμος εκτιμούσε τις τομές αιματοξυλίνης - ηωσίνης από τα block παραφίνης της βιοψίας του κάθε ασθενή επισημαίνοντας τις περιοχές όπου υπήρχε αυξημένη πυκνότητα όγκου - καρκινικών κυττάρων. Το DNA του όγκου απομονωνόταν από αυτές τις περιοχές αυξημένης πυκνότητας με συγκεκριμένη διαδικασία. Στη συνέχεια η ανίχνευση των μεταλλάξεων του *KRAS* γινόταν με τη χρήση της πλατφόρμας Allele specific RT-PCR cobas *KRAS* mutation test (Roche). Πρόκειται για ένα στοχευμένο τεστ PCR που γίνεται σε πραγματικό χρόνο για την ποιοτική ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα εξώνια 2,3 και 4 στο γονίδιο *KRAS*, είτε από ιστό μονιμοποιημένο

σε παραφίνη είτε σε ελεύθερο κυκλοφορούν DNA που απομονώνεται από το πλάσμα.

2.4 Ανάλυση Κλινικών Δεδομένων

Εκτός από τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων αίματος και των δειγμάτων ιστού, συλλέχθηκαν, καταγράφηκαν και αναλύθηκαν τα κλινικά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη. Έγινε επίσης συσχετισμός των κλινικών δεδομένων με τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων, που αποτελεί και έναν από τους βασικούς στόχους της μελέτης αυτής. Τα δεδομένα των ασθενών αντλήθηκαν από τα ιατρικά αρχεία που διατηρούν τα τμήματα στα οποία θεραπεύονται οι ασθενείς.

Τα κλινικά δεδομένα που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν ήταν τα εξής:

Κατά τη διάγνωση:

- Ηλικία
- Φύλο
- Ημερομηνία γέννησης
- Ημερομηνία διάγνωσης
- Ιστορικό καπνίσματος
- Συννοσηρότητες
- Οικογενειακό ιστορικό νεοπλασιών
- Ιστολογικός τύπος
- PS κατά ECOG
- Στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση
- Εντοπισμός δευτεροπαθών εντοπίσεων και φορτίο νόσου
- Τιμές αιματολογικού και βιοχημικού ελέγχου (γενική αίματος, κρεατινίνη, τρανσαμινάσες, χολερυθρίνη)
- Επίπεδα CA 19-9 ορού
- Επίπεδα CEA ορού

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας πριν τη δεύτερη αιμοληψία:

- Χημειοθεραπευτικό σχήμα
- Διάρκεια χημειοθεραπευτικού σχήματος (έναρξη - λήξη)

- Βέλτιστο αποτέλεσμα στην συμβατική απεικόνιση (Αξονική - Μαγνητική Τομογραφία)
- Τιμές αιματολογικού και βιοχημικού ελέγχου
- Επίπεδα CA 19-9 ορού
- Επίπεδα CEA ορού
- Ημερομηνία επιδείνωσης νόσου (εφόσον συμβεί)
- Περιγραφή φορτίου μεταστάσεων σε περίπτωση επιδείνωσης νόσου (όργανο, αριθμός μεταστάσεων)
- Ημερομηνία θανάτου (εφόσον συμβεί)
- Ημερομηνία διακοπής παρακολούθησης στα πλαίσια της μελέτης

2.5 Στατιστική Ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκαν περιγραφικά στατιστικά μεγέθη με τα αντίστοιχα ποσοστά (για τις ποιοτικές μεταβλητές), και η διάμεσος με εύρος τιμών (για τις συνεχείς μεταβλητές) προκειμένου να συνοψίσουν τα χαρακτηριστικά των ασθενών και του όγκου, όπως επίσης και την κατάσταση των μεταλλάξεων σε κάθε χρονική στιγμή ενδιαφέροντος.

Για τα δεδομένα επιβίωσης των ασθενών υπολογίστηκε το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS - Progression Free Survival) και το διάστημα ολικής επιβίωσης (OS - Overall Survival) σε συσχέτιση με τη μεταβολή του προφίλ των μεταλλάξεων του όγκου, με τη μεταβολή των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9, καθώς και με τα απεικονιστικά ευρήματα.

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές συσχέτισης Pearson r και Spearman ρ για τη διενέργεια διμερών συγκρίσεων μεταξύ ποσοτικών συνεχών μεταβλητών που ακολουθούσαν κανονική ή μη κανονική κατανομή αντίστοιχα. Το τεστ ανεξαρτησίας Pearson χ^2 χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστούν οι μονομερείς εξαρτήσεις μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών, το Student t τεστ για τη σύγκριση των μέσων τιμών (means) και το τεστ Mann-Whitney U για τη διενέργεια μη παραμετρικών τεστ. Οι διαφορές μεταξύ ζευγαρωτών παρατηρήσεων εκτιμήθηκαν με τεστ paired-samples

t-test και Wilcoxon signed rank test, κατά περίπτωση. Επί σκοπού σύγκρισης των μέσων τιμών και ανίχνευσης διαφορών μεταξύ πολλαπλών γκρουπ χρησιμοποιήθηκε μέθοδος επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated-measures) ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις ήταν αμφίδρομες (two-sided) και χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό GraphPad Prism v10.0 . Σε όλες τις περιπτώσεις στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των Ασθενών και της Νόσου

Συνολικά συμμετείχαν στην μελέτη 61 ασθενείς που διαγνώστηκαν με ανεγχείρητο και μεταστατικό αδеноκαρκίνωμα παγκρέατος, από τον Μάιο του 2017 έως και τον Ιούνιο του 2021. Η παρακολούθηση των ασθενών και η καταγραφή των δεδομένων τους συνεχίστηκε ως και τον Σεπτέμβριο του 2024. Η μέση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση ήταν τα 67 έτη (με εύρος 43 - 82 έτη). 56% των ασθενών ήταν άνδρες (34 από τους 61) και 44% ήταν γυναίκες (27 από τους 61).

Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (75%), είχαν αδеноκαρκίνωμα παγκρέατος χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3) και οι υπόλοιποι (25%) είχαν αδеноκαρκίνωμα παγκρέατος μέτριας διαφοροποίησης (grade 2). Σε 45 από τους συνολικά 61 ασθενείς ο όγκος εντοπιζόταν στην κεφαλή του παγκρέατος (74%) και στους υπόλοιπους 16 στην ουρά του παγκρέατος (16%). Στην μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (53 ασθενείς από τους 61), η νόσος τους ήταν σταδίου IV (87%) κατά τη διάγνωση, ενώ οι υπόλοιποι 8 ασθενείς διαγνώστηκαν με τοπικά προχωρημένη - ανεγχείρητη νόσο σταδίου III (13%). Η γενική κατάσταση ήταν πολύ καλή για το 52% των ασθενών (ECOG PS 0 για τους 32 από τους 61 ασθενείς) και για το υπόλοιπο 48% ήταν σχετικά καλή (ECOG PS 1 για τους 29 από τους 61 ασθενείς). Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 6)

Πίνακας 6: Βασικά Χαρακτηριστικά των Ασθενών της Μελέτης

	Total (N=61)	N (%)
Φύλο		
Άνδρας	34	56%
Γυναίκα	27	44%
Ηλικία Διάγνωσης (έτη)		67 (εύρος: 43 - 82)
ECOG PS		
PS0	32	52%
PS1	29	48%
Αρχική Σταδιοποίηση		
Τοπικά προχωρημένο	8	13%
Μεταστατικό	53	87%
Ιστολογικός Τύπος	Αδενοκαρκίνωμα Πόρων Παγκρέατος	100%
Εντόπιση πρωτοπαθούς εστίας		
Κεφαλή Παγκρέατος	45	74%
Ουρά Παγκρέατος	16	26%
Χημειοθεραπευτικό Σχήμα		
FOLFIRINOX	19	58%
Gemcitabine - Nab Paclitaxel	14	42%

3.2 Χαρακτηριστικά των θεραπευτικών σχημάτων και στοιχεία παρακολούθησης των ασθενών

Όλοι οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής μεταξύ Ιουνίου 2017 και Φεβρουαρίου 2022. Από τους συνολικά 61 ασθενείς, οι 32 ασθενείς (52%) που ήταν σε πολύ καλή κλινική κατάσταση (ECOG PS 0) κατά τη διάγνωση της νόσου, έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής με το σχήμα FOLFIRINOX, όπως ορίζεται από τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση του ανεγχείρητου και μεταστατικού αδενοκαρκινώματος παγκρέατος. [100, 101]. Οι υπόλοιποι 29 ασθενείς (48%), λόγω της ήπια επηρεασμένης κλινικής εικόνας που είχαν κατά τη διάγνωση (ECOG PS 1), έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με το σχήμα gemcitabine - nab-paclitaxel, που αποτελεί εναλλακτική επιλογή θεραπείας σε ασθενείς με επηρεασμένο PS, επίσης βάσει διεθνών κατευθυντήριων οδηγιών. [100, 101].

Το μέσο χρονικό διάστημα έως την εμφάνιση επιδείνωσης της νόσου ή θανάτου από την έναρξη της θεραπείας πρώτης γραμμής ήταν 9,4 μήνες (εύρος 3 - 18 μήνες). 46 ασθενείς (75,4%) συνέχισαν τη θεραπεία τους με τον συνδυασμό FOLFIRI, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής. Από αυτούς τους 46 ασθενείς οι 17 (27,9% του συνόλου των 61) κατάφεραν να λάβουν και τρίτης γραμμής θεραπεία. Μια μικρότερη ομάδα 14 ασθενών (23%), λόγω σημαντικά επηρεασμένης κλινικής εικόνας μετά την επιδείνωση στην θεραπεία πρώτης γραμμής, δεν κατάφεραν να λάβουν θεραπεία δεύτερης γραμμής. Μία ασθενής από το σύνολο των 61 (1,6%), πέτυχε πλήρη απεικονιστική ανταπόκριση με τη θεραπεία 1ης γραμμής με το σχήμα FOLFIRINOX που χορηγήθηκε συνολικά για ένα έτος και ως το τέλος της καταγραφής των δεδομένων της μελέτης τον Σεπτέμβριο του 2024 παρέμενε σε πλήρη ύφεση.

Σχετικά με τα στοιχεία επιβίωσης των ασθενών, 7 από τους 61 (11,7%) απεβίωσαν σε διάστημα μικρότερο των 6 μηνών από τη διάγνωση, ενώ 9 ασθενείς (14,8%) έζησαν περισσότερο από 6 μήνες, αλλά λιγότερο από ένα έτος. Ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών (37,7%, ήτοι 23 ασθενείς) επιβίωσαν για ένα διάστημα μεγαλύτερο των 12 μηνών από τη διάγνωση και μικρότερο των 24 μηνών, ενώ 21 από τους 61 ασθενείς (36%), βρισκόταν εν ζωή στα 2 χρόνια. Κανείς από τους ανωτέρω ασθενείς δεν απεβίωσε εξαιτίας των θεραπευτικών χειρισμών. Οι θάνατοι ήταν αποτέλεσμα της εξέλιξης της νόσου και των επιπλοκών που προέκυπταν από αυτή.

3.3 Σχεδιασμός πάνελ γονιδίων για υγρή βιοψία στον παγκρεατικό καρκίνο

Από την μέχρι τώρα γνώση μας, δεν έχει σχεδιαστεί κάποιο επικυρωμένο πάνελ υγρής βιοψίας στοχευμένο για τον παγκρεατικό καρκίνο. Τα πάνελ που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων είναι συνήθως γενικά πάνελ που συμπεριλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό μεταλλαγών και αφορούν το σύνολο των νεοπλασιών των συμπαγών οργάνων. Επίσης, στην περίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου χρησιμοποιούνται πάνελ που έχουν σχεδιαστεί για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού, ή άλλα πάνελ που είναι σχεδιασμένα για τις μοριακές μεταλλαγές του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς οι συνήθεις μεταλλαγές είναι κοινές.

Στην παρούσα μελέτη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν χρησιμοποιηθεί πάνελ σχεδιασμένα για τον καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού τόσο για την ανάλυση των δειγμάτων με BEAMing Digital PCR, όσο και για την ανάλυση με NGS. Λόγω της σχετικής ετερογένειας που υπάρχει στο πεδίο της υγρής βιοψίας για τον παγκρεατικό καρκίνο, έγινε μια εκτενής ανασκόπηση των δεδομένων της βιβλιογραφίας σχετικά με τις συνηθέστερες γενετικές μεταλλαγές που συμβαίνουν στον καρκίνο του παγκρέατος, καθώς και των συγκεκριμένων περιοχών αυξημένης μεταλλαξογένεσης (hotspots) που αφορούν το κάθε γονίδιο ξεχωριστά.

Μετά από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στο PubMed, στο AACR GENIE Data Guide, καθώς και από την ανάλυση των δεδομένων του FoundationOne® Liquid CDx (F1 Liquid CDx) και του Guardant360® CDx, σχεδιάσαμε ένα προτεινόμενο πάνελ για ανίχνευση μεταλλάξεων με υγρή βιοψία σε ασθενείς με πορογενές αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος. Για τον σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκαν οι συνηθέστερες μεταλλάξεις που απαντώνται στον καρκίνο του παγκρέατος καθώς και οι συγκεκριμένες περιοχές αυξημένης μεταλλαξογένεσης (hotspots) για κάθε γονίδιο. Τα γονίδια και τα hotspots παρατείθενται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. [103-136]

Πίνακας 7. Προτεινόμενες γονιδιακές μεταλλαγές για έλεγχο με υγρή βιοψία σε ασθενείς με προχωρημένο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο

GRCh37				
Gene	Chromosome	Exon	Starts	Ends
KRAS	12	2	25398200	25398330
KRAS	12	3	25380160	25380350
KRAS	12	4	25378543	25378712
NRAS	1	2	115258665	115258805
NRAS	1	3	115256421	115256610
NRAS	1	4	115252185	115252355
TP53	17	4	7579300	7579410
TP53	17	5	7578340	7578600
TP53	17	6	7578135	7578325
TP53	17	7	7577488	7577618
TP53	17	8	7577040	7577191
TP53	17	9	7576778	7576912
TP53	17		7576826	7576945
TP53	17	10	7573960	7574070
CDKN2A	9	2	21971060	21971236
CDKN2A	9		21970849	21970928
CDKN2A	9		21970940	21971033
CDKN2A	9		21971000	21971120
CDKN2A	9		21971087	21971224
CDKN2A	9		21974535	21974669
CDKN2A	9		21974698	21974790
CDKN2A	9		21994138	21994253
SMAD4	18	3	48575040	48575240
SMAD4	18		48575556	48575677
SMAD4	18	5	48581140	48581370
SMAD4	18	6	48584551	48584678
SMAD4	18	8	48586251	48586361
SMAD4	18	9	48591780	48591990
SMAD4	18	11	48603000	48603160
SMAD4	18		48604658	48604774
ARID1A	1		27099832	27099959
ARID1A	1		27106222	27106348
ARID1A	1		27106400	27106478
ARID1A	1		27106532	27106648

Πίνακας 8. Προτεινόμενες γονιδιακές μεταλλαγές για έλεγχο με υγρή βιοψία σε ασθενείς με προχωρημένο παγκρεατικό καρκίνο (συνέχεια)

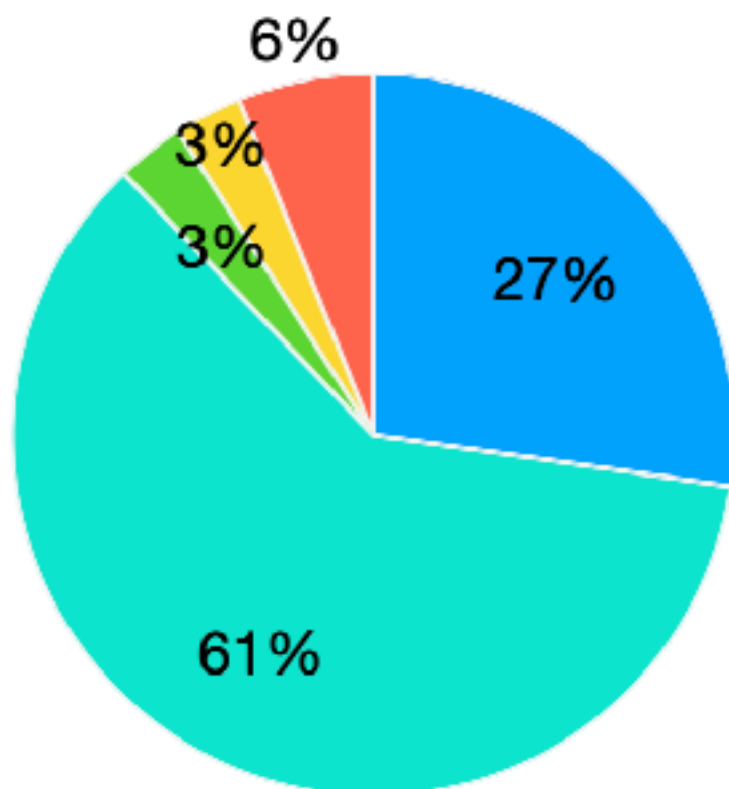
GRCh37				
Gene	Chromosome	Exon	Starts	Ends
MLH1		3	37035049	37035179
MLH1		3	37038119	37038240
MLH1		3	37042388	37042492
MLH1		3	37042388	37042492
MLH1		3	37042478	37042571
MLH1		3	37045900	37046020
MLH1		3	37055975	37056093
MLH1		3	37067147	37067254
BRCA2		13	32911990	32912111
BRCA2		13	32912299	32912406
BRCA2		13	32912404	32912505
BRCA2		13	32912893	32913014
BRCA2		13	32912945	32913058
BRCA2		13	32913073	32913183
BRCA2		13	32913225	32913305
BRCA2		13	32914037	32914153
BRCA2		13	32914201	32914291
BRCA2		13	32914264	32914383
BRCA2		13	32914356	32914458
BRCA2		13	32914505	32914613
BRCA2		13	32914692	32914814
BRCA2		13	32914865	32914985
BRCA2		13	32914975	32915082
BRCA2		13	32915070	32915188
BRCA2		13	32920922	32920996
BRCA2		13	32921023	32921109
BRCA2		13	32929313	32929433
BRCA2		13	32936628	32936748
BRCA2		13	32936701	32936785
BRCA2		13	32936806	32936889
BRCA2		13	32944472	32944584
BRCA2		13	32945108	32945213
BRCA2		13	32950851	32950971
BRCA2		13	32953453	32953568
BRCA2		13	32953618	32953741
BRCA2		13	32953918	32954043
BRCA2		13	32954226	32954344
BRCA2		13	32968878	32968996
BRCA2		13	32969051	32969155
BRCA2		13	32971103	32971223
BRCA2		13	32972322	32972426

3.4 Ανάλυση του μοριακού προφίλ των ασθενών με τις μεθόδους BEAMing Digital PCR και NGS, στο πλάσμα και στον ιστό

3.4.1 Ανίχνευση RAS μεταλλάξεων με BEAMing Digital PCR στο αρχικό δείγμα του πλάσματος των ασθενών

Αρχικά έγινε ανάλυση του δείγματος του πλάσματος πριν την έναρξη θεραπείας σε 33 ασθενείς με τη μέθοδο BEAMing Digital PCR. Στο πρώτο δείγμα της μελέτης, πριν την έναρξη της θεραπείας πρώτης γραμμής, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του RAS στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA σε 24 από τους 33 ασθενείς (72,7%). Συγκεκριμένα σε 20 ασθενείς βρέθηκε η μετάλλαξη *KRAS* 2_12 (εξώνιο 2, κωδικόνιο 12). Σε έναν ασθενή βρέθηκαν ταυτόχρονα η μετάλλαξη *KRAS* 2_12 και η μετάλλαξη *NRAS* 2_12 (εξώνιο 2, κωδικόνιο 12 του γονιδίου *NRAS*). Σε έτερο ασθενή ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα η μετάλλαξη *KRAS* 2_12 και η μετάλλαξη *NRAS* 3_61 (εξώνιο 3, κωδικόνιο 61 του γονιδίου *NRAS*), ενώ σε άλλους δύο ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις *KRAS* 2_12 και *NRAS* 4_117 (εξώνιο 4, κωδικόνιο 117 του γονιδίου *NRAS*). Το σύνολο των ασθενών με μεταλλάξεις *NRAS* υπολογίζεται στο 12%. 9 ασθενείς (27,3%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* και 29 από τους 33 (88%) ήταν αρνητικοί για μεταλλάξεις στο γονίδιο *NRAS*. Η κατανομή των μεταλλάξεων απεικονίζεται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα.

- KRAS WT
- KRAS 2_12
- KRAS 2_12 + NRAS 2_12
- KRAS 2_12 + NRAS 3_61
- KRAS 2_12 + NRAS 4_117

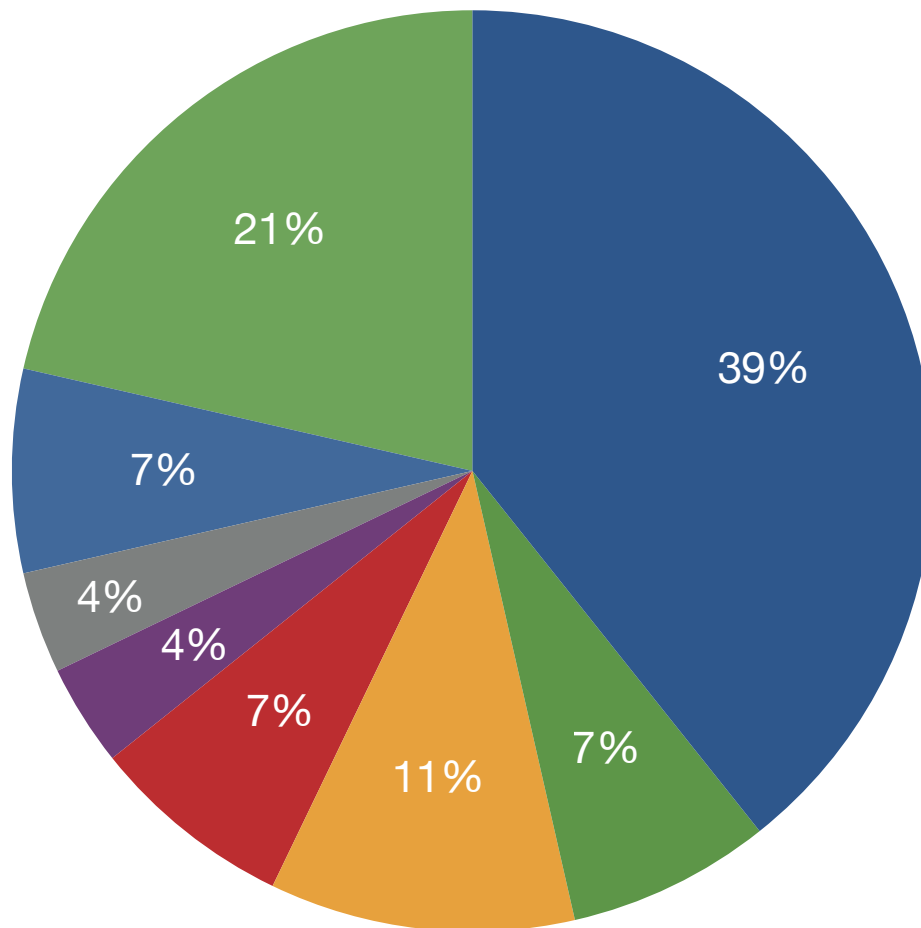


Διάγραμμα 1: Κατανομή των μεταλλάξεων RAS που ανιχνεύθηκαν με BEAMing στο αρχικό δείγμα πλάσματος (N=33).

3.4.2. Ανίχνευση RAS μεταλλάξεων με NGS στο αρχικό δείγμα του πλάσματος.

Από την ανάλυση των δειγμάτων του πλάσματος πριν την έναρξη θεραπείας σε 28 ασθενείς με τη χρήση της τεχνικής Next Generation Sequencing (NGS), βρέθηκαν 14 ασθενείς (50%) με μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS*. Οι συχνότερες ήταν οι μεταλλάξεις *KRAS G12D* και *KRAS G12V*. Άλλες μεταλλάξεις του *KRAS* που βρέθηκαν ήταν οι *KRAS Q61R* και *KRAS G12R*. Παράλληλα ανιχνεύθηκαν και έτερες μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53* και *MAP2K1*. 2 ασθενείς είχαν μόνο μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, και σε 6 ασθενείς βρέθηκε συνύπαρξη μεταλλάξεων *KRAS* και *TP53*. Επίσης σε έναν ασθενή βρέθηκε συγχρόνως μετάλλαξη στο γονίδιο *MAP2K1* και μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53*. Από το σύνολο των 28 ασθενών, οι 11 (39%), δεν έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* (*KRAS* wild type). Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται σχηματικά η κατανομή των μεταλλάξεων μεμονωμένα και σε συνδυασμούς όπως ανιχνεύθηκαν.

● KRAS WT ● KRAS G12D ● KRAS G12V ● KRAS Q61R
 ● KRAS G12R ● MAP2K1 + TP53 ● TP53 ● KRAS + TP53



Διάγραμμα 2: Κατανομή των KRAS και άλλων μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση του αρχικού δείγματος των ασθενών με NGS

3.5 Ανίχνευση RAS μεταλλάξεων στον ιστό και συμφωνία με την υγρή βιοψία

Μελετήθηκαν συνολικά 20 βιοψίες ασθενών, οι οποίες ήταν διαθέσιμες και κατάλληλες προκειμένου να γίνει ανάλυση για την ανίχνευση RAS μεταλλάξεων στον ιστό. Στα 14 από τα 20 συνολικά δείγματα (70%), υπήρχε συμφωνία ύπαρξης μετάλλαξης *KRAS* στον ιστό και στο πλάσμα και σε 3 δείγματα (15%) δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη ούτε στον ιστό ούτε και στο πλάσμα. Αντίθετα, σε 1 δείγμα ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη *KRAS* στο ctDNA και όχι στον ιστό (5%) και σε δύο από τα δείγματα η μετάλλαξη

ανιχνεύθηκε μόνο στον ιστό και όχι στο πλάσμα (10%).

Μετά τον προσδιορισμό των RAS μεταλλάξεων στον ιστό και στο πλάσμα, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του RAS με τις μεθόδους της υγρής βιοψίας με τα αποτελέσματα από την ανάλυση της βιοψίας του ιστού, που αποτελεί ως τώρα την μέθοδο εκλογής για τον μοριακό έλεγχο των μεταλλάξεων στην καθημερινή κλινική πρακτική. Για την σύγκριση αυτή υπολογίστηκε η θετική, η αρνητική και η συνολική ποσοστιαία συμφωνία. [102]

- Η θετική ποσοστιαία συμφωνία (Positive Percent Agreement - PPA), αντιστοιχεί στο ποσοστό των ασθενών με RAS μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA από τα δείγματα πριν την έναρξη θεραπείας, από το σύνολο των ασθενών με RAS μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στην ιστό. Συγκεκριμένα στο δείγμα της παρούσας μελέτης η PPA αφορά 14 από τους 16 ασθενείς, οπότε υπολογίζεται στο 87%
- Η αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (Negative Percent Agreement - NPA) αντιστοιχεί στο ποσοστό των ασθενών στο οποίο δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του RAS στα δείγματα του πλάσματος, από το σύνολο των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις του RAS από την ανάλυση του ιστού. Συγκεκριμένα η NPA στη μελέτη μας αφορά 2 από τους 4 ασθενείς, δηλαδή υπολογίζεται στο 50%.
- Η συνολική ποσοστιαία συμφωνία των δύο μεθόδων ορίζεται ως το ποσοστό των ασθενών των οποίων τα αποτελέσματα του ιστού και του πλάσματος συμφωνούν, είτε ως προς την παρουσία, είτε ως προς την απουσία RAS μεταλλάξεων, από το σύνολο των ασθενών της μελέτης. Εν προκειμένω 17 από τους 20 ασθενείς εμφανίζουν συμφωνία στα αποτελέσματα ιστού και πλάσματος, δηλαδή οι δύο μέθοδοι έχουν OPA 85%. Ο πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ ιστού και πλάσματος.

Πίνακας 9: Ανίχνευση RAS μεταλλάξεων στον ιστό

	Ανίχνευση μετάλλαξης στο ctDNA	Απουσία μετάλλαξης στο ctDNA	Σύνολο
Ανίχνευση μετάλλαξης στον ιστό	14 (70%)	2 (10%)	16 (80%)
Απουσία μετάλλαξης στον ιστό	1 (5%)	3 (15%)	4 (20%)
Σύνολο	16 (75%)	4 (25%)	20 (100%)

Το ποσοστό ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων από τη βιοψία του ιστού και της υγρής βιοψίας ελέγχεται με διάφορες παραμέτρους προκειμένου να τυποποιηθεί και να χρησιμοποιηθεί ευρύτερα στην καθημερινή κλινική πρακτική. Καθώς για την ανάλυση του ctDNA στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές με πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η ασυμφωνία σε μερικούς ασθενείς θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα μικρότερα ποσοστά ευαισθησίας που έχουν οι μέθοδοι ανίχνευσης ctDNA στον ιστό. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν και περιορίζουν την ανίχνευση μεταλλάξεων στο πλάσμα σε σχέση με τον ιστό είναι η ετερογένεια του όγκου, η πιθανότητα τα επίπεδα του DNA στο πλάσμα να είναι χαμηλά, το μικρότερο μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου ή ακόμη και η προηγηθείσα χειρουργική εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας, πριν τη διάγνωση της μεταστατικής νόσου. Γενικά το φορτίο της νόσου φαίνεται στις περισσότερες μελέτες να συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ctDNA. Επίσης το γεγονός ότι κάποιοι όγκοι έχουν μικρότερη μεταβολική δραστηριότητα μπορεί να οδηγεί σε μικρότερα ποσοστά ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο πλάσμα. Τέλος σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και ο τρόπος συλλογής των δειγμάτων. Η διαδικασία συλλογής και απομόνωσης DNA προκειμένου να γίνει έλεγχος με υγρή βιοψία, διέπεται από συγκεκριμένους κανόνες που εάν δεν τηρηθούν επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα του δείγματος και κατ' επέκταση την ανίχνευση μεταλλάξεων στο πλάσμα.

Συμπερασματικά, η χρήση της υγρής βιοψίας ως εργαλείο ανίχνευσης μεταλλάξεων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης για την σταθεροποίηση όλων αυτών των παραγόντων που μπορεί να οδηγήσουν σε απόκλιση των αποτελεσμάτων.

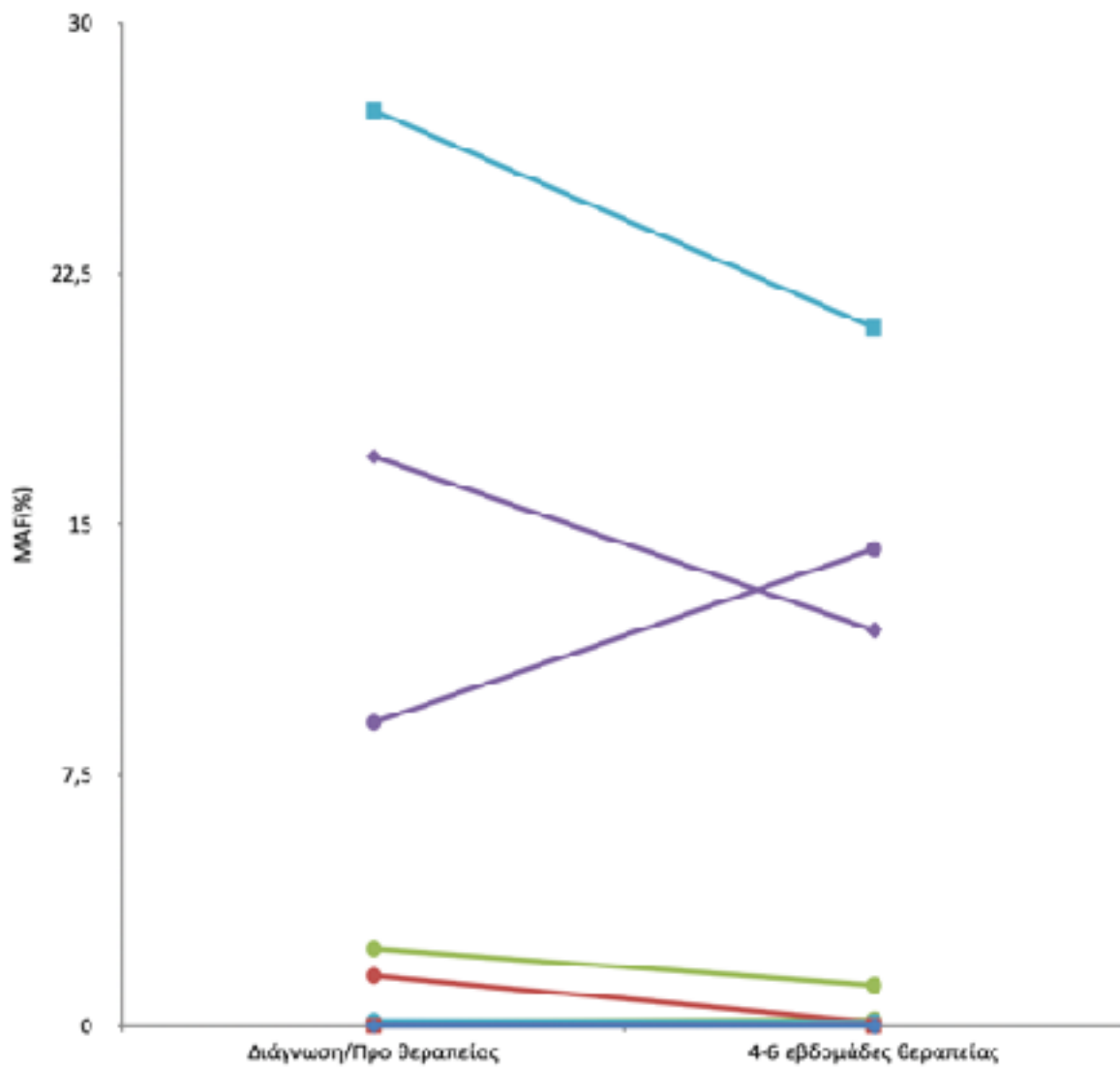
3.6 Μεταβολή του ποσοστού των RAS μεταλλάξεων 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας με BEAMing Digital PCR και NGS

Αναφορικά με τους ασθενείς που αναλύθηκαν με BEAMing Digital PCR, παρατηρήθηκε μεταβολή του κλάσματος μεταλλαγμένων αλληλομόρφων (Mutant Allele Fraction - MAF) στο σύνολο του πληθυσμού, καταγράφοντας ένα σημαντικά μεγάλο εύρος στο MAF, στο σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν (min: 0,035%, max: 27,392%). Αντίστοιχα, μεγάλο εύρος καταγράφηκε και στις μεταβολές του MAF (min: 0,002%, max: 16,2%). Λόγω της εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου στην ανίχνευση μεταλλάξεων του RAS, μεταβολές του φορτίου σε απόλυτο αριθμό, μπορεί να μην είναι σημαντικές ποσοστιαία (λαμβάνοντας υπόψη τον απόλυτο αριθμό των μεταλλαγμένων σφαιριδίων, που μπορεί να μεταβάλλεται ελάχιστα).

Σε 10 από τους συνολικά 33 ασθενείς, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του MAF, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30%. Παρατηρήθηκε επίσης μια μικρή ομάδα 6 συνολικά ασθενών, με σημαντική αύξηση του MAF, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30%. Ακόμη, παρατηρήθηκαν 9 ασθενείς με σχετικά σταθερό φορτίο μεταλλάξεων, στους οποίους το ποσοστό μεταβολής του MAF ήταν μικρότερο από 30%. Συγκεκριμένα 6 από τους 33 ασθενείς εμφάνισαν τάση μείωσης του MAF (με μείωση μικρότερη του 30%), ενώ 3 ασθενείς εμφάνισαν τάση αύξησης (με σχετική αύξηση του MAF μικρότερη από 30%).

Η μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων δεν συσχετίστηκε με το είδος της θεραπείας που έλαβαν οι ασθενείς.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η μεταβολή του κλάσματος των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων μεταξύ του αρχικού δείγματος και του δείγματος 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη θεραπείας.



Διάγραμμα 3:Μεταβολή του κλάσματος μεταλλαγμένων αλληλομόρφων KR2_12 πριν την έναρξη θεραπείας και 4-6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία.

Από την ανάλυση των δειγμάτων των ασθενών 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη θεραπείας, βρέθηκε ότι η πλειοψηφία τους (82%), παρουσίασε μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων.

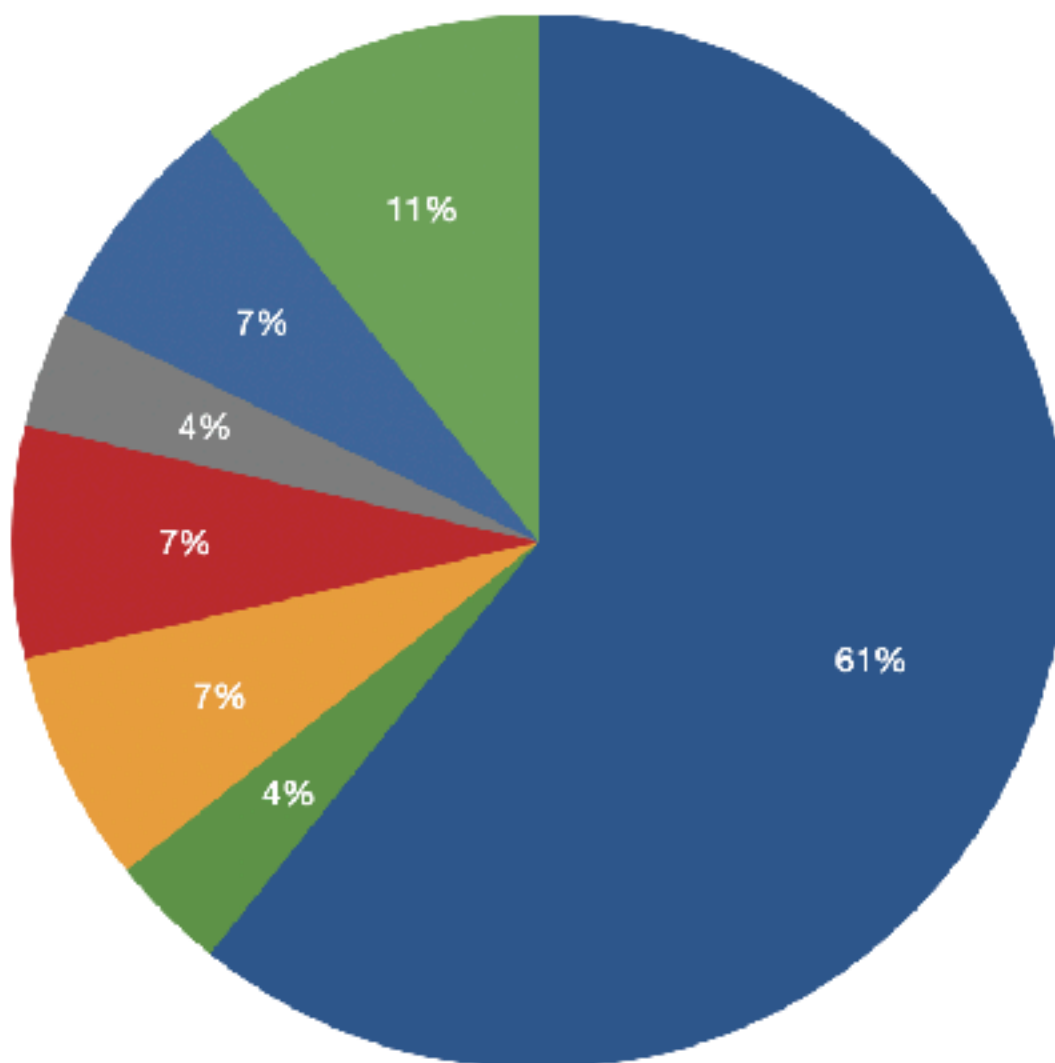
Συγκεκριμένα από τους ασθενείς που αναλύθηκαν με NGS, οι 11 ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις του *KRAS* στο αρχικό δείγμα παρέμειναν χωρίς μεταλλάξεις στο *KRAS* στο δείγμα 4-6 εβδομάδες μετά την λήψη θεραπείας. Συνολικά περισσότεροι ασθενείς στην ανάλυση του δεύτερου δείγματος βρέθηκαν αρνητικοί για *KRAS* και άλλες μεταλλάξεις (17), καθώς βρέθηκε ότι παρουσίασαν μείωση του φορτίου μεταλλάξεων κατά 100%, εξαλείφθηκαν δηλαδή οι μεταλλάξεις του αρχικού δείγματος.

Μελετώντας τον κάθε ασθενή ξεχωριστά, βρέθηκε εξάλειψη των μεταλλάξεων σε ασθενή με *KRAS G12D*, σε τρεις ασθενείς με συνδυασμό *KRAS G12D* και *TP53*, σε ασθενή με μετάλλαξη *KRAS G12V*, σε ασθενή με μετάλλαξη *KRAS G12R*, σε ασθενή με μετάλλαξη *TP53*, και σε έναν ασθενή με αρχικό συνδυασμό μεταλλάξεων *KRAS G12V* και *TP53*, βρέθηκε εξάλειψη του *KRAS* και σημαντική μείωση της μετάλλαξης *TP53* κατά 87%.

Από τους ασθενείς που διατήρησαν φορτίο μεταλλάξεων και στην ανάλυση του δεύτερου δείγματος, οι περισσότεροι (9 ασθενείς) παρουσίασαν μείωση του φορτίου των αρχικών μεταλλάξεων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60%. Βρέθηκε όμως και ένας ασθενής με αρχική μετάλλαξη *KRAS G12D* που παρουσίασε αύξηση του φορτίου μεταλλάξεων κατά 520%.

Παρακάτω ακολουθεί σχηματικά η κατανομή της μεταβολής των μεταλλάξεων για την ομάδα των ασθενών που αναλύθηκαν με NGS.

KRAS WT KRAS G12D KRAS G12V KRAS Q61R KRAS G12R MAP2K1 + TP53
 TP53 KRAS + TP53



Διάγραμμα 4: Κατανομή των KRAS και άλλων μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση δείγματος των ασθενών με NGS, 4- 6 εβδομάδες από την έναρξη θεραπείας.

3.7 Δεδομένα επιβίωσης

Μία από τις βασικές ιδιότητες του ctDNA είναι η παροχή πληροφοριών σε σχέση με τον πρωτοπαθή όγκο και τις μεταστατικές εστίες σε πραγματικό χρόνο, αποτυπώνοντας το εύρος της ετερογένειας του όγκου και τον τρόπο με τον οποίο ανταποκρίνεται στους θεραπευτικούς χειρισμούς σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις πληροφορίες για να λάβουμε πιο στοχευμένες και εξατομικευμένες θεραπευτικές αποφάσεις σε πρωιμότερο χρόνο σε σχέση με τις αποφάσεις που λαμβάνονται βάσει του συμβατικού μοριακού ελέγχου στον ιστό του ασθενή.

Ένας από τους βασικούς στόχους της συγκεκριμένης μελέτης είναι η συσχέτιση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων όπως αυτό προκύπτει από τις αναλύσεις των δειγμάτων του πλάσματος των ασθενών με NGS και Digital BEAMing PCR, με τα δεδομένα επιβίωσης, και την ανταπόκριση στη θεραπεία σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους απεικόνισης και με την παρακολούθηση των καρκινικών δεικτών στο ορό. Στην περίπτωση που προκύψουν θετικές συσχετίσεις, το ctDNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί πιθανά ως πρώιμος προβλεπτικός και προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία, είτε αντίστοιχα επιδείνωσης της νόσου και αντίστασης στη θεραπεία.

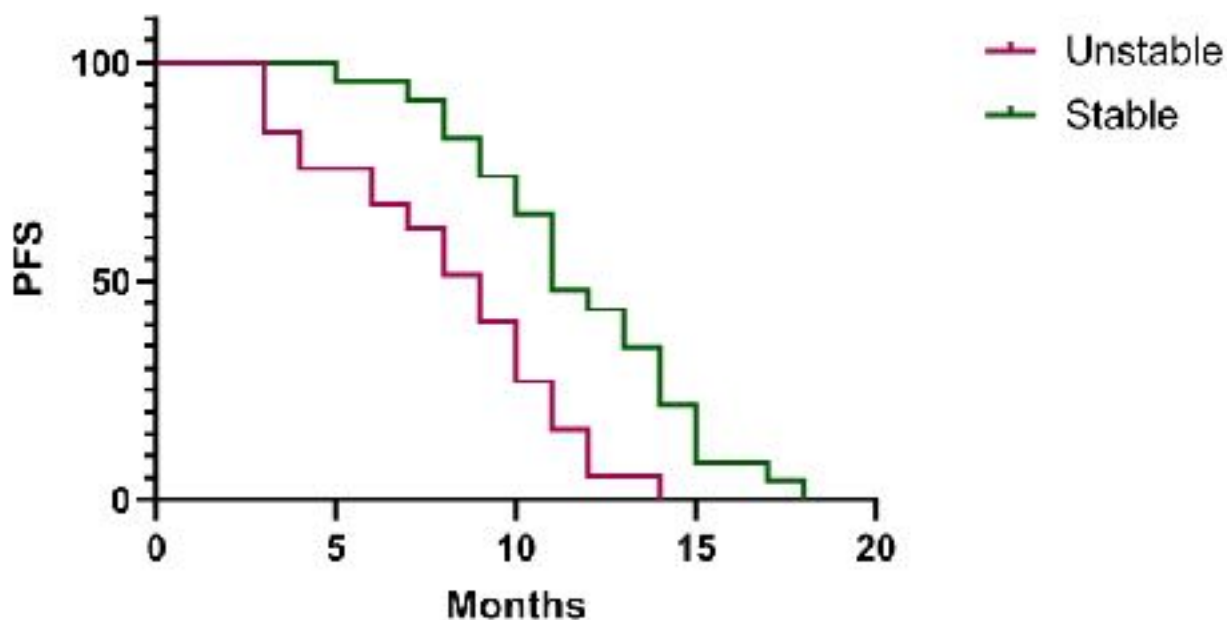
3.7.1 Διάστημα Ελεύθερο Προόδου Νόσου - PFS (Progression Free Survival)

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων σε σχέση με το διάστημα ελεύθερο επιδείνωσης της νόσου (progression-free survival - PFS). Το μέσο διάστημα ελεύθερο επιδείνωσης της νόσου (median PFS - mPFS) υπολογίστηκε χωρίζοντας τους ασθενείς σε 3 κατηγορίες ανάλογα με το είδος της μεταβολής στο φορτίο μεταλλάξεων. Οι κατηγορίες των ασθενών είναι α) ασθενείς που παρουσιάζουν σταθερότητα του φορτίου μεταλλάξεων, β) ασθενείς που παρουσιάζουν αύξηση του φορτίου μεταλλάξεων και γ) ασθενείς που παρουσιάζουν μείωση του φορτίου μεταλλάξεων.

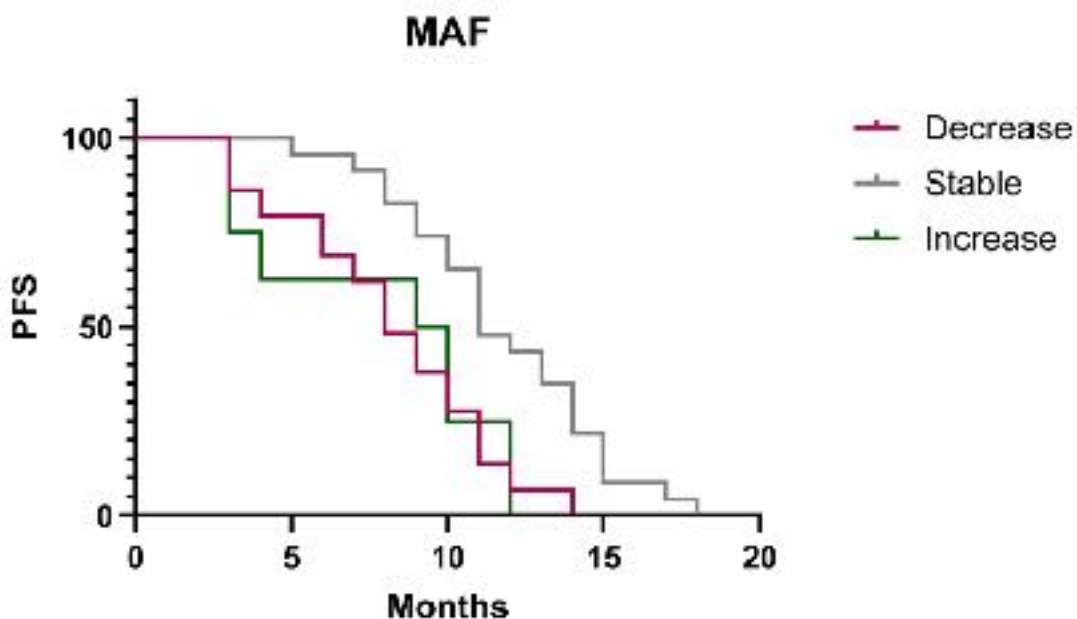
Υπολογίστηκε ότι οι ασθενείς με σταθερότητα στο φορτίο μεταλλάξεων έχουν μεγαλύτερο mPFS σε σχέση με τους ασθενείς με αύξηση του φορτίου μεταλλάξεων αλλά και με τους ασθενείς με μείωση φορτίου μεταλλάξεων. Το mPFS για τους ασθενείς με σταθερό MAF υπολογίστηκε περίπου στους 11 μήνες,

ενώ για τους ασθενείς με αύξηση του MAF, το mPFS υπολογίστηκε στους 9 μήνες. Οι ασθενείς με μείωση του MAF έχουν mPFS που ανέρχεται στους 10 μήνες. Στο συγκεκριμένο πληθυσμό ασθενών, με βάσει όσα έχουμε ήδη περιγράψει αναλυτικά, όσοι έχουν σταθερότητα φορτίου μεταλλάξεων είναι οι ασθενείς που ήταν αρνητικοί για μεταλλάξεις στο αρχικό δείγμα και που στο σύνολο τους διατήρησαν το αρχικό μοριακό προφίλ μεταλλάξεων.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι οι ασθενείς με αρνητικό ctDNA στο πλάσμα πριν και μετά τη θεραπεία πρώτης γραμμής έχουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου, σε σχέση με τους ασθενείς με θετικό ctDNA στο αρχικό δείγμα που αυξάνουν το φορτίο των μεταλλάξεων μετά τη θεραπεία, αλλά και σε σχέση με τους ασθενείς με θετικό ctDNA στη διάγνωση που μειώνουν το φορτίο των μεταλλάξεων μετά την χορήγηση θεραπείας. Επομένως προκύπτει ότι η ύπαρξη μεταλλάξεων είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για τους ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τις σχετικές καμπύλες για το PFS.



Διάγραμμα 5: mPFS 9 Vs. 11months, p value 0,0002, HR:0.44 95%CI 0.26 to 0.74



Διάγραμμα 6: mPFS σε συσχέτιση με την μεταβολή του MAF (9 μήνες vs 9,8 μήνες vs 11 μήνες)

3.7.2 Ολική Επιβίωση - OS (Overall Survival)

Η ανάλυση των δεδομένων σχετικά με την ολική επιβίωση των ασθενών της μελέτης, έδειξε ότι η συνολική επιβίωση στην ομάδα των ασθενών με μεταβολές του φορτίου μεταλλάξεων διέφερε σημαντικά από την ομάδα των ασθενών χωρίς μεταβολή στο μοριακό προφίλ.

Συγκεκριμένα η ομάδα των ασθενών με μείωση του φορτίου μεταλλάξεων είχε μέση ολική επιβίωση 16,5 μήνες, η ομάδα με αύξηση του φορτίου των μεταλλάξεων είχε μικρότερη μέση ολική επιβίωση που έφτανε τους 9 μήνες, ενώ σημαντικά μεγαλύτερη μέση ολική επιβίωση υπολογίστηκε για την ομάδα των ασθενών χωρίς μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων μεταξύ των δύο δειγμάτων (αρχικό και μετά από 4-6 εβδομάδες από την έναρξη της θεραπείας), που έφτανε τους 30,5 μήνες.

Μεταξύ των ομάδων των ασθενών με μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων, δηλαδή όσων αύξησαν ή μείωσαν το φορτίο των μεταλλάξεων, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μέση επιβίωση. Αντιθέτως μεταξύ του πληθυσμού των ασθενών με μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων και του πληθυσμού με σταθερό μοριακό προφίλ υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά

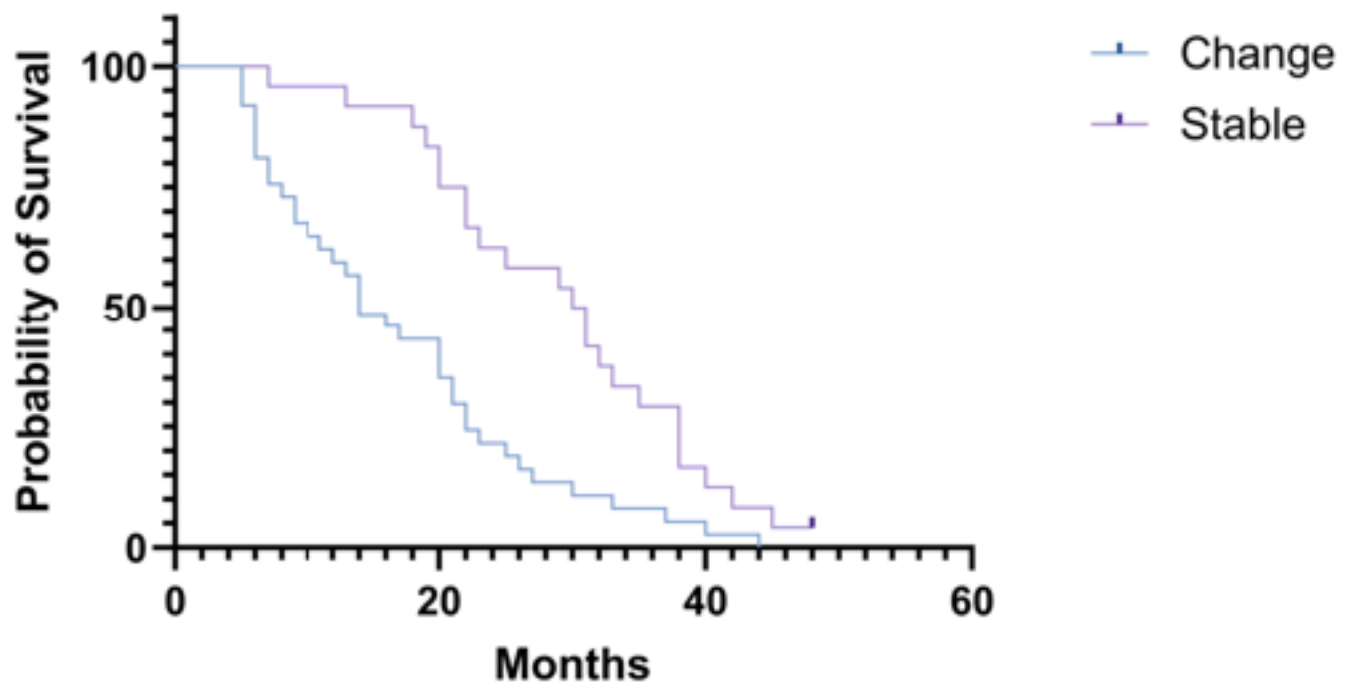
στην επιβίωση ($p=0,0005$ HR:0,43 και CI 95% 0.2566 to 0.7183.). Η πρώτη ομάδα είχε διάμεση επιβίωση 14 μήνες, ενώ η δεύτερη ομάδα ασθενών είχε σχεδόν διπλάσια διάμεση επιβίωση, που έφτανε τους 30,5 μήνες.

Αντίστοιχα με τα δεδομένα για το PFS, που αναλύθηκαν παραπάνω και σε όρους ολικής επιβίωσης φαίνεται ότι η απουσία μεταλλάξεων στο ctDNA, η οποία διατηρείται και μετά τη χορήγηση θεραπείας, είναι θετικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση των ασθενών με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος, ανεξάρτητα από το είδος της θεραπείας που λαμβάνει ο ασθενής.

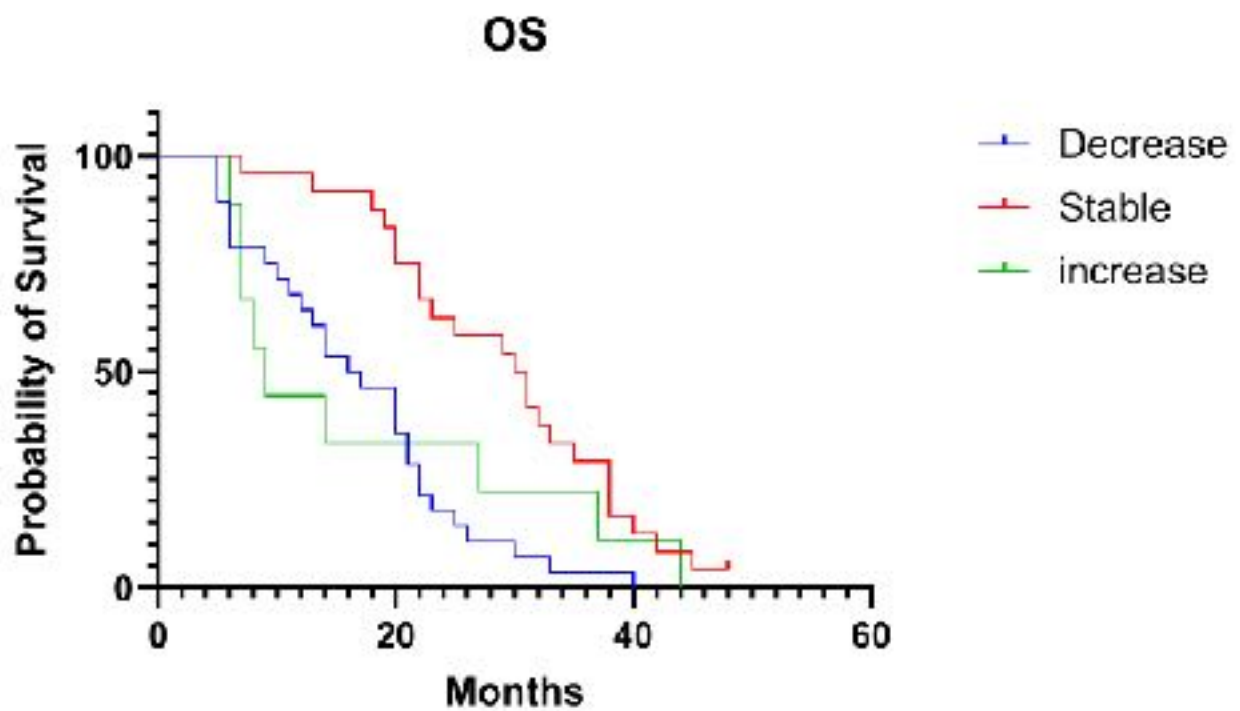
Αντίθετα η παρουσία μεταλλάξεων στο ctDNA του πλάσματος στο αρχικό δείγμα των ασθενών φαίνεται ότι αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών, η οποία όπως υπολογίστηκε μειώνεται περίπου στο μισό στην ομάδα των ασθενών με θετικό ctDNA στο αρχικό δείγμα που ανταποκρίνονται στη θεραπεία και μειώνουν το φορτίο των μεταλλάξεων στο δείγμα που ακολουθεί 4 - 6 εβδομάδες από την έναρξη της θεραπείας.

Σημαντικά δυσμενέστερη πρόγνωση φαίνεται να έχει η ομάδα των ασθενών με θετικό ctDNA στο αρχικό δείγμα που εμφανίζουν αύξησης του φορτίου μεταλλάξεων στην πορεία της νόσου, πιθανά λόγω αντίστασης στη θεραπεία. Στην τελευταία ομάδα η διάμεση επιβίωση φτάνει μόλις τους 9 μήνες.

Τα διαγράμματα που ακολουθούν απεικονίζουν τις καμπύλες επιβίωσης για τις ομάδες των ασθενών όπως αυτές περιγράφηκαν παραπάνω.



Διάγραμμα 7: Probability of survival, $p=0,0005$ HR:0,43 και CI 95% 0.2566 to 0.7183.



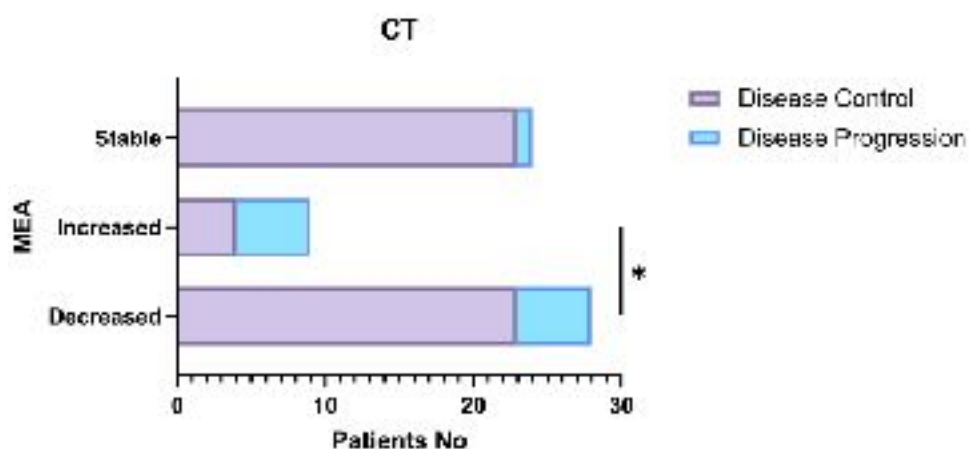
Διάγραμμα 8: Ολική επιβίωση των ασθενών σε σχέση με τον τρόπο μεταβολής του MAF

3.7.3 Συσχέτιση μεταβολής φορτίου μεταλλάξεων με τα απεικονιστικά ευρήματα

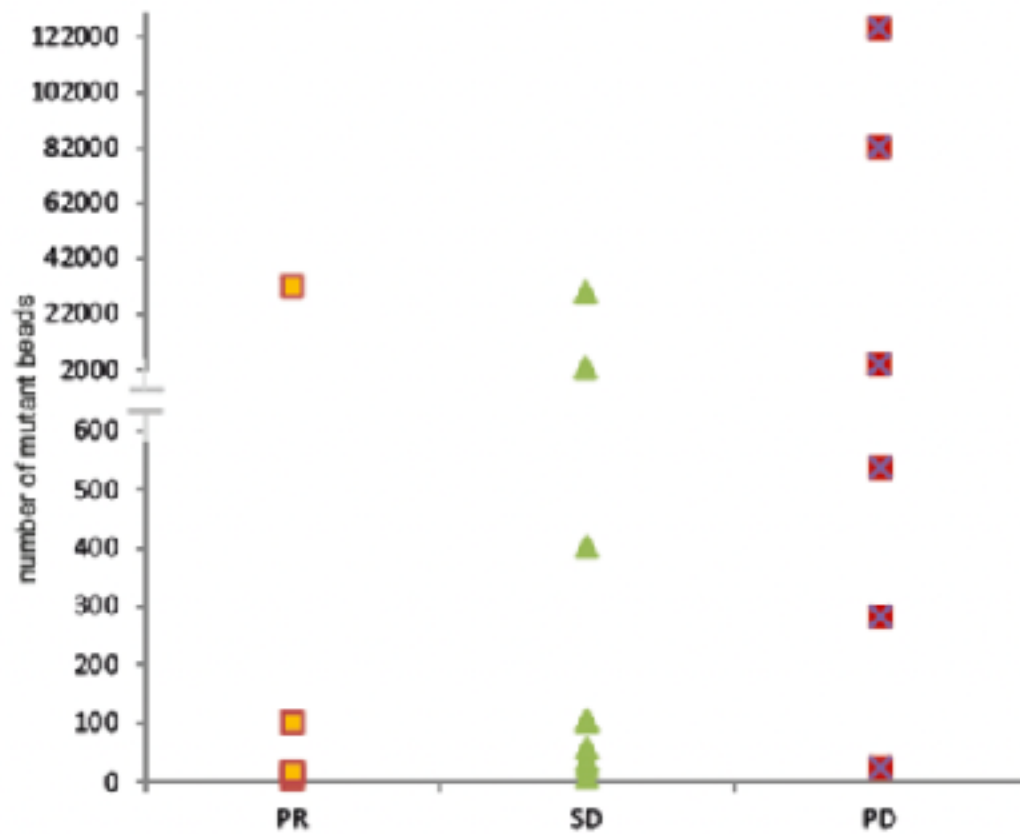
Επίσης, τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων του πλάσματος των ασθενών συσχετίστηκαν αναδρομικά με τα αποτελέσματα της συμβατικής απεικόνισης (αξονική ή μαγνητική τομογραφία), στις οποίες υποβάλλονται οι ασθενείς σε διάστημα τριμήνου από την έναρξη της χημειοθεραπείας, με σκοπό να καταδειχθεί εάν η σύγκριση με τα αποτελέσματα της μεταβολής του ctDNA βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των απεικονιστικών εξετάσεων.

Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση μεταξύ όσων είχαν έλεγχο της νόσου απεικονιστικά (σταθερή νόσος, μερική ανταπόκριση, πλήρης ανταπόκριση - stable disease, partial response, complete response - SD, PR, CR) και όσων είχαν απεικονιστική επιδείνωση (πρόοδος νόσου - progressive disease - PD). Φάνηκε ότι οι ασθενείς που είχαν είτε σταθερό φορτίο μεταλλάξεων είτε μείωση αυτού, παρουσίασαν σε μεγαλύτερο ποσοστό απεικονιστική σταθεροποίηση έναντι όσων είχαν αύξηση του φορτίου μεταλλάξεων. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) υπήρχε ωστόσο μόνο για τους ασθενείς που αύξησαν ή μείωσαν το φορτίο μεταλλάξεων και όχι για τους ασθενείς με σταθερό φορτίο νόσου.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων εμφανίζει τάση συμφωνίας με την έκβαση των απεικονιστικών εξετάσεων των ασθενών. Τα παρακάτω διαγράμματα αποτυπώνουν τη συσχέτιση του φορτίου μεταλλάξεων με τα απεικονιστικά αποτελέσματα.



Διάγραμμα 9: Συσχέτιση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων με τα απεικονιστικά ευρήματα



Διάγραμμα 10: Συσχέτιση του απόλυτου αριθμού των μεταλλαγμένων σφαιριδίων με τα απεικονιστικά αποτελέσματα

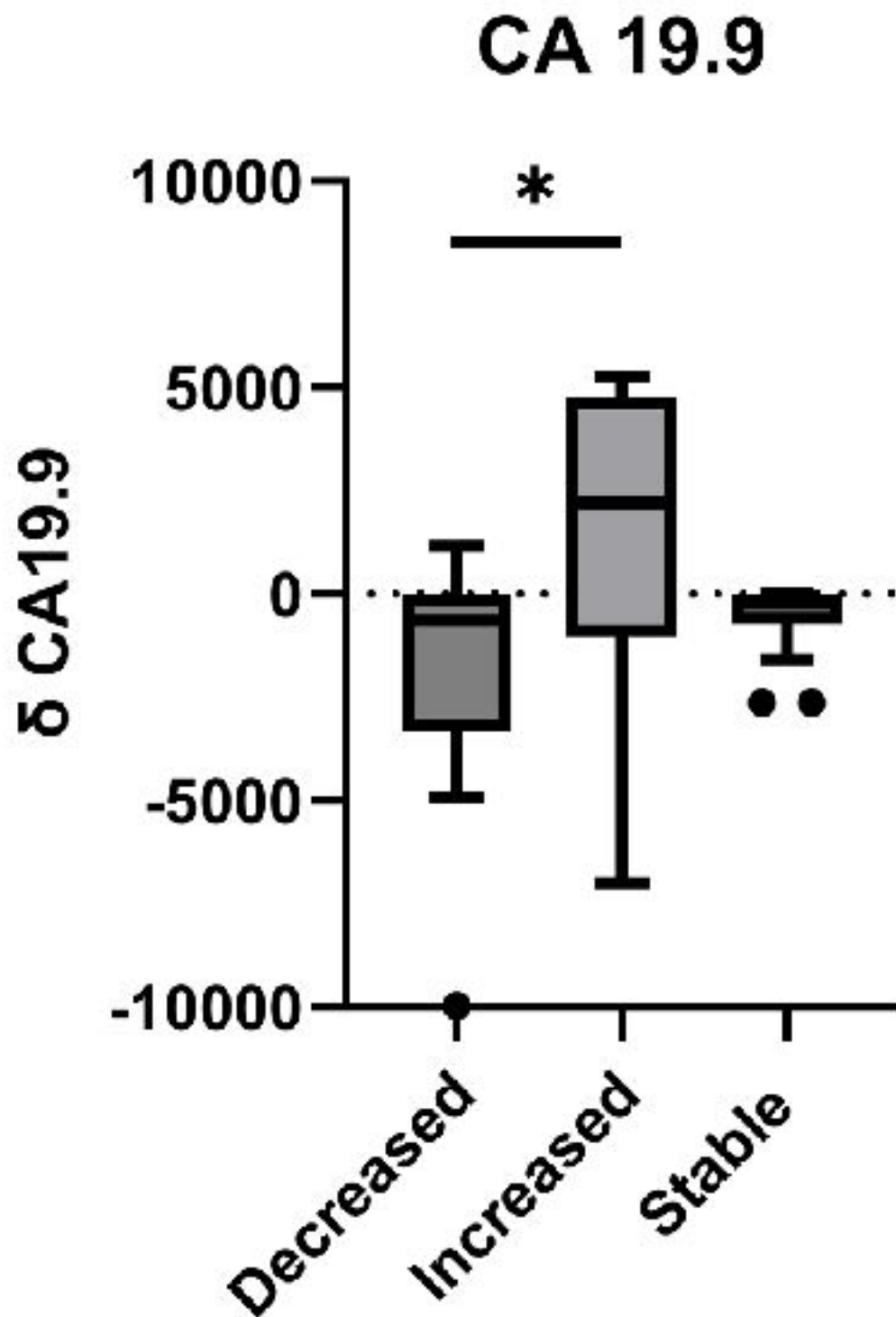
3.7.4 Συσχέτιση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων με τους καρκινικούς δείκτες CA 19-9 και CEA

Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής το φορτίου μεταλλάξεων από το δείγμα πλάσματος των ασθενών σε σχέση με την μεταβολή του τιμής των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9 στον ορό όπως αυτή εξετάζεται και αξιολογείται σύμφωνα με τη συνήθη κλινική πρακτική σε διάστημα τριμήνου, παράλληλα με την απεικονιστική επανεκτίμηση των ασθενών.

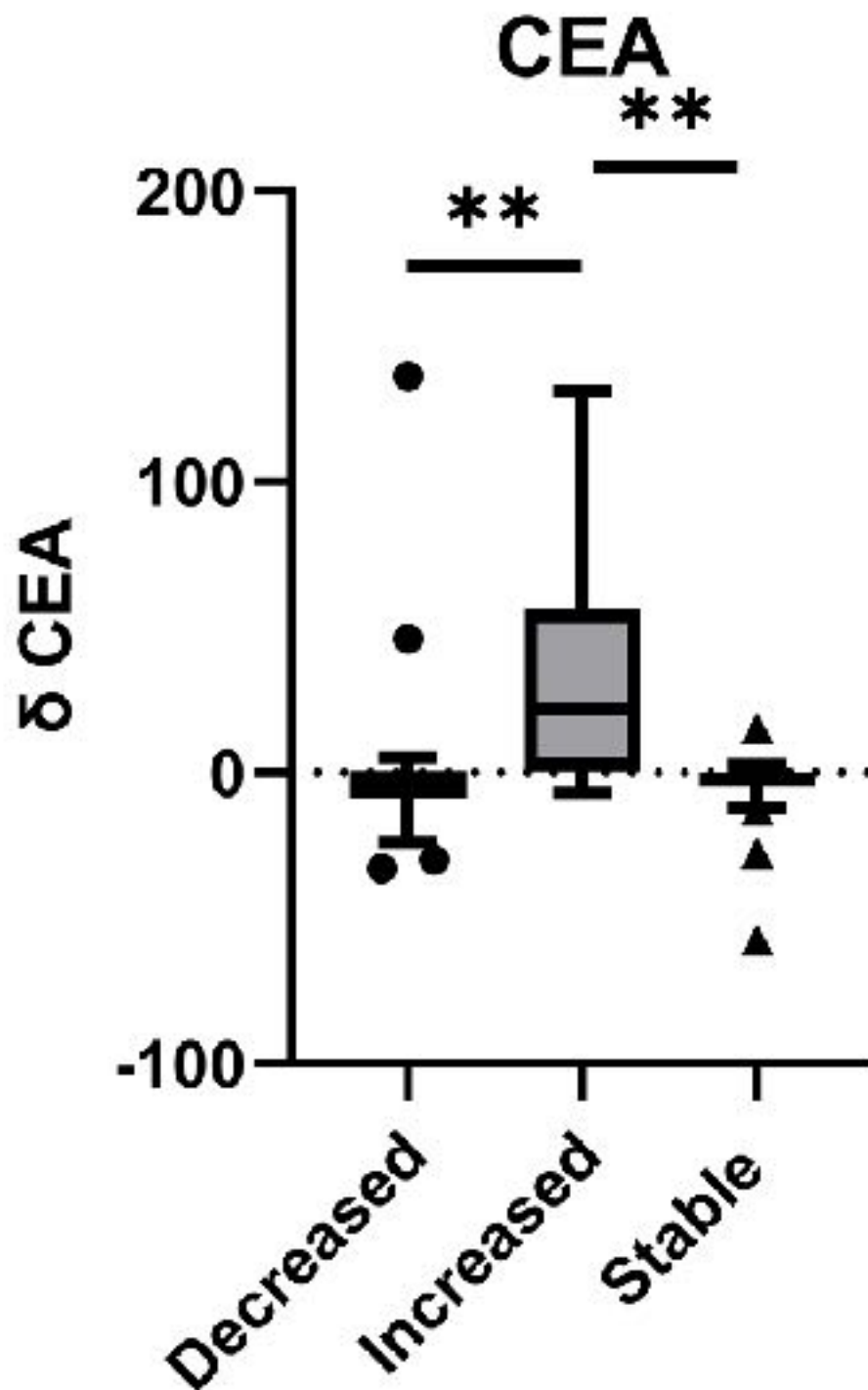
Αναφορικά με τον δείκτη CA 19-9, φάνηκε πως υπήρχε τάση αύξησης στην ομάδα των ασθενών με αύξηση στο φορτίο μεταλλάξεων, αλλά η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την ομάδα των ασθενών με μείωση του φορτίου μεταλλάξεων ($p < 0.05$).

Αντίστοιχα, σχετικά με το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), φάνηκε να υπάρχει αύξηση στην ομάδα των ασθενών με αύξηση του φορτίου μεταλλάξεων η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Αντίθετα, η μεταβολή του CEA στις ομάδες των ασθενών είτε με σταθερότητα του φορτίου μεταλλάξεων είτε με μείωση, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Συνολικά, η κινητική της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων φαίνεται να βρίσκεται σε συμφωνία με την τάση αύξησης ή μείωσης των καρκινικών δεικτών όπως αυτή καταγράφεται στο πρώτο τρίμηνο από την έναρξη της χημειοθεραπείας. Τα διαγράμματα που ακολουθούν αποτυπώνουν το πρότυπο της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων σε σχέση με την μεταβολή του τίτλου των καρκινικών δεικτών.



Διάγραμμα 11: Συσχέτιση της μεταβολής του καρκινικού δείκτη CA 19-9 με την μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων



Διάγραμμα 12: Συσχέτιση της μεταβολής του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου με την μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο παγκρεατικός καρκίνος παραμένει μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην σύγχρονη ογκολογία. Υπάρχουν πλέον πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία που υποδεικνύουν ότι αυτός ο θανατηφόρος καρκίνος εμφανίζει σταθερά αυξητική τάση, ειδικά σε νεαρότερους ενήλικες. Οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές, που αφορούν κυρίως χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς, έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα και ταυτόχρονα μπορεί να προκαλέσουν σημαντική τοξικότητα. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να ανιχνεύουμε έγκαιρα τους ασθενείς που δεν οφελούνται από έναν συνδυασμό θεραπείας, με σκοπό να τον αναστείλουμε ή να τον τροποποιήσουμε.

Η παρούσα μελέτη, εξ' όσων είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αποτελεί την πρώτη προσπάθεια χρήσης υγρής βιοψίας και ανάλυσης δεδομένων που προκύπτουν από αυτή, για ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο στην Ελλάδα. Συγκεντρώθηκε ένα ικανό δείγμα 61 ασθενών με μέση ηλικία διάγνωσης τα 67 έτη. Έγινε ανάλυση με τεχνικές υγρής βιοψίας σε δύο δειγμάτα για κάθε ασθενή, το πρώτο πριν από την έναρξη της θεραπείας και το δεύτερο 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη θεραπείας.

Από την ανάλυση του συνόλου των δειγμάτων των ασθενών, στο δείγμα πριν την έναρξη θεραπείας, προέκυψε ότι η ύπαρξη *KRAS* μεταλλάξεων στο πλάσμα, ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 77%. Το ποσοστό αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα που περιγράφονται για αντίστοιχες ομάδες ασθενών που συμμετείχαν σε παρόμοιες μελέτες. Αναφορικά με την μεταστατική νόσο, έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες ότι σε ποσοστό περίπου 70% των ασθενών με μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, ανιχνεύεται ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA στο πλάσμα και η παρουσία του σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Οι πρώτοι που περιέγραψαν την παρουσία ελεύθερου καρκινικού DNA σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο, ήταν ο Shapiro και η ομάδα του, και συμπέραναν ότι το ctDNA, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός και προγνωστικός βιοδείκτης για αυτή την ομάδα των ασθενών [211].

Αναλυτικά, οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *KRAS*, είναι μεταλλάξεις στο εξώνιο 2 - κωδικόνιο 12 του γονιδίου και συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις *KRAS G12V* και *G12D*. Εκτός από τις μεταλλάξεις στο *KRAS*, άλλες

μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων πριν τη θεραπεία είναι μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *MAP2K1*, *NRAS*. Συχνότερη ήταν η μετάλλαξη *KRAS G12D*, και ακολούθως η μετάλλαξη *KRAS G12V*. Όπως επιβεβαιώνεται και από δεδομένα της βιβλιογραφίας, οι μεταλλάξεις *KRAS* και *TP53*, είναι οι πιο συχνά ανιχνεύσιμες στο ctDNA του πλάσματος, γεγονός που βρίσκεται σε απόλυτη συνέπεια με τον ρόλο τους στην καρκινογένεση του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος [181]. Παρόλα αυτά, οι ευαισθησίες που καταγράφηκαν ήταν χαμηλές, με συνέπεια να επηρεάζουν αρνητικά τον διαγνωστικό ρόλο του ctDNA. Σχετικά με την μετάλλαξη *KRAS G12D*, αναφέρεται ότι αποτελεί μία από τις συχνότερες μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στον παγκρεατικό καρκίνο, και σχετίζεται περισσότερο από άλλες, με την ύπαρξη μικρομεταστάσεων και κατά συνέπεια με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μεταστατικών εστιών [212, 213, 214].

Από τα δεδομένα που προέκυψαν για τους δείκτες επιβίωσης των ασθενών και συγκεκριμένα για το διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου (PFS), βρέθηκε ότι η ύπαρξη ctDNA στο πλάσμα ήταν αρνητικός προγνωστικός παράγοντας, καθώς οι ασθενείς με αρνητικό ctDNA στο πλάσμα πριν και μετά τη θεραπεία πρώτης γραμμής έχουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου, τόσο από τους ασθενείς με θετικό ctDNA στο δείγμα πριν την θεραπεία, που αυξάνουν το φορτίο των μεταλλάξεων μετά τη θεραπεία, όσο και από τους ασθενείς με θετικό ctDNA που μειώνουν το φορτίο μεταλλάξεων. Επισημάνθηκε επίσης ότι οι ασθενείς με αρνητικό ctDNA είχαν μεγαλύτερο ελεύθερο διάστημα μέχρι την υποτροπή της νόσου, ακόμη και σε σχέση με τους ασθενείς με θετικό ctDNA στη διάγνωση που μειώνουν το φορτίο των μεταλλάξεων μετά την χορήγηση θεραπείας.

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για την διάμεση επιβίωση. Συγκεκριμένα η ομάδα των ασθενών με μείωση του φορτίου μεταλλάξεων είχε μέση ολική επιβίωση 16,5 μήνες, ενώ η ομάδα με αύξηση του φορτίου των μεταλλάξεων είχε μικρότερη μέση ολική επιβίωση που έφτανε μόλις τους 9 μήνες. Σημαντική διαφορά στην μέση ολική επιβίωση είχαν οι ασθενείς με σταθερό φορτίο μεταλλάξεων, που αντιπροσωπεύουν ουσιαστικά, κυρίως τους ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις στο πλάσμα.

Μεταξύ των ομάδων των ασθενών με μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μέση επιβίωση. Αντιθέτως μεταξύ του πληθυσμού των ασθενών με μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων και του πληθυσμού με σταθερό μοριακό προφίλ, υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση ($p=0,0005$ HR:0,43 και CI 95% 0.2566 to 0.7183.). Η πρώτη ομάδα είχε

διάμεση επιβίωση 14 μήνες, ενώ η δεύτερη ομάδα ασθενών είχε σχεδόν διπλάσια διάμεση επιβίωση, που έφτανε τους 30,5 μήνες.

Συμπερασματικά η ύπαρξη φορτίου μεταλλάξεων στο ctDNA, αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση. Βρέθηκε επίσης ότι η μείωση του φορτίου μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της θεραπείας, έχει θετική προγνωστική αξία για την ολική επιβίωση.

Τα αποτελέσματα μιας σειράς μελετών έχουν επιβεβαιώσει την αρνητική προγνωστική αξία της ανίχνευσης του ctDNA στο πλάσμα ασθενών με τοπικά προχωρημένο και μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος [162, 163, 164, 165]. Συγκεκριμένα σε μία μελέτη με 104 ασθενείς, η διάμεση επιβίωση στην ομάδα με ανιχνεύσιμο τίτλο ctDNA, η διάμεση επιβίωση ήταν 6,5 μήνες, ενώ αντίθετα στην ομάδα των ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ctDNA, η διάμεση επιβίωση έφτανε τους 19 μήνες [161].

Η απουσία ctDNA στο πλάσμα, εκτός από την εκτίμηση της πρόγνωσης, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι πιθανά έχει προβλεπτικό χαρακτήρα και μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τον έλεγχο της ανταπόκρισης στη θεραπεία, ανιχνεύοντας πρώιμα πιθανή αντίσταση σε αυτή. Ως αποτέλεσμα, ο θεράπων ιατρός, μπορεί να χρησιμοποιήσει την πληροφορία, προκειμένου να τροποποιήσει εγκαίρως τον θεραπευτικό χειρισμό, προς την κατεύθυνση που υποδεικνύει ο μηχανισμός αντίστασης.

Πολλά υποσχόμενες είναι οι μελέτες που διερευνούν τον προγνωστικό χαρακτήρα της μεθόδου. Αρκετές από τις μελέτες αυτές έχουν αναδείξει σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ύπαρξης μεταλλάξεων στο ctDNA του πλάσματος και πτωχότερης πρόγνωσης της νόσου, ανεξαρτήτως σταδίου, συμπεριλαμβανομένων ασθενών σε προεγχειρητική θεραπεία, με υπολειπόμενη νόσο μετά από χειρουργική εξαίρεση και ασθενών με μεταστατική νόσο.

Συγκεκριμένα, η ύπαρξη KRAS μεταλλάξεων στο πλάσμα έχει συσχετιστεί με πρώιμη υποτροπή νόσου, μεγαλύτερο φορτίο μεταστατικής νόσου, μικρότερο διάστημα ελεύθερου υποτροπή της νόσου (mPFS), καθώς και μικρότερη διάμεση ολική επιβίωση (mOS) [89,166, 167, 168, 169, 170, 171].

Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μελέτες βασισμένες σε γονιδιακά πάνελ [111, 121, 172, 173, 174].

Άλλα χαρακτηριστικά του ctDNA είναι ότι παρέχει κλινικές πληροφορίες για ένα ευρύτερο πάνελ μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον παγκρεατικό καρκίνο [175, 176].

Από την μελέτη συσχέτισης ανίχνευσης KRAS μεταλλάξεων στον ιστό και στο πλάσμα, η θετική ποσοστιαία συμφωνία (PPA) υπολογίστηκε στο 87%, η αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (NPA) στο 50%, ενώ βρέθηκε ότι η συνολική ποσοστιαία συμφωνία των δύο μεθόδων ανέρχεται στο 85%.

Σε διάφορες μελέτες καταγράφονται σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των μεταλλάξεων που ανευρίσκονται στον ιστό και εκείνων που ανευρίσκονται στο πλάσμα. Σε μια μελέτη που συμπεριέλαβε ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος και κολοορθικό καρκίνο, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε έλεγχο μεταλλάξεων με NGS σε 56 γονίδια στον ιστό και στο πλάσμα, παρατηρήθηκε ότι το 78% των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα, δεν βρέθηκαν στην ανάλυση του ιστού. [177].

Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση περιγράφεται ότι σε μελέτες που ασχολήθηκαν μόνο με την ανίχνευση των KRAS μεταλλάξεων, η συμφωνία ήταν 65%. Σε περαιτέρω ανάλυση του συνόλου των μεταλλάξεων που βρέθηκαν από τη χρήση πολυγονιδιακών πάνελ, το ποσοστό συμφωνίας μεταξύ ιστού και πλάσματος ήταν μόλις 31% [178].

Αυτές οι αποκλίσεις μπορούν να ερμηνευθούν από το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις που υπάρχουν στον αρχικό όγκο ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό στο πλάσμα, αλλά λόγω της ετερογένειας του όγκου, υπάρχουν και άλλες μεταλλάξεις που ανιχνεύονται κατά την ανάλυση του πλάσματος, ενώ δεν υπήρχαν στο τμήμα του ιστού που αναλύθηκε.

Από τις σημαντικότερες αιτίες που δυσχεραίνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της υγρής βιοψίας, είναι η παρουσία των σωματικών μεταλλάξεων μωσαϊκισμού που παραμένουν στο πλάσμα. Η ανάλυση του cfDNA για σωματικές μεταλλάξεις μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία μεταλλάξεων που δεν προέρχονται από τον όγκο. Αυτές περιλαμβάνουν γαμετικές μεταλλάξεις, μεταλλάξεις από δημιουργία κλώνων σε υγιείς ιστούς καθώς και artefacts κατά την αλληλούχιση.

Η κλωνική αιμοποίηση αφορά μία διαδικασία κατά την οποία οι σωματικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα οδηγούν σε κλωνική έκφραση αυτών των μεταλλάξεων στα κύτταρα του αίματος. Έτσι η κλωνική αιμοποίηση μπορεί να ευθύνεται για μη ογκογόνες μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA) [225]. Η κλωνική αιμοποίηση αποτελεί μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας της γήρανσης και είναι συνήθης στον γενικό πληθυσμό [226]. Τα γονίδια που συνήθως φέρουν μεταλλάξεις κλωνικής αιμοποίησης είναι τα DNMT3A, TET2, ASXL1 και JAK2. Παρόλα αυτά οι

μεταλλάξεις της κλωνικής αιμοποίησης μπορούν επίσης να επηρεάσουν γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση και συγκεκριμένα τα KRAS, PIK3CA και EGFR [227,229]. Η ταυτοποίηση αυτών των μεταλλάξεων κλωνικής αιμοποίησης έχει περιγραφεί ως πηγή “βιολογικού θορύβου” στην υγρή βιοψία του πλάσματος [225,228].

Η ιδέα των μεταλλάξεων κλωνικής αιμοποίησης στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA του πλάσματος, προτάθηκε πρώτη φορά σε δύο κλινικές μελέτες για τον καρκίνο του πνεύμονα [227, 230]. Η μελέτη των Razavi και λοιπών, έδειξε ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που ανευρίσκονται στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA ασθενών με καρκίνο προερχόταν από τους κλώνους των λευκών αιμοσφαιρίων και όχι από τον ίδιο τον όγκο [231]. Επομένως, εφόσον οι μεταλλάξεις των αιμοποιητικών κλώνων και των συμπαγών οργάνων μπορεί να είναι όμοιοι, η αλληλούχιση μόνο του cfDNA πιθανότατα δεν είναι αρκετή για να ξεχωρίσει τις μεταλλάξεις που προέρχονται από τον όγκο, από τις μεταλλάξεις της κλωνικής αιμοποίησης. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν στην κλινική πρακτική για την υγρή βιοψία του πλάσματος και θα διαχωρίζουν τις μεταλλάξεις κλωνικής αιμοποίησης.

Ένας άλλος λόγος που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτές τις αποκλίσεις είναι η παρουσία διαφορετικών κλώνων στις μεταστατικές εστίες. Δεδομένα από μελέτες που ανέλυσαν τα αποτελέσματα της χρήσης υγρής βιοψίας σε ασθενείς με μεταστατική νόσο, έδειξαν ότι οι βασικές οδηγοί μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, διατηρούνται κατά τη διάρκεια της κλωνικής εξέλιξης [179, 180], αλλά στην πορεία της εξέλιξης της μεταστατικής νόσου, προστίθενται και άλλες μοριακές μεταλλαγές, οι οποίες είναι ανιχνεύσιμες μόνο στις μεταστατικές εστίες και όχι στον πρωτοπαθή όγκο [182, 183].

Όσον αφορά την συσχέτιση της μεταβολής του MAF με την αύξηση ή μείωση του τίτλου του καρκινικού δείκτη CA 19-9 στο πλάσμα, φάνηκε πως υπήρξε αύξηση στην ομάδα των ασθενών των οποίων το φορτίο μεταλλάξεων αυξήθηκε, αλλά η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την ομάδα των ασθενών με μείωση του φορτίου μεταλλάξεων ($p < 0.05$). Αντίστοιχα από την συσχέτιση με το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), φάνηκε να υπάρχει αύξηση στην ομάδα των ασθενών με αύξηση του φορτίου μεταλλάξεων η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Αντίθετα η μεταβολή του CEA στις ομάδες των ασθενών είτε με σταθερότητα του φορτίου μεταλλάξεων, είτε με μείωση, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Έχει προταθεί ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα των KRAS μεταλλάξεων του πλάσματος μπορεί να βελτιωθεί συνδυάζοντας την μέτρηση των μεταλλάξεων KRAS στο πλάσμα, με τα αυξημένα επίπεδα CA 19-9 στον ορό [215]. Μια ανάλυση από την ομάδα του Däbritz J., πρότεινε ότι η ανίχνευση KRAS μεταλλάξεων στο πλάσμα, σχετίζεται με πρόοδο της νόσου σε ποσοστό 75% των περιπτώσεων, ενώ η συσχέτιση αυτή ενισχύονταν σημαντικά (92%), όταν παράλληλα με τα αυξημένα επίπεδα των μεταλλάξεων KRAS στο πλάσμα, υπήρχαν και αυξημένα επίπεδα CA 19-9 στον ορό [215, 216]. Μία άλλη πολυπαραμετρική ανάλυση έδειξε ότι οι KRAS μεταλλάξεις στο ctDNA του πλάσματος, ήταν ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση, από τα αυξημένα επίπεδα CA 19-9 [217]. Με τον τρόπο αυτό, οι μεταλλάξεις KRAS στο πλάσμα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμο προβλεπτικό βιοδείκτη με υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα από τους καρκινικούς δείκτες του ορού.

Μία από τις πιο σημαντικές, δυνητικά, εφαρμογές του ctDNA, που αποτελεί και έναν από τους στόχους της παρούσας μελέτης, είναι η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου, με σκοπό την πρόωπη ανίχνευση υποτροπών και την κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση, βάσει του προφίλ των μεταλλάξεων που θα προκύψει από την υγρή βιοψία. Ο Tjensvoll K. και η ομάδα του ανέφεραν ότι οι μεταβολές στα επίπεδα των KRAS μεταλλάξεων, βρισκόταν σε συμφωνία με τις αντίστοιχες μεταβολές που καταγραφόνταν στις απεικονιστικές εξετάσεις και στα επίπεδα του CA 19-9, κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων πρότειναν την χρήση των KRAS μεταλλάξεων στον πλάσμα για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και της πρόόδου νόσου σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο [218].

Ο προβλεπτικός ρόλος της χρήσης της υγρής βιοψίας υποστηρίζεται μέχρι στιγμής από λιγότερα δεδομένα σε σχέση με τον προγνωστικό. Σε μία μελέτη 54 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος, οι οποίοι βρισκόταν υπό χημειοθεραπεία, βρέθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα μεταλλάξεων KRAS στο ctDNA, είχαν προβλεπτικό χαρακτήρα για την επιδείνωση της νόσου με 83% ευαισθησία και 100% ειδικότητα [87]. Επιπλέον φαίνεται ότι η μείωση του ποσοστού των KRAS μεταλλάξεων κατά την διάρκεια της θεραπείας μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση σε αυτή.

Σε γενικό πλαίσιο, η υγρή βιοψία περιγράφει με έναν πιο σύνθετο τρόπο τις δυναμικές μεταβολές του όγκου σε πραγματικό χρόνο, παρέχοντας ολοκληρωμένη πληροφορία για το γονιδίωμα του όγκου και επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλαγών

που συμβαίνουν στην πορεία της νόσου, ως αποτέλεσμα της κλινικής εξέλιξης αλλά και της αντικαρκινικής θεραπείας.

Συνολικά, η μελέτη αυτή τοποθέτησε την υγρή βιοψία στον μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών στο πλαίσιο της καθημερινής κλινικής πρακτικής στην Ελλάδα. Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση KRAS και άλλων μεταλλάξεων στο πλάσμα, που έχουν την δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλαγμένων αλληλόμορφων ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα που αναλυτικά παρουσιάστηκαν και η άμεση συσχέτιση που προκύπτει με τα εργαλεία της καθημερινής κλινικής πρακτικής, αποδεικνύει ότι η χρήση του ctDNA σε ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος, μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο κυρίως με προγνωστικό, αλλά και με προβλεπτικό χαρακτήρα για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου των ασθενών, την πρόγνωση, αλλά και την εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την μελέτη αυτή προέκυψαν πρωτότυπα και αυθεντικά δεδομένα από τη χρήση υγρών βιοψιών σε μία ομάδα ασθενών με ανεγχείρητο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος, καταλήγοντας στα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Ο παγκρεατικό καρκίνος, είναι μια νόσος με υψηλή θνητότητα , με πενταετή επιβίωση μικρότερη από 10%.
- Η ύπαρξη μεταλλάξεων KRAS στο αίμα των ασθενών πριν την έναρξη θεραπείας υπολογίστηκε σε ποσοστό 77%.
- Οι συχνότερες μεταλλάξεις KRAS που ανιχνεύθηκαν με την υγρή βιοψία ήταν οι KRAS G12D και KRAS G12V και από τις υπόλοιπες ήταν οι μεταλλάξεις στο TP53, και στο NRAS.
- Η ύπαρξη KRAS μεταλλάξεων στον ιστό, υπολογίστηκε σε 77% από το σύνολο των περιστατικών που αναλύθηκαν.
- Η σύγκριση μεταξύ KRAS μεταλλάξεων στον ιστό, που αποτελεί την μέθοδο εκλογής για τον μοριακό έλεγχο, και στο πλάσμα έδειξε θετική ποσοστιαία συμφωνία (PPA) 87%, αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (NPA) 50% και συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA) 85%.
- Υπήρξε μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων μεταξύ του δείγματος πριν την έναρξη θεραπείας και του δείγματος 4-6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία κατά 82%, στο σύνολο του πληθυσμού.
- Ο πληθυσμός των ασθενών χωρίς μετάλλαξη KRAS αυξήθηκε από 39% στο δείγμα πριν την έναρξη θεραπείας σε 61% στο δείγμα 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη θεραπείας, λόγω εξάλειψης των KRAS μεταλλάξεων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ανταπόκρισης στην θεραπεία.
- Το διάμεσο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (mPFS), ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα των ασθενών με σταθερότητα στο φορτίο μεταλλάξεων (11 μήνες) έναντι 9,8 μηνών για τους ασθενείς με μείωση του φορτίου. Στους ασθενείς με αύξηση του φορτίου, το mPFS, έφτασε τους 9 μήνες. (p-value 0,0002, HR: 0,44, 95% CI 0,26 to 0,74)

- Σε όρους ολικής επιβίωσης, υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με σταθερό και αυτών με μεταβαλλόμενο φορτίο μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα η διάμεση επιβίωση (mOS) για τους ασθενείς με σταθερό φορτίο μεταλλάξεων ήταν 30,5 μήνες, ενώ αντίθετα στους ασθενείς με μεταβολή του φορτίου η διάμεση επιβίωση έφτασε τους 14 μήνες (16,5 μήνες σε όσους είχαν μείωση του φορτίου και 9 μήνες για όσους είχαν αύξηση του φορτίου).
- Υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συσχέτιση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων (μείωση ή αύξηση) με την απεικονιστική ανταπόκριση και την απεικονιστική επιδείνωση αντίστοιχα.
- Υπήρξε συμφωνία μεταξύ της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων (αύξηση - μείωση), και της αντίστοιχης μεταβολής του CA 19-9, αλλά η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για τους ασθενείς με μείωση του φορτίου μεταλλάξεων ($p < 0,05$).
- Για τον δείκτη CEA, βρέθηκε συμφωνία στην μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων με τις αντίστοιχες μεταβολές του CEA στον ορό, αλλά στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε μόνο για τους ασθενείς με αύξηση του φορτίου ($p < 0,05$).

Ανακεφαλαιώνοντας, μελετήσαμε την χρήση της υγρής βιοψίας σε 61 ασθενείς με ανεγχείρητο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, στην Ελλάδα. Αναλύθηκαν δύο δείγματα πλάσματος για κάθε ασθενή, ένα πριν την έναρξη θεραπείας και ένα δεύτερο δείγμα 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη θεραπείας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές υγρής βιοψίας πολύ υψηλής ευαισθησίας, η BEAMing Digital PCR, και η Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (NGS). Από την ανάλυση των δειγμάτων, βρέθηκε το προφίλ των μεταλλάξεων με τις μεθόδους υγρής βιοψίας και η μεταβολή του μεταξύ των δύο χρονικών σημείων. Υπήρχε ικανοποιητικός βαθμός συμφωνίας μεταξύ των ευρημάτων του πλάσματος και του ιστού. Η μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων συσχετίστηκε με διαφορά στο mPFS, υπέρ της ομάδας των ασθενών με αρνητικό φορτίο μεταλλάξεων στο πλάσμα και σταθερότητα του φορτίου μεταλλάξεων μεταξύ των δύο χρονικών σημείων. Επίσης, στη διάμεση επιβίωση, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με σταθερό και με μεταβαλλόμενο φορτίο μεταλλάξεων. Επιπλέον βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων και της μεταβολής των καρκινικών δεικτών CA 19-9 και CEA. Ανάλογα ήταν και τα

αποτελέσματα της συσχέτισης της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων με τις μεταβολές των απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών.

Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, την υγρή βιοψία, μπορούμε να καταγράψουμε τις δυναμικές μεταβολές των μεταλλάξεων KRAS και άλλων μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον παγκρεατικό καρκίνο, δημιουργώντας ένα προσωποποιημένο χρονολόγιο για τον κάθε ασθενή, βάσει του οποίου θα λαμβάνονται οι θεραπευτικές αποφάσεις. Η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει τα δεδομένα και το πλαίσιο που απαιτείται για να μελετηθούν περαιτέρω τα αποτελέσματα προς την κατεύθυνση αυτή. Τα δεδομένα που προέκυψαν δείχνουν ότι η κινητική και οι μεταβολές ιδιαιτέρως των μεταλλάξεων KRAS, παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την ανταπόκριση στη θεραπεία και για την πρόγνωση των ασθενών, σε συμφωνία με τα δεδομένα που προκύπτουν από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή κλινική πρακτική (απεικονιστικές εξετάσεις, καρκινικοί δείκτες).

Ολοκληρώνοντας, έχουμε ισχυρές ενδείξεις που μας επιτρέπουν να υποστηρίξουμε την σημαντικότητα της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς δίνει σημαντικά δεδομένα για την χρήση της υγρής βιοψίας στον ανεγχείρητο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο. Η περαιτέρω διερεύνηση και ανάπτυξη των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων, μπορεί να συμβάλει τα μέγιστα στην κατανόηση της βιολογικής πορείας της νόσου τόσο από τους κλινικούς παθολόγους ογκολόγους, όσο και από βασικούς ερευνητές, οδηγώντας έτσι στην βελτιστοποίηση της εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης για τους ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος είναι μια νόσος που σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση, και η επίπλωσή του φαίνεται να έχει αυξητική τάση κάθε χρόνο παγκοσμίως. Η πενταετής ολική επιβίωση (overall survival, OS), παραμένει μικρότερη του 10%. Παρά την ανάδυση νέων αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση του ανεγχείρητου και μεταστατικού παγκρεατικού καρκίνου (NALIRIFOX, FOLFIRINOX, Gemcitabine/Nab-Paclitaxel), απουσιάζουν αξιόπιστοι προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες με τεκμηριωμένη κλινική χρησιμότητα. Πρόσφατες πρόοδοι στην αποτελεσματικότητα των υπάρχοντων συνδυαστικών σχημάτων συστηματικής θεραπείας οδήγησαν σε ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης της τάξης του 20-30% στη μεταστατική νόσο, και σε χρόνους διάμεσης επιβίωσης μεταξύ 8-12 μηνών. Στον ανεγχείρητο και μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, ένας αξιόπιστος δείκτης με προγνωστική ή πρώιμη προβλεπτική ικανότητα θα επέτρεπε την προσαρμογή της θεραπείας σε χαμηλής τοξικότητας ανακουφιστική μονοθεραπεία έναντι πιο εντατικής συνδυαστικής θεραπείας, ενώ θα επέτρεπε και την έγκαιρη αλλαγή θεραπείας αν κρινόταν αναποτελεσματική.

Καθώς ο παγκρεατικός καρκίνος φέρει μεταλλάξεις KRAS εξονίων 2 ή 3 (κωδικόνια 12, 13, 61) στο 90% των περιπτώσεων, η μετάλλαξη KRAS στο ελεύθερο DNA του όγκου που βρίσκεται στο πλάσμα μπορεί να αποτελέσει ένδειξη τόσο του φορτίου της νόσου, όσο και της πρόγνωσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η συμφωνία ή μη ύπαρξης RAS μετάλλαξης στον ιστό (πρωτοπαθής παγκρεατικός καρκίνος).

Σκοπός: Σύμφωνα με τα παραπάνω, ένας από τους βασικούς στόχους αυτής της διατριβής είναι η ανίχνευση του φορτίου μεταλλάξεων σε ασθενείς με ανεγχείρητο ή μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, και η διερεύνηση του εάν η μεταβολή του πριν και μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας, μπορεί να αποτελέσει πρώιμο προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης. Επιπλέον στοχεύει στην μελέτη της χρησιμότητας των διαδοχικών υγρών βιοψιών, παράλληλα με τον έλεγχο του ιστού, για την εξατομίκευση της θεραπευτικής στρατηγικής με πιθανή προβλεπτική αξία για την λήψη θεραπευτικής απόφασης.

Μέθοδοι: Δείγματα πλάσματος ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό πορογενές αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας και

4-6 εβδομάδες αργότερα, από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, από το Γενικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Κηφισιάς “Οι Άγιοι Ανάργυροι” και από το Γενικό Νοσοκομείο Πατρών “Ο Άγιος Ανδρέας”. Συλλέχθηκαν κλινικά δεδομένα από τον ιατρικό φάκελο των ασθενών. Ελέγχθηκαν για 34 μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS* και *NRAS* (κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117, 146) με BEAMing Digital PCR, η οποία αποτελεί τεχνική υψηλή ευαισθησίας που δίνει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στο πλάσμα (Mutant Allele Fraction, MAF). Ο προσδιορισμός των αντίστοιχων μεταλλάξεων στον ιστό πραγματοποιήθηκε με allele-specific RT-PCR χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Cobas της Roche. Έγινε επίσης έλεγχος μεταλλάξεων με τη μέθοδο NGS. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων με την μέθοδο NGS, πραγματοποιήθηκε σε ένα δείγμα 28 ασθενών. Με τη μέθοδο του NGS μελετήθηκαν οι εξής γονιδιακές μεταλλαγές: *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MAD4*, *TP53*, *APC*, *AKT1*.

Αποτελέσματα: Η ύπαρξη μεταλλάξεων *KRAS* στο δείγμα πριν την έναρξη θεραπείας υπολογίστηκε σε ποσοστό 77%. Οι συχνότερες μεταλλάξεις *KRAS* που ανιχνεύθηκαν με την υγρή βιοψία ήταν οι *KRAS* G12D και *KRAS* G12V και από τις υπόλοιπες ήταν οι μεταλλάξεις στο *TP53*, και στο *NRAS*. Η σύγκριση μεταξύ *KRAS* μεταλλάξεων στον ιστό, που αποτελεί την μέθοδο εκλογής για τον μοριακό έλεγχο, και στο πλάσμα έδειξε θετική ποσοστιαία συμφωνία (PPA) 87%, αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (NPA) 50% και συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA) 85%. Υπήρξε μεταβολή του φορτίου μεταλλάξεων μεταξύ του δείγματος πριν την έναρξη θεραπείας και του δείγματος 4-6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία κατά 82%, στο σύνολο του πληθυσμού. Ο πληθυσμός των ασθενών χωρίς μετάλλαξη *KRAS* αυξήθηκε από 39% στο αρχικό δείγμα πριν την έναρξη θεραπείας σε 61% στο δείγμα 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη θεραπείας, λόγω εξάλειψης των *KRAS* μεταλλάξεων, ως ένδειξη ανταπόκρισης στην θεραπεία. Το διάμεσο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (mPFS), ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα των ασθενών με σταθερότητα στο φορτίο μεταλλάξεων (11 μήνες) έναντι 9,8 μηνών για τους ασθενείς με μείωση του φορτίου. Σε όρους ολικής επιβίωσης, υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με σταθερό και μεταβαλλόμενο φορτίο μεταλλάξεων. Υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συσχέτιση της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων (μείωση ή αύξηση) με την απεικονιστική ανταπόκριση και την απεικονιστική επιδείνωση αντίστοιχα.

Υπήρξε συμφωνία μεταξύ της μεταβολής του φορτίου μεταλλάξεων (αύξηση - μείωση), και της αντίστοιχης μεταβολής των καρκινικών δεικτών CA 19-9 και CEA

Συμπεράσματα: Συνολικά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση, ότι η ανίχνευση των μεταλλάξεων του RAS, κατέχει σημαντικό προγνωστικό ρόλο στην πορεία των ασθενών με ανεγχείρητο ή μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος, καθώς η μεταβολή τους (μείωση ή αύξηση) πριν και μετά την χορήγηση χημειοθεραπείας σχετίζεται με αντίστοιχη κλινική και απεικονιστική ανταπόκριση. Οπότε η χρήση της υγρής βιοψίας για ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS και άλλων, μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο, προγνωστικό αλλά και προβλεπτικό για στην πορεία των ασθενών με ανεγχείρητο ή μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και για την καθιέρωση της υγρής βιοψίας στην καθημερινή κλινική πρακτική, απαιτούνται τα αποτελέσματα τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών. Η παρούσα μελέτη ενισχύει την υπόθεση για τον σχεδιασμό ανάλογων κλινικών δοκιμών.

ABSTRACT

Introduction: Pancreatic ductal adenocarcinoma is a fatal disease with a poor prognosis, with an increasing incidence every year worldwide. 5-year overall survival remains lower than 10%. Despite new emerging therapies for locally advanced and metastatic PDAC (NALIRIFOX, FOLFIRINOX, Abraxane/Gemcitabine), reliable prognostic and predictive biomarkers with established clinical utility are lacking. Recent advancements in the effectiveness of current chemotherapy combinations have led to objective response rates of 20-30% in metastatic disease and an estimated median survival of 8-12 months. In locally advanced and metastatic PDAC, a reliable biomarker with prognostic or early predictive value would allow the de-escalation or intensification of treatment according to its efficacy and enable early therapy modifications if deemed ineffective. Since pancreatic cancer harbors KRAS exon 2 or exon 3 mutations (codons 12, 13, 61) in 90% of cases, KRAS mutation in circulating tumor DNA, the detection of KRAS mutations with liquid biopsy may indicate disease burden, prognosis, and treatment response. Furthermore, the agreement or lack thereof regarding the presence of RAS mutation in the tissue (primary pancreatic cancer) is of exceptional interest.

Aim: In light of the above, the primary objective of this study is to detect mutational burden in patients with unresectable and metastatic pancreatic cancer and determine whether the change before and after chemotherapy can serve as an early prognostic biomarker of treatment response. Additionally, the study aims to assess the utility of sequential liquid biopsies and standard tissue analysis to customize therapeutic strategy, potentially offering predictive value for therapeutic decision-making.

Methods: Plasma samples from patients with unresectable and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas were collected before the initiation of chemotherapy and 4-6 weeks later, from the University Hospital of Ioannina, the General Oncology Hospital of Kifisia “Agii Anargyroi,” and the General Hospital of Patras “Agios Andreas.” Clinical data were extracted from patients’ medical records. Analysis was conducted for 34 mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes (codons 12, 13, 59, 61, 117, 146) using BEAMing Digital PCR, a high-sensitivity technique enabling quantification of mutant alleles in plasma (Mutant Allele Fraction, MAF). Corresponding tissue mutations were analyzed using allele-specific RT-PCR on the Roche Cobas platform. Mutation analysis was also carried out using the NGS method. Mutations were detected with NGS in a subset of 28 patients.

Through NGS, the following gene mutations were examined: *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MAD4*, *TP53*, *APC*, and *AKT1*.

Results: The presence of *KRAS* mutations in pre-treatment samples was estimated at 77%. The most frequently detected *KRAS* mutations via liquid biopsy were *KRAS* G12D and *KRAS* G12V, alongside mutations in *TP53* and *NRAS*. Comparison between *KRAS* mutations in tissue, the standard method for molecular testing, and plasma revealed a positive percent agreement (PPA) of 87%, a negative percent agreement (NPA) of 50%, and an overall percent agreement (OPA) of 85%. There was an 82% change in mutation burden between the pre-treatment sample and the sample taken 4-6 weeks after treatment in the overall population. The proportion of patients without *KRAS* mutations increased from 39% in the initial pre-treatment sample to 61% in the post-treatment sample, indicating treatment response. The median progression-free survival (mPFS) was prolonged (11 months) for patients with stable mutational burden versus 9.8 months for those with a reduced mutational load. A statistically significant difference was found in survival between patients with stable mutational status and those with varying mutational burden. There was also a statistically significant association between changes in mutational burden (reduction or increase) and imaging response and progression, respectively. There was concordance between mutational burden changes (increase-decrease) and corresponding variations in serum biomarkers CA 19-9 and CEA.

Conclusions: The results of the present study support the initial hypothesis that the detection of RAS mutations plays a significant prognostic role in patients with unresectable and metastatic PDAC. Specifically, their change (either decrease or increase) before and after the administration of chemotherapy is directly linked to the clinical and imaging response of the patients. Consequently, using liquid biopsy to detect RAS mutations can play a significant role, both prognostic and predictive, in monitoring the progress of patients with unresectable and metastatic pancreatic adenocarcinoma. However, additional results from randomized clinical trials are required to establish liquid biopsy as a procedure for use in everyday clinical practice. This study adequately supports for the rationale for further clinical trials to be conducted.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/13-pancreas-fact-sheet.pdf>
2. Fitzgerald PJ. Medical anecdotes concerning some diseases of the pancreas. In.: Fitzgerald PJ, Morrison AB, eds. The pancreas. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980:1-29.
3. Deepak Kumar Bhasin, Surinder Singh Rana, Vijant Singh Chandail, The Pancreas and Respiration: Oblivious to the Obvious! - Editorial, JOP. J Pancreas (Online) 2006; 7(6):578-583.
4. Alixanna Norris, Murray Korc, Chapter 324 - Aberrant Signaling Pathways in Pancreatic Cancer: Opportunities for Targeted Therapeutics, Editor(s): Ralph A. Bradshaw, Edward A. Dennis, Handbook of Cell Signaling (Second Edition), Academic Press, 2010, Pages 2783-2798, ISBN 9780123741455
5. Klimstra DS, Nonductal neoplasms of the pancreas. Mod Pathol. 2007;20 Suppl 1:S94.
6. Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Available at: <https://gco.iarc.fr/> (Accessed on December 13, 2023).
7. The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. GBD 2017 Pancreatic Cancer Collaborators, Lancet Gastroenterol Hepatol. 2019;4(12):934. Epub 2019 Oct 21.
8. Cancer Stat Facts: Pancreatic Cancer. National Cancer Institute/Surveillance, Epidemiology, and End Results Program <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html> (Accessed on February 06, 2024). Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumor site and stage.
9. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jarid M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Solà R, Salas A, Real FX Clin Transl Oncol. 2005 Jun;7(5):189-97.
10. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR, Varieties of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. Ann Oncol. 1999;10 Suppl 4:82.
11. Tsuchiya R, Noda T, Harada N, Miyamoto T, Tomioka T, Yamamoto K, Yamaguchi T, Izawa K, Tsunoda T, Yoshino R, Collective review of small carcinomas of the pancreas. Ann Surg. 1986;203(1):77.

12. Aggarwal G, Kamada P, Chari ST, Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers. *Pancreas*. 2013;42(2):198.
13. Brand R, The diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer J*. 2001;7(4):287.
14. Pasanen PA, Partanen KP, Pikkarainen PH, Alhava EM, Janatuinen EK, Pirinen AE, A comparison of ultrasound, computed tomography, and endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the differential diagnosis of benign and malignant jaundice and cholestasis. *Eur J Surg*. 1993;159(1):23.
15. Pasanen PA, Eskelinen M, Partanen K, Pikkarainen P, Penttiläl, Alhava E, A prospective study of the value of imaging, serum markers and their combination in the diagnosis of pancreatic carcinoma in symptomatic patients. *Anticancer Res*. 1992;12(6B):2309.
16. Pleskow DK, Berger HJ, Gyves J, Allen E, McLean A, Podolsky DK, Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med*. 1989;110(9):704.
17. Steinberg W, The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(4):350.
18. Goonetilleke KS, Siriwardena AK, Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007 Apr;33(3):266-70. Epub 2006 Nov 9.
19. Maithel SK, Maloney S, Winston C, Gönen M, D'Angelica MI, Dematteo RP, Jarnagin WR, Brennan MF, Allen PJ, Preoperative CA 19-9 and the yield of staging laparoscopy in patients with radiographically resectable pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(12):3512. Epub 2008 Sep 10.
20. Bergquist JR, Puig CA, Shubert CR, Groeschl RT, Habermann EB, Kendrick ML, Nagorney DM, Smoot RL, Farnell MB, Truty MJ Carbohydrate Antigen 19-9 Elevation in Anatomically Resectable, Early Stage Pancreatic Cancer Is Independently Associated with Decreased Overall Survival and an Indication for Neoadjuvant Therapy: A National Cancer Database Study. *J Am Coll Surg*. 2016;223(1):52.
21. DelMaschio A, Vanzulli A, Sironi S, Castrucci M, Mellone R, Staudacher C, Carlucci M, Zerbi A, Parolini D, Faravelli A, Pancreatic cancer versus chronic pancreatitis: diagnosis with CA 19-9 assessment, US, CT, and CT-guided fine-needle biopsy. *Radiology*. 1991;178(1):95.
22. Wang W, Shpaner A, Krishna SG, Ross WA, Bhutani MS, Tamm EP, Raju GS, Xiao L, Wolff RA, Fleming JB, Lee JH, Use of EUS-FNA in diagnosing pancreatic neoplasm

without a definitive mass on CT. *Gastrointest Endosc.* 2013;78(1):73. Epub 2013 Mar 21.

23. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Genome Atlas Research Network*. Electronic address: andrew_aguirre@dfci.harvard.edu, *Cancer Genome Atlas Research Network Cancer Cell.* 2017;32(2):185.
24. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, Quinn MC, Robertson AJ, Fadlullah MZ, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wani S, Wilson PJ, Markham E, Cloonan N, Anderson MJ, Fink JL, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Newell F, Poudel B, Song S, Taylor D, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Lee HC, Jones MD, Nagrial AM, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Steinmann AM, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Pettitt JA, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, Graham JS, Niclou SP, Bjerkvig R, Grützmann R, Aust D, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C, Falconi M, Zamboni G, Tortora G, Tempero MA, Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Gill AJ, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Pearson JV, Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Bio Nature.* 2015;518(7540):495.
25. Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Pancreatic cancer. In: *The Genetic Basis of Human Cancer*, Vogelstein B, Kinzler KW (Eds), McGraw-Hill, New York 1998. p.659.
26. Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, Bondy ML, Brand R, Gallinger S, Kurtz RC, Olson SH, Rustgi AK, Schwartz AG, Stoffel E, Syngal S, Zogopoulos G, Ali SZ, Axilbund J, Chaffee KG, Chen YC, Cote ML, Childs EJ, Douville C, Goes FS, Herman JM, Iacobuzio-Donahue C, Kramer M, Makohon-Moore A, McCombie RW, McMahon KW, Niknafs N, Parla J, Pirooznia M, Potash JB, Rhim AD, Smith AL, Wang Y, Wolfgang CL, Wood LD, Zandi PP, Goggins M, Karchin R, Eshleman JR, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Klein AP, Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2016;6(2):166. Epub 2015 Dec 9.
27. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL, K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a

combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol.* 1993;143(2):545.

28. Abdul Q. Khan, Shilpa Kuttikrishnan, Kodappully S. Siveen, Kirti S. Prabhu, Muralitharan Shanmugakonar, Hamda A. Al- Naemi, Mohammad Haris, Said Dermime, Shahab Uddin, RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 54, 2019, Pages 1-13
29. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW, Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008;321(5897):1801. Epub 2008 Sep 4.
30. Bannoura SF, Uddin MH, Nagasaka M, Fazili F, Al-Hallak MN, Philip PA, El-Rayes B, Azmi AS, Targeting KRAS in pancreatic cancer: new drugs on the horizon. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(3):819. Epub 2021 Sep 9.
31. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE, Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998;58(23):5329.
32. Anstadt EJ, Carmona R, Berlin E, Yegya-Raman N, Venigalla S, Reddy V, Williams GR, Leibensperger MR, Wojcieszynski A, Baumann BC, Lee MK, Plastaras JP, Furth EE, Mell LK, Metz JM, Ben-Josef E. SMAD4 loss predicts worse overall and distant metastasis-free survival in patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer.* 2024;130(3):476. Epub 2023 Oct 12.
33. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, Jensen SØ, Medina JE, Hruban C, White JR, Palsgrove DN, Niknafs N, Anagnostou V, Forde P, Naidoo J, Marrone K, Brahmer J, Woodward BD, Husain H, van Rooijen KL, Ørntoft MW, Madsen AH, van de Velde CJH, Verheij M, Cats A, Punt CJA, Vink GR, van Grieken NCT, Koopman M, Fijneman RJA, Johansen JS, Nielsen HJ, Meijer GA, Andersen CL, Scharpf RB, Velculescu VE, Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019;570(7761):385. Epub 2019 May 29.
34. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, Anagnostou V, Fiksel J, Cristiano S, Papp E, Speir S, Reinert T, Ørntoft MW, Woodward BD, Murphy D, Parpart-Li S, Riley D, Nesselbush M, Sengamalay N, Georgiadis A, Li QK, Madsen MR, Mortensen FV, Huiskens J, Punt C, van Grieken N, Fijneman R, Meijer G, Husain

- H, Scharpf RB, Diaz LA Jr, Jones S, Angiuoli S, Ørntoft T, Nielsen HJ, Andersen CL, Velculescu VE, Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2017;9(403)
35. Chun Y.S., Pawlik T.M., Vauthey J.-N. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers. *Ann. Surg. Oncol.* 2017;25:845–847. doi: 10.1245/s10434-017-6025-x.
 36. Wattenberg MM, Asch D, Yu S, O'Dwyer PJ, Domchek SM, Nathanson KL, Rosen MA, Beatty GL, Siegelman ES, Reiss KA, Platinum response characteristics of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and a germline BRCA1, BRCA2 or PALB2 mutation. *Br J Cancer*. 2020;122(3):333. Epub 2019 Dec 2.
 37. Momtaz P, O'Connor CA, Chou JF, Capanu M, Park W, Bandlamudi C, Berger MF, Kelsen DP, Suehnholz SP, Chakravarty D, Yu KH, Varghese AM, Zervoudakis A, Li J, Ku GY, Park JS, Shcherba M, Harding JJ, Goldberg Z, Abou-Alfa GK, Salo-Mullen EE, Stadler ZK, Iacobuzio-Donahue CA, O'Reilly EM, Pancreas cancer and BRCA: A critical subset of patients with improving therapeutic outcomes. *Cancer*. 2021;127(23):4393. Epub 2021 Aug 5.
 38. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T, Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005;434(7035):913.
 39. McLornan DP, List A, Mufti GJ, Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(18):1725.
 40. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, Park JO, Hochhauser D, Arnold D, Oh DY, Reinacher-Schick A, Tortora G, Algül H, O'Reilly EM, McGuinness D, Cui KY, Schlienger K, Locker GY, Kindler HL, Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(4):317. Epub 2019 Jun 2.
 41. Shroff RT, Hendifar A, McWilliams RR, Geva R, Epelbaum R, Rolfe L, Goble S, Lin KK, Biankin AV, Giordano H, Vonderheide RH, Domchek SM, Rucaparib Monotherapy in Patients With Pancreatic Cancer and a Known Deleterious BRCA Mutation. *JCO Precis Oncol*. 2018;2018 Epub 2018 May 16.
 42. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, Geva R, Gottfried M, Penel N, Hansen AR, Piha-Paul SA, Doi T, Gao B, Chung HC, Lopez-Martin J, Bang YJ, Frommer RS, Shah M, Ghorri R, Joe AK, Pruitt SK, Diaz LA Jr, Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/

Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(1):1. Epub 2019 Nov 4.

43. Taïeb J, Sayah L, Heinrich K, Kunzmann V, Boileve A, Cirkel G, Lonardi S, Chibaudel B, Turpin A, Beller T, Hautefeuille V, Vivaldi C, Mazard T, Bauguion L, Niger M, Prager GW, Coutzac C, Benedikt Westphalen C, Auclin E, Pilla L, Efficacy of immune checkpoint inhibitors in microsatellite unstable/mismatch repair-deficient advanced pancreatic adenocarcinoma: an AGEO European Cohort. *Eur J Cancer.* 2023;188:90. Epub 2023 Apr 23.
44. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, Farago AF, Albert CM, Rohrberg KS, van Tilburg CM, Nagasubramanian R, Berlin JD, Federman N, Mascarenhas L, Geoerger B, Dowlati A, Pappo AS, Bielack S, Doz F, McDermott R, Patel JD, Schilder RJ, Tahara M, Pfister SM, Witt O, Ladanyi M, Rudzinski ER, Nanda S, Childs BH, Laetsch TW, Hyman DM, Drilon A, Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):531. Epub 2020 Feb 24.
45. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, Blakely CM, Seto T, Cho BC, Tosi D, Besse B, Chawla SP, Bazhenova L, Krauss JC, Chae YK, Barve M, Garrido-Laguna I, Liu SV, Conkling P, John T, Fakih M, Sigal D, Loong HH, Buchschacher GL Jr, Garrido P, Nieva J, Steuer C, Overbeck TR, Bowles DW, Fox E, Riehl T, Chow-Maneval E, Simmons B, Cui N, Johnson A, Eng S, Wilson TR, Demetri GD, trial investigators, Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271. Epub 2019 Dec 11.
46. Subbiah V, Wolf J, Konda B, Kang H, Spira A, Weiss J, Takeda M, Ohe Y, Khan S, Ohashi K, Soldatenkova V, Szymczak S, Sullivan L, Wright J, Drilon A, Tumour-agnostic efficacy and safety of selpercatinib in patients with RET fusion-positive solid tumours other than lung or thyroid tumours (LIBRETTO-001): a phase 1/2, open-label, basket trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(10):1261. Epub 2022 Sep 12.
47. Salama AKS, Li S, Macrae ER, Park JI, Mitchell EP, Zwiebel JA, Chen HX, Gray RJ, McShane LM, Rubinstein LV, Patton D, Williams PM, Hamilton SR, Armstrong DK, Conley BA, Arteaga CL, Harris LN, O'Dwyer PJ, Chen AP, Flaherty KT, Dabrafenib and Trametinib in Patients With Tumors With BRAFV600E Mutations: Results of the NCI-MATCH Trial Subprotocol H. *J Clin Oncol.* 2020;38(33):3895. Epub 2020 Aug 6.
48. Strickler JH, Satake H, George TJ, Yaeger R, Hollebecque A, Garrido-Laguna I, Schuler M, Burns TF, Coveler AL, Falchook GS, Vincent M, Sunakawa Y, Dahan L,

- Bajor D, Rha SY, Lemech C, Juric D, Rehn M, Ngarmchamnanrith G, Jafarinasabian P, Tran Q, Hong DS, Sotorasib in KRAS p.G12C-Mutated Advanced Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2023;388(1):33. Epub 2022 Dec 21.
49. Bekaii-Saab TS, Yaeger R, Spira AI, Pelster MS, Sabari JK, Hafez N, Barve M, Velastegui K, Yan X, Shetty A, Der-Torossian H, Pant S, Adagrasib in Advanced Solid Tumors Harboring a KRASG12C Mutation. *J Clin Oncol*. 2023;41(25):4097. Epub 2023 Apr 26.
 50. Gourgou-Bourgade S, Bascoul-Mollevis C, Desseigne F, et al. Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):23-29. doi:10.1200/JCO.2012.44.4869
 51. Wainberg, Zev A et al, NALIRIFOX versus nab-paclitaxel and gemcitabine in treatment-naïve patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (NAPOLI 3): a randomised, open-label, phase 3 trial, *The Lancet*, Volume 402, Issue 10409, 1272 - 1281
 52. Daniel D. Von Hoff et al., Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine, *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, doi: 10.1056/NEJMoa1304369
 53. Macarulla T, Pazo-Cid R, Guillén-Ponce C, López R, Vera R, Reboredo M, Muñoz Martín A, Rivera F, Díaz Beveridge R, La Casta A, Martín Valadés J, Martínez-Galán J, Ales I, Sastre J, Perea S, Hidalgo M, Phase I/II Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel in Combination With Gemcitabine in Patients With Pancreatic Cancer and an ECOG Performance Status of 2. *J Clin Oncol*. 2019;37(3):230. Epub 2018 Dec 4.
 54. Taïeb J, Lecomte T, Aparicio T, Asnacios A, Mansourbakht T, Artru P, Fallik D, Spano JP, Landi B, Lledo G, Desrame J, FOLFIRI.3, a new regimen combining 5-fluorouracil, folinic acid and irinotecan, for advanced pancreatic cancer: results of an Association des Gastro-Enterologues Oncologues (Gastroenterologist Oncologist Association) multicenter phase II study. *Ann Oncol*. 2007;18(3):498. Epub 2006 Dec 8.
 55. Bullock A, Stuart K, Jacobus S, Abrams T, Wadlow R, Goldstein M, Miksad R, Capecitabine and oxaliplatin as first and second line treatment for locally advanced and metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2017;8(6):945.
 56. Casper ES, Green MR, Kelsen DP, Heelan RT, Brown TD, Flombaum CD, Trochanowski B, Tarassoff PG, Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs*. 1994;12(1):29.

57. Van Rijswijk RE, Jeziorski K, Wagener DJ, Van Laethem JL, Reuse S, Baron B, Wils J, EORTC Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group, Weekly high-dose 5-fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic carcinoma: a phase II study of the EORTC Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer*. 2004;40(14):2077.
58. Cartwright TH, Cohn A, Varkey JA, Chen YM, Szatrowski TP, Cox JV, Schulz JJ, Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(1):160.
59. Vaidyanathan, R., Soon, R. H., Zhang, P., Jiang, K. & Lim, C. T. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab. Chip* **19**, 11–34 (2018).
60. Lone, S. N. et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol. Cancer* **21**, 79 (2022).
61. Mandel, P. & Metais, P. Nuclear acids in human blood plasma. *C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.* **142**, 241–243 (1948).
62. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* **13**, 269–288 (1967).
63. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**, 646–650 (1977).
64. Sorenson, G. D. et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **3**, 67–71 (1994).
65. Diehl, F. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med* **14**, 985–990 (2008).
66. Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S. & Haber, D. A. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* **192**, 373–382 (2011).
67. Sefrioui, D. et al. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br. J. Cancer* **117**, 1017–1025 (2017).
68. Petrik, J. et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection systems and clinical utility. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 13582 (2022).
69. Burnham P, Khush K, De Vlaminc I. Myriad applications of circulating cell-free DNA in precision organ transplant monitoring. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;14(7):S237–S241. doi: 10.1513/AnnalsATS.201608-634MG.
70. O’Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, Chantler PD, Barr TL. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in

- ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Inj.* 2017;31(10):1369–1375. doi: 10.1080/02699052.2017.1312018.
71. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, Samet Y, Maoz M, Druid H, Arner P, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun.* 2018;9(1):5068. doi: 10.1038/s41467-018-07466-6.
 72. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell.* 2016;164(1–2):57–68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050.Cell-free.
 73. Zhang R, Nakahira K, Guo X, Choi AMK, Gu Z. Very short mitochondrial DNA fragments and heteroplasmy in human plasma. *Sci Rep.* 2016;6:1–10. doi: 10.1038/srep36097.
 74. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 2018;10(466):eaat4921. doi: 10.1126/scitranslmed.aat4921.
 75. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8):1057–1067. doi:10.1080/15384047.2019.1598759
 76. Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *Br J Cancer.* 2021;124(2):345-358. doi:10.1038/s41416-020-01047-5
 77. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* 2007;1775:181–232.
 78. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz A-L, Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:6407–11.
 79. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, Gligorich KM, Rostomily RC, Bronner MP, Shendure J. Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006162.
 80. <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/circulating-tumour-dna-for-cancer-patients/#applications-of-ctdna-liquid-biopsy>
 81. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):131. Published 2022 Sep 12. doi:10.1186/s13045-022-01351-y

82. Zhang BO, Xu CW, Shao Y, et al. Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation. *Exp Ther Med*. 2015;9:1383–8.
83. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*. 2017;31(2):172-9.
84. Fiala C, Diamandis EP. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Med*. 2018;16(1):166.
85. Stewart CM, Tsui DWY. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet*. 2018;228-229:169-79.
86. Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.;Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research* 2014, 74 (11), 2913 – 2921
87. Kruger, S.; Heinemann, V.; Ross, C.; Diehl, F.; Nagel, D.; Ormanns, S.; Liebmann, S.; Prinz-Bravin, I.; Westphalen, C. B.; Haas, M.; et al. Repeated mut KRAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Annals of Oncology* 2018, 29 (12), 2348 – 2355
88. Mahima Mishra, Rubai Ahmed, Deepak Kumar Das, Devlina Das Pramanik, Sandeep Kumar Dash, and Arindam Pramanik, Recent Advancements in the Application of Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Early Detection of Cancers *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2024** 10 (8), 4740-4756, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.4c00606
89. Hussung, S.; Akhoundova, D.; Hipp, J.; Follo, M.; Klar, R. F.U.; Philipp, U.; Scherer, F.; von Bubnoff, N.; Duyster, J.; Boerries, M.; et al. Longitudinal analysis of cell-free mutated KRAS and CA 19 –9 predicts survival following curative resection of pancreatic cancer. *BMC cancer* 2021, 21, 49
90. Kirchweger P, Kupferthaler A, Burghofer J, et al. Prediction of response to systemic treatment by kinetics of circulating tumor DNA in metastatic pancreatic cancer. *Front Oncol*. 2022;12:902177. Published 2022 Aug 30. doi:10.3389/fonc.2022.902177
91. Rizzo JM, Buck MJ, Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(7):887. Epub 2012 May 22.
92. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE, Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*. 2020;21(10):597. Epub 2020 Jun 5.
93. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000001405.40/

94. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E, ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee *Genet Med*. 2013 Sep;15(9):733-47. Epub 2013 Jul 25.
95. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
96. <https://project.eortc.org/recist/wp-content/uploads/sites/4/2015/03/RECISTGuidelines.pdf>
97. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):649-655. PMID: 7165009.
98. <https://ecog-acrin.org/resources/ecog-performance-status/>
99. BEAMing_Digital_PCR_Technology_en.pdf BDPTIWAfhws-icfmfFsSI.
100. Conroy, T. et al., Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, Volume 34, Issue 11, 987 - 1002
101. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/pancreatic_blocks.pdf
102. Obermeier, Patrick & Muehlhans, Susann & Hoppe, Christian & Karsch, Katharina & Tief, Franziska & Seeber, Lea & Chen, Xi & Conrad, Tim & Böttcher, Sindy & Diedrich, Sabine & Rath, Barbara. (2016). Enabling Precision Medicine With Digital Case Classification at the Point-of-Care. *EBioMedicine*. 4. 10.1016/j.ebiom.2016.01.008.
103. Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer*. 2015;121(13):2271-2280. doi:10.1002/cncr.29364
104. Bernard V, Fleming J, Maitra A. Molecular and Genetic Basis of Pancreatic Carcinogenesis: Which Concepts May be Clinically Relevant?. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(2):227-238. doi:10.1016/j.soc.2015.11.003
105. <https://guardanthealth.eu/>
106. <https://accela.eu/wp-content/uploads/2024/08/spotlight-59-data-sheet-reva-1.pdf>
107. Jana Oliveriusova Kent, Masen Chad Christensen - Highly selective Cooperative Primers for multiplex detection of rare mutations, Co-Diagnostics Inc, Salt Lake City, UT, United States of America, 2021.07.23.453558; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.07.23.453558>

108. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(4):219-232. doi:10.1002/gcc.22695
109. Pectasides D, Kotoula V, Papaxoinis G, et al. Expression Patterns of Growth and Survival Genes with Prognostic Implications in Advanced Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(12):6347-6356. doi:10.21873/anticancer.11232
110. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(38):10202-10207. doi:10.1073/pnas.1704961114
111. Patel H, Okamura R, Fanta P, et al. Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):130. Published 2019 Dec 4. doi:10.1186/s13045-019-0824-4
112. Park, G., Park, J.K., Son, D.S. *et al.* Utility of targeted deep sequencing for detecting circulating tumor DNA in pancreatic cancer patients. *Sci Rep* 8, 11631 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30100-w>
113. <https://www.synapse.org/Synapse:syn7222066/files/>
114. <https://cordis.europa.eu/project/id/687785/results>
115. Berger AW, Schwerdel D, Costa IG, et al. Detection of Hot-Spot Mutations in Circulating Cell-Free DNA From Patients With Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Gastroenterology*. 2016;151(2):267-270. doi:10.1053/j.gastro.2016.04.034
116. Palacín-Aliana I, García-Romero N, Asensi-Puig A, Carrión-Navarro J, González-Rumayor V, Ayuso-Sacido Á. Clinical Utility of Liquid Biopsy-Based Actionable Mutations Detected via ddPCR. *Biomedicines*. 2021; 9(8):906. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080906>
117. Butler KS, Young MY, Li Z, Elespuru RK, Wood SC. Performance characteristics of the AmpliSeq Cancer Hotspot panel v2 in combination with the Ion Torrent Next Generation Sequencing Personal Genome Machine. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;74:178-186. doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.011
118. Heredia-Soto V, Rodríguez-Salas N, Feliu J. Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer: Are We Ready to Apply It in the Clinical Practice?. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1986. Published 2021 Apr 20. doi:10.3390/cancers13081986
119. Liu X, Liu L, Ji Y, et al. Enrichment of short mutant cell-free DNA fragments enhanced detection of pancreatic cancer. *EBioMedicine*. 2019;41:345-356. doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.010

120. Zarkavelis G, Kotoula V, Kolliou GA, et al. Genetic mapping of pancreatic cancer by targeted next-generation sequencing in a cohort of patients managed with nab-paclitaxel-based chemotherapy or agents targeting the EGFR axis: a retrospective analysis of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *ESMO Open*. 2019;4(5):e000525. Published 2019 Sep 18. doi:10.1136/esmoopen-2019-000525
121. Uesato Y, Sasahira N, Ozaka M, Sasaki T, Takatsuki M, Zembutsu H. Evaluation of circulating tumor DNA as a biomarker in pancreatic cancer with liver metastasis. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235623. Published 2020 Jul 2. doi:10.1371/journal.pone.0235623
122. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, et al. Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):349. Published 2021 Feb 27. doi:10.3390/genes12030349
123. Hayashi A, Hong J, Iacobuzio-Donahue CA. The pancreatic cancer genome revisited. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(7):469-481. doi:10.1038/s41575-021-00463-z
124. De Mattos-Arruda L, Siravegna G. How to use liquid biopsies to treat patients with cancer. *ESMO Open*. 2021;6(2):100060. doi:10.1016/j.esmoop.2021.100060
125. Ana Giménez-Capitán, Jillian Bracht, Juan José García, Núria Jordana-Ariza, Beatriz García, Mónica Garzón, Clara Mayo-de-las-Casas, Santiago Viteri-Ramirez, Alejandro Martinez-Bueno, Andrés Aguilar, Ivana-Gabriela Sullivan, Eric Johnson, Chung-Ying Huang, Jay L Gerlach, Sarah Warren, Joseph M Beechem, Cristina Teixidó, Rafael Rosell, Noemí Reguart, Miguel A Molina-Vila, Multiplex Detection of Clinically Relevant Mutations in Liquid Biopsies of Cancer Patients Using a Hybridization-Based Platform, *Clinical Chemistry*, Volume 67, Issue 3, March 2021, Pages 554–563
126. Cheng H, Liu C, Jiang J, et al. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int J Cancer*. 2017;140(10):2344-2350. doi:10.1002/ijc.30650
127. Zhu Y, Zhang H, Chen N, Hao J, Jin H, Ma X. Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jan;99(3):e18581. doi: 10.1097/MD.00000000000018581. PMID: 32011436; PMCID: PMC7220382.
128. de Albuquerque A, Kubisch I, Breier G, et al. Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: a feasibility study. *Oncology*. 2012;82(1):3-10. doi:10.1159/000335479
129. Sausen M, Phallen J, Adleff V, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun*. 2015;6:7686. Published 2015 Jul 7. doi:10.1038/ncomms8686

130. Kamyabi N, Bernard V, Maitra A. Liquid biopsies in pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2019;19(10):869-878. doi:10.1080/14737140.2019.1670063
131. Hou J, Li X, Xie KP. Coupled liquid biopsy and bioinformatics for pancreatic cancer early detection and precision prognostication. *Mol Cancer.* 2021;20(1):34. Published 2021 Feb 16. doi:10.1186/s12943-021-01309-7
132. Deger T, Boers RG, de Weerd V, et al. High-throughput and affordable genome-wide methylation profiling of circulating cell-free DNA by methylated DNA sequencing (MeD-seq) of LpnPI digested fragments. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):196. Published 2021 Oct 20. doi:10.1186/s13148-021-01177-4
133. Samandari M, Julia MG, Rice A, Chronopoulos A, Del Rio Hernandez AE. Liquid biopsies for management of pancreatic cancer. *Transl Res.* 2018;201:98-127. doi:10.1016/j.trsl.2018.07.008
134. <https://www.atcc.org/products/tcp-2060>
135. Yin L, Wei J, Lu Z, et al. Prevalence of Germline Sequence Variations Among Patients With Pancreatic Cancer in China. *JAMA Netw Open.* 2022;5(2):e2148721. Published 2022 Feb 1. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.48721
136. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>
137. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. (2007) Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007 Apr;33(3):266-70
138. Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, et al. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med* 2009;6(4):e1000046
139. Jamieson NB, Carter CR, McKay CJ, Oien KA. (2011) Tissue biomarkers for prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *ClinCancerRes.* 2011 May 15;17(10):3316-31
140. Lundin J, Roberts PJ, Kuusela P, Haglund C. (1995) Prognostic significance of serum CA 242 in pancreatic cancer. A comparison with CA 19-9. *Anticancer Res.* 1995 Sep-Oct;15(5B):2181-6
141. Slesak B, Harlozinska-Szmyrka A, Knast W, Sedlaczek P, van Dalen A, Einarsson R. (2000) Tissue polypeptide specific antigen (TPS), a marker for differentiation between
142. Gonzalo-Marin J, Vila JJ, Perez-Miranda M. Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6(9):360-368. doi:10.4251/wjgo.v6.i9.360

143. Hartwig W, Hackert T, Hinz U, et al. Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. *Ann Surg.* 2011;254(2):311-319. doi:10.1097/SLA.0b013e31821fd334
144. Kang H, Kim SS, Sung MJ, et al. Evaluation of the 8th Edition AJCC Staging System for the Clinical Staging of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(19):4672. Published 2022 Sep 26. doi:10.3390/cancers14194672
145. Arvind Rishi, Michael Goggins, Laura D. Wood, Ralph H. Hruban, Pathological and Molecular Evaluation of Pancreatic Neoplasms, *Seminars in Oncology*, Volume 42, Issue 1, 2015, Pages 28-39, ISSN 0093-7754
146. Egal A, Cros J, Svrcek M, et al. Prognostic factors of acinar cell carcinomas. *Pancreas.* 2019;48(10):1393-1396.
147. Pavel M, Oberg K, Falconi M, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;31(7):844-860.
148. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN clinical practice guidelines in oncology. Available at: <https://www.nccn.org/> (Accessed on February 5, 2024).
149. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol.* 2015;44(1):186-198.
150. Yu J, Yang X, He W, et al. Burden of pancreatic cancer along with attributable risk factors in Europe between 1990 and 2019, and projections until 2039. *Int J Cancer.* 2021;149(5):993-1001.
151. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(12):1200-1210.
152. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA.* 2013;310(14):1473-1481.
153. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, openlabel, randomised, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;389(10073):1011-1024.
154. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(25): 2395-2406.

155. Conroy T, Castan F, Lopez A, et al. Five-year outcomes of FOLFIRINOX vs gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2022;8(11):1571-1578.
156. Versteijne E, Suker M, Groothuis K, et al. Preoperative chemoradiotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer: results of the Dutch randomized phase III PREOPANC trial. *J Clin Oncol.* 2020;38(16):1763-1773.
157. Ghaneh P, Palmer D, Cicconi S, et al. Immediate surgery compared with short-course neoadjuvant gemcitabine plus capecitabine, FOLFIRINOX, or chemoradiotherapy in patients with borderline resectable pancreatic cancer (ESPAC5): a four-arm, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2023;8(2):157-168.
158. Katz MHG, Shi Q, Meyers J, et al. Efficacy of preoperative mFOLFIRINOX vs mFOLFIRINOX plus hypofractionated radiotherapy for borderline resectable adenocarcinoma of the pancreas: the A021501 phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2022;8(9): 1263-1270.
159. Suker M, Beumer BR, Sadot E, et al. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):801-810.
160. Van Laethem J-L. Induction chemotherapy in borderline (non-) resectable pancreatic cancer: a unique window of opportunity for understanding pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2019;106:34-36.
161. Pietrasz D., Pecuchet N., Garlan F., Didelot A., Dubreuil O., Doat S., Imbert-Bismut F., Karoui M., Vaillant J.C., Taly V., et al. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2017;23:116–123. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0806.
162. Bernard V., Kim D.U., San Lucas F.A., Castillo J., Allenson K., Mulu F.C., Stephens B.M., Huang J., Semaan A., Guerrero P.A., et al. Circulating Nucleic Acids Are Associated with Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 2019;156:108–118.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2018.09.022.
163. Mohan S., Ayub M., Rothwell D.G., Gulati S., Kilerci B., Hollebecque A., Sun Leong H., Smith N.K., Sahoo S., Descamps T., et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies KRAS copy number gain and mutation as a novel prognostic marker in Pancreatic cancer. *Sci. Rep.* 2019;9:11610. doi: 10.1038/s41598-019-47489-7.

164. Toledano-Fonseca M., Cano M.T., Inga E., Rodriguez-Alonso R., Gomez-Espana M.A., Guil-Luna S., Mena-Osuna R., de la Haba-Rodriguez J.R., Rodriguez-Ariza A., Aranda E. Circulating Cell-Free DNA-Based Liquid Biopsy Markers for the Non-Invasive Prognosis and Monitoring of Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2020;12:1754. doi: 10.3390/cancers12071754.
165. Kim M.K., Woo S.M., Park B., Yoon K.A., Kim Y.H., Joo J., Lee W.J., Han S.S., Park S.J., Kong S.Y. Prognostic Implications of Multiplex Detection of KRAS Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Chem*. 2018;64:726–734. doi: 10.1373/clinchem.2017.283721.
166. Groot, V.P.; Mosier, S.; Javed, A.A.; Teinor, J.A.; Gemenetzis, G.; Ding, D.; Haley, L.M.; Yu, J.; Burkhart, R.A.; Hasanain, A.; et al. Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2019**, *25*, 4973–4984.
167. Lee, B.; Lipton, L.; Cohen, J.; Tie, J.; Javed, A.A.; Li, L.; Goldstein, D.; Burge, M.; Cooray, P.; Nagrial, A.; et al. Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2019**, *30*, 1472–1478.
168. Guo, S.; Shi, X.; Shen, J.; Gao, S.; Wang, H.; Shen, S.; Pan, Y.; Li, B.; Xu, X.; Shao, Z.; et al. Preoperative detection of KRAS G12D mutation in ctDNA is a powerful predictor for early recurrence of resectable PDAC patients. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 857–867.
169. Li, S.; Zhang, G.; Li, X.; Li, X.; Chen, X.; Xu, Y.; Ren, H. Role of the preoperative circulating tumor DNA KRAS mutation in patients with resectable pancreatic cancer. *Pharmacogenomics* **2021**, *22*, 657–667.
170. Sugimori, M.; Sugimori, K.; Tsuchiya, H.; Suzuki, Y.; Tsuyuki, S.; Kaneta, Y.; Hirotani, A.; Sanga, K.; Tozuka, Y.; Komiyama, S.; et al. Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 266–278.
171. Cheng, H.; Luo, G.; Jin, K.; Fan, Z.; Huang, Q.; Gong, Y.; Xu, J.; Yu, X.; Liu, C. Kras mutation correlating with circulating regulatory T cells predicts the prognosis of advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 2153–2159.
172. Strijker, M.; Soer, E.C.; de Pastena, M.; Creemers, A.; Balduzzi, A.; Beagan, J.J.; Busch, O.R.; van Delden, O.M.; Halfwerk, H.; van Hooft, J.E.; et al. Circulating tumor DNA quantity is related to tumor volume and both predict survival in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 1445–1456.

173. Wei, T.; Zhang, Q.; Li, X.; Su, W.; Li, G.; Ma, T.; Gao, S.; Lou, J.; Que, R.; Zheng, L.; et al. Monitoring Tumor Burden in Response to FOLFIRINOX Chemotherapy via Profiling Circulating Cell-Free DNA in Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 196–203.
174. Bachet, J.-B.; Blons, H.; Hammel, P.; Hariry, I.E.; Portales, F.; Mineur, L.; Metges, J.-P.; Mulot, C.; Bourreau, C.; Cain, J.; et al. Circulating Tumor DNA is Prognostic and Potentially Predictive of Eryaspase Efficacy in Second-line in Patients with Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2020**, *26*, 5208–5216
175. Bettgowda C., Sausen M., Leary R.J., Kinde I., Wang Y., Agrawal N., Bartlett B.R., Wang H., Lubner B., Alani R.M., et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2014;6:224. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
176. Fernandez-Lazaro D., Hernandez J.L.G., Garcia A.C., Castillo A.C.D., Hueso M.V., Cruz-Hernandez J.J. Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. *Diagnostics*. 2020;10:443. doi: 10.3390/diagnostics10070443.
177. Vietsch E.E., Graham G.T., McCutcheon J.N., Javadi A., Giaccone G., Marshall J.L., Wellstein A. Circulating cell-free DNA mutation patterns in early and late stage colon and pancreatic cancer. *Cancer Genet.* 2017;218–219:39–50. doi: 10.1016/j.cancergen.2017.08.006.
178. Luchini C., Veronese N., Nottegar A., Cappelletti V., Daidone M.G., Smith L., Parris C., Brosens L.A.A., Caruso M.G., Cheng L., et al. Liquid Biopsy as Surrogate for Tissue for Molecular Profiling in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis Towards Precision Medicine. *Cancers*. 2019;11:1152. doi: 10.3390/cancers11081152.
179. Makohon-Moore A.P., Zhang M., Reiter J.G., Bozic I., Allen B., Kundu D., Chatterjee K., Wong F., Jiao Y., Kohutek Z.A., et al. Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nat. Genet.* 2017;49:358–366. doi: 10.1038/ng.3764.
180. Connor A.A., Denroche R.E., Jang G.H., Lemire M., Zhang A., Chan-Seng-Yue M., Wilson G., Grant R.C., Merico D., Lungu I., et al. Integration of Genomic and Transcriptional Features in Pancreatic Cancer Reveals Increased Cell Cycle Progression in Metastases. *Cancer Cell.* 2019;35:267–282.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.12.010.
181. Kim, M.P.; Li, X.; Deng, J.; Zhang, Y.; Dai, B.; Allton, K.L.; Hughes, T.G.; Siangco, C.; Augustine, J.J.; Kang, Y.; et al. Oncogenic KRAS Recruits an Expansive Transcriptional

- Network through Mutant p53 to Drive Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Discov.* 2021, 11, 2094–2111.
182. Heredia-Soto V, Rodríguez-Salas N, Feliu J. Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer: Are We Ready to Apply It in the Clinical Practice?. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1986. Published 2021 Apr 20. doi:10.3390/cancers13081986
 183. Munnings R, Gibbs P, Lee B. Evolution of Liquid Biopsies for Detecting Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2024; 16(19):3335. <https://doi.org/10.3390/cancers16193335>
 184. Ipsen Biopharmaceuticals Canada Inc. ONIVYDE® product monograph. Mississauga, Ontario; 17 August 2023
 185. Merrimack Pharmaceuticals Inc. ONIVYDE® prescribing information. Cambridge, Massachusetts, USA; 13 February 2024
 186. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387(10018):545-557.
 187. de la Fouchardiere C, Malka D, Chabaud S, et al. LBA60 Evaluation of gemcitabine and paclitaxel versus gemcitabine alone after FOLFIRINOX failure or intolerance in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: results of the randomized phase III PRODIGE 65-UCGI 36- GEMPAX UNICANCER study. *Ann Oncol*. 2022;33:S1426.
 188. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE, Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 1994;8(1):27.
 189. Zhen DB, Rabe KG, Gallinger S, Syngal S, Schwartz AG, Goggins MG, Hruban RH, Cote ML, McWilliams RR, Roberts NJ, Cannon-Albright LA, Li D, Moyes K, Wenstrup RJ, Hartman AR, Seminara D, Klein AP, Petersen GM BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study. *Genet Med*. 2015 Jul;17(7):569-77. Epub 2014 Nov 20.
 190. Kimura H, Klein AP, Hruban RH, Roberts NJ The Role of Inherited Pathogenic CDKN2A Variants in Susceptibility to Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2021;50(8):1123.
 191. Mavrakis KJ, McDonald ER 3rd, Schlabach MR, Billy E, Hoffman GR, deWeck A, Ruddy DA, Venkatesan K, Yu J, McAllister G, Stump M, deBeaumont R, Ho S, Yue Y, Liu Y, Yan-Neale Y, Yang G, Lin F, Yin H, Gao H, Kipp DR, Zhao S, McNamara JT, Sprague ER, Zheng B, Lin Y, Cho YS, Gu J, Crawford K, Ciccone D, Vitari AC, Lai A, Capka V, Hurov K, Porter JA, Tallarico J, Mickanin C, Lees E, Pagliarini R, Keen N,

- Schmelzle T, Hofmann F, Stegmeier F, Sellers WR Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5. *Science*. 2016 Mar;351(6278):1208-13. Epub 2016 Feb 11.
192. Hu Q, Qin Y, Ji S, Shi X, Dai W, Fan G, Li S, Xu W, Liu W, Liu M, Zhang Z, Ye Z, Zhou Z, Yang J, Zhuo Q, Yu X, Li M, Xu X MTAP Deficiency-Induced Metabolic Reprogramming Creates a Vulnerability to Cotargeting De Novo Purine Synthesis and Glycolysis in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 2021;81(19):4964. Epub 2021 Aug 12.
 193. Humphris JL, Patch AM, Nones K, Bailey PJ, Johns AL, McKay S, Chang DK, Miller DK, Pajic M, Kassahn KS, Quinn MC, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Stone A, Wilson PJ, Anderson M, Fink JL, Holmes O, Kazakoff S, Leonard C, Newell F, Waddell N, Wood S, Mead RS, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Jones MD, Nagrial AM, Chin VT, Chantrill LA, Mawson A, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Rooman I, Giry-Laterriere M, Samra JS, Kench JG, Merrett ND, Toon CW, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, McKay CJ, Carter CR, Dickson EJ, Graham JS, Duthie F, Oien K, Hair J, Morton JP, Sansom OJ, Grützmann R, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Rusev B, Corbo V, Salvia R, Cataldo I, Tortora G, Tempero MA, Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Hofmann O, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Gill AJ, Pearson JV, Grimmond SM, Waddell N, Biankin AV, Hypermutation In Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 2017;152(1):68. Epub 2016 Nov 15.
 194. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S, Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA*. 2009;302(16):1790.
 195. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, Middha S, Hechtman J, Zehir A, Dubard-Gault M, Tran C, Stewart C, Sheehan M, Penson A, DeLair D, Yaeger R, Vijai J, Mukherjee S, Galle J, Dickson MA, Janjigian Y, O'Reilly EM, Segal N, Saltz LB, Reidy-Lagunes D, Varghese AM, Bajorin D, Carlo MI, Cadoo K, Walsh MF, Weiser M, Aguilar JG, Klimstra DS, Diaz LA Jr, Baselga J, Zhang L, Ladanyi M, Hyman DM, Solit DB, Robson ME, Taylor BS, Offit K, Berger MF, Stadler ZK, Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(4):286. Epub 2018 Oct 30.
 196. Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Hirakawa K, Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(8):2536.

197. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S, Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(3):247.
198. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA, Campa D, Grützmann R, Rehder H, Rothmund M, Schmiegel W, Neoptolemos JP, Bartsch DK, BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(3):214.
199. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL, Hopper JL, Nielsen HR, Lee A, Yang X, McGuffog L, Parsons MT, Andrulis IL, Arnold N, Belotti M, Borg Å, Buecher B, Buys SS, Caputo SM, Chung WK, Colas C, Colonna SV, Cook J, Daly MB, de la Hoya M, de Pauw A, Delhomelle H, Eason J, Engel C, Evans DG, Faust U, Fehm TN, Fostira F, Fountzilas G, Frone M, Garcia-Barberan V, Garre P, Gauthier-Villars M, Gehrig A, Glendon G, Goldgar DE, Golmard L, Greene MH, Hahnen E, Hamann U, Hanson H, Hassan T, Hentschel J, Horvath J, Izatt L, Janavicius R, Jiao Y, John EM, Karlan BY, Kim SW, Konstantopoulou I, Kwong A, Laugé A, Lee JW, Lesueur F, Mebirouk N, Meindl A, Mouret-Fourme E, Musgrave H, Ngeow Yuen Yie J, Niederacher D, Park SK, Pedersen IS, Ramser J, Ramus SJ, Rantala J, Rashid MU, Reichl F, Ritter J, Rump A, Santamariña M, Saule C, Schmidt G, Schmutzler RK, Senter L, Shariff S, Singer CF, Southey MC, Stoppa-Lyonnet D, Sutter C, Tan Y, Teo SH, Terry MB, Thomassen M, Tischkowitz M, Toland AE, Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J Clin Oncol.* 2022;40(14):1529. Epub 2022 Jan 25.
200. Hu C, LaDuca H, Shimelis H, Polley EC, Lilyquist J, Hart SN, Na J, Thomas A, Lee KY, Davis BT, Black MH, Pesaran T, Goldgar DE, Dolinsky JS, Couch FJ, Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes. *JCO Precis Oncol.* 2018;2 Epub 2018 Jul 25.
201. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, Livingston DM, *Mol Cell.* 2006;22(6):719.
202. Slater EP, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, Habbe N, Neoptolemos JP, Greenhalf W, Bartsch DK, PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet.* 2010 Nov;78(5):490-4.
203. Yang X, Leslie G, Doroszuk A, Schneider S, Allen J, Decker B, Dunning AM, Redman J, Scarth J, Plaskocinska I, Luccarini C, Shah M, Pooley K, Dorling L, Lee A, Adank MA, Adlard J, Aittomäki K, Andrulis IL, Ang P, Barwell J, Bernstein JL, Bobolis K,

BorgÅ, Blomqvist C, Claes KBM, Concannon P, Cuggia A, Culver JO, Damiola F, de Pauw A, Diez O, Dolinsky JS, Domchek SM, Engel C, Evans DG, Fostira F, Garber J, Golmard L, Goode EL, Gruber SB, Hahnen E, Hake C, Heikkinen T, Hurley JE, Janavicius R, Kleibl Z, Kleiblova P, Konstantopoulou I, Kvist A, Laduca H, Lee ASG, Lesueur F, Maher ER, Mannermaa A, Manoukian S, McFarland R, McKinnon W, Meindl A, Metcalfe K, Mohd Taib NA, Moilanen J, Nathanson KL, Neuhausen S, Ng PS, Nguyen-Dumont T, Nielsen SM, Obermair F, Offit K, Olopade OI, Ottini L, Penkert J, Pylkäs K, Radice P, Ramus SJ, Rudaitis V, Side L, Silva-Smith R, Silvestri V, Skytte AB, Slavin T, Soukupova J, Tondini C, Trainer AH, Unzeitig G, Usha L, van Overeem Hansen T, Whitworth J, Wood M, Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol*. 2020;38(7):674. Epub 2019 Dec 16.

204. Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Jesus-Acosta A, Jones S, Maitra A, Hruban RH, Eshleman JR, Klein A, Laheru D, Donehower R, Hidalgo M, Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(1):3. Epub 2010 Dec 6.
205. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M, Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*. 1998;18(1):38.
206. Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol*. 1999;154(6):1835.
207. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JAVery high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1447.
208. Sato N, Rosty C, Jansen M, Fukushima N, Ueki T, Yeo CJ, Cameron JL, Iacobuzio-Donahue CA, Hruban RH, Goggins M, STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene inactivation in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2017.
209. Park W, Chen J, Chou JF, Varghese AM, Yu KH, Wong W, Capanu M, Balachandran V, McIntyre CA, El Dika I, Khalil DN, Harding JJ, Ghalehsari N, McKinnell Z, Chalasani SB, Makarov V, Selenica P, Pei X, Lecomte N, Kelsen DP, Abou-Alfa GK, Robson ME, Zhang L, Berger MF, Schultz N, Chan TA, Powell SN, Reis-Filho JS, Iacobuzio-

- Donahue CA, Riaz N, O'Reilly EM, Genomic Methods Identify Homologous Recombination Deficiency in Pancreas Adenocarcinoma and Optimize Treatment Selection. *Clin Cancer Res.* 2020;26(13):3239. Epub 2020 May 22.
210. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 8th edition: John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2017.
211. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer.* 1983; 51:2116–20.
212. Waters AM, Der CJ. KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* (2018) 8:a031435. doi: 10.1101/cshperspect.a031435
213. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2020) 17:153–68. doi: 10.1038/s41575-019-0245-4
214. Guo S, Shi X, Shen J, Gao S, Wang H, Shen S, et al. Preoperative detection of KRAS G12D mutation in ctDNA is a powerful predictor for early recurrence of resectable PDAC patients. *Br J Cancer.* (2020) 122:857– 67. doi: 10.1038/s41416-019-0704-2
215. Däbritz J, Preston R, Hänfler J, Oettle H. K-ras mutations in the plasma correspond to computed tomographic findings in patients with pancreatic cancer. *Pancreas.* 2012;41:323-325.
216. Takai E, Yachida S. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(38): 8480-8488
217. Chen H, Tu H, Meng ZQ, Chen Z, Wang P, Liu LM. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2010;36:657-662.
218. Tjensvoll K, Lapin M, Buhl T, Oltedal S, Steen-Ottosen Berry K, Gilje B, Søreide JA, Javle M, Nordgård O, Smaaland R. Clinical relevance of circulating KRAS mutated DNA in plasma from patients with advanced pancreatic cancer. *Mol Oncol.* 2016;10:635-643.
219. Gonzalez RS. WHO classification. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/pancreaswho.html>. Accessed February 9th, 2025.
220. Sorenson, G., Communication at the XXVth Anniversary Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Montreux, Switzerland, September, 1997.

221. Kim H, Park KU. Clinical Circulating Tumor DNA Testing for Precision Oncology. *Cancer Res Treat.* 2023 Apr;55(2):351-366. doi: 10.4143/crt.2022.1026. PMID: 36915242; PMCID: PMC10101787.
222. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001;313:139–42. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00665-9.
223. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998;17:89–97.
224. Anker P, Stroun M, Maurice P. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res* 1975;35:2375–82.
225. Chan HT, Chin YM, Nakamura Y, Low SK. Clonal Hematopoiesis in Liquid Biopsy: From Biological Noise to Valuable Clinical Implications. *Cancers (Basel).* 2020 Aug 14;12(8):2277. doi: 10.3390/cancers12082277. PMID: 32823942; PMCID: PMC7463455.
226. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* (2014) 371:2488–98. doi: 10.1056/NEJMoa1408617
227. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res.* (2018) 24:4437–43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0143
228. Croitoru Vlad M. , Cazacu Irina M. , Popescu Ionut , Paul Doru , Dima Simona Olimpia , Croitoru Adina Emilia , Tanase Alina Daniela, Clonal Hematopoiesis and Liquid Biopsy in Gastrointestinal Cancers, *Frontiers in Medicine*, Volume 8 - 2021 (2022), DOI=10.3389/fmed.2021.772166
229. Ptashkin RN, Mandelker DL, Coombs CC, Bolton K, Yelskaya Z, Hyman DM, et al. Prevalence of clonal hematopoiesis mutations in tumor-only clinical genomic profiling of solid tumors. *JAMA Oncology.* (2018) 4:1589–93. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2297
230. Fernandez-Cuesta L, Perdomo S, Avogbe PH, Leblay N, Delhomme TM, Gaborieau V, et al. Identification of circulating tumor DNA for the early detection of small-cell lung cancer. *EBioMedicine.* (2016) 10:117–23. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.032
231. Razavi P, Li BT, Brown DN, Jung B, Hubbell E, Shen R, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med.* (2019) 25:1928–37. doi: 10.1038/s41591-019-0652-7

