



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ
ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΕΙΞΗ
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

Βάια Γεωρβασίλη

Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2025



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ
ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΕΙΞΗ
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

Βάια Γεωρβασίλη

Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2025

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

*Στην οικογένειά μου,
ιδίως στα παιδιά μου Θωμά και Κωνσταντίνο.*

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γεωρβασίλη Βάϊας: 07-02-2017

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 798α/06-06-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Μπαλή Χριστίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

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

Μήτσης Μιχαήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-06-2017

«Ο ρόλος της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη του ορθοκολικού καρκίνου και στην ανάδειξη προγνωστικών παραγόντων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1125α/03-12-2024

1. Μπαλή Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μήτσης Μιχαήλ, Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Βλάχος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μπαλταγιάννης Γεράσιμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Λιανός Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-02-2025

Ιωάννινα 09-05-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Αικατερίνη Λαγού

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες η αρχή της διατήρησης των οργάνων στη χειρουργική ογκολογία αποκτά όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον στη διεθνή βιβλιογραφία σε μια προσπάθεια βελτίωσης της ποιότητας ζωής των ασθενών χωρίς ωστόσο να υπονομεύεται το τελικό ογκολογικό αποτέλεσμα. Πρόσφατα, έχει αρχίσει να εφαρμόζεται και σε όγκους του ορθού. Νέες μελέτες έρχονται διαρκώς στο προσκήνιο, στις οποίες όλο και στενότερα όρια εκτομής, φαίνεται να παρέχουν τα ίδια ογκολογικά αποτελέσματα δίνοντας τη δυνατότητα για διατήρηση του πρωκτού σε ολοένα και περισσότερους ασθενείς. Επιπλέον, ο ορθοκολικός καρκίνος εμφανίζει μια σταθερά αυξανόμενη επίπτωση με τη μέση ηλικία των ασθενών να μειώνεται στο πέρας των ετών. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη του πρωτοποριακού “Ioannina Protocol” στο νοσοκομείο μας, αποτέλεσαν την έμπνευση για την έναρξη του παρόντος ερευνητικού πρωτοκόλλου 8 χρόνια πριν.

Η ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί για μένα ένα σημαντικό επιστημονικό και προσωπικό επίτευγμα, το οποίο δεν θα ήταν δυνατό χωρίς τη βοήθεια και την υποστήριξη πολλών ανθρώπων που συνέβαλαν καθοριστικά στη διαδρομή αυτή.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου, κυρία Χριστίνα Μπαλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψουμε μαζί, υπό την καθοδήγηση και τις εύστοχες ιδέες και παρατηρήσεις της, το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο από τη γέννηση ως το πέρας του. Εκτός από τη θέση του βασικού μου μέντορα στην τέχνη της χειρουργικής, της έρευνας και της συγγραφής, κατέχει και μια ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου καθώς χρόνια τώρα με τιμά με τη φιλία της. Κανένας λόγος, γραπτός ή προφορικός, δεν μπορεί να εκφράσει επαρκώς την ευγνωμοσύνη μου για όσα της χρωστάω.

Ευχαριστώ θερμά επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την κυρία Άννα Μπατιστάτου, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και τον κύριο Μιχάλη Μήτση, Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων για την πολύτιμη συνεισφορά τους, τις υποδείξεις τους και την υποστήριξή τους στην επίτευξη αυτής της έρευνας.

Αμέριστη ευγνωμοσύνη χρωστάω στους δύο βασικούς συντελεστές της μελέτης αυτής, τους κυρίους Γεώργιο Βαρθολομάτο, Βιοχημικό, Επικεφαλής της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του ΠΓΝΙ και Γεώργιο Μαρκόπουλο, Βιολόγο, Επιστημονικό Συνεργάτη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,

οι οποίοι αφιέρωσαν αμέτρητες ώρες από τον πολύτιμο χρόνο τους, για την μελέτη των δειγμάτων, την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη βοήθεια και καθοδήγησή μου στη συγγραφή των δημοσιεύσεων. Ο κύριος Βαρθολομάτος είναι ένας σπουδαίος ερευνητής, με διεθνή αναγνώριση, αποτελεί τον πρωτοπόρο της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής παγκοσμίως, αεικίνητος και ανήσυχος με πολλές καινοτόμες ιδέες και αστείρευτη όρεξη που κατάφερε να μυήσει πολλούς κλινικούς γιατρούς στη βασική έρευνα. Ο κύριος Μαρκόπουλος, ένας ευφυέστατος ερευνητής, πολυπράγμων και πολυτάλαντος με γνώσεις πέρα από το αντικείμενο της βιολογίας, δούλεψε εξ ολοκλήρου τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και συνέβαλε καθοριστικά στην συγγραφή των δημοσιεύσεων. Η συνεργασία μαζί τους αποτελεί μέγιστη τιμή και τύχη για μένα και αποτελεί ορόσημο στην επιστημονική μου πορεία. Η συμβολή τους δε χαρακτηρίζεται απλά πολύτιμη, αλλά καθοριστική στην ολοκλήρωση αυτού του πρωτοκόλλου.

Θεωρώ χρέος μου επίσης να ευχαριστήσω δύο σπουδαίους χειρουργούς και μέντορές μου, τους κυρίους Χρήστο Κάτσιο και Θωμά Μεσσήνη για την εμπιστοσύνη και τη συνεισφορά τους στη συλλογή δειγμάτων για τον εμπλουτισμό της μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό της Χειρουργικής Κλινικής, του Χειρουργείου και των Εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας και Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για τη συνεργασία και την ευκαιρία που μου παρείχαν να διεξαγάγω την έρευνά μου στο αντικείμενο αυτό. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κυρία Μαρίνα Τσιτσέ, γραμματέα της Ογκολογικής κλινικής, η οποία συνέβαλε πρακτικά στην συλλογή δεδομένων κατά την παρακολούθηση των ασθενών.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την αδιάκοπη στήριξη, την υπομονή και την ενθάρρυνση που μου προσέφεραν. Χωρίς τη δύναμη και την αγάπη τους, το έργο αυτό δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
A. ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	7
1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
1.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	8
2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ	12
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
2.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	12
2.3. ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	14
2.3.1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ	14
2.3.2. ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ (MSI)	16
2.3.3. Ο ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ CIMP (CpG island methylator phenotype)	17
2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	19
2.5. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	20
3. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	21
3.1. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	21
3.2. ΕΝΤΟΠΙΣΗ	23
3.3. ΆΛΛΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ	25
3.3.1. Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα.....	25
3.3.2. Μέγεθος	26
3.3.3. Βαθμός διαφοροποίησης (Tumor Grade).....	27
3.3.4. Λεμφαγγειακή Διήθηση (LVI).....	28
3.3.5. Περινευρική διήθηση (PNI).....	28
3.3.6. Tumor budding	29
3.3.7. Σύνολο των εξαιρεθέντων λεμφαδένων (Lymph node yield-LNY)	30

3.3.8.	Lymph node ratio (LNR)	31
3.3.9.	Διήθηση του κυκλοτερούς ορίου (CRM).....	32
3.4.	Μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες	33
3.4.1	Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI status)	33
3.4.2.	Τα γονίδια BRAF – KRAS.....	34
3.5.	Άλλοι υπό μελέτη μοριακοί βιοδείκτες.....	36
3.5.1	Γενικά	36
3.6.	Η αναγκαιότητα των βιοδεικτών στην αντιμετώπιση του ορθοκολικού καρκίνου	45
4.	ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	47
4.1.	Χειρουργική αντιμετώπιση.....	47
4.1.1.	Στο μη μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο.....	47
4.1.2.	Στη μεταστατική νόσο.....	52
4.2.	Χημειοθεραπεία	53
4.2.1.	Καρκίνος του κόλου και του ανώτερου ορθού	53
4.2.2.	Καρκίνος του μέσου και κατώτερου ορθού	56
4.3	Ακτινοθεραπεία	58
B.	ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	60
5.	Περιγραφή της μεθόδου	60
6.	Εφαρμογές.....	62
7.	Διεγχειρητική Κυτταρομετρία Ροής (intraoperative Flow Cytometry-iFC).....	66
Γ.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	73
8.	Ο ρόλος της ανευπλοειδίας στον ορθοκολικό καρκίνο (CRC)	73
9.	Ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells- CTCs)..	76
Δ.	ΣΚΟΠΟΣ	79
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	82
A.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	83
1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83

1.1.ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	83
1.2. ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	85
1.2.1 Διεγχειρητική Ανάλυση Περιεχομένου DNA	85
1.2.2. Υπολογισμός κυτταρομετρικών παραμέτρων και δεικτών	87
1.2.3. Ανάλυση δύο διαστάσεων για την ανάλυση των επιφανειακών δεικτών σε κύτταρα ορθοκολικού καρκίνου	87
1.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	88
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	91
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	120
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	123
ABSTRACT	125
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ.....	133
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	127

ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

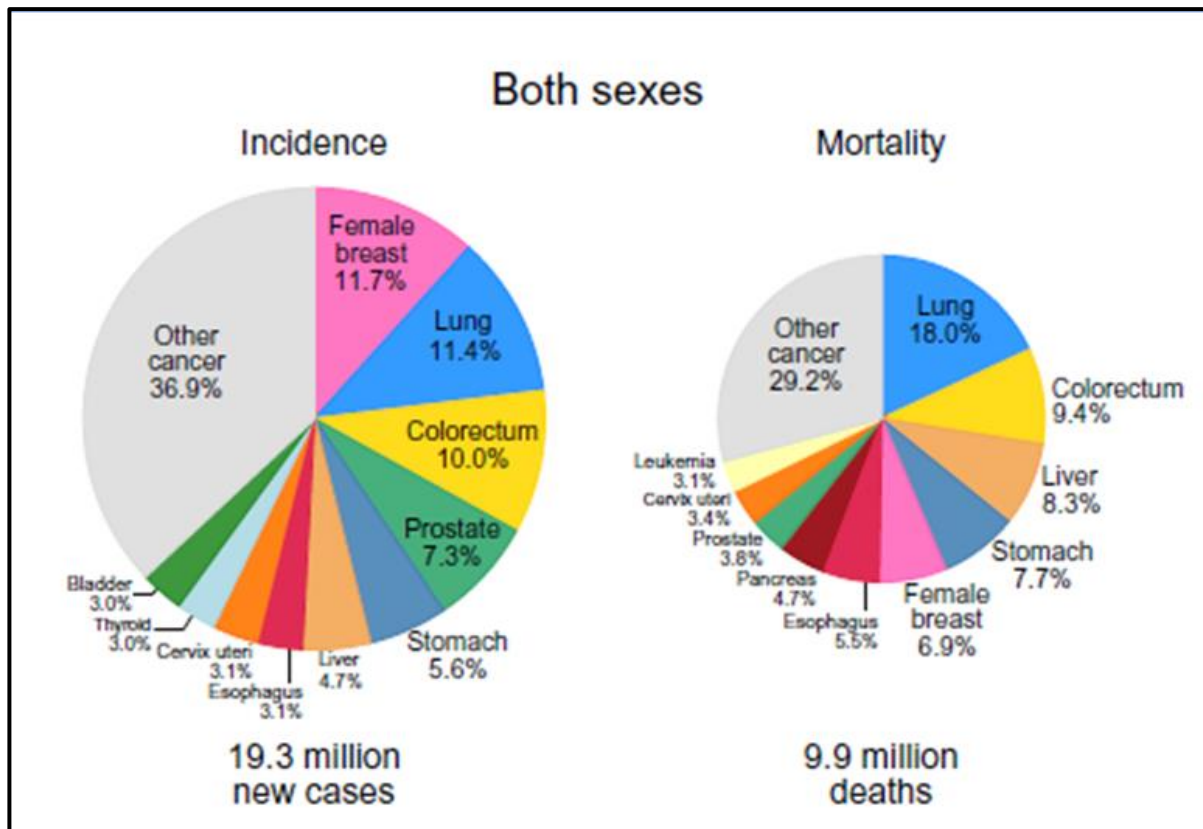
A. ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο ορθοκολικός καρκίνος (Colorectal Cancer- CRC) αποτελεί την τρίτη σε επίπτωση κακοήθεια παγκοσμίως και τη δεύτερη συχνότερη αιτία θνητότητας σχετιζόμενη με καρκίνο. Ο αριθμός των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο παγκοσμίως για το 2020 υπολογίζεται περί τα 1,9 εκατομμύρια με τους 935.000 από αυτούς να απεβίωσαν, αντιπροσωπεύοντας μία στις 10 περιπτώσεις κακοήθειας και θανάτου. (1) Η παγκόσμια επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου αναμένεται να αυξηθεί κατά 60%, με 2,2 εκατομμύρια νέα κρούσματα και 1,1 εκατομμύρια θανάτους έως το 2030. (2)

Η επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου αποτελεί δείκτη κοινωνικοοικονομικής ανάπτυξης και αυτό διαφαίνεται ξεκάθαρα στα σταθερά αυξανόμενα ποσοστά του στις χώρες που βρίσκονται σε μείζονα κοινωνικοοικονομική μετάβαση (Ανατολική Ευρώπη, Νοτιοανατολική και Κεντρική Ασία και Νότια Αμερική). Η επίπτωσή του είναι τετραπλάσια στον αναπτυγμένο κόσμο με τα υψηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται στις Ευρωπαϊκές χώρες, την Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία και τη Βόρεια Αμερική ενώ τα χαμηλότερα στις περισσότερες Αφρικανικές χώρες και την κεντρική και νότια Ασία. Οι λόγοι που δικαιολογούν αυτή την κατανομή αφορούν κυρίως τον τρόπο ζωής των πληθυσμών αυτών. (1)(3)

Στην Ελλάδα, ο ορθοκολικός καρκίνο αποτελεί τον τέταρτο πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες και το δεύτερο στις γυναίκες με 2.000 και 1.800 νέα περιστατικά ετησίως ανά φύλο. Η θνητότητα συγκριτικά με τα παγκόσμια δεδομένα, είναι σχετικά χαμηλή με 2.500 θανάτους ετησίως, που αντιστοιχεί σε περίπου 12 θανάτους ανά πληθυσμό 100.000 ατόμων και αναλογεί σε 9% των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο. (4)



Εικόνα 1. Η παγκόσμια κατανομή της επίπτωσης και των θανάτων των 10 συχνότερων νεοπλασμάτων για το έτος 2020. (1)

1.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Φυλή-εθνικότητα: Οι Αμερικανοί αφρικανικής καταγωγής έχουν υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου σε σχέση με τους Καυκάσιους, ενώ οι Λατίνοι φαίνεται να έχουν το μικρότερο κίνδυνο. (5)

Φύλο: Αναφορικά με το φύλο, οι άνδρες έχουν 1,5 φορά μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου. Στις γυναίκες ωστόσο, παρατηρούνται πιο συχνά νεοπλάσματα του δεξιού κόλου που σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση. (6)(3)

Ηλικία: Ο κίνδυνος εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου αυξάνει με την ηλικία. Πάνω από 90% των ασθενών με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών.(1)(7)

Κληρονομική προδιάθεση και μεταλλάξεις: Οι συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο έχουν 2-4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο. Περισσότεροι από 30% των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό πράγμα που υποδεικνύει

ότι υπάρχουν κληρονομικές μεταλλάξεις που δεν έχουν ακόμα εντοπισθεί.(8) Οι κληρονομικές μορφές ορθοκολικού καρκίνου αποτελούν 7-10% του συνόλου (πίνακας 1). (3)

Το σύνδρομο Lynch (hereditary non-polyposis colorectal cancer-HNPCC), είναι η πιο συχνή μορφή κληρονομικού ορθοκολικού καρκίνου με επίπτωση 2–4%. Τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη έχουν 20% πιθανότητα να νοσήσουν ως την ηλικία των 50 ετών και 50% πιθανότητα ως την ηλικία των 70 ετών. Έχουν επιπλέον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας και σε άλλα όργανα όπως ο οισοφάγος, το ενδομήτριο, το λεπτό έντερο, οι ωθήκες και ο στόμαχος. (3) Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial adenomatous polyposis-FAP) είναι η δεύτερη συχνότερη κληρονομική μορφή ορθοκολικού καρκίνου με επίπτωση 1%. Οι ασθενείς εμφανίζουν εκατοντάδες προκαρκινωματώδεις πολύποδες ως την ηλικία των 10–12 ετών και έχουν 100% πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου ως την ηλικία των 40 ετών. (3)

Πίνακας 1. Τα πιο συχνά κληρονομικά σύνδρομα ορθοκολικού καρκίνου (3)

Condition	Gene	Inheritance pattern
Familial adenomatous polyposis (FAP) (classic and attenuated FAP)	APC	Autosomal dominant
Gardner's syndrome (variant of FAP)	APC	Autosomal dominant
Turcot syndrome (variant of FAP)	APC, MLH1 or PMS2	Autosomal dominant or autosomal recessive
Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome (Lynch syndrome)	MLH1, MSH2, MSH6, EpCAM and PMS2	Autosomal dominant
MUTYH-associated polyposis (MAP)	MUTYH, APC	Autosomal recessive
Juvenile polyposis syndrome (JPS)	SMAD4 (MADH4), BMPR1A (ALK3)	Autosomal dominant
Peutz-Jeghers syndrome (PJS)	STK11 (LKB1)	Autosomal dominant
Polymerase proofreading-associated polyposis (PPAP)	POLE, POLD1	Autosomal dominant
PTEN hamartoma tumors syndrome (PHTS)	PTEN	Autosomal dominant
Cowden syndrome	PTEN	Autosomal dominant
Familial colorectal cancer type X	BRCA2, KRAS, APC, NTS, BRAF, BMPR1A, and RPS20	Autosomal dominant

Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου: Οι ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου έχουν διπλάσια πιθανότητα ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. (3) Ο κίνδυνος αυξάνει με τη διάρκεια της νόσου, τη σοβαρότητα και την έκταση της φλεγμονής καθώς και στο άρρεν φύλο. (9) Η ελκώδης κολίτιδα θεωρείται αυτοάνοσης αιτιολογίας φλεγμονή του παχέος εντέρου, η οποία προκαλεί έλκη, χωρίς να έχει τεκμηριωθεί το αίτιό της και εμφανίζει κληρονομικότητα. Η νόσος Crohn έχει επίσης αυτοάνοση αιτιολογία είναι μερικώς κληρονομική. Προσβάλλει το λεπτό και το παχύ έντερο προκαλώντας βαθύτερης έκτασης διατρίαινουσα φλεγμονή. (3) Σε κάποιες μελέτες, οι ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου συγκριτικά με αυτούς με ν. Crohn. (10)

Άλλοι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου είναι η ακτινοθεραπεία στην κοιλιά, η οποία διπλασιάζει τον κίνδυνο, η κυστική ίνωση με 10πλάσια επίπτωση ορθοκολικού καρκίνου σε αυτούς τους ασθενείς, η χολοκυστεκτομή, η οποία φαίνεται ότι αυξάνει το κίνδυνο καρκίνου στο εγγύς κόλον πιθανά λόγω της συνεχούς έκθεσης του βλεννογόνου στη χολή και η θεραπεία με αντιανδρογόνα. (3)

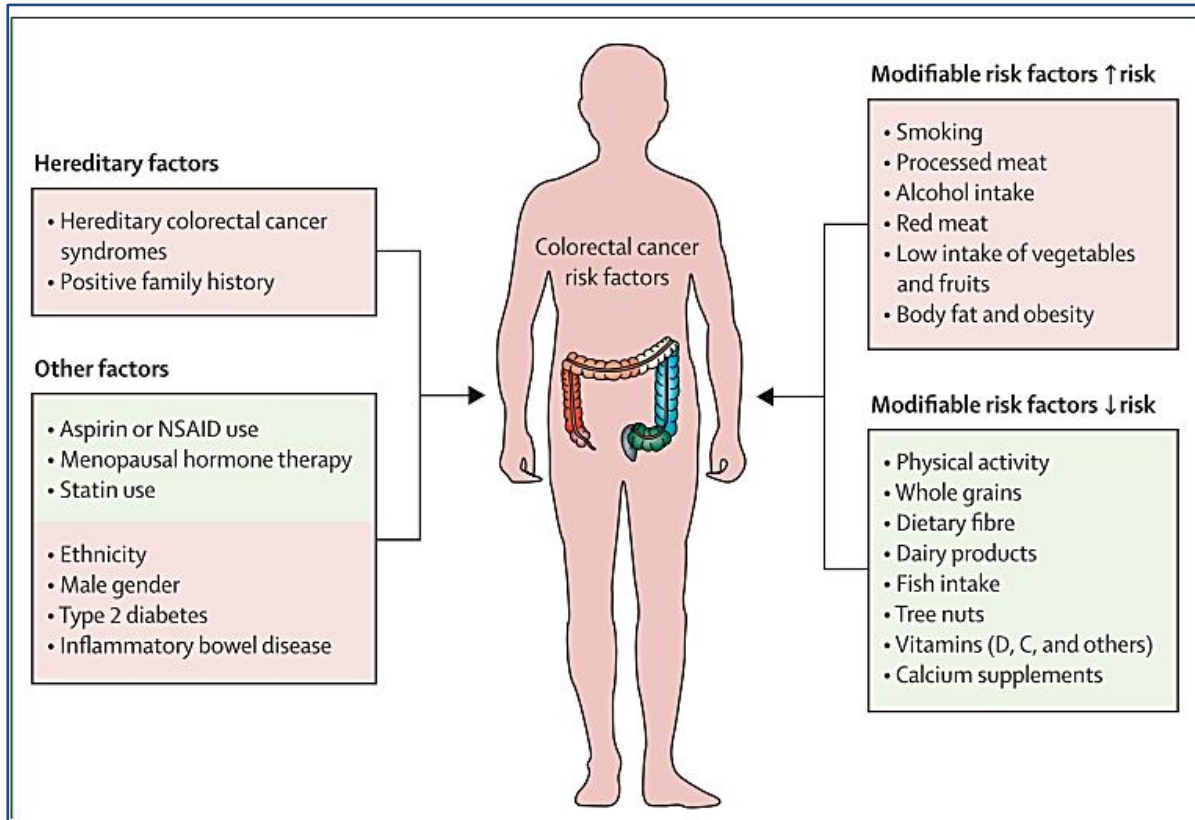
Η αυξημένη πρόσληψη ζωικής προέλευσης πρωτεϊνών και η κατανάλωση επεξεργασμένου και κόκκινου κρέατος, η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, η παχυσαρκία, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα αποτελούν γνωστούς τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου. Επιπλέον οι καπνιστές που νοσούν φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση. Αντιθέτως, επαρκής πρόσληψη φυτικών ινών και δημητριακών ολικής άλεσης, γαλακτοκομικών προϊόντων και συμπληρωμάτων ασβεστίου φαίνεται πως μειώνει τον κίνδυνο. (10)(3)

Φαρμακευτικές ουσίες: Η μακροχρόνια κατανάλωση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (ΜΣΑΦ) όπως η ασπιρίνη, φαίνεται ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης CRC. Επιπλέον οι ασθενείς με CRC, που βρίσκονται σε αγωγή με ασπιρίνη, έχουν λιγότερο επιθετικούς όγκους και καλύτερη πρόγνωση. (12) Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η λήψη διφωσφονικών (χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης) και η μακροχρόνια χρήση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE-I αντιυπερτασικό), μειώνει τον κίνδυνο. (3)

Ο διαβήτης τύπου II φαίνεται ότι αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου. (13)(14) Ο κίνδυνος για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου στους διαβητικούς ασθενείς είναι 27% μεγαλύτερος. (13) Η μετφορμίνη, ένα γνωστό

αντιδιαβητικό, φαίνεται ότι μειώνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου σε διαβητικούς ασθενείς. (3)

Στην εικόνα 2 συνοψίζονται οι τροποποιήσιμοι και μη παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση CRC. (14)



Εικόνα 2. Σύνοψη των τροποποιήσιμων και μη παραγόντων κινδύνου για ορθοκολικό καρκίνο (14)

2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

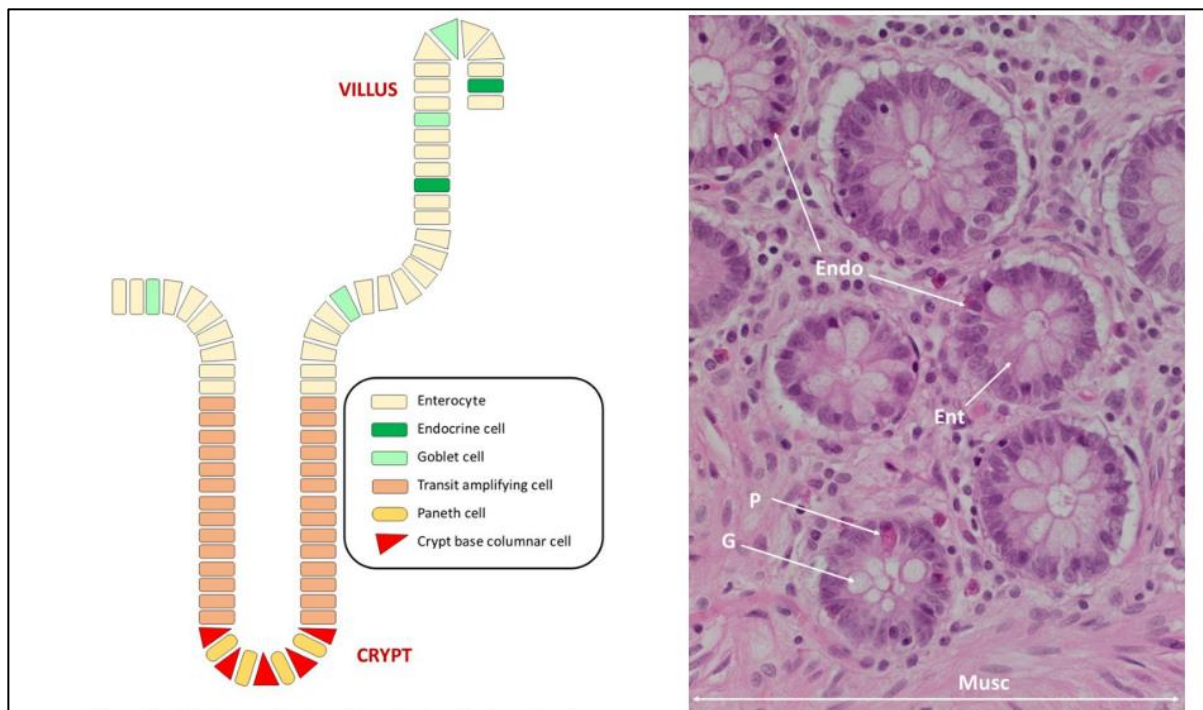
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καρκινογένεση στο παχύ έντερο αποτελεί εξελικτική διαδικασία και συνήθως ξεκινά με τον μη καρκινικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου που ονομάζονται πολύποδες. Οι πολύποδες που προέρχονται από τα αδενικά κύτταρα ονομάζονται αδενώματα. Η παραδοσιακή οδός αδενώματος-καρκινώματος θεωρείται υπεύθυνη για την ανάπτυξη του 70-90% των καρκίνων του παχέος εντέρου. Αυτός ο μετασχηματισμός συνήθως διαρκεί 10-15 χρόνια, γεγονός που επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση και αφαίρεση αυτών των προκαρκινικών ή πρώιμων κακοήθων βλαβών.⁽¹⁵⁾ Ο χρόνος για την εξέλιξη ποικίλλει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του πολύποδα. Τα χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου για ταχεία κακοήθη εξαλλαγή περιλαμβάνουν το μεγάλο μέγεθος (>1 cm σε διάμετρο), τα πολλαπλά αδενώματα (>3), η απουσία μίσχου, τα λαχνωτά αδενώματα και τα αδενώματα με υψηλού βαθμού δυσπλασία. Τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα (sessile serrated adenomas-SSA) παρουσιάζουν διακριτές μοριακές και παθολογικές αλλαγές που δεν παρατηρούνται συνήθως στα παραδοσιακά αδενώματα. Αυτές οι βλάβες εξελίσσονται σε καρκίνο μέσω μιας διαφορετικής οδού, της οδού της οδοντωτής νεοπλασίας (μονοπάτια CIMP).^(15,14) Αναλόγως της προέλευσης των μεταλλάξεων, ο ορθοκολικός καρκίνος ταξινομείται σε σποραδικό (70%), κληρονομικό (5%) και οικογενή (25%).⁽¹⁶⁾

2.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το εντερικό επιθήλιο σχηματίζει λάχνες και κρύπτες (του Lieberkühn) και αποτελείται από καλυκοειδή βλεννοπαραγωγά κύτταρα (goblet cells), υψηλά κυλινδρικά ή επιπολής απορροφητικά κύτταρα (εντεροκύτταρα), νευροενδοκρινικά κύτταρα και κύτταρα Paneth ⁽¹⁷⁾. Αναγεννητικά κύτταρα εντοπίζονται στο δεύτερο ήμισυ των κρυπτών του Lieberkühn και λειτουργούν ως πληθυσμός αρχέγονων βλαστοκυττάρων, τα οποία αντικαθιστούν το σύνολο του εντερικού επιθηλίου κάθε 4-6 ημέρες, δημιουργώντας νέες επιθηλιακές σειρές κατά την ανοδική κίνησή τους μέσα στην κρύπτη. ⁽¹⁸⁾ Αυτά τα βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να διαιρούνται ασύμμετρα, δημιουργώντας πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα και να διαφοροποιούνται σε εντεροκύτταρα, βλεννοπαραγωγά και νευροενδοκρινικά κύτταρα, καθώς και κύτταρα Paneth τα οποία επιστρέφουν στη βάση της κρύπτης.⁽¹⁷⁾ Οι 3 πρώτες σειρές φτάνουν στη κορυφή των λαχνών σε περίπου 14 ημέρες, όπου υφίστανται

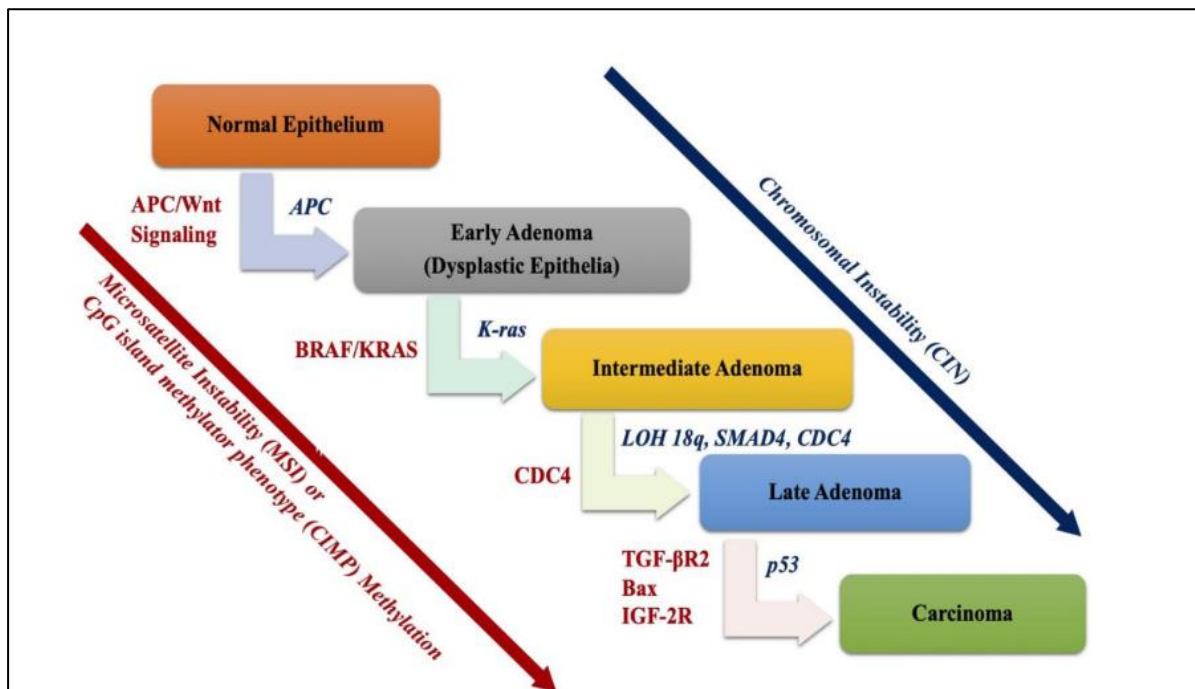
προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).(8) Η θεωρία των καρκινικών βλαστοκυττάρων αναφέρεται σε ένα υποπληθυσμό βλαστικών κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί εξαλλαγή με αποτέλεσμα να διαιρούνται ασύμμετρα παράγοντας διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα καθώς και πανομοιότυπα θυγατρικά, όπως συμβαίνει και με τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα. Τα πρώτα ωστόσο έχουν απωλέσει τον έλεγχο της αναπαραγωγής και της διαφοροποίησης καθώς και της απόπτωσης, γεγονός που οδηγεί σε καρκινογένεση.(18) Υπάρχουν δύο θεωρίες σχετικά με τη δημιουργία των καρκινικών βλαστοκυττάρων: η πρώτη είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων σε ένα φυσιολογικό ώριμο κύτταρο ή σε ένα βλαστοκύτταρο οι οποίες οδηγούν σε ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή τους, η δεύτερη αφορά κυτταρική αποδιαφοροποίηση σε κατάσταση που μοιάζει με τη βλαστική, η οποία σε ένα καρκινικό κύτταρο θα παράγει καρκινικά βλαστοκύτταρα. (17) Αυτή η διεργασία είναι αποτέλεσμα προοδευτικής συσσώρευσης γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων που αδρανοποιούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και ενεργοποιούν τα πρωτο-ογκογονίδια. (17, 19)



Εικόνα 3. Η κυτταρική οργάνωση του κολονικού επιθηλίου (αριστερά) και Μικροσκοπική απεικόνιση του κολονικού επιθηλίου (400x) με χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης όπου απεικονίζονται τα νευροενδοκρινικά κύτταρα (Endo), τα εντεροκύτταρα (Ent), τα κύτταρα Paneth (P), τα καλυκοειδή κύτταρα (G) και η βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα (Musc) (δεξιά)(17)

2.3. ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Τρία είναι τα κύρια μονοπάτια που εμπλέκονται στη γενετική αστάθεια και την παθογένεια του ορθοκολικού καρκίνου: η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN), η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και τα μονοπάτια CIMP (CpG island methylator phenotype). (8,15,16) Ένα ή περισσότερα μονοπάτια μπορεί να συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο. (8)

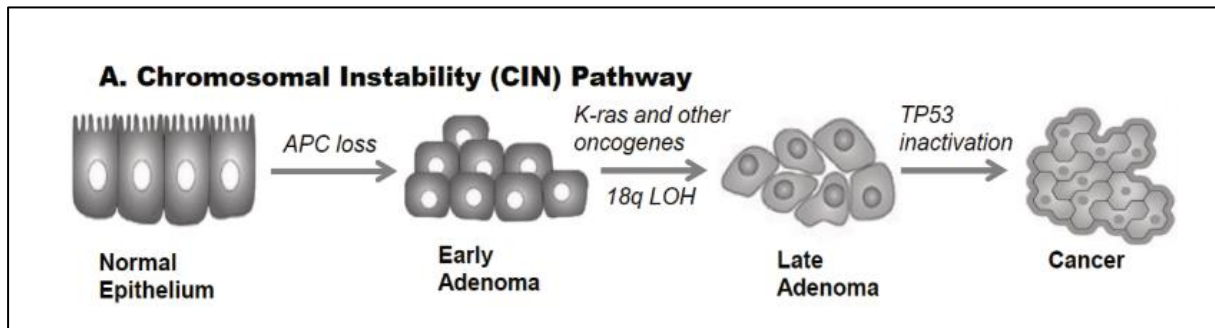


Εικόνα 4. Γενετικό μοντέλο πολλαπλών σταδίων στην παθογένεση του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου(16)

2.3.1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ

Η χρωμοσωμική αστάθεια αφορά μια σημαντική μεταβολή του αριθμού των αντιγράφων ενός χρωμοσώματος όπως και της δομής του. Είναι ο πιο συχνός μοριακός μηχανισμός στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και συναντάται στο 85% περίπου των σποραδικών αδενοκαρκινωμάτων. (16,20) Χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων KRAS και BRAF, την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων APC και TP53 και την απώλεια της ετεροζυγωτίας του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 18 (18q LOH). (8, 15,16,20-22) Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν γενετικές εκτροπές στο TGF-βR και το PI3KCA οι οποίες εμπλέκονται στο μοντέλο της καρκινογένεσης. Επιπλέον, με τις νεότερες τεχνικές αλληλούχησης, διαπιστώθηκαν μερικές συχνά επαναλαμβανόμενες απώλειες χρωμοσωμικών σκελών συγκεκριμένα των 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p, 22q. Από την άλλη πλευρά,

χρωμοσωμικές προθέσεις εντοπίστηκαν στο χρωμόσωμα 7 και στους χρωμοσωμικούς βραχίονες 1q, 8q, 12q, 13q και 20q. Η αλληλική απώλεια ή πρόθεση υλικού υποδηλώνει την παρουσία υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ογκογονιδίων, αντίστοιχα, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη μεταλλαγμένων κυττάρων, οδηγώντας σε μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. (16)



Εικόνα 5. Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας: οι μεταλλάξεις που προκαλούν την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το APC και την ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων όπως το KRAS οδηγούν σε κλωνική αναπαραγωγή των κυττάρων. Η επακόλουθη απώλεια της ετεροζυγωτίας του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 18 και η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 ενισχύουν τα αναπτυσσόμενα αυτά κύτταρα με επιπλέον δυνατότητες πολλαπλασιασμού οδηγώντας στην ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου. (22)

Το γονίδιο APC περιγράφεται ως «φρουρός» στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q και η απώλειά του οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/ β -canetin, ένα από τα πρώτα γεγονότα στη δημιουργία αδενωμάτων.(15) Μεταλλάξεις σε αυτό το μονοπάτι επιδρούν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την αγγειογένεση διαδραματίζοντας έτσι βασικό ρόλο τόσο στην έναρξη, όσο και στην εξέλιξη της καρκινογένεσης. (15, 21, 22)

Μεταλλάξεις στο πρωτοογκογονίδιο K-ras διαπιστώνονται σε 30-60% των σποραδικών ορθοκολικών καρκίνων και αδενωμάτων. (15) Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν συσσώρευση του ενεργού ισοτόπου της πρωτεΐνης RAS οδηγώντας στην επακόλουθη διαδοχική ενεργοποίηση των προ-πολλαπλασιαστικών μονοπατιών σηματοδότησης επιδρώντας ποικιλοτρόπως στην κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση, απόπτωση και τη φλεγμονή. (15,21,22)

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p και η αδρανοποίησή του οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (19,22)

Η απώλεια της ετεροζυγωτίας του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 18 (18q LOH) διαπιστώνεται στο 50-70% των σποραδικών ορθοκολικών καρκίνων και επιδρά σε πληθώρα ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Cables, DCC, Smad2, and Smad4). (15,22) Η απενεργοποίηση του SMAD4 ενεργοποιεί το μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα β (TGF- β) και φαίνεται να εντοπίζεται σε όγκους προχωρημένων σταδίων, ενώ αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών. (15, 22)

2.3.2. ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ (MSI)

Το δεύτερο γνωστό γονιδιωματικό μονοπάτι στη δημιουργία του ορθοκολικού καρκίνου είναι αυτό της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI). Μικροδορυφορική αστάθεια διαπιστώνεται σε περισσότερο από 95% των ασθενών με σύνδρομο Lynch (hereditary non-polyposis colorectal cancer-HNPCC), αποτελώντας βασικό χαρακτηριστικό του. Στους ασθενείς με σποραδικό ορθοκολικό καρκίνο, MSI διαπιστώνεται σε πολύ μικρότερο ποσοστό (15-20% του συνόλου των περιπτώσεων). (16,22)

Οι μικροδορυφόροι (Microsatellites ή Small Tandem Repeats-STRs) αποτελούν πανομοιότυπες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 1-6 ζευγών νουκλεοτιδίων, που εντοπίζονται στο σύνολο του γονιδιώματος (σε κωδικοποιούσες και μη κωδικοποιούσες περιοχές) και αποτελούν το 3% του συνολικού DNA. Λόγω της επαναλαμβανόμενης δομής τους είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στις μεταλλάξεις. (23)

Η μικροδορυφορική αστάθεια αντανακλά την αδυναμία του γονιδιακού συστήματος επιδιόρθωσης (Mismatch Repair-MMR) να αποκαταστήσει τις αναντιστοιχίες που προκύπτουν στα ζεύγη των νουκλεοτιδίων κατά το διπλασιασμό του DNA. (15,16,23) Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το MMR φυσιολογικά προσδένονται σε αυτές τις αναντιστοιχίες, αναγνωρίζουν τη φυσιολογική έλικα και ακολούθως αφαιρούν το λάθος νουκλεοτίδιο επιδιορθώνοντας την αναντιστοιχία. Η δυσλειτουργία του MMR οδηγεί σε συσσώρευση μεταλλάξεων μέσω προθέσεων ή διαγραφών στους μικροδορυφόρους που εντοπίζονται στις κωδικοποιούσες περιοχές του γενετικού υλικού οδηγώντας σε καρκινογένεση. (22)

Οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις των γονιδίων MMR που αφορούν τη βλαστική σειρά έχουν ως αποτέλεσμα το σύνδρομο Lynch (HNPCC). Ο σποραδικός ορθοκολικός καρκίνος προκύπτει από σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων του MMR με συχνότερη την υπερμεθυλίωση και αδρανοποίηση του MLH1. Τα υπόλοιπα μέλη του συστήματος MMR που έχουν ταυτοποιηθεί είναι τα γονίδια MSH2, MSH6, PMS2, MLH3, MSH3, PMS1 και Epc1.73. (15) Μεταλλάξεις στα

γονίδια MLH1 ή MSH2 έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου (70–80%) συγκριτικά με αυτές των γονιδίων MSH6 και PMS2 όπου ο κίνδυνος είναι σχετικά μικρότερος (25–60%). (16)

Στην πρώιμη φάση της καρκινογένεσης που σχετίζεται με την MSI, σημαντικό ρόλο παίζει η αδρανοποίηση του παραγώγου του γονιδίου APC.(22) Επιπλέον, μεταλλάξεις στην πολυαδενινική έλικα του γονιδίου του TGFbRII (Transforming growth factor b type II receptor) αναστέλλει την ογκοκατασταλτική του δράση και απαντάται στο 90% των MSI κολοορθικών καρκίνων. (15) Είναι πλέον γνωστό ότι στο σποραδικό ορθοκολικό καρκίνο το μονοπάτι της MSI αλληλεπιδρά με αυτό της οδοντωτής νεοπλασίας, ως εκ τούτου μεταλλάξεις στο BRAFV600E είναι συχνές. Στο σύνδρομο Lynch δεν απαντώνται μεταλλάξεις του BRAF. (15) (16) Οι όγκοι με αυξημένο MSI είναι συνήθως διπλοειδείς με μικρότερο ποσοστό απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH). Μεταλλάξεις των K-ras και p53 είναι σπανιότερες σε αυτούς τους όγκους.(15)

Το υποσύνολο των όγκων με ασταθείς περιοχές σε $\geq 30\%$ των δεικτών ορίζονται ως “Microsatellite high” (MSI-H), το υποσύνολο των όγκων με 10-20% ασταθείς περιοχές ορίζονται ως “Microsatellite low” (MSI-L), και οι όγκοι που δεν φέρουν δείκτες αστάθειας χαρακτηρίζονται “microsatellite stable” (MSS). (16) Οι σποραδικοί MSI-H όγκοι είναι πιο συχνοί σε ηλικιωμένες γυναίκες και εντοπίζονται κατά το πλείστον κοντά στη σπληνική καμπή ενώ ιστολογικά χαρακτηρίζονται από αυξημένη λεμφοκυτταρική διήθηση, βλεννώδες στοιχείο και κακή διαφοροποίηση. (15)

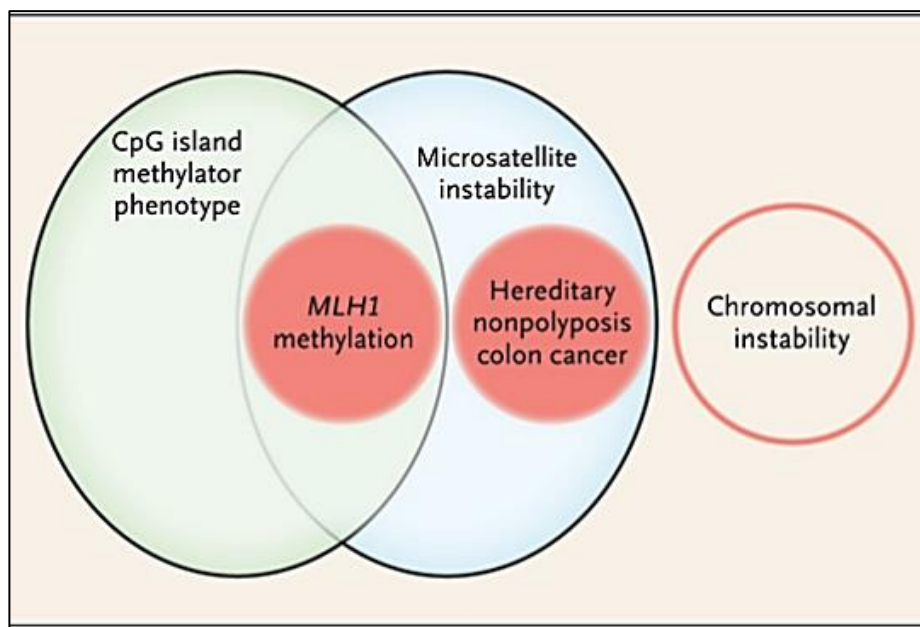
2.3.3. Ο ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ CIMP (CpG island methylator phenotype)

Επιγενετικές αλλοιώσεις είναι οι αλλαγές στην έκφραση ή τη λειτουργία των γονιδίων χωρίς αλλαγές στην αλληλούχησή τους. Στους ανθρώπους οι επιγενετικές αλλοιώσεις γίνονται συνήθως με τη μεθυλίωση του DNA ή μέσω των τροποίσεων των ιστονών. (24) Η μεθυλίωση του DNA συνήθως συμβαίνει στα νουκλεοτίδια 5'-CG-3' (CpG).(15) Η μεθυλίωση των εκκινητών των γονιδίων οδηγεί σε απενεργοποίηση των γονιδίων αποτελώντας έτσι έναν επιπλέον μηχανισμό απώλειας της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. (24)

Τα πιο γνωστά γονίδια που εμπλέκονται στη καρκινογένεση του παχέος εντέρου και απενεργοποιούνται με την υπερμεθυλίωση του DNA είναι τα APC, MCC, MLH1, MGMT SFRP1, SFRP2, CDKN2A, TIMP3, VIM, SEPT, CDH1 and HLTF.(16) Κλασσικό παράδειγμα αποτελεί η απενεργοποίηση του MLH1 από υπερμεθυλίωση στο σποραδικό MSI-H CRC.(15)

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με υπερμεθυλίωση αποτελούν το κάπνισμα και η προχωρημένη ηλικία.(15) Η εμφάνιση του φαινότυπου CIMP, προϋποθέτει την σύγχρονη υπερμεθυλίωση πολλαπλών γονιδίων και υποκατηγοριοποιείται περεταίρω βάσει του βαθμού της γενετικής και επιγενετικής αστάθειας σε CIMP2, CIMP-low και CIMP-high. (16)

Ο CIMP-high ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί το 15–20% των περιπτώσεων σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου και έχει διακριτά χαρακτηριστικά. Είναι συχνότερος στις γυναίκες, στους ηλικιωμένους ασθενείς και εντοπίζεται στο δεξιό κόλο.(15,16) Όσον αφορά τα παθολογοανατομικά τους χαρακτηριστικά είναι συνήθως βλενώδεις όγκοι, χαμηλής διαφοροποίησης ή με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, MSI-H και φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF*.(15,16) Οι όγκοι αυτοί φαίνεται πως έχουν κακή ανταπόκριση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες με βάση την 5-FU.(15) Οι πρόδρομες βλάβες των CIMP-High όγκων είναι τα *άμισχα οδοντωτά αδενώματα* που αφορούν το 9% των πολυπόδων του κόλου. Πρόκειται για επίπεδες, δυσδιάκριτες βλάβες που απαιτούν ιδιαίτερη επαγρύπνηση και ειδικές τεχνικές ώστε να μη διαλάθουν της προσοχής του ενδοσκόπου. (15,16)



Εικόνα 6. Τα μονοπάτια της γονιδιακής αστάθειας που οδηγούν στις ορθοκολικές νεοπλασίες και η αλληλοεπικαλυπτόμενη συσχέτισή τους (20)

2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Το 2015 ο Guinney και οι συνεργάτες του συγκέντρωσαν τα δεδομένα των βάσεων δεδομένων των γονιδιακών εκφράσεων 18 διαφορετικών ορθοκολικών καρκίνων και κατέληξαν στον ορισμό των μοριακών υποτύπων του ορθοκολικού καρκίνου (Consensus Molecular Subtypes-CMS): *CMS1 (MSI-immune)*, *CMS2 (canonical)*, *CMS3 (metabolic)*, and *CMS4 (mesenchymal)* (πίνακας 2). (25) Τα γονίδια ή τα μονοπάτια που εμπλέκονται είναι μοναδικά ανά υπότυπο. Οι όγκοι του δεξιού κόλου είναι συνήθως CMS1 ή CMS3 ενώ του αριστερού CMS2 ή CMS4. Η ταξινόμηση CMS μελετάται στις κλινικές δοκιμές ως ένας πολλά υποσχόμενος προγνωστικός δείκτης. (14)

Πίνακας 2. Τα χαρακτηριστικά των μοριακών υποτύπων του ορθοκολικού καρκίνου (Consensus Molecular Subtypes-CMS) (25)

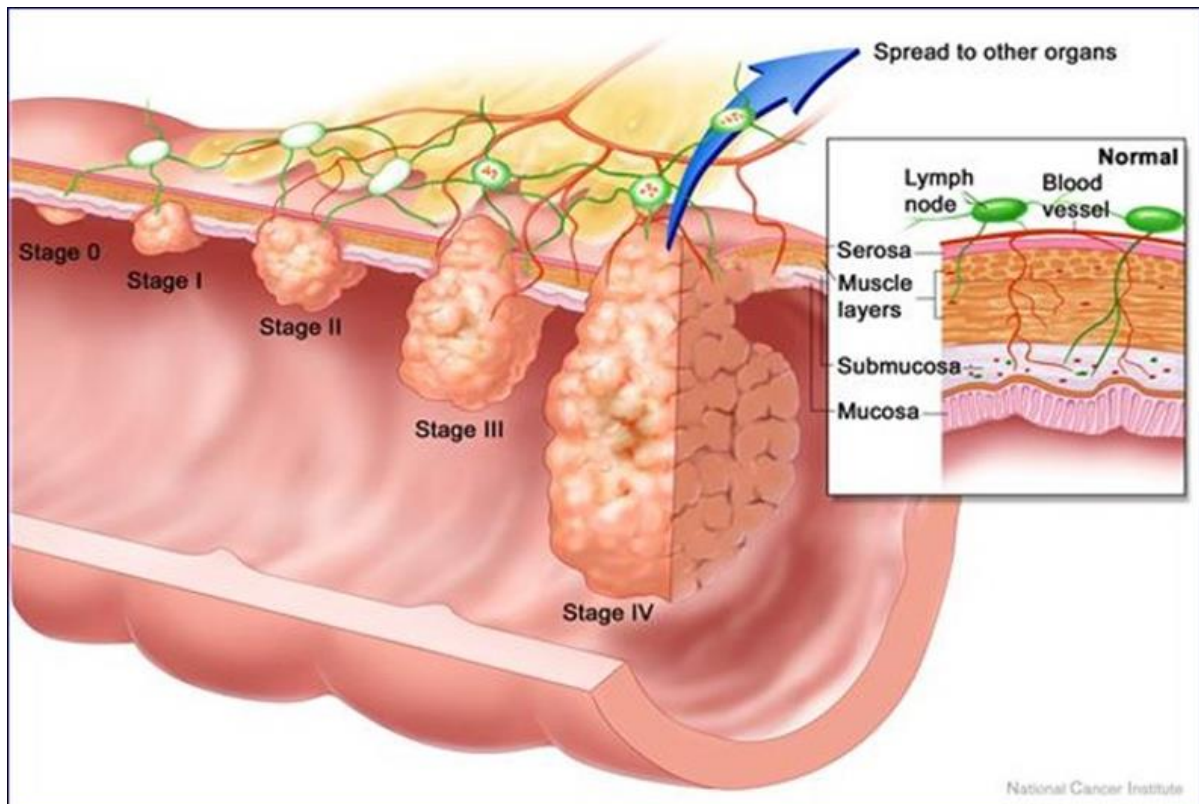
ΥΠΟΤΥΠΟΣ		ΜΟΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΠΡΟΓΝΩΣΗ
CMS1 (MSI-immune)	14%	Απορρύθμιση του MMR, MSI-High, αδρανοποίηση του MLH1 CIMP-high με συχνές μεταλλάξεις του BRAF Ανοσολογική διήθηση και ενεργοποίηση	Πολύ κακή πρόγνωση μετά από υποτροπή
CMS2 (canonical)	37%	Έκφραση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών (Wnt και MYC) Συχνή η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών και η υπερέκφραση των ογκογονιδίων	Καλύτερη επιβίωση μετά από υποτροπή συγκριτικά με τους λοιπούς υπότυπους
CMS3 (metabolic)	13%	Μεταβολική απορρύθμιση σε ποικιλία μονοπατιών Συχνές οι μεταλλάξεις του KRAS CIMP-low	Καλύτερη επιβίωση μετά από υποτροπή συγκριτικά με τους λοιπούς υπότυπους
CMS4 (mesenchymal)	23%	Ενεργοποίηση του TGF-β (Transforming growth factor-β) Υπερενεργοποίηση των γονιδίων EMT (Epithelial-Mesenchymal transition) Ενίσχυση της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν τη φλεγμονή, την αναδιαμόρφωση και διήθηση του στρώματος και την νεοαγγειογένεση.	Η χειρότερη επιβίωση και το μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής.

2.5. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο ορθοκολικός καρκίνος, όπως κάθε νεόπλασμα, αναπτύσσεται τοπικά και μεθίσταται σε όλο το σώμα. Η μετάσταση στον ορθοκολικό καρκίνο ξεκινά με τη διήθηση της υποβλεννογόνιας στιβάδας, η οποία είναι πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα ευνοώντας την αιματογενή διασπορά σε απομακρυσμένα όργανα (ήπαρ, πνεύμονες κλπ.) ή τη λεμφογενή διασπορά διαμέσου των επιχώριων λεμφαδένων. Άλλοι τρόποι μετάστασης του ορθοκολικού καρκίνου είναι μέσω της διήθησης του ορογόνου χιτώνα του εντέρου και της ανάπτυξης περιτοναϊκών εμφυτεύσεων καθώς και διαμέσου της ενδοαυλικής μετατόπισης βιώσιμων καρκινικών κυττάρων τα οποία δημιουργούν απομακρυσμένους όγκους στον αυλό του εντέρου ιδίως στα σημεία των αναστομώνσεων. Η διασπορά είναι ο κύριος λόγος αποτυχίας της θεραπείας και μείωσης της επιβίωσης στον ορθοκολικό καρκίνο. Για αυτούς τους λόγους η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην κατανόηση των οδών που οδηγούν στην μετάσταση. (23)

Η διαδικασία της διασποράς είναι περίπλοκη και εμπεριέχει πολλές τροποποιήσεις στο πρωτογενές σημείο της μετάστασης, στα ίδια τα κύτταρα που μεθίστανται (seed) καθώς και στο μικροπεριβάλλον που τα υποδέχεται (soil). Η διαδικασία της διήθησης και της μετάστασης ενεργοποιείται από επιγενετικούς μηχανισμούς που επηρεάζονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, σήματα προσκόλλησης από τα στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας, τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων, τα υδατοδιαλυτά σήματα, τις ανοσολογικές αντιδράσεις και το μικροβίωμα του όγκου. (23)

Τα σημεία των δευτεροπαθών εντοπίσεων δεν υποδέχονται τα μετασταστικά κύτταρα παθητικά. Στην πραγματικότητα, το μικροπεριβάλλον της μετάστασης προετοιμάζεται εκλεκτικά από τον πρωτοπαθή όγκο πριν ακόμα ξεκινήσει η διασπορά. Οι μεταστατικοί όγκοι αποτελούνται από μια ποικιλία κυττάρων που εμφανίζουν διαφορετικά γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η ετερογένεια προδιαθέτει σε υποτροπή και αντίσταση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. (23)



Εικόνα 7. Διασπορά του ορθοκολικού καρκίνου και στάδια (Διαθέσιμο στο: <https://www.nih.gov/research-training/advances-colorectal-cancer-research> [9/11/2024])

3. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

3.1. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο καθορισμός της τοπικής επέκτασης και της απομακρυσμένης διασποράς του CRC ονομάζεται σταδιοποίηση. Το πιο διαδεδομένο προγνωστικό σύστημα σταδιοποίησης είναι αυτό της *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* το οποίο εκτιμά 3 παραμέτρους: την έκταση του όγκου στο εντερικό τοίχωμα (T), την διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων (N) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M) (Πίνακας 3). (25,26) Δημιουργήθηκε αρχικά το 1968 και έκτοτε έχει καθιερωθεί στη βιβλιογραφία ως το βασικό εργαλείο που καθορίζει τη διαχείριση και την πρόγνωση στους ασθενείς με CRC.(25) Η 8^η έκδοση (2017) εμπεριέχει και άλλες παραμέτρους που επικουρούν στον καθορισμό του θεραπευτικού πλάνου όπως είναι τα προεγχειρητικά επίπεδα του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA), ο βαθμός ανταπόκρισης στην προεγχειρητική θεραπεία (tumor regression score-TRG), η λεμφαγγειακή και περινευρική διήθηση, το MSI και οι μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS/NRAS/BRAF. (26)

Η κλινική προεγχειρητική σταδιοποίηση στηρίζεται στην κλινική εξέταση και κυρίως στις απεικονιστικές μεθόδους όπως είναι η αξονική ή μαγνητική τομογραφία κοιλίας, θώρακα, πυέλου. Η οριστική και πιο ακριβής σταδιοποίηση πραγματοποιείται μετεγχειρητικά και βασίζεται στα μικροσκοπικά ευρήματα της παθολογοανατομικής έκθεσης, βάσει των οποίων οι ασθενείς σταδιοποιούνται σε 4 στάδια (πίνακας 4). Το στάδιο της νόσου εκτός από το βασικό εργαλείο στον καθορισμό του θεραπευτικού πλάνου, αποτελεί και το πιο ισχυρό προγνωστικό δείκτη ιδίως σε ασθενείς σταδίων I και IV. Ωστόσο, στους ασθενείς σταδίων II και III υπάρχει μεγάλη ετερογένεια ως προς την πρόγνωση και την επιβίωσή τους. (25)

Το προχωρημένο *στάδιο T* συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, μεγαλύτερη θνητότητα και μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής. Επιπλέον, έχει μεγαλύτερη επίπτωση λεμφαδενικών και απομακρυσμένων μεταστάσεων καθώς και αυξημένη πιθανότητα διάγνωσης σε επείγουσα βάση (λόγω διάτρησης ή απόφραξης). (25)

Το *στάδιο N* αφορά τη διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων και σχετίζεται με το *στάδιο T* καθώς και με το βαθμό διαφοροποίησης του πρωτοπαθούς όγκου. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών με λεμφαδενική επέκταση της νόσου κυμαίνεται στο 30-60% ενώ το ποσοστό των υποτροπών είναι 30-35% και συμβαίνει συνήθως την πρώτη 3ετία. Η λεμφαδενική διήθηση αποτελεί ένδειξη για χημειοθεραπεία λόγω της υψηλής πιθανότητας απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η επικουρική θεραπεία μειώνει τον κίνδυνο θανάτου κατά 10-20% και την πιθανότητα υποτροπής κατά 40% στους ασθενείς αυτούς. (25,26)

Το *στάδιο M* αφορά την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων και αποτελεί τον πιο ισχυρό προγνωστικό παράγοντα στον ορθοκολικό καρκίνο. 35-50% των ασθενών εμφανίζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά την αρχική διάγνωση. Σε αυτούς τους ασθενείς η χημειοθεραπεία χορηγείται κυρίως παρηγορητικά και φαίνεται πως αυξάνει τη μέση επιβίωση από 5 στους 18 μήνες (26).

Πίνακας 3. TMN σταδιοποίηση στον ορθοκολικό καρκίνο (26)

Primary tumor staging (T)		
•	Tx:	primary tumor cannot be assessed
•	T0:	no evidence of primary tumor
•	Tis:	carcinoma in situ
•	T1:	invasion into submucosa
•	T2:	invasion into muscularis propria
•	T3:	invasion of the subserosa or non-peritonealised pericolic tissues
•	T4	a: penetration of the visceral peritoneal layer b: penetration or adhesion to adjacent organs
Nodal status (N)		
•	Nx:	nodes cannot be assessed
•	N0:	no evidence of nodal involvement
•	N1	a: involvement of one regional node b: involvement of 2-3 regional nodes c: deposits involving serosa or non-peritonealised pericolic/perirectal tissues without regional nodal metastasis
•	N2	a: involvement of 4-6 nodes b: involvement of ≥ 7 nodes
Metastases (M)		
•	Mx:	presence of metastases cannot be assessed
•	M0:	no evidence of metastases
•	M1	a: distant metastases confined to one organ (e.g. liver, lung, ovary, non-regional node) b: distant metastases confined to more than one organ or to the peritoneum

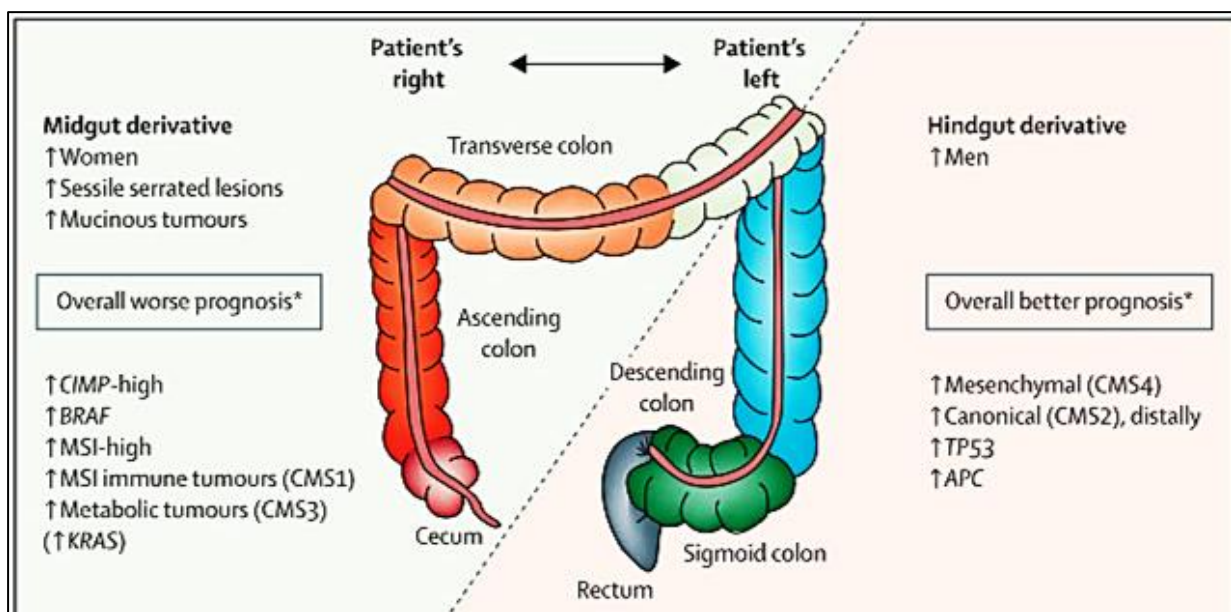
Πίνακας 4. Τα στάδια του ορθοκολικού καρκίνου και η αντίστοιχη 5-ετής επιβίωση (27)

Στάδια	TNM	5-ετής επιβίωση
0, I	Tis-T1, N0, M0	>90%
I	T2, N0, M0	80-85%
II	T3-4, N0, M0	70-75%
IIIα	T2, N1-3, M0	70-75%
IIIβ	T3, N1-3, M0	50-65%
IIIγ	T4, N1-2, M0	25-45%
IV	M1	<10%

3.2. ΕΝΤΟΠΙΣΗ

Ο δεξιός και αριστερός CRC έχουν διαφορετικό κλινικό και βιολογικό προφίλ. Εμβρυολογικά, το δεξί κόλο προέρχεται από το μέσο έντερο ενώ το αριστερό κόλο και το ορθό, από το οπίσθιο. Τα μονοπάτια της καρκινογένεσης είναι διαφορετικά για το δεξί και το αριστερό κόλο. (14,25)

Οι ασθενείς με όγκους του δεξιού κόλου είναι συχνότερα γυναίκες, με μεγαλύτερη μέση ηλικία κατά τη διάγνωση, έχουν συνήθως μικρότερο βαθμό διαφοροποίησης και πιο προχωρημένο στάδιο συγκριτικά με τους όγκους του αριστερού κόλου. Το μεταστατικό μοτίβο επίσης διαφέρει: οι όγκοι του δεξιού κόλου συχνά μεθίστανται στην περιτοναϊκή κοιλότητα ενώ μεγαλύτερο ποσοστό των όγκων του αριστερού κόλου μεθίστανται στο ήπαρ ή τους πνεύμονες. (14,25)



Εικόνα 8. Διαφορές μεταξύ του δεξιού και του αριστερού ορθοκολικού καρκίνου (14)

Δεν υπάρχει σαφής ορισμός του δεξιού και αριστερού κόλου στις μελέτες. Στις περισσότερες ως δεξί κόλο ορίζεται το τμήμα που εκτείνεται από το τυφλό ως τη σπληνική καμπή, ενώ σε άλλες μόνο το τυφλό και το ανιόν. (14,25)

Τα δεδομένα που καθιστούν τη δεξιά εντόπιση του ορθοκολικού καρκίνου ως κακό προγνωστικό παράγοντα, είναι πιο ισχυρά στη μεταστατική νόσο και αυτό πιθανά σχετίζεται με το γεγονός ότι η περιτοναϊκή μετάσταση, που είναι πιο συχνή στο δεξιό παχύ έντερο, αντιμετωπίζεται δυσκολότερα από την απομακρυσμένη ολιγομεταστατική νόσο. (14,25)

Στο μη μεταστατικό καρκίνο, τα δεδομένα της βιβλιογραφίας δείχνουν χειρότερη πρόγνωση και μικρότερη συνολική επιβίωση στους δεξιούς όγκους, κυρίως σταδίου III. Μελέτες έχουν δείξει χειρότερη συνολική επιβίωση στους τοπικά προχωρημένους και μεταστατικούς όγκους με μεταλλάξεις των KRAS/BRAF γονιδίων κυρίως λόγω της κακής τους ανταπόκρισης στις

θεραπείες με anti-EGFR και anti-VEGF παράγοντες . Οι μεταλλάξεις των γονιδίων BRAF/KRAS είναι πιο συχνές στο δεξί κόλο και αυτό εξηγεί μερικώς τη χειρότερη πρόγνωση στου ασθενείς με όγκους σταδίου III.(14,25)

Ωστόσο, οι όγκοι του δεξιού κόλου είναι συχνότερα MSI-H. Έτσι στα πρώιμα στάδια φαίνεται πως η επιβίωση είναι καλύτερη για όγκους του δεξιού κόλου λόγω της καλύτερης πρόγνωσης των MSI-H όγκων συνολικά και της μικρότερης πιθανότητας διασποράς τους. Επιπλέον, η δυνατότητα ανοσοθεραπείας στους όγκους αυτούς παρά την αντοχή τους στα χημειοθεραπευτικά, πιθανά θα αλλάξει στο μέλλον τα μοτίβα επιβίωσης και στα προχωρημένα στάδια. (14,25)

Συνοψίζοντας, η εντόπιση του όγκου αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα στους μεταστατικούς όγκους. Το NCCN (National Comprehensive Cancer Network) της Αμερικής προτείνει τη χορήγηση anti-EGFR χημειοθεραπευτικών σε όλους τους μεταστατικούς όγκους του αριστερού κόλου ενώ στους δεξιούς όγκους συστήνει τη χρήση τους μετά από εξατομίκευση. Η εντόπιση του όγκου, δεν αποτελεί επί του παρόντος μείζονα προγνωστικό παράγοντα στο μη μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο. (25)

3.3. Άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν την πρόγνωση

3.3.1. Βλεννώδες αδеноκαρκίνωμα

Το βλεννώδες αδеноκαρκίνωμα αποτελεί ένα ξεχωριστό υπότυπο του ορθοκολικού καρκίνου και χαρακτηρίζεται από την εξωκυττάρια παρουσία βλέννης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50% του συνολικού καρκινικού ιστού. Είναι πιο συχνό στο εγγύς κόλο, έχει μεγαλύτερο μέγεθος, υψηλότερο T στάδιο, μεγαλύτερο ποσοστό θετικών λεμφαδένων, μικρότερη διαφοροποίηση και μεγαλύτερο ποσοστό περιτοναϊκών εμφυτεύσεων κατά την αρχική διάγνωση.(28,29) Η ανώμαλη έκφραση των βλεννίνων (MUC1, MUC2 και MUC5AC) είναι από τα διακριτά χαρακτηριστικά των βλεννωδών αδеноκαρκινωμάτων και πιθανά σχετίζεται με τη διήθηση, μετάσταση, αναστολή της απόπτωσης καθώς και με την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά και την ακτινοβολία. (28)

Από μοριακής σκοπιάς, τα βλεννώδη αδеноκαρκινώματα εμφανίζουν πολύ συχνά μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS και BRAF και είναι CIMP-H και MSI-H. (28,29) Η αυξημένη επίπτωση της μικροδορυφορικής αστάθειας σε αυτούς τους όγκους είναι ενδεικτικό καλύτερης

ανταπόκρισης στους νεότερους παράγοντες ανοσοθεραπείας (anti-PD-1, CTLA-4), με την ελπίδα να βελτιωθεί η επιβίωσή τους στο μέλλον.(28)

Η πρόγνωση των ασθενών με βλεννώδη αδеноκαρκινώματα παραμένει αμφιλεγόμενη επί του παρόντος και πιθανά σχετίζεται κυρίως με το υψηλότερο TNM στάδιο κατά την αρχική διάγνωση. Τα βλεννώδη αδеноκαρκινώματα που εντοπίζονται στο ορθό, έχουν αποδεδειγμένα χειρότερη πρόγνωση ενώ για αυτά τα κόλου η βιβλιογραφία δεν έχει καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα. (28)

3.3.2. Μέγεθος

Το μέγεθος του όγκου ορίζεται ως η μέγιστη διάμετρος του όγκου στο παρασκεύασμα. (25) Στους συμπαγείς όγκους όπως αυτοί του μαστού, του πνεύμονα και του θυρεοειδούς έχει θεμελιωθεί ως προγνωστικός παράγοντας και ενσωματωθεί στον ορισμό του T σταδίου. Ωστόσο η προγνωστική του αξία στον ορθοκολικό καρκίνο παραμένει αμφιλεγόμενη. (25,30)

Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου μεγέθους του όγκου και της κακής πρόγνωσης καθώς και με άλλα κακά προγνωστικά ιστολογικά χαρακτηριστικά, όπως χειρότερη διαφοροποίηση, υψηλότερο στάδιο T, λεμφαδενικές μεταστάσεις και νέκρωση. (25,30) Πιθανοί λόγοι διαφοράς στην επιβίωση με βάση το μέγεθος του όγκου μπορεί να αποτελούν οι δυσκολίες στην επίτευξη πλήρους ορίων εκτομής σε μεγαλύτερους όγκους ή λόγω της διήθησης των παρακείμενων δομών. (25) Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το μέγεθος του όγκου δεν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα.(25,30) Τα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά δεν περιορίζονται σε μεγαλύτερους όγκους και μικρότεροι όγκοι με διήθηση T4b ή/και μεταστάσεις στους λεμφαδένες μπορεί να σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση ανεξάρτητα από το μέγεθός τους.(25)

Η προγνωστική ικανότητα του μεγέθους του όγκου φαίνεται επίσης να ποικίλλει ανάλογα με την θέση, με τους όγκους του ορθού να έχουν τη χειρότερη πρόγνωση συσχετιζόμενη με το μέγεθος.(25,30)

Δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς το όριο μεγέθους του όγκου που επιδρά στην πρόγνωση του ορθοκολικού καρκίνου.(25,30) Η πλειοψηφία των μελετών θέτει ως κατώφλι τα 4 cm. (25,30) Συνοψίζοντας, ενώ το μέγεθος του όγκου καταγράφεται συνήθως στην ιστολογική έκθεση, δεν ενσωματώνεται στο τρέχον σύστημα σταδιοποίησης TNM AJCC-UICC για τον ορθοκολικό καρκίνο. Επί του παρόντος δεν καθορίζει τη διαχείριση σε καμία διεθνή οδηγία. Μέγεθος ≥ 4 cm μπορεί να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση εάν σχετίζεται με άλλα δυσμενή

παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ή ανεπαρκή χειρουργικά όρια, αλλά δεν υπάρχουν πειστικές ενδείξεις ότι το μέγεθος του όγκου από μόνο του αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα. (25,30)

3.3.3. Βαθμός διαφοροποίησης (Tumor Grade)

Ο βαθμός διαφοροποίησης (Tumor Grade) αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα ανεξαρτήτως του σταδίου στον ορθοκολικό καρκίνο.(25,31,32) Σχετίζεται με μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) και με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής.(25,31) Σχετίζεται επιπλέον, με προχωρημένο στάδιο και θετικούς λεμφαδένες καθώς και λεμφαγγειακή διήθηση. (31)

Το Tumor Grade αποτελεί μέρος των περισσότερων διεθνών κατευθυντήριων γραμμών για τον ορθοκολικό καρκίνο. Συμπεριλαμβάνεται πάντα στην ιστοπαθολογική έκθεση του ορθοκολικού καρκίνου στην πρακτική ρουτίνας και ταξινομείται ως πρόσθετος προγνωστικός παράγοντας στο εγχειρίδιο σταδιοποίησης AJCC TNM.(25) Πολλαπλές διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες (ASCO, NCCN, ASCRS, NCI, ESMO και NHMRC) προσδιορίζουν τον κακώς διαφοροποιημένο tumor grade ως παράγοντα κινδύνου για υποτροπή στο στάδιο II του ορθοκολικού καρκίνου και προτείνουν το ενδεχόμενο επικουρικής χημειοθεραπείας όταν υπάρχει. (25)

Οι κύριοι περιορισμοί στον καθορισμό του Tumor Grade έγκεινται στην έλλειψη ενός ενιαίου, ομοιόμορφα χρησιμοποιούμενου συστήματος και στη σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των παρατηρητών στην αξιολόγησή του. (31) Στη βιβλιογραφία, υπάρχει ποικιλία απόψεων ως προς το αν θα πρέπει να βασίζεται στο κυρίαρχο πρότυπο διαφοροποίησης ή στην περιοχή της ελάχιστης διαφοροποίησης. (31) Οι περισσότεροι ορισμοί του βαθμού όγκου βασίζονται στο ποσοστό σχηματισμού αδένων. Το Κολέγιο των Αμερικανών Παθολογοανατόμων (CAP) χρησιμοποιεί ένα σύστημα βαθμολόγησης τεσσάρων επιπέδων για το CRC, που βασίζεται αποκλειστικά στον βαθμό σχηματισμού αδενίων. (33) Grade 1 ορίζεται ως καλά διαφοροποιημένος (>95% σχηματισμός αδένων), Grade 2 μέτρια διαφοροποιημένος (50-95% σχηματισμός αδένων), Grade 3 κακώς διαφοροποιημένος (<50% σχηματισμός αδένων) και Grade 4 αδιαφοροποίητος (χωρίς σχηματισμό αδένων). (33) Η ταξινόμηση των όγκων του πεπτικού συστήματος του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) χρησιμοποιεί ένα σύστημα δύο επιπέδων: α) Χαμηλού Grade ($\geq 50\%$ σχηματισμός αδένων) και β) Υψηλού Grade (κακώς διαφοροποιημένος, σχηματισμός αδένων <50%). (34)

3.3.4. Λεμφαγγειακή Διήθηση (LVI)

Η λεμφαγγειακή διήθηση (Lymphovascular Invasion-LVI) αναφέρεται στην προσβολή μικρών λεμφικών ή αιμοφόρων (συνήθως φλεβικών) αγγείων από όγκο στην ιστολογική εξέταση.(33) Η LVI θεωρείται βασικό βήμα στην ανάπτυξη λεμφαδενικών μεταστάσεων.(35) Η συχνότητα εμφάνισης LVI στον ορθοκολικό καρκίνο κυμαίνεται από 4,1% έως 63,8%, πιθανότατα λόγω διαφορετικών πληθυσμών μελέτης και διαγνωστικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται.(35) Η LVI έχει αναδειχθεί ως ένας καλά αναγνωρισμένος ανεξάρτητος σταδίου προγνωστικός παράγοντας κακής πρόγνωσης στο CRC. (25,35) Αρκετές συστηματικές ανασκοπήσεις και μεγάλης κλίμακας πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με CRC και LVI έχουν έως και 55% μείωση στη συνολική επιβίωση (OS) και σημαντικά μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS). (25,35) Η παρουσία LVI σχετίζεται με άλλα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, όπως προχωρημένο στάδιο, λεμφαδενική συμμετοχή, απομακρυσμένη μετάσταση, κακή διαφοροποίηση, μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, περινευρική διήθηση, αυξημένο tumor budding και θετικό KRAS. (35) Η κακή πρόγνωση της LVI ισχύει για όλα τα στάδια του CRC.(25) Οι ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες, ειδικά σταδίου II, είναι η πιο πιθανή ομάδα να ωφεληθεί από την αναγνώριση της LVI. (25)

Δεδομένης της προγνωστικής της σημασίας στον ορθοκολικό καρκίνο, η LVI ταξινομείται επί του παρόντος ως πρόσθετος προγνωστικός παράγοντας στο εγχειρίδιο σταδιοποίησης AJCC-UICC TNM. (26) Ωστόσο, υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των παθολογοανατόμων στη διάγνωση της LVI και υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που υποδηλώνουν ότι διαφορετικοί τρόποι χρώσης μπορούν να επηρεάσουν το ποσοστό ακρίβειας. (36,37) Ως εκ τούτου, τα πραγματικά ποσοστά LVI είναι πιθανώς υψηλότερα από αυτά που αναφέρονται σήμερα. (36) Ενώ η διήθηση των εξωτοιχωματικών φλεβών είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας κακής έκβασης και αυξημένου κινδύνου ηπατικής μετάστασης, η σημασία της ενδομυϊκής φλεβικής εισβολής είναι λιγότερο σαφής. (25)

3.3.5. Περινευρική διήθηση (PNI)

Η περινευρική διήθηση (Perineural Invasion-PNI) αφορά τη νεοπλασματική διήθηση των νεύρων από καρκινικά κύτταρα ως μέθοδος εξάπλωσης του όγκου.(38) Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν μέσα, γύρω και διά μέσου οποιουδήποτε από τα τρία νευρικά στρώματα. (38) Η αναφερόμενη συχνότητα περινευρικής διήθησης στον CRC κυμαίνεται από

9% έως 30% και εμφανίζεται πιο συχνά σε υψηλότερο στάδιο του CRC. Μελέτες έχουν αναφέρει PNI σε περίπου 10% σε νόσο σταδίου I-II, έως 30% σε νόσο σταδίου III και έως 40% σε νόσο σταδίου IV. (37,38) Η PNI είναι ένας ανεξάρτητος δείκτης κακής έκβασης και μειωμένης επιβίωσης. (25,38) Υπάρχει έλλειψη ενιαίων προτύπων αναφοράς και κατευθυντήριων γραμμών για τον προσδιορισμό της PNI. (33) Η PNI τείνει να υποτιμάται, με τα ποσοστά ανίχνευσης να κυμαίνονται από 9% έως 42%. (25) Υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μελετών ως προς τον ορισμό της PNI με επικρατέστερο τα καρκινικά κύτταρα να περιβάλλουν >33% της περιφέρειας του νεύρου. (25) Η τεκμηρίωση της PNI αποτελεί μέρος της τυπικής παθολογοανατομικής εξέτασης στον CRC. (25) Η AJCC-UICC 8η έκδοση της σταδιοποίησης TNM προσδιορίζει την PNI ως έναν πρόσθετο κακό προγνωστικό παράγοντα στον ορθοκολικό καρκίνο. (26)

3.3.6. Tumor budding

Το Tumor budding είναι ένα ιστολογικό εύρημα που αφορά την ύπαρξη μονήρων κακοήθων κυττάρων ή μικρών ομάδων (έως 5) κυττάρων στο διηθητικό μέτωπο του όγκου. (39) Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το tumor budding μπορεί να είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός βιοδείκτης σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Αρκετές μελέτες και συστηματικές ανασκοπήσεις έχουν βρει ότι το tumor budding σχετίζεται ανεξάρτητα με την υποτροπή της νόσου, το θάνατο που σχετίζεται με τον καρκίνο και τη μειωμένη συνολική επιβίωση (OS). (25) Έχει επίσης αναφερθεί η δυνατότητά του να εντοπίζει ασθενείς με CRC σταδίου II υψηλού κινδύνου που θα ωφελούνταν από την επικουρική χημειοθεραπεία. (25,39) Το Tumor budding έχει επίσης συσχετιστεί με άλλα επιθετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως η διήθηση των λεμφαδένων, το MSS, η φλεβική διήθηση και η κακή διαφοροποίηση του όγκου. (25,39)

Μέχρι πρόσφατα, η εφαρμογή του tumor budding στην κλινική πράξη περιοριζόταν από την έλλειψη τυποποιημένης μεθοδολογίας αξιολόγησης και αναφοράς. Το 2016, το International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) κατέληξε σε ένα διεθνές, βασισμένο σε στοιχεία τυποποιημένο σύστημα βαθμολόγησης για το tumor budding στον CRC. (40) Σύμφωνα με τα κριτήρια, το Tumor budding χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: BD1 (χαμηλή, 0-4), BD2 (ενδιάμεση, 5-9) και BD3 (υψηλή, ≥10). Στη συνέχεια, οι μελέτες επικύρωσαν τη συσχέτιση μεταξύ μεσαίου/υψηλού tumor budding με δυσμενή κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά (40) και χειρότερη επιβίωση. (25) Έχουν αναφερθεί ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ KRAS/BRAF-mt και

tumor budding. Επιπλέον, οι ασθενείς με μεταστατικό CRC και θετικό tumor budding και/ή KRAS-mt ανταποκρίνονται ελάχιστα στη θεραπεία αντι-EGFR. (25)

Το tumor budding προστέθηκε ως προγνωστικός παράγοντας που σχετίζεται με τον όγκο στην 8η έκδοση της Ταξινόμησης Κακοήθων Όγκων TNM της Ένωσης για τον Διεθνή Ελέγχο Καρκίνου (UICC) το 2017, και προστέθηκε ως συνιστώσα της παθολογοανατομικής έκθεσης του CRC. (26)

3.3.7. Σύνολο των εξαιρεθέντων λεμφαδένων (Lymph node yield-LNY)

Το σύνολο των εξαιρεθέντων λεμφαδένων (Lymph node yield-LNY), ορίζεται ως ο αριθμός των λεμφαδένων που ανακτήθηκαν με την εκτομή του χειρουργικού παρασκευάσματος και αποτελεί έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα, ιδιαίτερα σε μη μεταστατικό CRC. (25,41-43) Η ανεπαρκής λεμφαδενική εκτομή αποτελεί παράγοντα στη λήψη αποφάσεων για επικουρική χημειοθεραπεία. (25) Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ένα υψηλότερο LNY, ανεξάρτητα από την κατάσταση (θετικό ή αρνητικό) σχετίζεται με βελτιωμένη συνολική επιβίωση (OS), μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) και μειωμένο κίνδυνο υποτροπής. (25) Το LNY έχει καθιερωθεί ως ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου II και III και ενώ η χρησιμότητά του στο στάδιο I είναι λιγότερο σαφής, τα αναδυόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι υπάρχει προγνωστική συσχέτιση και στο στάδιο αυτό. (25,41-43)

Στον καρκίνο του ορθού σταδίου III, η νεοεπικουρική θεραπεία είναι το τρέχον πρότυπο αντιμετώπισης και η μείωση του αριθμού των αφαιρεθέντων λεμφαδένων δευτερογενώς στην ακτινοθεραπεία είναι καλά αναγνωρισμένη. (44) Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ένας μικρότερος αριθμός εξαιρεθέντων λεμφαδένων μετά από νεοεπικουρική θεραπεία δεν προσδίδει απαραίτητως χειρότερη πρόγνωση. (25,44)

Υπάρχει έλλειψη ομοφωνίας σχετικά με το τι ορίζει ένα κατάλληλο LNY. (41,43) Το LNY έχει πολλαπλές επιρροές που σχετίζονται με τη χειρουργική τεχνική, τον ασθενή και την παθολογοανατομική εξέταση. (25) Το AJCC/UICC απαιτεί τουλάχιστον 12 λεμφαδένες για επαρκή σταδιοποίηση, με βάση μια μελέτη που αποδεικνύει ότι αυτός ο αριθμός ήταν επαρκής για τον προσδιορισμό της θετικότητας των λεμφαδένων στο 94% των δειγμάτων. (25,26) Παραμένει αβέβαιο το πώς ο υψηλός αριθμός εξαιρεθέντων βελτιώνει τα αποτελέσματα στον CRC. Μια θεωρία είναι ότι ένας υψηλότερος αριθμός ανακτημένων λεμφαδένων μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένη ανίχνευση ασθενών με θετικούς λεμφαδένες (γνωστό ως φαινόμενο

μετανάστευσης σταδίου). (43) Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι παρά την αύξηση του αριθμού των εξαιρεθέντων λεμφαδένων με την πάροδο του χρόνου, το ποσοστό του σταδίου III CRC παραμένει σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητο. (25) Μια άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι το LNY συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ασθενούς στον καρκίνο, με μεγαλύτερη αφθονία λεμφαδένων να αποτελεί ένδειξη αποτελεσματικής ανοσολογικής απόκρισης που οδηγεί σε βελτιωμένη πρόγνωση και επιβίωση. (25)

Συνοψίζοντας, το LNY χρησιμοποιείται επί του παρόντος σε πολλές διεθνείς οδηγίες για την πρόγνωση και τη διαχείριση του CRC. Το εγχειρίδιο σταδιοποίησης AJCC/UICC και άλλες διεθνείς οδηγίες συνιστούν την αναγνώριση τουλάχιστον 12 λεμφαδένων σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου για τον ακριβή προσδιορισμό της συμμετοχής των λεμφαδένων για σκοπούς σταδιοποίησης. (26,46,47)

3.3.8. Lymph node ratio (LNR)

Ως Lymph Node Ratio (LNR) ορίζεται η αναλογία του αριθμού των θετικών λεμφαδένων προς τον αριθμό των λεμφαδένων που εξετάστηκαν ιστολογικά. (25) Ένα υψηλότερο LNR σχετίζεται με πιο προχωρημένο στάδιο T, λεμφαδενικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις. (25) Το LNR μπορεί να παρέχει πληροφορίες που σχετίζονται με τη συμπεριφορά του όγκου, την έκταση της χειρουργικής εκτομής και την ανοσοαπόκριση του ξενιστή. (48) Το LNR σχετίζεται μόνο με τα στάδια III και IV του CRC καθώς είναι τα μόνα στάδια που φέρουν θετικούς λεμφαδένες. (26) Το LNR έχει αναφερθεί ως αρνητικός ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης και σχετίζεται με μειωμένη συνολική επιβίωση (OS) και μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS). (25,48,49) Τα στοιχεία για το LNR ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα είναι ισχυρότερα στο στάδιο III CRC, ωστόσο τα στοιχεία για το στάδιο IV CRC είναι επίσης ισχυρά. (25,50) Το LNR έχει ισχυρότερη αρνητική συσχέτιση στον καρκίνο του ορθού από τον καρκίνο του παχέος εντέρου. (49) Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το LNR είναι ανώτερο από τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων (τρέχουσα N σταδιοποίηση) τόσο στο στάδιο III όσο και στο IV CRC. (48,49)

Η προγνωστική σημασία του LNR μπορεί να είναι μεγαλύτερη όταν ο αριθμός των εξαιρεθέντων λεμφαδένων είναι μικρότερος από 12. (51) Το όριο για υψηλό LNR ποικίλλει από 0,125 έως 0,3 στις διάφορες μελέτες. (48,49) Επί του παρόντος, ενώ η βιβλιογραφία έχει δείξει ότι το LNR είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στον ορθοκολικό καρκίνο, δεν παίζει ρόλο στη σταδιοποίηση N, ούτε χρησιμοποιείται σε οποιοσδήποτε διεθνείς

κατευθυντήριες οδηγίες. (26,46,47,52) Δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τα όρια των τιμών του LNR για την πρόγνωση όπως και για τον ελάχιστο αριθμό λεμφαδένων που απαιτούνται για τη σωστή αξιολόγηση του LNR. (25)

3.3.9. Διήθηση του κυκλοτερούς ορίου (Circumferential Resection Margin-CRM)

Το κυκλοτερές όριο εκτομής (CRM), επίσης γνωστό ως ακτινικό όριο, είναι η απόσταση (σε χιλιοστά) μεταξύ του βαθύτερου σημείου διήθησης του όγκου και της χειρουργικά εξαιρεθείσας μη περιτοναϊκής επιφάνειας του δείγματος. (33) Οι όγκοι του κατώτερου ορθού, κάτωθεν της περιτοναϊκής ανάκαμψης περιβάλλονται πλήρως από αυτό το κυκλοτερές, μη περιτοναϊκό όριο, ενώ οι όγκοι του ανώτερου ορθού έχουν ένα μη περιτοναϊκό όριο οπισθοπλάγια και μια περιτοναϊκή επιφάνεια προσθίως. (25,33) Για τους όγκους του παχέος εντέρου, το μεσεντερικό χείλος του εντέρου καθώς και οι επιφάνειες των οπισθοπεριτοναϊκών τμημάτων σχηματίζουν το ακτινικό όριο. (33) Το κριτήριο που χρησιμοποιείται για τον ορισμό ενός θετικού ορίου CRM παραμένει αμφιλεγόμενο. (53,54) Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ορισμός της θετικότητας του CRM είναι ο όγκος να απέχει ≤ 1 mm από το ελεύθερο όριο. (53) Η θετικότητα του CRM εμφανίζεται στο 7,3% έως 25% των καρκίνων του ορθού και 5,3% έως 20,5% των καρκίνων του παχέος εντέρου. Σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο, κακή διαφοροποίηση, λεμφαγγειακή και περινευρική διήθηση. (25,54) Στον καρκίνο του ορθού, η θετικότητα του CRM είναι ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας υποτροπής και μειωμένης επιβίωσης, ανεξάρτητα από τη σταδιοποίηση του TNM. (25,53,54) Το θετικό CRM σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοπικής υποτροπής (HR 4,67 95% CI 2,51–4,15), απομακρυσμένης μετάστασης (HR 2,95) και μειωμένη συνολική επιβίωση (OS -HR 3,21) και μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS- HR 3,63). (53) Η προγνωστική σημασία του CRM είναι ισχυρότερη σε ασθενείς που υποβάλλονται σε νεο-επικουρική ακτινοθεραπεία πριν από τη χειρουργική επέμβαση σε σύγκριση με τη χειρουργική επέμβαση μόνο, πιθανότατα επειδή οι όγκοι με περιορισμένη ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία είναι βιολογικά δυσμενείς. (55) Η σημασία της θετικότητας στο CRM έχει μελετηθεί λιγότερο στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ωστόσο πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η κακή πρόγνωση του στον καρκίνο του ορθού ισχύει και για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. (54)

Ο προσδιορισμός της συμμετοχής του CRM είναι βασική παράμετρος στην παθολογοανατομική έκθεση του CRC. (33) Οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούν

αρνητικά περιθώρια (>1 mm) για όλους τους ασθενείς με CRC που υποβάλλονται σε εκτομή και το ποσοστό θετικότητας CRM χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης ποιότητας στη χειρουργική του καρκίνου του ορθού. (46,52) Ένα θετικό CRM υποδηλώνει τουλάχιστον νόσο T3 με εκτομή που εμπεριέχει μικροσκοπική ή μακροσκοπική ιστολογικά υπολειπόμενη νόσο στο εγχειρίδιο σταδιοποίησης AJCC-UICC. (26) Οι κατευθυντήριες οδηγίες του NCCN περιλαμβάνουν τη θετικότητα του CRM ως κριτήριο για χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας στο στάδιο II του CRC και οι κατευθυντήριες οδηγίες της ESMO συνιστούν να ληφθεί υπόψη για την αξιολόγηση κινδύνου σε αυτούς τους ασθενείς. (46, 52)

3.4. Μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες

3.4.1 Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI status)

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), όπως προαναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στις περιοχές του γονιδιώματος που ονομάζονται μικροδορυφόροι. Υψηλό MSI διαπιστώνεται στο 15% του συνόλου των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. (15,16,25) Οι ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο υψηλού MSI (MSI-H) είναι συνήθως μικρότερης ηλικίας, διαγιγνώσκονται σε μικρότερο στάδιο και έχουν όγκους του δεξιού κόλου. (25) Οι MSI-H όγκοι χαρακτηρίζονται συνήθως από παραγωγή βλέννης, στοιχεία που αφορούν το μονοπάτι της οδοντωτής νεοπλασίας (όπως κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου) και υψηλό ποσοστό λεμφοκυτταρικής διήθησης (Tumor infiltrating lymphocytes-TILs). (56) Τα TILs φαίνεται να διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο έναντι της διασποράς στους MSI-H όγκους και τους καθιστούν ευαίσθητους στη ανοσοθεραπεία. (23,56) Οι όγκοι που δεν εμφανίζουν μικροδορυφορική αστάθεια χαρακτηρίζονται MSS (microsatellite stable). (23)

Η MSI έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες ότι αποτελεί ισχυρό παράγοντα καλής πρόγνωσης στον ορθοκολικό καρκίνο και ιδίως στα μικρότερα στάδια (23,25,56). Η προγνωστική αξία του MSI στο μεταστατικό CRC δεν έχει αποσαφηνιστεί. Κάποιες μελέτες δείχνουν χειρότερη πρόγνωση στους MSI-H μεταστατικούς όγκους ενώ άλλες δεν έχουν αποδείξει προγνωστική συσχέτιση του MSI στη μεταστατική νόσο (25). Έχει ωστόσο παρατηρηθεί σε πολλές κλινικές δοκιμές ότι οι MSI όγκοι εμφανίζουν κακή ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-FU ειδικά στη μεταστατική νόσο (23,25).

Συνοψίζοντας, ο βασικός ρόλος του ελέγχου της MSI είναι ο εντοπισμός των ασθενών υψηλού κινδύνου για σύνδρομο Lynch. (23,25,46) Ωστόσο, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λήψη αποφάσεων για χορήγηση νεοεπικουρικής θεραπείας στον ορθοκολικό καρκίνο σταδίου II. (46) Επιπλέον, η ανοσοθεραπεία αποκτά πλέον σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του MSI-H μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου και η ένταξή της στα θεραπευτικά πρωτόκολλα φαίνεται να αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με μεταστάσεις. (23,25)

3.4.2. Τα γονίδια BRAF – KRAS

Το BRAF είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B-RAF, ένα ζωτικό συστατικό της οδού της πρωτεϊνικής κινάσης MAPK (mitogen activated protein kinase). (25,57) Η οδός MAPK με τη σειρά της παίζει ουσιαστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την απόπτωση. (25,57) Η μετάλλαξη BRAF (BRAF-mt) εμφανίζεται περίπου στο 11% όλων των CRC και παίζει βασικό ρόλο στην ογκογένεση. (25,57) Ενώ υπάρχουν περίπου 30 διαφορετικές μεταλλάξεις BRAF, η μετάλλαξη V600E είναι η πιο κοινή, αντιπροσωπεύοντας το 90% όλων των μεταλλάξεων BRAF στο CRC. (57) Η σημασία του BRAF για την πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου παραμένει αμφιλεγόμενη, αν και τα τρέχοντα στοιχεία κλίνουν προς κακή πρόγνωση. (25,58) Οι ασθενείς με BRAF-mt CRC είναι συνήθως γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας κατά τη διάγνωση. (25) Υπάρχει συσχέτιση με κακή διαφοροποίηση, βλεννώδη ιστολογία και εγγύς εντόπιση στο κόλον. (25) Η χρησιμότητά του στην πρόγνωση ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο και μπορεί να επηρεαστεί από την κατάσταση του MSI. (25,57) Τα στοιχεία για το BRAF mt ως κακός προγνωστικός δείκτης είναι ισχυρότερα στον μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (mCRC), με χειρότερο OS και αντοχή σε αναστολείς EGFR. (25,57) Στο στάδιο I CRC, υπάρχουν λίγες ενδείξεις ότι το BRAF-mt επηρεάζει την επιβίωση. (25) Τα πιο αμφιλεγόμενα δεδομένα ως προς την προγνωστική του αξία αφορούν τα στάδια II και III του CRC. Μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες καταλήγουν ότι το BRAF σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στα στάδια αυτά. (25,58)

Η κατάσταση MSI μπορεί να επηρεάσει τη χρησιμότητα του BRAF στην πρόγνωση. (25,57) Τα αποτελέσματα ωστόσο των μελετών μέχρι σήμερα είναι αντικρουόμενα. Το BRAF-mt σε υψηλό MSI (MSI-H) CRC συνήθως υποδηλώνει σποραδικό CRC, ενώ οι ασθενείς με MSI-H ορθοκολικό καρκίνο τύπου BRAF-wt θα πρέπει να ελέγχονται για σύνδρομο Lynch. (46)

Η μετάλλαξη BRAF αναφέρεται επί του παρόντος ως πρόσθετος προγνωστικός παράγοντας στις οδηγίες σταδιοποίησης AJCC-UICC. (26) Οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες δεν συνιστούν τον έλεγχο ρουτίνας BRAF σε μη μεταστατικούς ασθενείς με CRC, εκτός από το MSI-H CRC για τη διάκριση μεταξύ σποραδικών και οικογενών περιπτώσεων (σύνδρομο Lynch). (46,47) Στη μεταστατική νόσο, υπάρχουν ισχυρότερα στοιχεία για τη χρησιμότητα του ελέγχου του BRAF, και αυτό αντικατοπτρίζεται στις τρέχουσες διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές οι οποίες συνιστούν τη διενέργεια ελέγχου για μετάλλαξη BRAF στον μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου για την πρόγνωση και τον προσδιορισμό της ανταπόκρισης σε θεραπείες κατά του EGFR. (59,60) Η μετάλλαξη BRAF-V600E υποδεικνύει αντοχή στη θεραπεία κατά του EGFR. (25) Οι ασθενείς με όγκους mCRC και BRAF-V600e-mt RAS-wt μπορεί να ωφεληθούν από την προσθήκη αναστολέων BRAF στην επικουρική τους θεραπεία. (52,57)

Το KRAS είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη K-Ras, ένα βασικό συστατικό της οδού της πρωτεϊνικής κινάσης MAPK (mitogen activated protein kinase). (25) Η μετάλλαξη KRAS (KRASmt) εμφανίζεται στο 40% περίπου του συνόλου του CRC, με μειωμένο επιπολασμό στον αφρικανικό πληθυσμό (περίπου 21%). (61) Οι μεταλλάξεις KRAS συμβάλλουν στην απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οδηγώντας τελικά στην ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων. (61,62) Οι μεταλλάξεις KRAS επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης από αυτές που απαιτούνται για την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων. (25) Ενώ οι μεταλλάξεις KRAS αποτελούν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα αντοχής στις θεραπείες κατά του EGFR, ο ρόλος τους στην πρόγνωση παραμένει ασαφής, ειδικά για το στάδιο II και III του CRC. (25,62) Οι ασθενείς με KRAS-mt CRC τείνουν να είναι γυναίκες, με βλεννώδη ιστολογία και είναι πιο πιθανό να εμφανίζουν όγκους του δεξιού κόλου. (25) Ορισμένα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η κακή πρόγνωση μπορεί να επηρεαστεί από την κατάσταση MSI. (25) Στη μεταστατική νόσο, το KRAS-mt έχει συσχετιστεί με μικρότερη συνολική επιβίωση (OS) και μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (RFS). (25,62) Ο KRAS-mt mCRC είναι ανθεκτικός στη θεραπεία αντι-EGFR και αυτό πιθανότατα συμβάλλει στη χειρότερη πρόγνωση. (25)

Τα στοιχεία στη μη μεταστατική νόσο παραμένουν ανεπαρκή και αντικρουόμενα. (25) Συνολικά, ο πραγματικός προγνωστικός ρόλος της μετάλλαξης KRAS στην επιβίωση του CRC παραμένει αβέβαιος και δεν χρησιμοποιείται επί του παρόντος για να καθοδηγήσει την πρόγνωση ή την επικουρική θεραπεία σε μη μεταστατική νόσο. (46,60) Η μετάλλαξη KRAS αναφέρεται επί του παρόντος ως πρόσθετος προγνωστικός παράγοντας στις οδηγίες

σταδιοποίησης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. (46,47) Η εξέταση KRAS είναι σημαντική σε ασθενείς με μεταστατικό CRC καθώς οι όγκοι KRAS-mt δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία anti-EGFR. (52,59,60)

Status	Prevalence	Prognostic Value	Predictive Value	
			Non-Metastatic	Metastatic
Microsatellite instability (MSI) high	overall: 15% stage II/III: 15% stage IV: 4.5%	Increased overall survival in stage II	✗ 5-FU monotherapy (stage II) ✓ FOLFOX (stage III)	✓ Immuno-therapy
KRAS/NRAS mutation	45%	Bad prognostic (debatable in stage II)	No impact on treatment	✗ Anti-EGFR therapy
BRAF mutation	7–10%	Bad prognostic especially in the metastatic setting	Currently no impact on treatment	✗ Anti-EGFR therapy (conflicting data) ✓ Combi therapy: Anti-BRAF/Anti-EGFR
Benefit: ✓; No benefit: ✗.				

Εικόνα 9. Οι μοριακοί βιοδείκτες στον ορθοκολικό καρκίνο και οι εφαρμογές τους (63).

3.5. Άλλοι υπό μελέτη μοριακοί βιοδείκτες

3.5.1 Γενικά

3.5.1.1. ctDNA

Η υγρή βιοψία (liquid biopsy) αφορά τον εντοπισμό και ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, ελεύθερων νουκλεϊκών οξέων (ctDNA) ή εξωκυττάρων κυστιδίων προερχόμενων από τον καρκινικό ιστό τα οποία απελευθερώνονται από τον πρωτοπαθή όγκο ή τις μεταστάσεις στην κυκλοφορία ή σε άλλα υγρά. (63) Ο προσδιορισμός του ctDNA συμβάλλει στην εκτίμηση της επάρκειας της χειρουργικής εκτομής στην εκρίζωση του καρκινικού φορτίου και ως εκ τούτου μπορεί να καθορίσει τον κίνδυνο υποτροπής. Επιπλέον, μπορεί να παίζει ρόλο στην επιλογή της κατάλληλης στοχευμένης θεραπείας και να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης ανταπόκρισης. (63,64) Ωστόσο, ο εντοπισμός του ctDNA είναι ιδιαίτερα δύσκολος καθώς στα αρχικά στάδια αποτελεί λιγότερο του 1% του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA σε αντίθεση με το στάδιο IV όπου μπορεί να αποτελέσει >50% του συνολικού κυκλοφορούντος DNA. (63) Ο καθορισμός του γονιδιακού προφίλ του πρωτοπαθούς όγκου καθορίζει το μοναδικό γονιδιακό προφίλ του ctDNA καθιστώντας το έτσι

έναν δυνητικά ευαίσθητο δείκτη στον καθορισμό της εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης. (63,64)

3.5.1.2. HER2

Ο HER2 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας της οικογένειας του EGFR και η ενεργοποίησή του οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης. (63) Υπερέκφραση του HER2 εμφανίζεται σε 5% των ορθοκολικών καρκίνων και συχνότερα σε αυτούς που εντοπίζονται στο σιγμοειδές. (63) Η προγνωστική του αξία είναι υπό συζήτηση με κύρια ωστόσο εφαρμογή την ανταπόκριση στην αντι-EGFR θεραπεία. (63)

3.5.1.3. Immunoscore-TILs

Τα TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) είναι ένα ιστολογικό εύρημα που αντιπροσωπεύει την ανοσογονικότητα ενός ασθενούς, η οποία θεωρείται ότι είναι προστατευτική έναντι της εξέλιξης του όγκου. (25,63) Τα TILs μεσολαβούν στη στρατολόγηση, την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων που καταστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου. (25) Οι υποτύποι των λεμφοκυττάρων που εμπλέκονται στον CRC περιλαμβάνουν τις υπο-ομάδες των Τ λεμφοκυττάρων (τα CD3 λεμφοκύτταρα, τα βοηθητικά CD4, τα κυτταροτοξικά CD8 και τα CD45RO και FoxP3 λεμφοκύτταρα), τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) και τα μακροφάγα. (25) Μελέτες έχουν δείξει ότι τα TILs είναι ένας θετικός προγνωστικός παράγοντας στο CRC ανεξάρτητος του ιστολογικού σταδίου. (25,63) Υψηλή συγκέντρωση TILs σχετίζεται με παρατεταμένο OS, CSS και DFS καθώς και με καλύτερα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου. (25) Η παρουσία των υποομάδων CD3, CD8 και FoxP3 των TILs έχει συσχετισθεί με καλύτερη πρόγνωση. (25,63)

Το πλέον διαδεδομένο και έγκυρο σύστημα ανοσολογικής ταξινόμησης για το CRC είναι το Immunoscore. (25,63,65,66) Το Immunoscore χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία, προσδιορίζει την παρουσία των CD3+ και CD8+ Τ λεμφοκυττάρων στο κέντρο και το διηθητικό όριο του όγκου και ταξινομεί τους όγκους σε χαμηλού, μέσου και υψηλού Immunoscore με τους χαμηλού score όγκους να έχουν τη χειρότερη πρόγνωση. (65) Η προγνωστική του αξία επί του παρόντος, δεν έχει αποδειχθεί να υπερτερεί σε συνδυασμό με τις κατοχυρωμένες γνωστές

ιστολογικές παραμέτρους. Επιπλέον, μένει να αποδειχθεί η αξία του ως δείκτης ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία. (63)

3.5.1.4. CDX2

Το CDX2 είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί έναν πρωτεϊνικό παράγοντα μεταγραφής που είναι κύριος ρυθμιστής της εντερικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. (25) Επί του παρόντος, η CDX2 πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως ανοσοϊστοχημικός δείκτης του γαστρεντερικού επιθηλίου, ειδικά στην ταξινόμηση καρκίνων άγνωστης προέλευσης. (25) Η CDX2 έχει αναγνωριστεί ως ένας αναδυόμενος προγνωστικός βιοδείκτης στο CRC και η απώλειά της φαίνεται σε ορισμένες μελέτες ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα μειωμένης επιβίωσης. (25,63) Η CDX2 απουσιάζει σε περίπου 10% των ορθοκολικών καρκίνων και οι αρνητικοί σε CDX2 όγκοι συχνά συνδέονται με πολλά δυσμενή προγνωστικά χαρακτηριστικά, όπως προχωρημένο στάδιο, αγγειακή διήθηση, κακή διαφοροποίηση, εντόπιση στο δεξί κόλο, CIMP και μετάλλαξη του BRAF. (25) Η CDX2 δεν χρησιμοποιείται επί του παρόντος στην πρόγνωση του ορθοκολικού καρκίνου. (25,63) Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες, συμπεριλαμβανομένων στοιχείων επιπέδου 1, ανέφεραν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της απώλειας CDX2 και της κακής πρόγνωσης. (25,63)

3.5.1.5. CD15

Το CD15 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελεί μόριο προσκόλλησης για την E-selectin και συναντάται στις γλυκοπρωτεΐνες, τα γλυκολιπίδια και τις πρωτεογλυκάνες. (67) Ονομάζεται αλλιώς και Sialyl Lewis^x (sLe^x) και SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen 1). (67,68) Αποτελεί βασικό μόριο έκφρασης των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των ενεργοποιημένων Th-1 λεμφοκυττάρων και συμμετέχει στην φαγοκυττάρωση και τη χημειοταξία διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση. (67,68) Η έκφρασή του αυξάνεται στα λεμφώματα Hodgkin, σε κάποιους τύπους λευχαιμιών καθώς και στο 50% των αδενοκαρκινωμάτων του πεπτικού. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης για τη διαφορική τους διάγνωση από τους μεσεγχυματογενείς όγκους και σε συνδυασμό με άλλους δείκτες επιφανείας βοηθάει στην ταυτοποίηση των καρκινικών βλαστοκυττάρων (CSC) του ορθοκολικού καρκίνου. (67)

Το CD15 φαίνεται στις διάφορες μελέτες να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων του πεπτικού καθώς και τη μετάστασή τους αφού συμμετέχει στην κυτταρική

προσκόλληση και μετανάστευση. (67,68) Η αυξημένη σύνδεση του sLex στα καρκινικά κύτταρα φάνηκε να αυξάνει την πρόσδεσή τους (μέσω της E-selectin) στα κύτταρα των αγγείων και προάγει με αυτόν τον τρόπο την αγγειογένεση καθώς και τις αιματογενείς μεταστάσεις. (67) Ωστόσο, παλαιότερες ερευνητικές εργασίες έδειξαν ότι οι όγκοι που εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD15 διεγείρουν την φυσιολογική κυττόλυση από τα NK-κύτταρα και ως εκ τούτου εμφανίζουν μικρότερη μεταστατική δραστηριότητα. (67)

Όσον αφορά την προγνωστική του αξία στον κολοορθικό καρκίνο τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και ασαφή μέχρι σήμερα. Αρκετές μελέτες ανέδειξαν αντιστρόφως ανάλογη επιβίωση σε σχέση με τα εκφραζόμενα επίπεδα του CD15 σε όλα τα στάδια του CRC. (67)

Οι Villar-Portela et al. το 2011 εξέτασαν δείγματα φρέσκου ορθοκολικού ιστού από υγιείς μάρτυρες, από ασθενείς με CRC, με αδενώματα παχέος εντέρου και ασθενών με ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ). (67) Τα αποτελέσματα έδειξαν μηδενική έκφραση του sLex στα δείγματα των ασθενών με ΙΦΝΕ ενδεικτικό ότι η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από τη σχετιζόμενη με τον όγκο φλεγμονώδη αντίδραση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ των υγιών ιστών και των καρκινικών δειγμάτων καθώς και μεταξύ των καλοήθων αδενωμάτων και αυτών με υψηλόβαθμη δυσπλασία αναδεικνύοντας έτσι τη συμμετοχή του CD15 στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Τα επίπεδα έκφρασης του sLex δεν συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την επιβίωση των ασθενών με CRC. (67)

Οι Tae Jung Jang et al. το 2013 μελέτησαν την έκφραση του CD15 σε ασθενείς με υπερπλαστικούς πολύποδες, αδενώματα υψηλόβαθμης δυσπλασίας και CRC καθώς και σε υγιείς μάρτυρες και διαπίστωσαν ότι αυξημένη έκφραση του CD15 παρατηρήθηκε στα καρκινικά κύτταρα (tCD15) και στα λευκοκύτταρα (ιδίως στα ουδετερόφιλα- iCD15). (68) Επιπλέον, η μεγαλύτερη έκφραση του tCD15 ήταν στα υψηλής δυσπλασίας αδενώματα, όπως και στον in situ και διηθητικό CRC συγκριτικά με τα μη νεοπλασματικά δείγματα ($p < 0.05$). Η έκφραση του iCD15 είχε παρόμοια κατανομή με αυτή του καρκινικού με έντονες όμως διακυμάνσεις μεταξύ των νεοπλασιών ($p < 0.05$) ενώ φάνηκε να είναι μεγαλύτερη στο όριο διήθησης συγκριτικά με το κέντρο του όγκου. Τα επίπεδα του CD15 των καρκινικών κυττάρων συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με το βάθος διήθησης ($p < 0.05$). (68)

Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν την αυξημένη έκφραση του CD15 στον μεταστατικό CRC με την αντίσταση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που στοχεύουν το EGFR και VEGF μονοπάτι ανοίγοντας νέες προοπτικές για τη δημιουργία στοχευμένων θεραπειών. (69)

3.5.1.6. CD24

Το CD24 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας που εκφράζεται σε μια ποικιλία ιστών όπως το αναπτυσσόμενο πάγκρεας και εγκέφαλο, τους αναγεννώμενους μύες, τα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα, τα νεφρικά σωληνάκια και το εντερικό επιθήλιο. (70) Η φυσιολογική του λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά φαίνεται να εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, απόπτωσης και κυτταρικής συγκόλλησης. (70,71) Πρόκειται κυρίως για ένα μόριο κυτταρικής συγκόλλησης το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται στη μεταστατική εξέλιξη πολλών συμπαγών όγκων (ωοθηκών, μαστού, μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, προστάτη, παγκρέατος) (70). Επιπλέον, έχει αναγνωρισθεί ως δείκτης επιφανείας των καρκινικών βλαστοκυττάρων διαφόρων προελεύσεων συμπεριλαμβανομένου του κόλου. (70) Το συνδετικό μόριο του CD24 που έχει αναγνωρισθεί είναι η P-selectin. (71) Μελέτες αναδεικνύουν έναν προμεταστατικό ρόλο του CD24 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ο οποίος φαίνεται να βασίζεται στην αλληλεπίδραση του CD24 και της P-selectin. (71) Ο ρόλος του στον ορθοκολικό καρκίνο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως με τα δεδομένα των διαφόρων μελετών ως προς την δράση και την προγνωστική του αξία να είναι αντικρουόμενα. (71-76)

Η πρώτη μελέτη όπου έγινε συσχέτιση της πρόγνωσης του κολοορθικού καρκίνου με τα επίπεδα του CD24 δημοσιεύτηκε το 2005. (71) Το κύριο συμπέρασμα της οποίας ήταν ότι το 10% των δειγμάτων εμφάνισε μεγάλη κυτταροπλασματική έκφραση του CD24 η οποία συσχετίσθηκε με σημαντικά μικρότερη επιβίωση στους ασθενείς με μη μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο δίνοντας μια πρώτη εικόνα ότι το CD24 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης στον CRC. (71)

Σε μια μεταγενέστερη μελέτη ελέγχθηκε η έκφραση διαφόρων δεικτών επιφανείας σε μονιμοποιημένα σε παραφίνη δείγματα CRC. Τα μισά δείγματα ήταν θετικά στο CD24, τα επίπεδα του οποίου συσχετίσθηκαν με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Δεν μπόρεσε ωστόσο να αναδειχθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση του δείκτη με την επιβίωση και την πρόγνωση των ασθενών αυτών. (72)

Οι Sagin et al. μελέτησαν την έκφραση ποικίλων γονιδίων σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς πεπτικού σε αρουραίους και σε δείγματα ανθρώπινων ιστών με ανοσοϊστοχημεία. (73) Τα συμπεράσματα της μελέτης ήταν ποικίλα. Τα επίπεδα του CD24 είναι εξίσου αυξημένα σε

αδενώματα όσο και στα αδενοκαρκινώματα του κόλου ενώ δεν φάνηκε να αυξάνουν στο φυσιολογικό ιστό. Η αύξηση των επιπέδων του CD24 παρατηρήθηκε στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης ως εκ τούτου δεν αναμένεται η χρήση του ως προγνωστικού δείκτη στο μέλλον. Επιπλέον, η ανεύρεση του CD24 σε έναν προκαρκινικό ή καρκινικό ιστό μπορεί να φανεί χρήσιμη στην αντιμετώπισή του καθώς η χρήση της celecoxib φαίνεται να μειώνει αισθητά την έκφρασή του και αναδεικνύεται με αυτόν τον τρόπο η δράση της ως χημειοπροφυλακτικό ή/και ως θεραπευτικό παράγοντα στον CRC. (73)

Οι Okano et al, από την Ιαπωνία το 2014 παρατήρησαν ότι τα CD24+ βλαστοκύτταρα στον κολοορθικό καρκίνο είναι επιρρεπή στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT-έναν σημαντικό φαινότυπο που αφορά το μεταστατικό δυναμικό ενός όγκου) καθιστώντας το CD24 ως έναν από τους υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους. (74)

Οι Seo et al. από την Κορέα, το 2015 μελέτησαν CRC σταδίων II-III και συσχέτισαν στατιστικά σημαντικά την έκφραση του CD24 στον CRC με μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS). Από την πολυπαραγοντική ανάλυση όμως δεν αναδείχθηκε συσχέτιση της έκφρασης του CD24 με την συνολική επιβίωση (OS). Η έκφρασή του συσχετίσθηκε επιπλέον, με μεγαλύτερους σε μέγεθος όγκους(>5cm). (75).

Σε αντίθεση με όλα τα ανωτέρω, μια πολύ πρόσφατη μελέτη από τους Nersisyan et al. το 2022, ανέδειξε αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση της επιβίωσης των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο με τα εκφραζόμενα από τον όγκο και τις μεταστάσεις επίπεδα του CD24. (76)

3.5.1.7. CD26

Το CD26 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που ονομάζεται διπεπτυλπεπτιδάση IV (DPP4, DPP-IV). (77) Ρυθμίζει την δράση διάφορων χημειοκινών και κυτοκινών αφαιρώντας τα αμινοτελικά διπεπτίδια αποκτώντας έτσι ογκοκατασταλτική ή ογκογόνο δράση ανά περίπτωση. (64,77,78) Υπάρχει σε διαλυτή μορφή στο πλάσμα και στις κυτταρικές μεμβράνες ως υποδοχέας. (64,77) Ως υποδοχέας επιφανείας απαντάται στις μεμβράνες των T και B λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων. (77) Συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες όπως στην ομοιοστάση της γλυκόζης (αναστέλλει την δράση των ινγκρετινών οι οποίες αποτελούν ορμόνες του γαστρεντερικού συστήματος με υπογλυκαιμική δράση) και στην ανοσολογική απάντηση. (77,78) Έχει επίσης διαφανεί ο ρόλος της σε διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις καθώς και στην απόρριψη μοσχευμάτων. (77) Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση

καθώς και στην κυτταρική διασπορά και μετανάστευση, καθώς αλληλεπιδρά με πληθώρα εξωκυττάρων πρωτεϊνών όπως το κολλαγόνο και η φιβρονεκτίνη. (64,77,78) Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και εκφράζεται σε πληθώρα κακοηθειών όπως του πνεύμονα, του προστάτη, του ενδομητρίου, του μαστού, του θυρεοειδούς και των Τ λεμφωμάτων. (77,78)

Ο ρόλος του στον ορθοκολικό καρκίνο είναι ποικίλος. Αποτελεί δείκτη επιφανείας των καρκινικών βλαστοκυττάρων και φαίνεται να προάγει τη μετάσταση. (64,79,81,82) Επιπλέον, αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα είτε ανιχνεύεται σε διαλυτή μορφή στο πλάσμα είτε ως επιφανειακός δείκτης των καρκινικών κυττάρων. (64, 79-83)

Οι Pang et al. το 2010 δημοσίευσαν μια πολύ ενδιαφέρουσα ερευνητική εργασία στο ρόλο εξετάζοντας με κυτταρομετρία ροής την έκφραση των CD133,CD44, και CD26 σε δείγματα από φρέσκους καρκινικούς ιστούς κολοορθικού καρκίνου και από τις σύγχρονες και μετάγχρονες ηπατικές μεταστάσεις τους. (79) Τα CD26+ καρκινικά βλαστοκύτταρα, ανεξαρτήτως της έκφρασης των CD133 και CD44, αποδείχθηκαν ικανά να προκαλέσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις όταν γινόταν εμφύτευσή τους στο τυφλό των πειραματόζωων ή έγχυσή τους στη πυλαία φλέβα. (79) Συμπερασματικά κατέληξαν ότι το CD26 είναι ένας σημαντικός δείκτης των καρκινικών βλαστοκυττάρων (Cancer Stem Cells- CSCs) στον κολοορθικό καρκίνο, ικανός να προάγει τη μετάσταση και να αυξήσει τη διεισδυτικότητα και την χημειοανθεκτικότητα του όγκου. (79) Οι δείκτες CD133 και CD44 δε συσχετίστηκαν με απομακρυσμένες μεταστάσεις, αλλά φάνηκε να συσχετίζονται με την ογκογένεση. (79) Επιπλέον, διαφάνηκε ότι τα CD26+ βλαστοκύτταρα στον κολοορθικό καρκίνο παίζουν προγνωστικό ρόλο όσον αφορά το μεταστατικό δυναμικό του όγκου και ο εντοπισμός τους μπορεί να καθορίζει την ανάγκη επικουρικής θεραπείας στο μέλλον. (79) Η ίδια ομάδα σε άλλη μελέτη ανέδειξε ότι η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των CD26+ καρκινικών βλαστοκυττάρων τα οποία οδηγούν σε μετάσταση. (80)

Οι Lam CS-C et al, σε μια μεταγενέστερη μελέτη το 2014, έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση του CD26 συσχετίστηκε με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, με όψιμο στάδιο κατά TNM (κυρίως III και IV) και με την παρουσία μεταστάσεων (ιδιαίτερα ηπατικών). Στην ίδια μελέτη οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα CD26 είχαν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση ($p,0.001$). (81)

Οι Saigusa S. et al. το 2016 μελέτησαν την έκφραση του CD26 σε ασθενείς με ορθικό καρκίνο που έλαβαν προεγχειρητική Χ/Θ και Α/Θ και συμπέραναν ότι τα αυξημένα επίπεδα CD26 στον καρκινικό ιστό συσχετίστηκαν με διήθηση του ορογόνου, μικροαγγειακή διασπορά και μικρή

ανταπόκριση στην θεραπεία. Επιπλέον, υψηλή έκφραση του CD26 συσχετίσθηκε με υποτροπή του όγκου και με συνολικά χειρότερη πρόγνωση. (82)

Έχει επίσης μελετηθεί και ο ρόλος της διαλυτής στο πλάσμα μορφής του CD26 (sCD26) τόσο ως μέσο προσυμπτωματικού ελέγχου για τον ορθοκολικό καρκίνο αλλά και ως δείκτη υποτροπής μετά από κολεκτομή. (83-85)

Αυτό που καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό το CD26 ως προγνωστικό δείκτη είναι η εύκολη πρόσβαση στη χορήγηση των αναστολέων του οι οποίοι αποτελούν κοινά αντιδιαβητικά φάρμακα από του στόματος χορηγούμενα (Sitagliptin, Vildagliptin) που θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια οικονομική εναλλακτική στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας ή/και πρόληψης σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου. (86,87) Πειραματικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα, έχουν αναδείξει την αντικαρκινική δράση των αναστολέων της DDP-4 στον κολοορθικό καρκίνο. (86-88)

3.5.1.8. CD44 και CD133

Το CD44, είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία λειτουργεί ως ένας ανακυκλώσιμος υποδοχέας της υαλουρονάνης. Κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της αγγειογένεσης και κατ' επέκταση της μετάστασης. (89) Ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και φαίνεται να αυξάνει την μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. (90) Το CD44 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την απομόνωση των κυτταρικών πληθυσμών των καρκινικών βλαστοκυττάρων στον CRC. (91)

Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη βιβλιογραφία ως προς την προγνωστική αξία του δείκτη αυτού στον ορθοκολικό καρκίνο και τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα μελετών είναι αντικρουόμενα ενώ στην πλειοψηφία μελετάται σε συνδυασμό με άλλους δείκτες (κυρίως με το CD133). (91-93)

Οι Qu et al. το 2017 μελέτησαν τα καρκινικά δείγματα ασθενών με CRC σταδίων II-III και συμπέραναν ότι οι ασθενείς των οποίων τα δείγματα εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του CD44 έχουν χειρότερη πρόγνωση (μικρότερο DFS και OS). (92)

Οι Seo et al, το 2015 μελέτησαν δείγματα ασθενών με CRC σταδίων II και III μονιμοποιημένα σε παραφίνη και συμπέραναν πως η έκφραση του CD44 συσχετίσθηκε με χαμηλή

διαφοροποίηση του όγκου, ενώ δεν συσχετίσθηκε στατιστικά σημαντικά με την επιβίωση και με το στάδιο της νόσου. (93)

Το CD133 (PROML-1, προμινίνη) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των αρχέγονων αιμοποιητικών και νευρικών κυττάρων. (94,95) Έχει επίσης μελετηθεί ως δείκτης των καρκινικών βλαστοκυττάρων στον CRC, και σε άλλους συμπαγείς όγκους. (91,94,95) Η έκφρασή του επηρεάζεται από τα επίπεδα οξυγόνου στους ιστούς. (96) Δε φαίνεται να συσχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό στον κολοορθικό καρκίνο καθώς το 40% των CRC που μεθίστανται στο ήπαρ δεν εκφράζουν το CD133. (96)

3.5.1.9. CD133/CD44

Η συνέκφραση των CD133/CD44 προτείνεται από πολλές μελέτες ως δείκτης των CSCs στον κολοορθικό καρκίνο. (79,97,98,99) Οι Wang et al. το 2012 μελέτησαν την συνδυαστική έκφραση των δύο δεικτών σε κυτταρικές σειρές καρκινικών βλαστοκυττάρων ορθοκολικού καρκίνου. Τα CD44⁺ φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη αντοχή στα χημειοθεραπευτικά και μεγαλύτερη μεταναστευτική ικανότητα. Τα CD133⁺ κύτταρα φάνηκε ότι ήταν πιο ανθεκτικά στην φυσική απόπτωση γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή ιντερλευκίνης-4. Η έκφραση των δύο δεικτών στις κυτταρικές σειρές εμφάνισε διακυμάνσεις, δεδομένο που υποδηλώνει ότι καθένας ξεχωριστά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως CSC δείκτης. (97) Ο συνδυασμός των δύο δεικτών συσχετίστηκε με περισσότερα χαρακτηριστικά των CSCs. Η έκφραση των δύο δεικτών φάνηκε να μεταβάλλεται αναλόγως της πηγής και του σταδίου του κολοορθικού καρκίνου. (97)

Οι Zhou et al. (2016) μελέτησαν επίσης την έκφραση των δύο δεικτών σε κυτταρικές σειρές ορθοκολικού καρκίνου με διάφορες μεθόδους. (98) Ο ανοσοφαινοτυπικός διαχωρισμός των CD44^{high}/CD133^{high} και CD44^{low}/CD133^{low} κυτταρικών πληθυσμών έγινε με κυτταρομετρία ροής. Η πλειοψηφία των CD44^{high}/CD133^{high} κυττάρων ήταν στην φάση G0/G1, πράγμα που υποδηλώνει μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Στα κύτταρα CD44^{high}/CD133^{high} ανευρέθησαν και άλλοι δείκτες CSCs όπως οι LGR5 και ALDH2. Επιπλέον, όταν τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν, φάνηκε ότι σχημάτιζαν διαφορετικής και μεταβαλλόμενης μορφολογίας καλλιέργειες, πράγμα που πιθανά υποδηλώνει την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται και να σχηματίζουν ετερογενείς όγκους. Τα CD44^{high}/CD133^{high} κύτταρα σχημάτιζαν μεγαλύτερους

όγκους στα in vivo πειραματικά μοντέλα. Το συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι τα CD133/CD44 αποτελούν πιθανούς CSCs δείκτες στον κολοορθικό καρκίνο. (98)

Ο συνδυασμός των δύο δεικτών έχει μελετηθεί και ως προγνωστικός δείκτης. Τα αποτελέσματά τους μέχρι στιγμής είναι αντικρουόμενα, με την πλειοψηφία όμως των μελετών να υποστηρίζει ότι σχετίζεται με υψηλότερο κακόηθες δυναμικό των όγκων και ως εκ τούτου με χειρότερη πρόγνωση. (100,102)

Οι Galizia et al. το 2012 μελέτησαν τους δύο δείκτες σε φρέσκα δείγματα ορθοκολικού καρκίνου με FCM και διαπίστωσαν ότι μόνο τα CD133/CD44 κύτταρα εμφάνισαν καρκινογενετική ικανότητα, καθώς η έκφραση των δύο δεικτών ήταν αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον απέδειξαν ότι η συνδυασμένη έκφραση των CD44/CD133 αποτέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την υποτροπή του όγκου και συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση και μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS). (100)

Οι Choi et al. το 2009 σε μια μεγαλύτερη σειρά ασθενών δεν τεκμηρίωσαν συσχέτιση της έκφρασης των CD133 και CD44 με τη συνολική επιβίωση. (101)

Οι Jing et al. (2015) μελέτησαν ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο και σύγχρονες ηπατικές μεταστάσεις και διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση των CD133/CD44 στις ηπατικές μεταστάσεις συγκριτικά με τον πρωτοπαθή όγκο, ενώ η έκφραση του CD44 συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση. (102)

3.6. Η αναγκαιότητα των βιοδεικτών στην αντιμετώπιση του ορθοκολικού καρκίνου

Η πρόγνωση και η αντιμετώπιση του ορθοκολικού καρκίνου καθορίζονται κυρίως από το στάδιο (TNM) κατά την αρχική διάγνωση. (46,47,52) Οι ασθενείς που δεν έχουν λεμφαγγειακή διήθηση και έχουν υποβληθεί σε R0 εκτομή δεν λαμβάνουν επικουρική θεραπεία (στάδιο I και II). (46,47,52) Πάραυτα, ένα ικανό ποσοστό τους εμφανίζει τοπική υποτροπή ή/και απομακρυσμένες μεταστάσεις (5-15% για το στάδιο I, 20-40% για το στάδιο II). (103) Επιπλέον, στο στάδιο III 50% των ασθενών θα θεραπευτούν πλήρως μόνο με την χειρουργική εκτομή ενώ ένα 20% θα επιβιώσει λόγω της προσθήκης της χημειοθεραπείας ενώ 30% θα εμφανίσει υποτροπή τα 2-3 πρώτα χρόνια. (63) Συνοψίζοντας τα δεδομένα, μόνο 20% των ασθενών

σταδίου III θα ωφεληθεί από τη χημειοθεραπεία, εκθέτοντας το υπόλοιπο 80% σε ανώφελη τοξικότητα. (63) Στο στάδιο IV του ορθοκολικού καρκίνου έχει αποδειχθεί ότι παρά την φαινομενικά και απεικονιστικά πλήρη ανταπόκριση των όγκων στη χημειοθεραπεία για τις ηπατικές μεταστάσεις, υποτροπή συμβαίνει σε περίπου 80% των ασθενών. (104) Ένα μικρό ποσοστό ασθενών σταδίου IV εμφανίζει θεαματική ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. (63)

Πολλοί παράγοντες κινδύνου επιπρόσθετοι του σταδίου έχουν μελετηθεί και εφαρμόζονται στην κλινική πράξη όπως η περινευρική και λεμφαγγειακή διήθηση, η κακή διαφοροποίηση, η επείγουσα χειρουργική επέμβαση για διάτρηση ή απόφραξη, το προχωρημένο στάδιο Tα, για τον εντοπισμό των ασθενών σταδίου II που θα ωφελούνταν από την επικουρική θεραπεία. (46,52,63) Επιπλέον, διάφοροι μοριακοί δείκτες εφαρμόζονται ώστε να καθοριστεί το ιδανικό πλάνο θεραπείας για κάθε ασθενή. (25,63,64) Η μοριακή ταξινόμηση του ορθοκολικού καρκίνου, που στηρίζεται επί του παρόντος στη μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability-MSI) και τις μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS και BRAF, αν και χρήσιμη, δεν αντιπροσωπεύει το σύνολο των μοριακών υπομονάδων που καθορίζουν την πρόγνωση. (105) Ως εκ τούτου, είναι πλέον εμφανής η ανάγκη εφαρμογής νέων βιοδεικτών που να καθορίζουν την πρόγνωση, και κατ'επέκταση τη θεραπεία, των ασθενών με κολοορθικό καρκίνο εύκολα εφαρμόσιμων στην καθ' ημέρα ιατρική πρακτική. (105) Καθώς η έρευνα εξελίσσεται συνεχώς στον τομέα αυτό, είναι σαφές ότι θα ανακαλυφθούν πιο στοχευμένες και εξατομικευμένες θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με συγκεκριμένους μοριακούς υποτύπους καρκίνου του παχέος εντέρου. Η ενσωμάτωση μοριακών παραγόντων στην κλινική πρακτική προβλέπεται να βελτιώσει σημαντικά τη διαχείριση και τα αποτελέσματα των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο.

Biomarkers	Value	Therapy Involved	Target Group
Currently Translated into Daily Routine			
ctDNA	Predictive/prognostic	✓ Targeted therapies ✓ Chemotherapy duration	All CRC
Tumor sidedness	Prognostic/predictive	✗ Anti-EGFR therapy (RCC) ✓ Intensive Chemotherapy (RCC) ✓ Immunotherapy (RCC) (most likely)	All CRC/mCRC
ALK, ROS1, NTRK1-3 fusions	Predictive	✓ ALK, ROS and TRK inhibitors	All CRC ALK, ROS and NTRK fusions
HER2 amplification	Predictive	✓ Anti-HER2 strategies ✗ Anti-EGFR strategies	All CRC with HER2 amplification
Need for Further Investigation			
CMS subtyping	Prognostic	Predictive value currently studied	All CRC
Immunoscore	Prognostic	Predictive value not yet determined	All CRC
Markers based on the stromal compartment	Prognostic/predictive	✗ Adjuvant chemotherapy in rectal cancer	All stages with a focus on stage II for the prognostic value
Tumor mutation burden	Predictive	✓ Immunotherapy	mCRC
CIMP	Prognostic	Predictive value not yet determined	All CRC
PI3K	Predictive	✗ Anti-EGFR therapy ✗ First-line chemotherapy	mCRC All CRC
miR-31-3p (low expression)	Predictive	✓ Anti-EGFR therapy	KRAS wt mCRC
Promising Biomarker Specifically Focusing on Stage II CRC			
CDX2 (low expression)	Prognostic	Predictive value not yet confirmed	Stage II CRC
MYO5B (low expression)	Prognostic	Predictive value currently studied	Stage II CRC
Benefit: ✓; No benefit: ✗.			

Εικόνα 10. Οι πιο γνωστοί και πολλά υποσχόμενοι υπό μελέτη βιοδείκτες στον ορθοκολικό καρκίνο (63)

4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

4.1. Χειρουργική αντιμετώπιση

4.1.1. Στο μη μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο

Η χειρουργική επέμβαση παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος των διαθέσιμων θεραπευτικών μεθόδων και η μόνη που μπορεί να προσφέρει την προοπτική ίασης για τα στάδια I-III του ορθοκολικού καρκίνου. (46,106) Η παράμετρος της υπολειπόμενης νόσου (R) είναι καθοριστική για την πρόγνωση των ασθενών διότι μόνο οι R0 εκτομές είναι αυτές που μπορεί να προσφέρουν ίαση (Πίνακας 5). (26,46, 106-110)

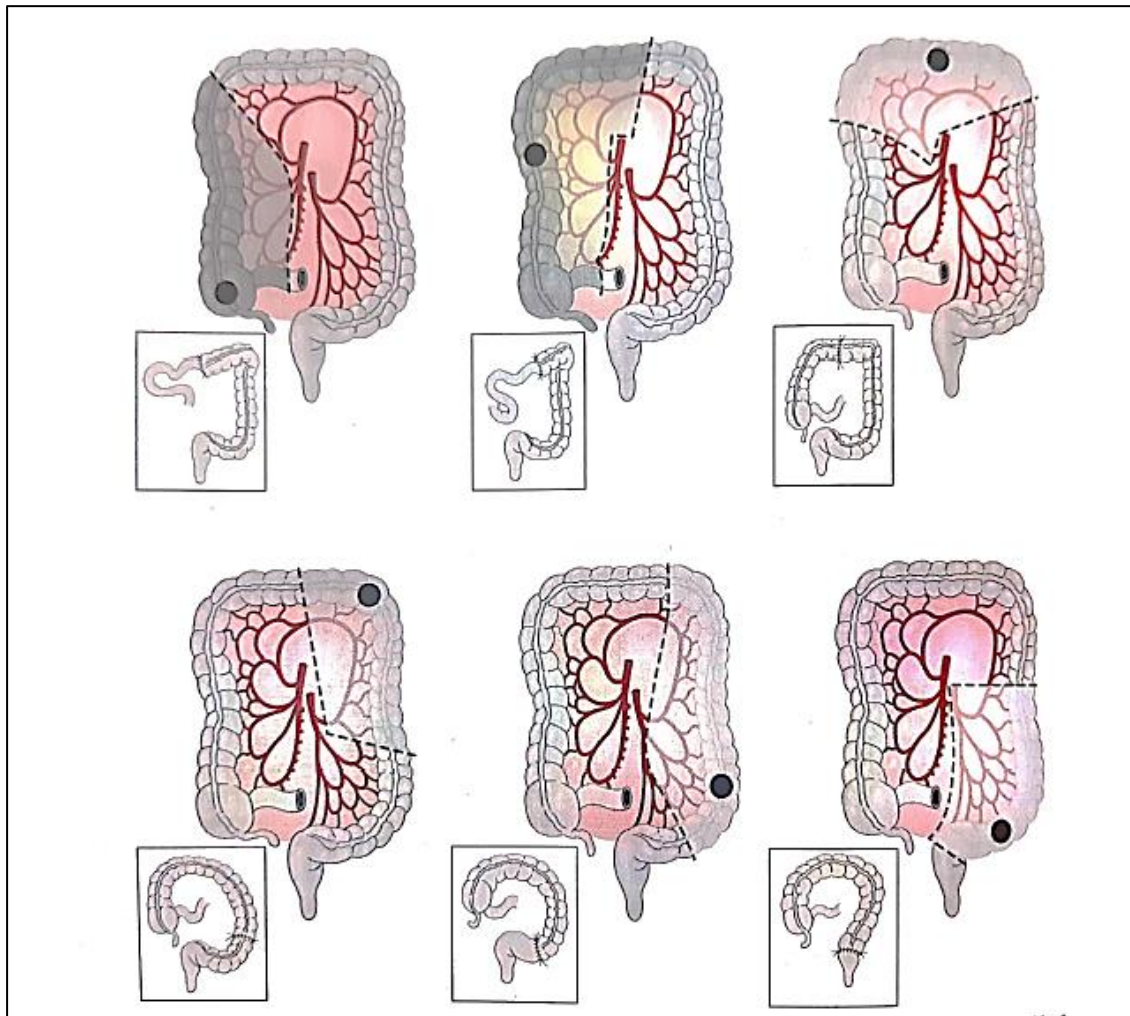
Πίνακας 5. Η σταδιοποίηση R (residual tumor) της AJCC (26)

Στάδιο Υπολειπόμενης Νόσου(R)	Χαρακτηριστικά
R0	Πλήρης εκτομή, όρια ιστολογικά αρνητικά, χωρίς υπολειπόμενη νόσο μετά την εκτομή (π.χ. πρωτοπαθής όγκος, περιοχικοί λεμφαδένες)
R1	Ατελής εκτομή, όρια ιστολογικά θετικά, μικροσκοπικά υπολειπόμενη νόσος μετά την εκτομή (π.χ. πρωτοπαθής όγκος, περιοχικοί λεμφαδένες)
R2	Ατελής εκτομή, όρια μακροσκοπικά θετικά μετά την εκτομή ή υπολειπόμενη μακροσκοπικά νόσος (π.χ. πρωτοπαθής όγκος, περιοχικοί λεμφαδένες ή μεταστάσεις)

Ο ορθοκολικός καρκίνος κατηγοριοποιείται βάσει τοπογραφίας σε καρκίνο:

- του κόλου, ο οποίος εντοπίζεται 15cm κεντρικότερα του πρωκτού
- του ανώτερου ορθού, ο οποίος εντοπίζεται από τα 10 cm έως τα 15 cm από τον πρωκτό
- του μέσου ορθού, ο οποίος εντοπίζεται από τα 5cm έως τα 10 cm από τον πρωκτό και
- του κατώτερου ορθού με εντόπιση 5 cm από τον πρωκτό (109).

Στον καρκίνο του κόλου, οι επεμβάσεις που πραγματοποιούνται είναι τυπικές κολεκτομές ανάλογα με τη θέση του όγκου. (46,106) Οι αρχές της χειρουργικής εκτομής στον καρκίνο του κόλου περιλαμβάνουν αρχικά την επαρκή λεμφαδενεκτομή η οποία καθορίζεται από τους αγγειακούς κλάδους που αρδεύουν το τμήμα που φέρει τον όγκο με το σύστοιχο μεσόκολο (εικόνα 10). (106,107) Το μεγάλο μήκος του παχέος εντέρου επιτρέπει αυτές τις ευρείες εκτομές χωρίς λειτουργικές επιπτώσεις στον ασθενή. Αν και η επάρκεια της λεμφαδενεκτομής είναι η βασική παράμετρος που ορίζει την έκταση της κολεκτομής, η εκτομή του αυλού του εντέρου οφείλει να γίνεται σε επαρκή όρια (5cm εκατέρωθεν του όγκου) ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο ενδοαυλικής διασποράς. (46,106) Επιπλέον, στις περιπτώσεις που ο όγκος διηθεί πέριξ δομές, επιβάλλεται η en block εκτομή τους με το παρασκεύασμα της κολεκτομής ώστε να αποφευχθεί η διασπορά. (106,107)



Εικόνα 11. Η έκταση της κολεκτομής για καρκίνο του παχέος εντέρου διαφόρων θέσεων καθορίζεται από την κατανομή των επιχώριων λεμφαδένων κατά μήκος των αγγειακών κλάδων. Η θέση του όγκου εμφανίζεται σαν μαύρος δίσκος και το τελικό αποτέλεσμα της κολεκτομής και αναστόμωσης φαίνεται στα μικρά πρόσθετα (106)

Η στρατηγική θεραπείας του καρκίνου του ορθού επικεντρώνεται επί του παρόντος, σε μεθόδους διατήρησης του οργάνου (ορθού), οι οποίες δεν θέτουν σε κίνδυνο το ογκολογικό αποτέλεσμα, αλλά διατηρούν τη λειτουργία της αφόδευσης διά του πρωκτού. (109) Στους όγκους του ορθού, ένα περιφερικό όριο 5cm στους περισσότερους ασθενείς είναι συνώνυμο της κοιλιοπερινεϊκής εκτομής και της μόνιμης στομίας λόγω της γειτνίασης με τους σφιγκτήρες.

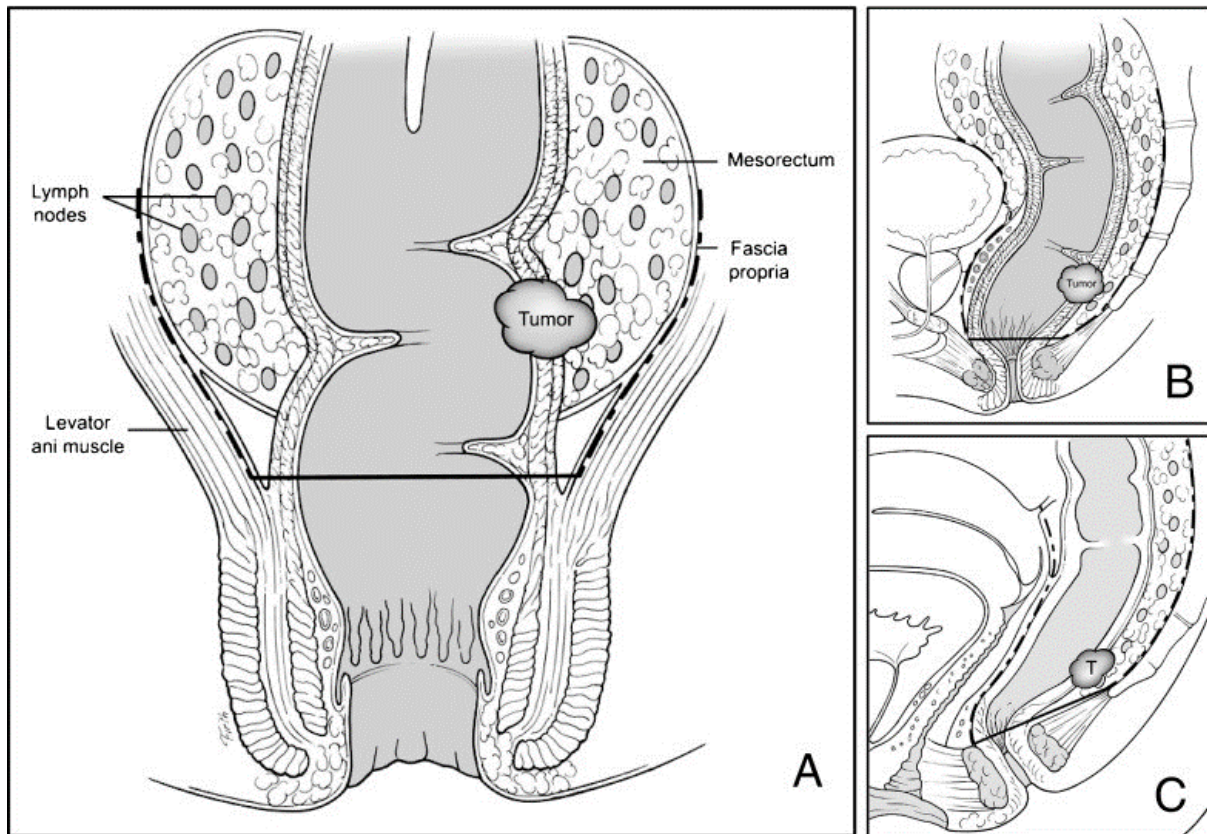
Η άλλη διαφορά στους όγκους του ορθού αφορά το υψηλότερο ποσοστό τοπικής υποτροπής σε σύγκριση με το κόλον. (108-110) Ο ρόλος του μεσοορθού και η αναγκαιότητα της πλήρους εκτομής του, κατά μήκος του επιπέδου της μεσοορθικής περιτονίας, έχει αναδειχθεί τη δεκαετία του '80 οπότε και έγινε η επανάσταση στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου του ορθού από τον καθηγητή B. Heald, τον πρωτοπόρο της ολικής εκτομής του μεσοορθού.

(111).Το αρνητικό περιφερικό όριο εκτομής (μη καρκινική εισβολή της μεσοορθικής περιτονίας) έχει επίσης βρεθεί ότι είναι μείζων προγνωστικός παράγοντας. (33,53,55 108-110)

Ως εκ τούτου, οι αρχές της ριζικής εκτομής σε όγκους του ορθού επιβάλλουν την ολική εκτομή του μεσοορθού για όγκους του μέσου και κατώτερου ορθού μαζί με 1cm περιφερικό όριο εκτομής του αυλού en-block (εικόνα 11). (106, 108-112) Στις περιπτώσεις όπου έχει προηγηθεί νεοεπικουρική ακτινοθεραπεία, περιφερικό όριο του αυλού μικρότερο του 1cm είναι αποδεκτό (108). Για όγκους του ανώτερου ορθού, η R0 εκτομή περιλαμβάνει 5cm περιφερικό όριο εκτομής του αυλού και του σύστοιχου μεσοορθού. (106,108-110) Επιπλέον, προαναφέρθηκε η σημασία του αρνητικού ακτινωτού ορίου εκτομής (τουλάχιστον 1mm) στην επίτευξη της ριζικής εκτομής. (25,26,33,52,53, 108-110) Ανεξαρτήτως εντόπισης, σε όλες τις ριζικές εκτομές για όγκους του ορθού συστήνεται η υψηλή απολίνωση της κάτω μεσεντέριας αρτηρίας καθώς και η υψηλή απολίνωση της κάτω μεσεντέριας φλέβας ακριβώς κάτωθεν του παγκρέατος. (108) Η μεσοορθική εκτομή οφείλει πάντα να πραγματοποιείται οξέως στα εμβρυϊκά πλάνα, σεβόμενη του κλάδους των υπογάστριων νεύρων. (108,110) Οι επεμβάσεις που πραγματοποιούνται είναι η (χαμηλή) πρόσθια εκτομή του ορθού με υψηλή, χαμηλή ή πολύ χαμηλή κολο-ορθική ή κολο-πρωκτική αναστόμωση και η κοιλιοπερινεϊκή εκτομή του ορθού και του πρωκτού.

Η δεύτερη προτιμάται στις περιπτώσεις όγκων του κατώτερου ορθού όπου το απαιτούμενο όριο του 1 cm εμπεριέχει μεγάλο τμήμα του έξω σφιγκτήρα ή σε ασθενείς που αναμένονται να έχουν κακά λειτουργικά αποτελέσματα μετά από κολοπρωκτική αναστόμωση. (106,108,110)

Οι ριζικές χειρουργικές επεμβάσεις στον ορθοκολικό καρκίνο μπορούν να γίνουν ανοικτά, λαπαροσκοπικά υποβοηθούμενες, αμιγώς λαπαροσκοπικά και ρομποτικά χωρίς διαφορές ως προς το τελικό ογκολογικό αποτέλεσμα με την προϋπόθεση να πραγματοποιούνται από εξειδικευμένους χειρουργούς. (46,106-110) Στη φαρέτρα των ελάχιστα επεμβατικών τεχνικών για όγκους του κατώτερου ορθού έχει προστεθεί από το 2010 και η τεχνική της διαπρωκτικής εκτομής του μεσοορθού (Transanal TME- TaTME) με καλά αρχικά ογκολογικά αποτελέσματα. (108,110)



Εικόνα 12. Το πλάνο της ολικής μεσορθικής εκτομής (TME) για όγκους του μέσου και κατώτερου ορθού (112)

Η τοπική διαπρωκτική εκτομή αποτελεί εναλλακτική πρακτική για συγκεκριμένους ασθενείς με μικρούς όγκους (<3 cm), που εντοπίζονται σε απόσταση 8 cm από τον πρωκτό, καλής έως μέτριας διαφοροποίησης που καταλαμβάνουν <30% της περιφέρειας του αυλού και που δεν εμφανίζουν στοιχεία λεμφαδενικής διήθησης στην προεγχειρητική απεικόνιση. (108-110) Η εκτομή πρέπει να είναι πλήρους πάχους και κάθετη προς το τοίχωμα του ορθού, συμπεριλαμβανομένου του παρακείμενου περιορθικού λίπους, με καθαρό όριο εκτομής στο ορθό και το περιορθικό λίπος τουλάχιστον 3 mm. (108,109) Με αυτήν την τεχνική ωστόσο δεν πραγματοποιείται λεμφαδεκτομή, έτσι τα οφέλη στην νοσηρότητα θα πρέπει να συγκρίνονται με την πιθανότητα θετικών ορίων, υποτροπής και μείωσης της συνολικής επιβίωσης συγκριτικά με τις ριζικές εκτομές (108-110).

Οι πιθανότητες υποτροπής είναι 10% για T1 όγκους, 25% για T2 και 38% για όγκους T3. (110) Επιπλέον, η πιθανότητα μικροσκοπικής λεμφαδενικής διήθησης στους T2 όγκους κυμαίνεται από 25-47% ενώ οι όγκοι T1 με διήθηση του άνω 1/3 του υποβλεννογόνιου εμφανίζουν έως και 23% λεμφαδενική διήθηση.(106,110) Ως εκ τούτου, επί του παρόντος διαπρωκτική τοπική εκτομή συστήνεται μόνο στους όγκους T1 με καλά ιστολογικά χαρακτηριστικά και σε ασθενείς μεγαλύτερων σταδίων με μείζονα συνοσηρότητα που αποκλείει ριζικές εκτομές μετά από

συζήτηση με τον ασθενή και εντός κλινικών μελετών. (106,108-110) Στις περιπτώσεις όπου η τελική ιστολογική διάγνωση του παρασκευάσματος της διαπρωκτικής εκτομής αναδεικνύει παράγοντες κινδύνου (κακή διαφοροποίηση, βλεννώδης ιστολογία, λεμφαγγειακή ή/και περινευρική διήθηση, αυξημένο Tumor Budding ή ανεπαρκή όρια εκτομής) ο ασθενής πρέπει να οδηγείται σε ριζική εκτομή. (108) Έχει φανεί ότι οι ασθενείς με υποτροπή μετά από τοπική εκτομή έχουν χειρότερη πρόγνωση από αυτούς που υποβάλλονται εξ αρχής σε ριζική εκτομή για αυτό θα πρέπει να γίνεται προσεκτική διαλογή τους.(106) Ειδικές πλατφόρμες διαπρωκτικής ενδοσκοπικής χειρουργικής (Transanal endoscopic surgery-TES), δίνουν τη δυνατότητα ιδανικής εκτομής αυτών των όγκων μειώνοντας τα ποσοστά διάτμησης και κατ'επέκταση τα ποσοστά των υποτροπών σε σχέση με την παραδοσιακή διαπρωκτική εκτομή. (110)

4.1.2. Στη μεταστατική νόσο

Το 20% των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο θα έχουν μεταστάσεις κατά την αρχική τους εκτίμηση. Οι πιο συχνές εντοπίσεις αφορούν το ήπαρ και τους πνεύμονες. (106) Η μέση πενταετής επιβίωση αυτών των ασθενών είναι περίπου 5%. (106) Ορισμένοι ασθενείς ωστόσο, είναι κατάλληλοι για ριζική χειρουργική εκτομή με προοπτική ίασης.(59,106,108) Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων προτείνεται η περιεγχειρητική χορήγηση χημειοθεραπείας και από πολλές μελέτες προτείνεται ο βαθμός ανταπόκρισης ως κριτήριο διαλογής των ασθενών οι οποίοι θα ωφεληθούν από τη μεταστασεκτομή. (59,106) Οι ασθενείς που δεν έχουν κακούς προγνωστικούς παράγοντες μπορούν να οδηγηθούν άμεσα σε εκτομή. (59) Οι ηπατικές και πνευμονικές μεταστάσεις θεωρούνται εγχειρήσιμες όταν μπορούν να εκταμούν σε υγιή όρια μαζί με τον πρωτοπαθή όγκο (R0 εκτομή). (106) Η εξαιρεσιμότητά τους εξαρτάται από τη θέση τους, καθώς και από την ποσότητα του εναπομείναντος υγιούς παρεγχύματος ώστε να μην παρακλυθεί η φυσιολογική λειτουργία του οργάνου. (59,106) Σε ασθενείς με ευμεγέθεις ηπατικές μάζες , ο προεγχειρητικός εμβολισμός της πυλαίας φλέβας και η κατά στάδια εκτομή, μπορεί να προσφέρουν πιθανότητες ριζικότητας. (59,106) Επιπλέον, 16% των ασθενών με μη εγχειρήσιμη μετασταστική νόσο κατά την αρχική εκτίμηση, εμφανίζουν ανταπόκριση μετά την αρχική χημειοθεραπεία που καθιστά τη νόσο εξαιρέσιμη. (106) Η ριζική χειρουργική εκτομή προσφέρει βελτίωση στην πενταετή επιβίωση 22-49% στους ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις και 14%-78% στους ασθενείς με πνευμονικές μεταστάσεις. (106) Η περιτοναϊκή νόσος εμφανίζει ακόμα χειρότερη πρόγνωση με συνολική επιβίωση που κυμαίνεται από 5-24

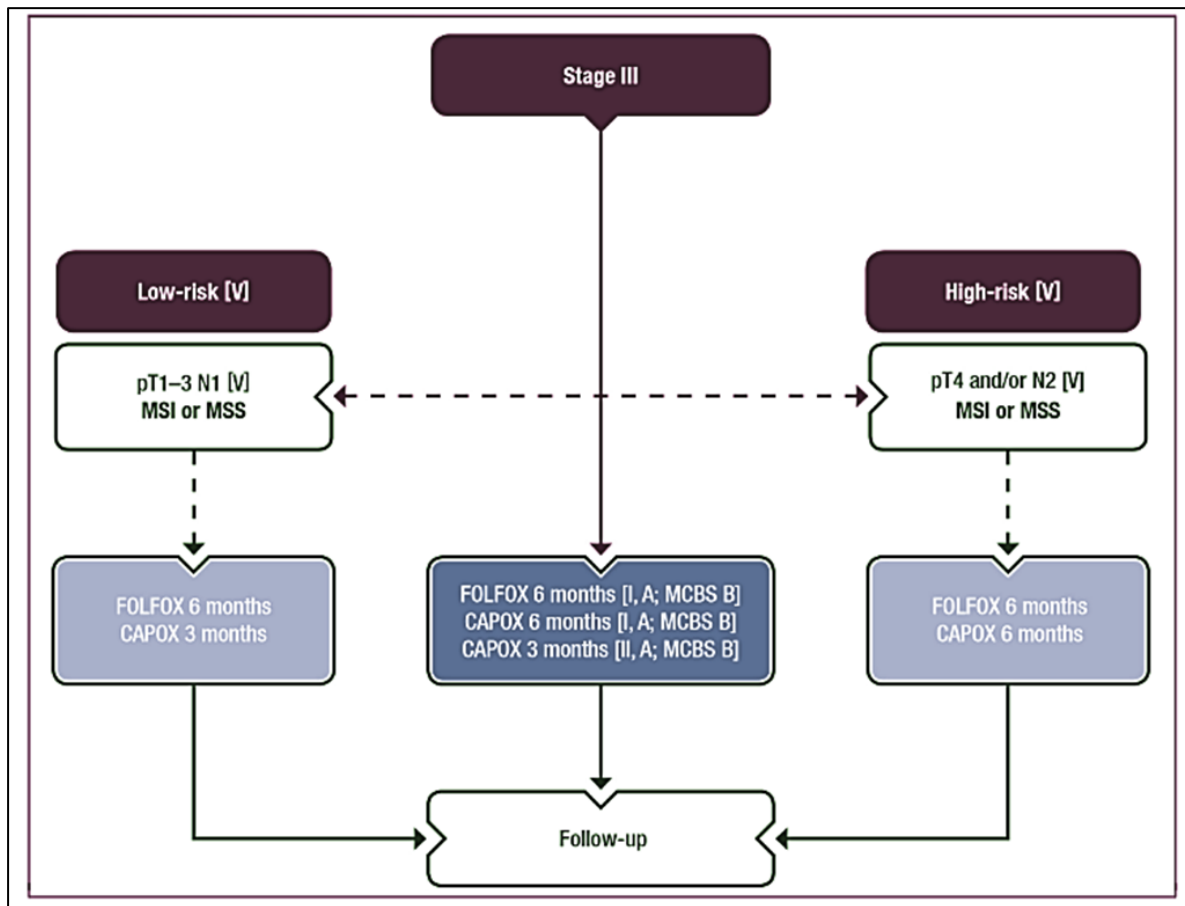
μήνες και επί του παρόντος η χορήγηση χημειοθεραπείας είναι η κύρια αντιμετώπισή της. Η κυτταρομείωση και η ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία αποτελούν πολλά υποσχόμενες μεθόδους με σημαντική ωστόσο νοσηρότητα και θνητότητα και η χρήση τους πρέπει να εξατομικεύεται. (106)

Ένας επιπλέον λόγος χειρουργικής παρέμβασης στον μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο, είναι οι επιπλοκές από τον πρωτοπαθή όγκο όπως η απόφραξη, η διάτρηση ή η αιμορραγία. (106) Οι παρεμβάσεις αφορούν εκτομή, παράκαμψη ή ενδοσκοπική τοποθέτηση stent. (106) Στους ασθενείς με μη εξαιρέσιμη μετασταστική νόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν όφελος στην επιβίωση από την εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου έναντι της χημειοθεραπείας. (106) Η επείγουσα χειρουργική παρέμβαση στους ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο έμφανίζει υψηλά ποσοστά νοσηρότητας (30%) και θνητότητας (10%). (106)

4.2. Χημειοθεραπεία

4.2.1. Καρκίνος του κόλου και του ανώτερου ορθού

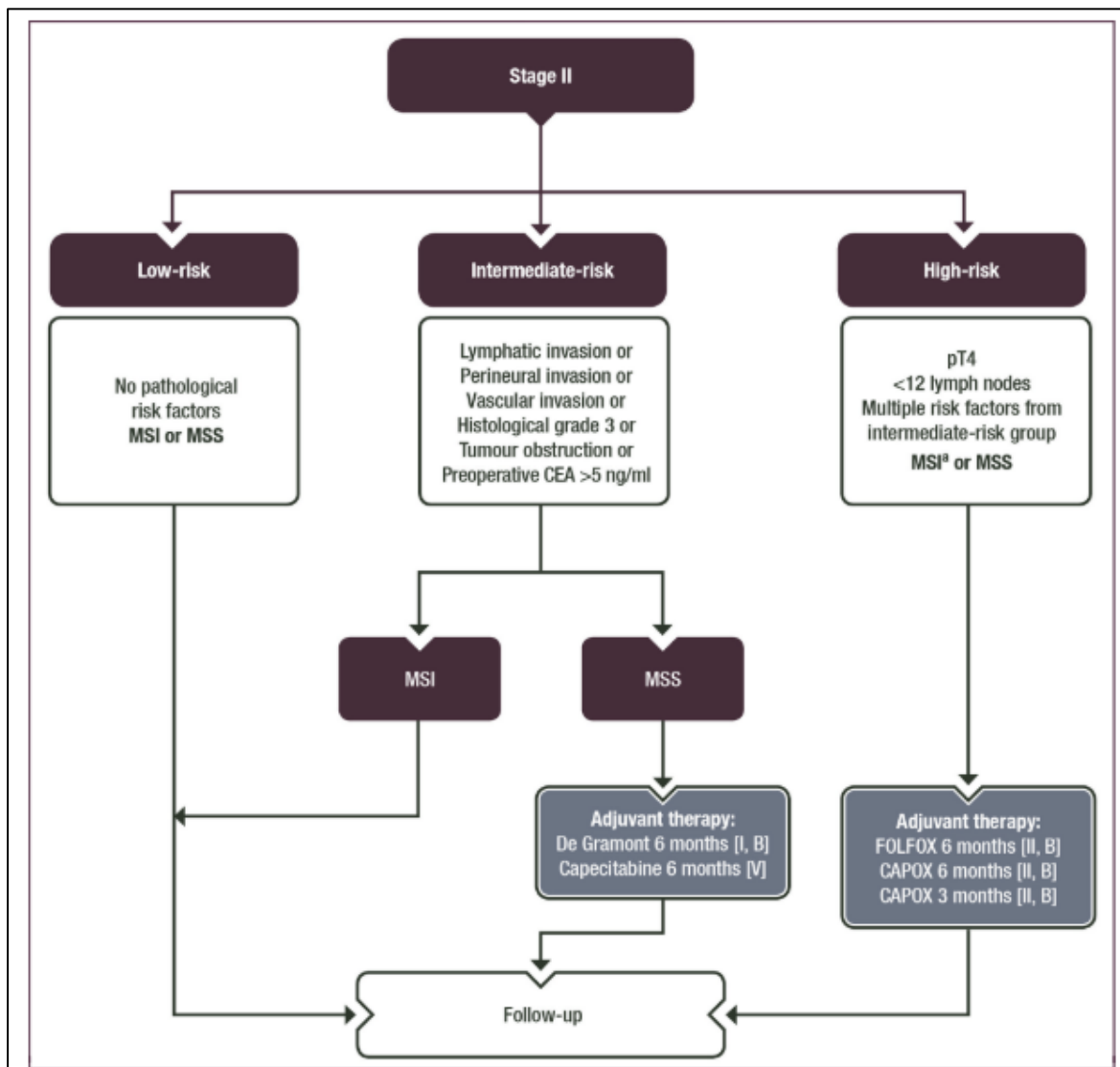
Η επικουρική χημειοθεραπεία έχει ένδειξη στους ασθενείς με λεμφαδενική διήθηση (στάδιο III). (46, 52, 106) Φαίνεται ότι βελτιώνει την επιβίωση κατά 33% και μειώνει τα ποσοστά υποτροπών κατά 40%. (106) Τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται είναι ο συνδυασμός λευκοβορίνης (φολινικό οξύ), 5-φλουουρακίλης (5-FU) και οξαλιπλατίνης (FOLFOX) και ο συνδυασμός καπεσιταμπίνης με οξαλιπλατίνη (CAPOX). (46,52) Η διάρκεια της θεραπείας καθορίζεται και από τους παράγοντες κινδύνου μεταξύ των ασθενών σταδίου III χωρίς ωστόσο να υπάρχει επαρκής βιβλιογραφική τεκμηρίωση ως προς την αξία τους (εικόνα 12). (46) Είναι σημαντικό η χορήγηση της χημειοθεραπείας να ξεκινά το συντομότερο δυνατόν μετά την χειρουργική εκτομή και ιδανικά, όχι αργότερα από 8 εβδομάδες. (46)



Εικόνα 13. Ο αλγόριθμος χορήγησης επικουρικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σταδίου III (46)

Η χορήγηση χημειοθεραπείας στους ασθενείς **σταδίου II** είναι ένα σημαντικό θέμα μελετών και όπως προαναφέρθηκε, η έρευνα εστιάζει ώστε να ανακαλυφθούν εφαρμόσιμοι βιοδείκτες που θα καθορίζουν τους ασθενείς οι οποίοι θα ωφεληθούν από τη χημειοθεραπεία έναντι αυτών που θα υποβληθούν σε ανώφελη τοξικότητα. Χωρίς τη χορήγηση χημειοθεραπείας, οι ασθενείς σταδίου IIb έχουν χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς σταδίου III. (106) Επί του παρόντος, οι μείζονες προγνωστικοί παράγοντες για τους ασθενείς σταδίου II είναι η ανεπαρκής λεμφαδενεκτομή (αριθμός λεμφαδένων <12) και το στάδιο T4 ή η διάτρηση του όγκου.(46) Ελάχιστονες παράγοντες κινδύνου για τους ασθενείς σταδίου II είναι η κακή διαφοροποίηση (υψηλό Grade), λεμφαγγειακή και περινευρική διήθηση, η επείγουσα χειρουργική επέμβαση λόγω απόφραξης κατά την αρχική διάγνωση καθώς και αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA>5ng/ml). (46) Όπως προαναφέρθηκε, οι ασθενείς με MSI-H όγκους έχουν καλύτερη πρόγνωση και εμφανίζουν αντίσταση στις θεραπείες με βάση την 5-FU. (106) 10-15% των ασθενών σταδίου II έχουν MSI-H όγκους οι οποίοι έχουν μικρό κίνδυνο υποτροπής και κανένα όφελος από τη χορήγηση

χημειοθεραπείας. (46) Βάσει των ανωτέρω παραμέτρων, οι ασθενείς σταδίου II χωρίζονται σε χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου για υποτροπή. (46) Οι ασθενείς υψηλού κινδύνου λαμβάνουν παρόμοια χημειοθεραπεία με τους ασθενείς σταδίου III ενώ οι ενδιάμεσου κινδύνου ασθενείς συστήνεται να λαμβάνουν φλουοροπυριμιδίνες (De Gramont, καπεσιταμίνη) (εικόνα 12). (46)



Εικόνα 14. Ο αλγόριθμος χορήγησης επικουρικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σταδίου II (46)

4.2.2. Καρκίνος του μέσου και κατώτερου ορθού

Η χορήγηση προεγχειρητικής χημειοθεραπείας στους μέσου και υψηλού κινδύνου για υποτροπή όγκους του ορθού, φαίνεται ότι αυξάνει την ευαισθησία του όγκου στην ακτινοβολία. (106,108,109) Προτιμάται η συνεχής ενδοφλέβια έγχυση 5-φλουορουκίλης (5-FU) ή η από του στόματος χορήγηση καπεσιταμίμπης (capecitabine) σε συνδυασμό με την μακράς διάρκειας ακτινοθεραπεία. (109) Σε όγκους που στην προεγχειρητική σταδιοποίηση εμφανίζουν διήθηση της μεσοορθικής περιτονίας ή διήθηση των πλάγιων πυελικών λεμφαδένων, συστήνεται εναλλακτικά η χορήγηση FOLFOX σε συνδυασμό με μακράς διάρκειας ακτινοθεραπεία. (108)

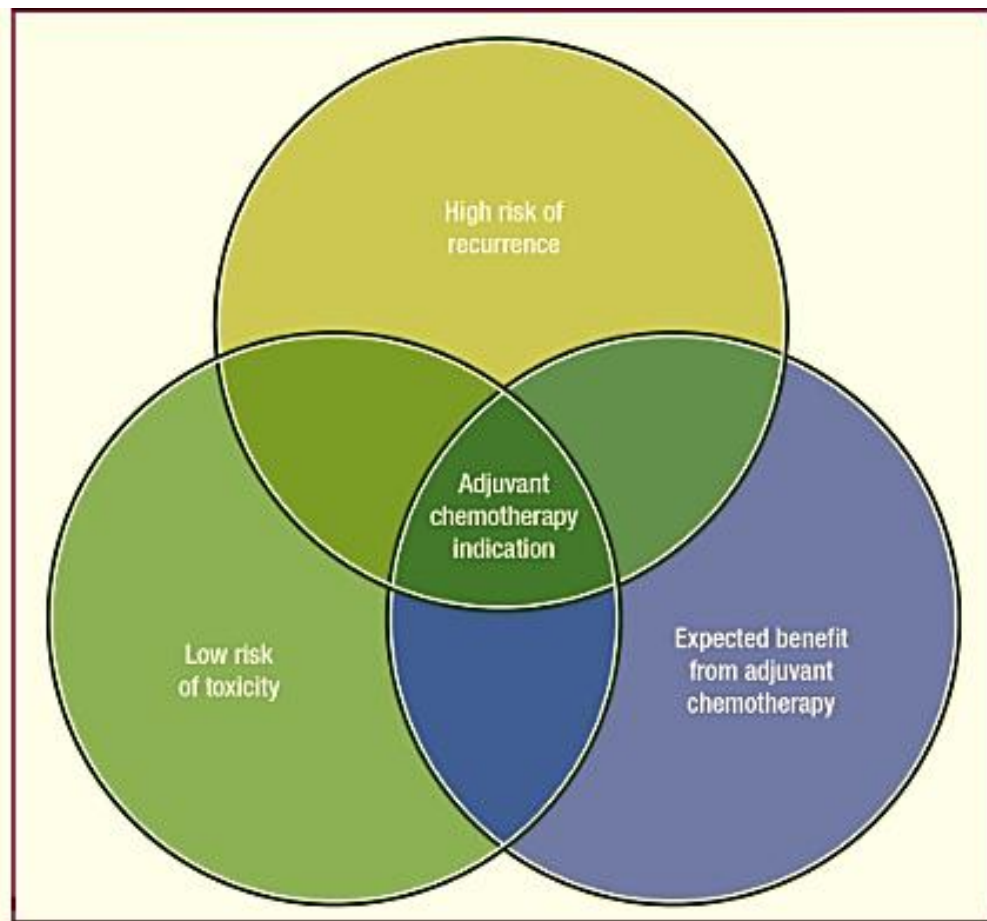
Η χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας στους ασθενείς με καρκίνο ορθού σταδίου III (και υψηλού κινδύνου σταδίου II) στην τελική ιστολογική έκθεση μετά από προηγηθείσα χορήγηση νεοεπικουρικής χημειο-ακτινοθεραπείας έχει σχετική ένδειξη. (109) Τα δεδομένα των μελετών για το όφελός της στους ασθενείς με όγκους του ορθού είναι πολύ λιγότερα από αυτά για τους όγκους του κόλου και αφορούν κυρίως το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) παρά τη συνολική επιβίωση (OS). (109) Ως εκ τούτου, η απόφαση για μετεγχειρητική χημειοθεραπεία (φθοροπυριμιδίνη μόνη της ή σε συνδυασμό με οξαλιπλατίνη) θα πρέπει να είναι ισορροπημένη ως προς τον κίνδυνο, λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προβλεπόμενη τοξικότητα για έναν συγκεκριμένο ασθενή όσο και τον κίνδυνο υποτροπής. (109)

Η χημειοθεραπεία αποτελεί το βασικό μέσο αντιμετώπισης των ασθενών με ανεγχείρητο ορθοκολικό καρκίνο (στάδιο IV). (46, 59,106) Τα αρχικά σχήματα που χορηγούνται είναι αυτά του σταδίου III (FOLFOX, CAPOX) με την πιθανή προσθήκη της ιρινοτεκάνης (FOLFIRI) ή/και των αναστολέων του VEG-F όπως το bevacizumab. (59,106) Όπως προαναφέρθηκε, στους ασθενείς με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο, πρέπει να γίνεται έλεγχος των KRAS/BRAF καθώς όσοι φέρουν μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων εμφανίζουν αντίσταση στους αναστολείς του VEG-F και δεν ωφελούνται από τη χορήγησή τους. (52,59,60) Η ένταξη της ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπιση επιλεγμένων ασθενών με μεταστατικό CRC είναι πολλά υποσχόμενη και φαίνεται να βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσης. (113)

Η απόφαση για χορήγηση χημειοθεραπείας θα πρέπει να λαμβάνεται συνυπολογίζοντας τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου και την πιθανή τοξικότητα και τις παρενέργειες. (46) Σχετικές αντενδείξεις για χορήγηση χημειοθεραπείας είναι: κακό performance status (Eastern Cooperative Oncology Group ECOG >2) , μη ελεγχόμενη λοίμωξη, οξεία ηπατική και νεφρική

δυσλειτουργία, σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια (NYHA III and IV) και πιθανά η ηλικία. (46)
Επίσης, θα πρέπει να συνυπολογίζονται και οι λοιπές συννοσηρότητες που μπορεί να επηρεάσουν τη συνολική επιβίωση. (46)

Η αφυδρογονάση των διυδροπυριμιδινών (Dihydropyrimidine dehydrogenase- DPD) είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των φθοριοπυριμιδινών (5- φθοριοουρακίλη ή 5-FU, καπεσιταβίνη, τεγκαφούρη, φλουκυτοσίνη). (46) Περίπου το 3%-5% των ασθενών έχουν ελλείψεις στη λειτουργία της DPD λόγω γενετικών πολυμορφισμών που οδηγούν σε αυξημένη τοξικότητα από τις φθοριοπυριμιδίνες, η οποία μπορεί να είναι θανατηφόρα. (46) Ως εκ τούτου, έλεγχος της λειτουργικότητας της DPD συστήνεται πάντα πριν την έναρξη λήψης των εν λόγω φαρμάκων. (46)



Εικόνα 15. Οι παράγοντες που επιδρούν στην απόφαση για χορήγησης επικουρικής θεραπείας (46)

4.3 Ακτινοθεραπεία

Στους όγκους του μέσου και του κατώτερου ορθού σταδίων II και III η προεγχειρητική χορήγηση (χήμειο-)ακτινοθεραπείας αυξάνει την πιθανότητα διατήρησης των σφιγκτήρων και μειώνει τα ποσοστά τοπικής υποτροπής χωρίς ωστόσο να επιδρά στη συνολική επιβίωση. (108,109) Επιπλέον, σχετίζεται με σημαντική επιδείνωση της εντερικής και σεξουαλικής λειτουργίας. (109) Ένδειξη για χορήγηση προεγχειρητικής ακτινοθεραπείας έχουν οι όγκοι του ορθού που στην προεγχειρητική σταδιοποίηση έχουν θετικούς λεμφαδένες (N1-2) ή εμφανίζουν εξωτοιχωματική αγγειακή διήθηση (EMVI+) ή επισφαλές κυκλοτερές όριο εκτομής (CRM). (108-110) Οι όγκοι του ανώτερου ορθού άνωθεν της ανάκαμψης του περιτοναίου αντιμετωπίζονται όπως οι όγκοι του κόλου και ακτινοβολούνται μόνο σε περιπτώσεις T4 με διήθηση της πυέλου. (109) Οι όγκοι του μέσου και κατώτερου ορθού λαμβάνουν προεγχειρητική ακτινοθεραπεία και ακόμα και ελλείψει των ανωτέρων κριτηρίων όταν είναι τοπικά προχωρημένοι (T3, T4). (108-110)

Τα πρωτόκολλα χορήγησης προεγχειρητικής ακτινοθεραπείας στους όγκους του ορθού είναι:

Η *ακτινοθεραπεία βραχείας διάρκειας* (Short course preoperative radiotherapy-SCPRT) με συνολικά χορηγούμενη δόση 25 Gy διαιρεμένη σε 5 Gy/συνεδρία σε διάρκεια 5 ημερών και ακολούθως άμεση χειρουργική επέμβαση (σε διάστημα 10-15 ημερών από την πρώτη συνεδρία). (108-110). Επίσης, η SCPRT με καθυστερημένη χειρουργική εκτομή είναι μια εναλλακτική λόγω των μικρότερων ποσοστών επιπλοκών ενώ εμφανίζει παρόμοια ογκολογικά αποτελέσματα. (109-110)

Η *μακράς διάρκειας χήμειο-ακτινοθεραπεία (CRT)* με προτεινόμενη δόση 45–50 Gy διαιρεμένη σε 25–28 συνεδρίες με σύγχρονη χορήγηση καπεσιταμπίνης ή 5FU. Σε περιπτώσεις όπου το CRM είναι επισφαλές, συστήνεται επιπλέον ενίσχυση με 5.4 Gy σε 3 συνεδρίες. (109) Ο ιδανικός χρόνος της χειρουργικής επέμβασης μετά από CRT δεν έχει τεκμηριωθεί με ακρίβεια και κυμαίνεται από 6 έως 12 εβδομάδες (108).

Δεν υπάρχει σαφής οδηγία σχετικά με τις ακριβείς ενδείξεις χορήγησης του κάθε πρωτοκόλλου. Σε περιπτώσεις όπου στην προεγχειρητική σταδιοποίηση υπάρχει αμφιβολία για τη δυνατότητα επίτευξης αρνητικού CRM ή R0 εκτομής καθώς και σε περιπτώσεις T4 όγκων και όγκων που διηθούν τους σφιγκτήρες, τότε προτείνεται η CRT. (108-110)

Στην *Επαγωγική χήμειοθεραπεία ή πλήρη νεοεπικουρική θεραπεία (Total neoadjuvant therapy-TNT)* χορηγούνται 3-6 κύκλοι FOLFOX και έπεται μακράς διάρκειας

ακτινοθεραπεία.(110) Αυτή η προσέγγιση, προσφέρει πρώιμο συστηματικό έλεγχο της νόσου, βοηθά στην αποφυγή της μετεγχειρητικής τοξικότητας που σχετίζεται με τη χημειοθεραπεία και βελτιώνει τα ποσοστά ολοκλήρωσης με την παροχή της θεραπείας πριν από τη χειρουργική επέμβαση, όταν οι ασθενείς είναι πιο κατάλληλοι και συμμορφούμενοι. (110) Μελέτες δείχνουν ότι η TNT έχει παρόμοια ογκολογικά αποτελέσματα με τη μετεγχειρητική χημειοθεραπεία, διευκολύνει την παροχή προγραμματισμένης συστηματικής θεραπείας και μη χειρουργικών θεραπευτικών στρατηγικών που στοχεύουν στη διατήρηση του οργάνου και είναι πιο οικονομική. (110)

Η ανταπόκριση στη νεοεπικουρική (προεγχειρητική) (χημειο)-ακτινοθεραπεία είναι ποικίλη ανάμεσα στους ασθενείς με το 15%-38% να εμφανίζει πλήρη παθολογοανατομική ανταπόκριση (pathological complete response-pCR). (108, 110,114) Έχουν προταθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης της ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική θεραπεία με το AJCC/CAP (College of American Pathologists) σύστημα, να υπερτερεί σε ακρίβεια και προγνωστικότητα στις διάφορες μελέτες (πίνακας 8). (114) Οι ασθενείς με πλήρη ανταπόκριση εμφανίζουν καλύτερα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα ενώ αυτοί που δεν ανταποκρίνονται φαίνεται να έχουν τη χειρότερη πρόγνωση. Ως εκ τούτου, νεότερες μελέτες δείχνουν ότι το TRG αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του ορθού και προτείνουν τη χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας στους ασθενείς με TRG 1-3. (114)

Οι ασθενείς με πλήρη ιστολογική ανταπόκριση μετά από νεοεπικουρική θεραπεία, που υποβλήθηκαν σε πλήρη μεσοορθική εκτομή, εμφανίζουν άριστα ογκολογικά αποτελέσματα με πιθανότητα τοπικής υποτροπής 0.7%, απομακρυσμένων μεταστάσεων 8.7%, συνολική επιβίωση 90% και διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) 87%. (108)

Πίνακας 6. Το σύστημα ταξινόμησης της ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική θεραπεία της AJCC/CAP για τον καρκίνο του ορθού(26)

Tumor Regression Score	Περιγραφή
0	Απουσία βιώσιμων καρκινικών κυττάρων (πλήρης ανταπόκριση-pCR)
1	Μεμονωμένα κύτταρα και αραιά μικρές ομάδες καρκινικών κυττάρων (σχεδόν πλήρης ανταπόκριση)
2	Υπολειπόμενος καρκινικός ιστός με εμφανή υποστροφή (μερική ανταπόκριση)
3	Εκτεταμένη παρουσία υπολειπόμενου καρκινικού ιστού χωρίς εμφανείς ενδείξεις υποστροφής (κακή ή καθόλου ανταπόκριση)

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η ριζική χειρουργική εκτομή επισύρει σημαντική νοσηρότητα, η εφαρμογή ενός πλάνου στενής παρακολούθησης και αναβολής της χειρουργικής εκτομής μέχρι να εμφανιστεί απεικονιστική και κλινική ένδειξη υποτροπής, είναι μια λογική πολιτική

("watch and wait approach"). (108,110,115) Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι ασθενείς με πλήρη ανταπόκριση στην νεοεπικουρική θεραπεία που δεν υποβλήθηκαν σε ριζική χειρουργική εκτομή και παρακολουθούνται στενά με οργανωμένα πρωτόκολλα κλινικής, απεικονιστικής και ενδοσκοπικής εκτίμησης, εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά τοπικής (0-1.6%) και απομακρυσμένης (0-8.9%) υποτροπής συγκρίσιμα με αυτά της ολικής μεσοορθικής εκτομής. (108,110,115) Δεν υπάρχουν σαφείς κατευθυντήριες οδηγίες ως προς την επιλογή και την παρακολούθηση των ασθενών που μπορεί να ενταχθούν στην πολιτική *watch and wait*. (110) Ως εκ τούτου, επί του παρόντος εφαρμόζεται μόνο σε ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι ή δεν επιθυμούν χειρουργική επέμβαση και πάντα εντός ερευνητικών πρωτοκόλλων. (108,110)

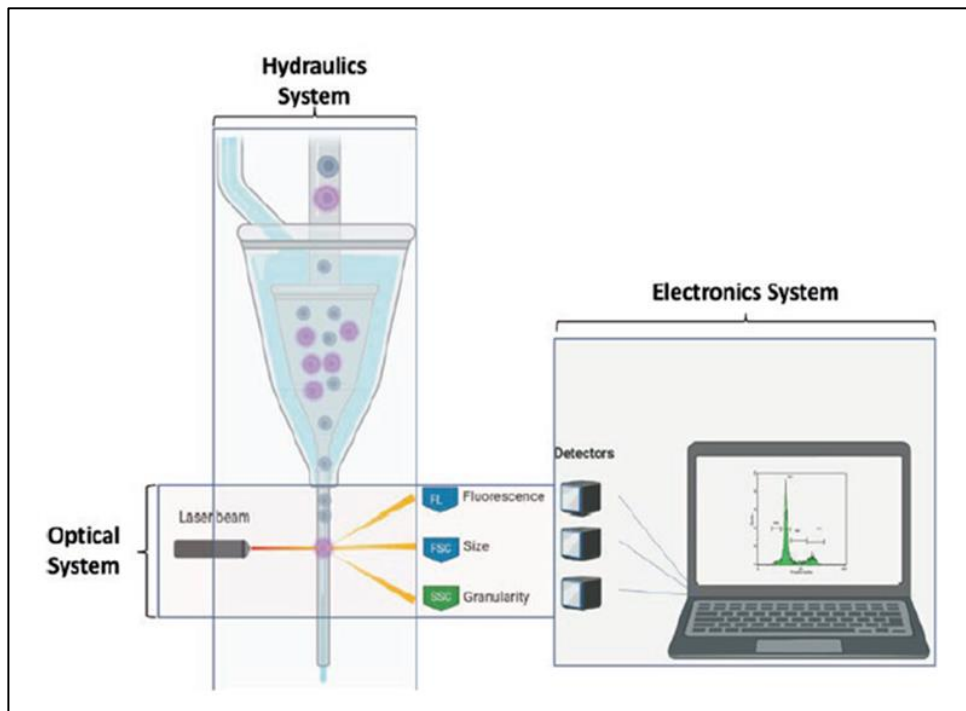
B. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

5. Περιγραφή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry-FC) αποτελεί μια τεχνολογία που επιτρέπει την πολυπαραμετρική μελέτη διάφορων σωματιδίων: των ευκαρυωτικών κυττάρων, των βακτηρίων, του πλαγκτόν, των κυτταρικών οργανιδίων και άλλων υποκυτταρικών οργανιδίων, των DNA, RNA και των πρωτεϊνών ακόμη και των διαλυτών πρωτεϊνών με την τεχνική των σφαιριδίων Latex. Τα σωματίδια αυτά πρέπει να βρίσκονται στη μορφή κυτταρικού εναιωρήματος και να ρέουν μπροστά από μία πηγή λέιζερ με ρυθμό αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. (117,118) Το φως που παράγεται από την αλληλεπίδραση των σωματιδίων με την ακτίνα λέιζερ μεταφέρεται διαμέσου πολλαπλών φίλτρων και κατόπτρων σε πολλαπλούς ανιχνευτές φωτός. Το παραγόμενο φως εμπλουτίζεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών, οι οποίες εκλεκτικά προσδένονται στα κύτταρα, κυρίως μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων. (117) Στη συνέχεια, τα συλλεγόμενα φωτεινά σήματα ενισχύονται, μετατρέπονται ψηφιακά και τελικά εισάγονται σε ένα υπολογιστικό σύστημα. Τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση των δεδομένων που δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο, με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού. (117,118)

Το κυτταρόμετρο ροής αποτελείται από τρία συστήματα:

- *Το Υδραυλικό σύστημα:* Υπεύθυνο για τη μεταφορά κυττάρων σε ροή στη δέσμη λέιζερ και το σημείο συμβολής του. Αυτό το σύστημα μεταφέρει τα κύτταρα που αιωρούνται σε ένα ρεύμα αδρανούς υγρού από ένα ή περισσότερα σημεία ανίχνευσης. Το ρεύμα του αδρανούς υγρού εστιάζεται με υδροδυναμική ακρίβεια για να διασφαλίσει ότι τα κύτταρα περνούν μεμονωμένα μπροστά από τη δέσμη λέιζερ, επιτρέποντας τη μέγιστη διακριτή ανάλυση.
- *Το Οπτικό σύστημα:* Περιλαμβάνει την πηγή λέιζερ για τη διέγερση και μια σειρά από κάτοπτρα και φίλτρα που κατευθύνουν συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός στους κατάλληλους ανιχνευτές. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από λέιζερ και μια σειρά φίλτρων και φακών που εστιάζουν το φως του λέιζερ στην κυψέλη της ροής και συλλέγουν τα εκπεμπόμενα σήματα. Διαφορετικά λέιζερ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διέγερση διαφορετικών φθοριοχρωμάτων που συνδέονται πάνω στα κύτταρα, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται φως σε διάφορα μήκη κύματος ανάλογα με τα μήκη διέγερσης των φθοριοχρωμάτων. Αυτό το σύστημα είναι κεντρικής σημασίας για την σωστή ανίχνευση πολλαπλών παραμέτρων πάνω σε ένα μόνο κύτταρο.
- *Το Ηλεκτρονικό σύστημα:* Μετατρέπει τα ανιχνευμένα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια ψηφιοποιούνται και αναλύονται από το λογισμικό του κυτταρομέτρου. Μόλις το οπτικό σύστημα συλλέξει τα εκπεμπόμενα σήματα, το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει αυτά τα σήματα σε ψηφιακά δεδομένα τα οποία μπορούν να αναλυθούν. Τα δεδομένα εμφανίζονται συνήθως ως ιστογράμματα ή διαγράμματα διασποράς, επιτρέποντας την οπτικοποίηση πληθυσμών εντός ενός δείγματος με βάση συγκεκριμένες παραμέτρους [εικόνα 16]. (117,118)



Εικόνα 16. Η δομή και τα αλληλένδετα συστήματα ενός κυτταρόμετρου ροής (118)

6. Εφαρμογές

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη μέθοδο και ένα πολύ χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στα κλινικά εργαστήρια. Οι εφαρμογές της εκτείνονται σε μεγάλο εύρος ειδικοτήτων όπως η αιματολογία, η ογκολογία, η ανοσολογία, η λοιμωξιολογία, οι μεταμοσχεύσεις, η μικροβιολογία ακόμα και η βιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος. (117)

Στην αιματολογία εφαρμόζεται στη μελέτη των λευχαιμιών, των λεμφωμάτων, των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και του πολλαπλού μυελώματος. Συμβάλλει στη διάγνωση, στον καθορισμό του τύπου του νοσήματος και του σταδίου, στην ταξινόμηση, στην μέτρηση της υπολειπόμενη νόσου για έλεγχο της ανταπόκρισης στην θεραπεία και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να διαγνώσει τον τύπο της παροξυσμικής νυχτερινής αιμοσφαιρινουρίας

(PNH- paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) και να παρακολουθήσει την ανταπόκρισή της στη θεραπεία με την εξάλειψη των κλώνων της. (117)

Στην ανοσολογία, συμβάλλει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών που προκαλούν τις ανοσολογικές αντιδράσεις στα παθογόνα και τα εμβόλια καθώς και τις οδούς της αυτοάνοσης αντίδρασης και της ανοσολογίας του καρκίνου. Σημαντικό ρόλο έχει στην εφαρμογή πρωτοκόλλων για τη διάγνωση και παρακολούθηση των πρωτοπαθών και δευτεροπαθών ανοσοανεπαρκειών (όπως η λοίμωξη HIV). (117)

Στη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων αποτελεί μέθοδο εκλογής για την αξιολόγηση της ανοσολογικής ανταπόκρισης. Χρησιμοποιείται επιπλέον στην ορολογική αντιστοίχιση δότη-λήπτη στις μεταμοσχεύσεις των συμπαγών οργάνων. (117)

Εκτός από τη μελέτη διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να αναγνωρίσει μια ποικιλία σωματιδίων, όπως ενδοκυττάρια οργανίδια, χρωμοσώματα, πυρήνες, μιτοχόνδρια και εξωκυτταρικά κυστίδια ή ακόμη και μικροοργανισμούς. (117)

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής. (117,119) Η κυτταρομετρία ροής από πολλές μελέτες υποστηρίζεται ως η καταλληλότερη μέθοδος ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου σε φρέσκους ιστούς ή εκχυλίσματα κυττάρων. (119) Μπορεί να μετρήσει το ποσοστό των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, την πλοειδία και τις μεταβολές στο περιεχόμενο του DNA που είναι υπεύθυνες για μια σειρά κακοήθων παθήσεων. (117,119) Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού των δεικτών του φαινομένου της απόπτωσης με ταχεία και ποσοτική μέτρηση καθώς και της ποσοτικοποίησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, βάσει μιας σειράς διαφορετικών δεικτών που προκύπτουν από την ανάλυση του ιστογράμματος. (117,119)

Με την FC μπορούμε να αναλύσουμε μονοδιάστατα μια μεμονωμένη κυτταρική παράμετρο μέσα σε έναν κυτταρικό πληθυσμό. Αυτή η ανάλυση είναι κεντρικής σημασίας σε διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της αξιολόγησης του μεγέθους των κυττάρων, της κοκκίωσης, της περιεκτικότητας σε DNA και των επιπέδων έκφρασης επιφανειακών ή ενδοκυτταρικών μορίων. (118)

Η δυνατότητα της FC να μελετάει ένα μοναδικό χαρακτηριστικό ενός κυττάρου ανάμεσα σε χιλιάδες έως εκατομμύρια κύτταρα, της προσδίδει μια μοναδική βιολογική δυναμική. Τα ιστογράμματα είναι το κύριο εργαλείο για την παρουσίαση δεδομένων σε μονοδιάστατη

ανάλυση. Ένα ιστόγραμμα απεικονίζει τη συχνότητα των κυττάρων έναντι μιας μόνο παραμέτρου του , όπως για παράδειγμα η ένταση φθορισμού. (118)

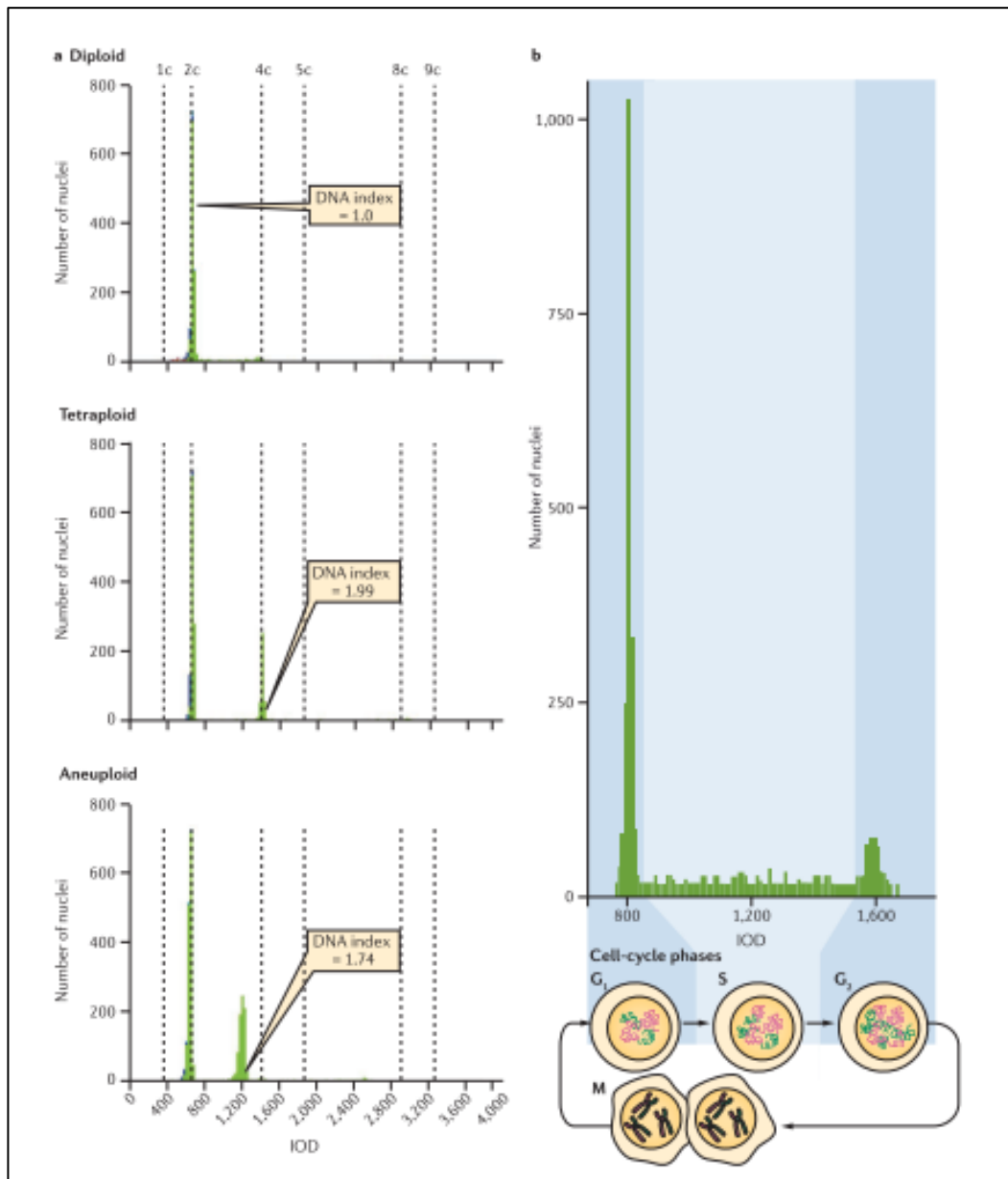
Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μονοδιάστατης ανάλυσης είναι η εξέταση του περιεχομένου DNA για την αξιολόγηση του κυτταρικού κύκλου. Επιδρώντας στα κύτταρα μια χρωστική που δεσμεύεται πάνω στο DNA, δημιουργείται ένα ιστόγραμμα που απεικονίζει την κατανομή των κυττάρων στις φάσεις G0/G1, S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Από αυτή την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μπορούμε να κατανοήσουμε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τις επιδράσεις των φαρμάκων στην κυτταρική διαίρεση και να εντοπίσουμε κυτταρικούς πληθυσμούς με μη φυσιολογική περιεκτικότητα σε DNA, πράγμα που συχνά σχετίζεται με την ύπαρξη κακοήθειας. (118)

Ο *DNA Index (DI)* είναι ένας δείκτης που αντιπροσωπεύει τη μέση ποσότητα του περιεχόμενου DNA των κυτταρικών σειρών ενός ιστογράμματος και χρησιμοποιείται ως δείκτης της σχετικής ποσότητας DNA που περιέχεται στον πυρήνα ενός μεμονωμένου κυττάρου του υπό μελέτη ιστού. Κατά την ανάλυση ενός κυτταρομετρικού ιστογράμματος (εικόνα 17) το χαρακτηριστικό των διπλοειδών δειγμάτων ($DI = 1.0$) είναι η επικράτηση των πυρήνων στη στήλη 2c. (119) Επιπλέον, ένας μικρός κυτταρικός πληθυσμός που βρίσκεται στο σημείο G2/M του κυτταρικού κύκλου εκφράζεται ως κορυφή στη θέση 4c ($DI = 2$). Στις περιπτώσεις όπου ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι υψηλός, οι πυρήνες που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου απεικονίζονται ως γεγονότα μεταξύ των κορυφών 2c και 4c. Οι όγκοι χαρακτηρίζονται τετραπλοειδικοί όταν ένας κυτταρικός πληθυσμός είναι εμφανής στη θέση 4c μαζί με έναν μικρότερο G2/M τετραπλοειδικό πληθυσμό στη θέση 8c ή όταν τουλάχιστον 10% του συνόλου των πυρήνων βρίσκονται στη θέση 4c του ιστογράμματος-στην πραγματικότητα ένας τετραπλοειδικός ιστός σπάνια αποτελείται αποκλειστικά από τετραπλοειδή κύτταρα. Ένας ιστός χαρακτηρίζεται ανευπλοειδικός όταν το ιστόγραμμα αναδεικνύει ανώμαλους κυτταρικούς φαινότυπους όπου ο G0/G1 πληθυσμός εμφανίζεται ως κορυφή του ιστογράμματος η οποία δεν αποτελεί ακέραιο πολλαπλάσιο του 2c ($DI = 2,4,8,16$). (119)

Ο όρος *S-phase fraction (SPF)* αναφέρεται στο σχετικό αριθμό πυρήνων που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου , όπως αυτός υπολογίζεται από τον αριθμό των πυρήνων που βρίσκονται μεταξύ της G0/G1 και G2/M κορυφές του ιστογράμματος (απεικονίζονται ως γεγονότα μεταξύ των κορυφών 2c και 4c). Αποτελεί δείκτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού και συναντάται σε πολλές μελέτες σε συνδυασμό με τη cyclin A ή το Ki67 ως δείκτης κακοήθειας. (119)

Η φαινοτυπική ετερογένεια ενός όγκου είναι αναπόφευκτη συνέπεια της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN) και ως εκ τούτου αποτελείται από ομάδες κυττάρων με κυττογενετική ανευπλοειδία (cytogenetic aneuploidy- μη φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση) και DNA ανευπλοειδία (μη φυσιολογική ποσότητα DNA κατά τη μεσόφαση). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση των δυνατότερων κλώνων οι οποίοι αποτελούν τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (cancer stem cells-CSCs). (119)

Οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν διευρύνει τις δυνατότητες της κυτταρομετρίας ροής, ενσωματώνοντας την κυτταρική διαλογή υψηλής απόδοσης και τις τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας ενός μόνο κυττάρου. Αυτή η εξέλιξη επιτρέπει ακριβέστερη διερεύνηση της κυτταρικής ετερογένειας και της λειτουργίας, ανοίγοντας νέες οδούς στην εξατομικευμένη ιατρική και στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών. Η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής εκτείνεται πέρα από την απλή κυτταρική ανάλυση και φέρνει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο κατανοούμε την κυτταρική πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων, παρέχοντας γνώσεις που οδηγούν σε καινοτόμες θεραπευτικές στρατηγικές και τις διαγνωστικές προσεγγίσεις. (117,119)



Εικόνα 17. α. Χαρακτηριστικά ιστογράμματα διπλοειδούς ($Di=1,0$), τετραπλοειδούς ($Di=1,99$) και ανευπλοειδούς ιστού ($DI=1,74$)

β. Κυτταρομετρικό ιστόγραμμα και η αντιστοιχία των κορυφών με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (119)

7. Διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής (intraoperative Flow Cytometry-iFC)

Για τουλάχιστον 150 χρόνια η εκτίμηση των χειρουργικά εξαιρεθέντων συμπαγών νεοπλασμάτων βασίζεται στην παθολογοανατομική εξέταση. (120,121) Αυτή η διαδικασία συνήθως διαρκεί από 2 έως 4 εβδομάδες, γεγονός που καθυστερεί την τελική διάγνωση και

την έγκαιρη θεραπεία σε κάποιες περιπτώσεις. Διεγχειρητικά, ο χειρουργός μέχρι σήμερα μέσω της ταχείας βιοψίας μπορεί να έχει μια εκτίμηση του βαθμού και του τύπου κακοήθειας των νεοπλασμάτων και κυρίως των ορίων εκτομής του όγκου. (120) Η παθολογοανατομική εκτίμηση των ορίων εκτομής των όγκων με ταχεία βιοψία ή κυτταρολογική εξέταση διαρκεί τουλάχιστον 20 λεπτά. Η εκτίμηση αυτή κατευθύνει το χειρουργό ως προς την ανάγκη συμπληρωματικής εκτομής ώστε να επιτευχθούν τα απαιτούμενα «υγιή» όρια εκτομής. (122) Ωστόσο, η ταχεία βιοψία έχει πολλά μειονεκτήματα, καθώς ο χρόνος από τη συλλογή του δείγματος μέχρι την απάντηση μπορεί να φτάσει τα 20-30 λεπτά, οι τομές είναι συνήθως χαμηλής ποιότητας, η τεχνική βασίζεται στην εμπειρία του παθολογοανατόμου και ορισμένες φορές η τελική διάγνωση μπορεί να διαφέρει από το πόρισμα της ταχείας βιοψίας. (120-122) Η συνολική ακρίβεια της μεθόδου είναι περίπου 95.1% και μπορεί να ποικίλει μεταξύ των διάφορων τύπων όγκων και μεταξύ των μεθόδων δειγματοληψίας. (122) Στον καρκίνο του κατώτερου ορθού όπως προαναφέρθηκε, το περιφερικό όριο εκτομής οφείλει να είναι τουλάχιστον 1 cm πράγμα που καθορίζει το είδος της επέμβασης και την ποιότητα ζωής του ασθενούς. (108,110) Οι Khouiry et al, εκτίμησαν τα περιφερικά όρια σε όγκους ορθού με ταχεία βιοψία. Η ευαισθησία της μεθόδου στη μελέτη αυτή ήταν 83%, η ειδικότητα 98% και η συνολική ακρίβεια 95%. Η ακρίβεια της μεθόδου δεν επηρεάστηκε από τη λήψη προεγχειρητικής ακτινοθεραπείας. (123)

Η εφαρμογή της κυτταρομετρικής ανάλυσης προσφέρει πολλαπλά οφέλη στη μελέτη των όγκων. (119) Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά μέσω της συσσώρευσης γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων που επιδρούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση προκαλώντας μεταβολές στο περιεχόμενο DNA των κυττάρων. (14-25,119) Η κυτταρομετρική ανάλυση πραγματοποιείται στο επίπεδο του κάθε κυττάρου, προσδίδοντας στη μέθοδο αυξημένη ευαισθησία καθώς αφορά το βασικό επίπεδο όπου συμβαίνουν όλες οι διεργασίες της καρκινογένεσης. (117-119) Άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της κυτταρομετρικής της ανάλυσης είναι η ταχύτητα που αυτή δύναται να πραγματοποιηθεί όπως και η ποσοτική φύση των αποτελεσμάτων, καθώς ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων/γεγονότων μπορεί να αναλυθεί σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. (117-19)

Λαμβάνοντας υπόψιν τις ανωτέρω δυνατότητες γεννήθηκε η ιδέα της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής (intraoperative Flow Cytometry-iFC). Η εφαρμογή της αφορά τον ταχύ

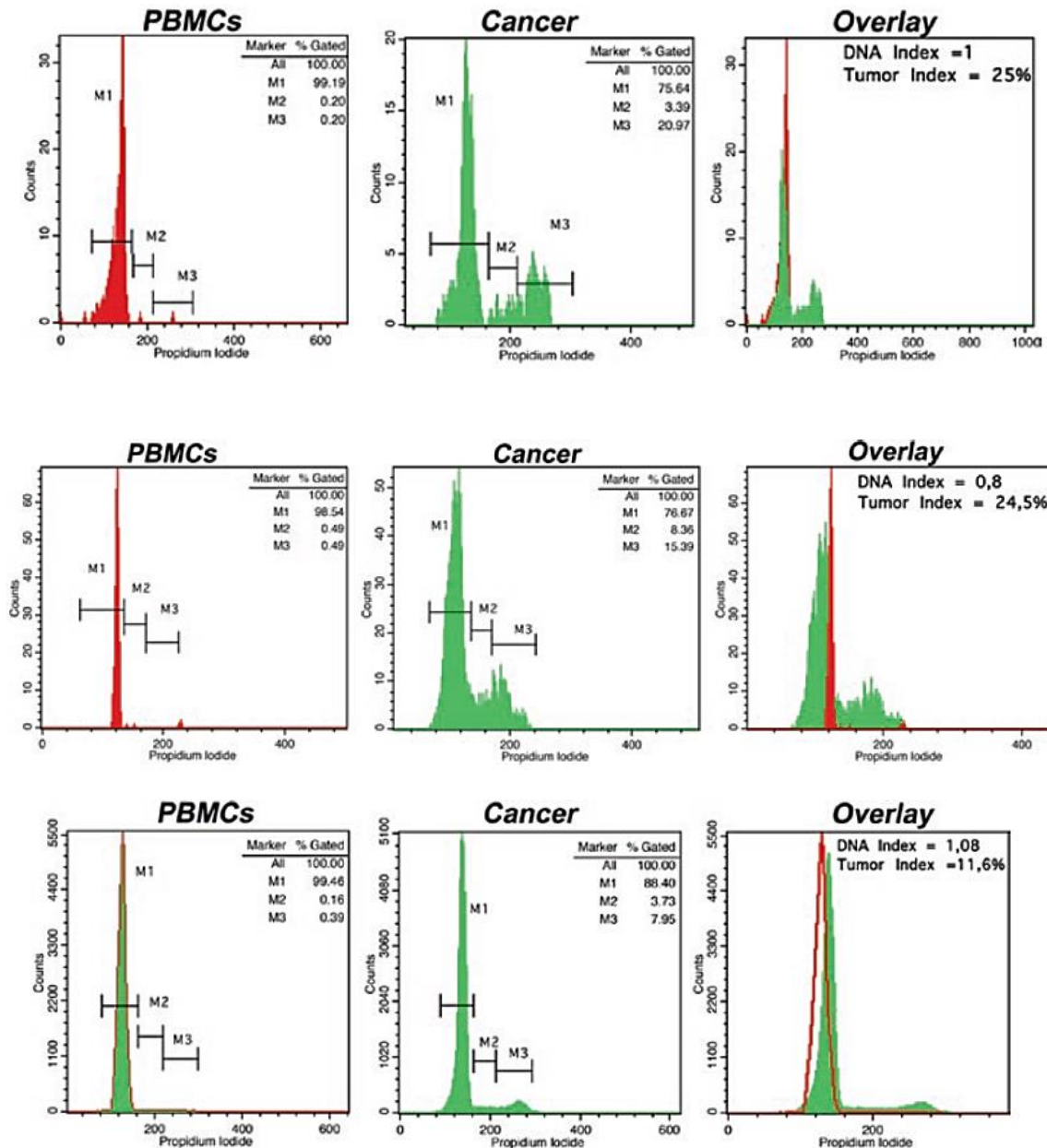
χαρακτηρισμό και το διαχωρισμό των καρκινικών κυττάρων ενός ιστού από τα υγιή και κατ' επέκταση τον προσδιορισμό των ορίων εκτομής. (124)

Η διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια ταχεία παραλλαγή της συμβατικής ανάλυσης του περιεχομένου DNA η οποία βασίζεται στο διαχωρισμό των φάσεων του κυτταρικού κύκλου με τη λεγόμενη μονοδιάστατη ανάλυση. (119,124) Αυτό που διαχωρίζει τα κύτταρα στις διαφορετικές φάσεις είναι το ποσό του DNA κατά την αντιγραφή, μια διαδικασία που συμβαίνει κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη φάση S. Η iFC στηρίζεται στο υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων και στην παρουσία της ανευπλοειδίας. (122) Συγκεκριμένοι δείκτες, όπως ο DNA Index και ο Tumor Index (δείκτης κακοήθειας) συμβάλλουν στην περαιτέρω μελέτη των καρκινικών κυττάρων (119,124)

Ο *DNA index (DI)* υπολογίζεται από το κλάσμα του γεωμετρικού μέσου της G0/G1 κορυφής των καρκινικών κυττάρων διά το γεωμετρικό μέσο της G0/G1 κορυφής των φυσιολογικών κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC cells) που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες (διπλοειδικά κύτταρα). (125) Ο δείκτης αυτός είναι ενδεικτικός της παρουσίας ανευπλοειδίας. DNA index ~1 είναι χαρακτηριστικό των διπλοειδικών ιστών, ενώ DNA index μεγαλύτερο του 1,05 αντιστοιχεί σε υπερπλοειδία (μεγαλύτερο αριθμό χρωμοσωμάτων ή χρωμοσώματα με μεγαλύτερη ποσότητα DNA από το φυσιολογικό). (125) Αντιθέτως, DNA index μικρότερο του 0,95 είναι ενδεικτικό υποπλοειδικού ιστού που ερμηνεύεται ως απώλεια χρωμοσωμάτων ή τμημάτων τους από τα υπό μελέτη κύτταρα. (125) Σε όλες τις περιπτώσεις, DNA index διαφορετικό του 1 είναι χαρακτηριστικό των ανευπλοειδικών ιστών και αποτελεί ενδεικτικό κακοήθειας. (125)

Ο *Tumor-index (TI)* είναι ενδεικτικός του πολλαπλασιαστικού δυναμικού ενός ιστού και ορίζεται ως το σύνολο του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Το υψηλό Tumor index είναι ενδεικτικό κακοήθειας σε διπλοειδείς ιστούς με ένα κατώφλι που κυμαίνεται από 5% μέχρι 10,5% και εξαρτάται από το είδος του ιστού και από το πολλαπλασιαστική ικανότητα των υγιών κυττάρων. (125)

Ο δείκτης κακοήθειας (malignancy index -MI) αποτελεί το συνολικό ποσοστό των κυττάρων που έχουν υψηλότερο γεωμετρικό μέσο από αυτό της διπλοειδούς κορυφής στη φάση G0/G1 και ουσιαστικά συμπεριλαμβάνει τα ανευπλοειδικά και τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Αυτός ο δείκτης έχει διαγνωστική και προγνωστική αξία στο γλοιοβλάστωμα. Υπολογίζεται εύκολα, ωστόσο στους υποπλοειδικούς όγκους υπάρχει κίνδυνος να υποεκτιμηθεί ως φυσιολογικός. (125)



Εικόνα 18. Ενδεικτικά ιστογράμματα iFC όπου απεικονίζονται η κατανομή του περιεχόμενου DNA των PBMCs, των καρκινικών κυττάρων καθώς και η αλληλοεπικάλυψή τους σε 3 χαρακτηριστικές περιπτώσεις: Α. διπλοειδούς καρκινικού ιστού (DI=1,0) όπου η παρουσία καρκινικών κυττάρων στοιχειοθετείται από το υψηλό Tumor index (25%), Β. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υπερπλοειδία (DNA index=1.08) και από υψηλό Tumor index (11.6%), Γ. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υποπλοειδία (DNA index=0,8) και από υψηλό Tumor index (24.5%) (125)

Η διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής εισήλθε στην κλινική πρακτική την τελευταία δεκαπενταετία, όταν αναπτύχθηκε μια νέα ιδέα: η ανάλυση της κατανομής περιεχομένου DNA, κατά τη χειρουργική εκτομή όγκων του εγκεφάλου. Έτσι, το 2013 εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το Ioannina Protocol σε δείγματα από όγκους εγκεφάλου 56 ασθενών. Η μελέτη της κατανομής του κυτταρικού κύκλου αποδείχθηκε χρήσιμη για τη διάκριση μεταξύ

μηνιγγιωμάτων βαθμού I έως βαθμού II/III και μεταξύ γλοιωμάτων χαμηλού βαθμού και γλοιοβλαστώματων υψηλότερου βαθμού. (126)

Η iFC βασίζεται στην ταχεία κυτταρομετρική ανάλυση, έτσι ώστε να μπορεί εφαρμοστεί διεγχειρητικά ως πρόσθετη ή εναλλακτική εφαρμογή της ταχείας βιοψίας. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο ταχείας κυτταρομετρικής ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου στις βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος και των ορίων εκτομής τους αναπτύχθηκε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων με το όνομα Ioannina Protocol. Στη μελέτη αυτή εντάχθηκαν 31 ασθενείς. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έδειξε σημαντική αύξηση του Tumor index στους όγκους υψηλής κακοήθειας (high grade) συγκριτικά με τους όγκους χαμηλής κακοήθειας (low grade). Επιπλέον στους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της φάσης G0/G1 και του Tumor Index μεταξύ των δειγμάτων του όγκου και των ορίων εκτομής, επικυρώνοντας έτσι την αξία της μεθόδου στον καθορισμό των «υγιών» ορίων εκτομής. (127)

Παράλληλα με την ανάπτυξη του Ioannina Protocol, ένα παρόμοιο πρωτόκολλο iFC αναπτύχθηκε από ερευνητές του Women's Medical University του Τόκιο με ανάλυση που απαιτούσε 10-12 λεπτά ανά δείγμα. (128) Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει 328 ασθενείς με γλοίωμα και βάσει των λοιπών κυτταρομετρικών παραμέτρων, στην τελική ανάλυση υπολογίστηκε ο βέλτιστος δείκτης κακοήθειας (ποσοστό κυττάρων με μη φυσιολογική περιεκτικότητα σε DNA) με τιμή αποκοπής (cut off) το 6,8% επιτυγχάνοντας έτσι 88% ευαισθησία και 88% ειδικότητα στον εντοπισμό της κακοήθειας. (128)

Οι δύο ερευνητικές ομάδες σε κοινή δημοσίευση ανέδειξαν την αξία της iFC στη μελέτη των ενδοκράνιων νεοπλασμάτων. Συνοψίζοντας, σε αυτή τη μελέτη προβλήθηκε η ικανότητα της iFC στον καθορισμό των ορίων του όγκου στα γλοιώματα όπως και στον καθορισμό του βαθμού κακοήθειας (tumor grade) και της πρόγνωσης. Επιπλέον, αναδείχθηκε η ικανότητα της iFC στον καθορισμό των ενδοκράνιων λεμφωμάτων. Διευρύνοντας το φάσμα των εφαρμογών της iFC στα ενδοκράνια νεοπλάσματα, φάνηκε πως ο διεγχειρητικός υπολογισμός του Tumor Index έχει προγνωστική αξία εάν υπολογιστεί μετά από χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη και ακτινοθεραπεία. (129)

Η τεκμηρίωση της αξίας της iFC στους ενδοκράνιους όγκους οδήγησε στην ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων για τον χαρακτηρισμό και τη διάγνωση νεοπλασμάτων και άλλων οργάνων.

Στα κακοήγη νεοπλάσματα του μαστού η iFC εμφανίζει εξαιρετικά αποτελέσματα. Σε δείγματα 99 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ογκεκτομή η μέθοδος εμφανίζει ακρίβεια 92,5% με ευαισθησία 93,3% (έναντι 82,3% της κυτταρολογικής εξέτασης) και ειδικότητα 92,4%. (130) Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν την iFC ως μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο στον καθορισμό των ορίων εκτομής στον καρκίνο του μαστού όπου τα υγιή όρια εκτομής αποτελούν τη βασική παράμετρο για υποτροπή μετά από επεμβάσεις διατήρησης του μαστού. (131, 132)

Η εφαρμογή της iFC στα νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου ανέδειξε επίσης σημαντικά αποτελέσματα με κλινικό αντίκτυπο και προοπτικές. (133,134) Σε μια σειρά 78 ασθενών με βλάβες κεφαλής και τραχήλου διαπιστώθηκε ότι για Tumor Index μεγαλύτερο ή ίσο με 10% , η μέθοδος εμφανίζει 97,4% ευαισθησία και 90% ειδικότητα ως προς τον εντοπισμό των κακοήγων κυττάρων.(134) Επιπλέον στην ίδια μελέτη όλες οι ανευπλοειδείς βλάβες αποδείχθηκαν κακοήγεις στην τελική ιστολογική εξέταση. (134) Οι κακοήγεις βλάβες εμφάνισαν μικρότερο ποσοστό G0/G1 και μεγαλύτερες τιμές G2/M από τις καλοήγεις. (132) Όλα τα δεδομένα της μελέτης ήταν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.0001$). (132)

Τα πρώιμα αποτελέσματα της μεθόδου στην μελέτη των νεοπλασμάτων του ήπατος και του παγκρέατος είναι επίσης ενθαρρυντικά. (135,136) Σε μια σειρά 42 ασθενών με νεοπλάσματα του γυναικολογικού συστήματος, η ακρίβεια της iFC να διαχωρίσει τον καρκινικό από το φυσιολογικό ιστό φτάνει το 95,25% (100% ευαισθησία και 90,5% ειδικότητα) όταν ως κατώφλι οριστεί η τιμή 6,5% και άνω για το Tumor Index. (137) Τέλος, η εφαρμογή της iFC σε νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης εμφανίζει αντίστοιχα εντυπωσιακά αποτελέσματα. (138) Συγκεκριμένα σε μια σειρά 52 ασθενών με όγκους ουροδόχου κύστης οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διουρηθρική εκτομή η ακρίβεια της μεθόδου αγγίζει το 98,1% (100% ευαισθησία, 96,2% ειδικότητα) για τιμές Tumor Index μεγαλύτερες ή ίσες του 6,5%. (138)

Συνοψίζοντας, τα πρώιμα αποτελέσματα των μελετών από την εφαρμογή της μεθόδου είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα. (118, 124-138) Η διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος στην περιεγχειρητική διαχείριση των νεοπλασμάτων ποικίλης προέλευσης καθώς εμφανίζει μεγάλη ακρίβεια στον εντοπισμό των καρκινικών κυττάρων, με πολύ μικρό απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης (λιγότερο από 8 λεπτά) και με ιδιαίτερα χαμηλό κόστος συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους «ταχείας βιοψίας».(118,124) Μεγαλύτερες πολυκεντρικές μελέτες απαιτούνται ώστε να τεκμηριωθεί και να εδραιωθεί η χρήση της στην παγκόσμια χειρουργική ογκολογία.

Γ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

8. Ο ρόλος της ανευπλοειδίας στον ορθοκολικό καρκίνο (CRC)

Από το 1982, η κυτταρομετρία ροής (FC) έχει χρησιμοποιηθεί από μεγάλο αριθμό μελετών ως μέθοδος προσδιορισμού της ανευπλοειδίας στον CRC σε ποικιλία δειγμάτων (φρέσκων και μονιμοποιημένων σε παραφίνη). Το κύριο αντικείμενο των μελετών αυτών είναι η συσχέτιση της ανευπλοειδίας και άλλων επιμέρους παραμέτρων όπως οι δείκτες επιφανείας (CD24, CD26 κ.α.) με την πρόγνωση των ασθενών, ειδικά στο στάδιο II του ορθοκολικού καρκίνου όπου η χορήγηση χημειοθεραπείας είναι ένα μείζον αμφιλεγόμενο ζήτημα (εικόνα 19). (119,139-147)

Οι Grabsch et al το 2002, σε μια συστηματική ανασκόπηση προσπάθησαν να απαντήσουν στο ερώτημα αν έχει κλινική αξία ο συστηματικός προσδιορισμός της ανευπλοειδίας σε ποικιλία νεοπλασμάτων του πεπτικού σωλήνα συμπεριλαμβανομένου και του CRC. Η επίπτωση της ανευπλοειδίας στα δείγματα CRC κυμαίνονταν από 38-93% σε αυτή τη μελέτη. Επιπλέον, η επίπτωση της ανευπλοειδίας είχε σημαντικές διακυμάνσεις, που έφταναν μέχρι 38%, σε νεοπλάσματα διαφορετικών εντοπίσεων. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της ανευπλοειδίας με τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό διαφοροποίησης ή την πρόγνωση. Ο μόνος προγνωστικός δείκτης ανεξαρτήτως σταδίου ήταν το DNA index. Συμπερασματικά, οι συγγραφείς κατέληξαν πως δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα τη συγκεκριμένη στιγμή, που να στοιχειοθετούν την συστηματική χρήση της ανευπλοειδίας ως μια διαγνωστική εξέταση ρουτίνας για τον προσδιορισμό των προκαρκινικών βλαβών στο κολονικό επιθήλιο. (139)

Οι Stoian et al, δύο δεκατίες αργότερα, μελέτησαν ξανά την ανευπλοειδία ως πρώιμο δείκτη κακοήθους εξαλλαγής στους αδενωματώδεις πολύποδες του παχέος εντέρου. Τα δείγματα από τους πολύποδες διαχωρίστηκαν σε 2 τεμάχια ώστε το ένα να εξετασθεί ιστολογικά και το δεύτερο με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι τα αδενώματα που παρουσίαζαν ανευπλοειδία σχετίζονταν με τοπική καρκινωματώδη εξαλλαγή συχνότερα συγκριτικά με τα διπλοειδή [100% vs 28%] ($P < 0.01$). Επιπλέον το DNA index στο αδενωματώδες τμήμα ήταν το ίδιο με αυτό του καρκινικού ιστού. Η ανευπλοειδία συσχετίστηκε επίσης με το μέγεθος των βλαβών. Δεν αναδείχθηκε ωστόσο συσχέτιση της ανευπλοειδίας με το βαθμό δυσπλασίας. Συμπερασματικά, κατέληξαν ότι η παρουσία ανευπλοειδίας σε ένα αδενωματώδη πολύποδα είναι ενδεικτική πιο επιθετικής βλάβης και

μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ώστε αυτοί οι ασθενείς να έχουν μια πιο στενή παρακολούθηση. (140)

Study	Number of stage II CRCs (proportion that were diploid)	Survival end point	Follow-up duration (years)	DNA-cytometry method	Survival in patients with diploid vs those with aneuploid tumours	Aneuploidy associated with survival after multivariate analysis	P value for association of aneuploidy with survival in univariate analysis
Hveem et al. (2014) ¹⁶²	348 (34%)	OS	10	ICM	52% vs 34%	Yes; HR 1.46	0.003
Hveem et al. (2014) ¹⁶²	278 (53%)	TTR	10	ICM	74% vs 49%	Yes; HR 2.19	0.006
Takanishi et al. (1996) ¹⁶⁴	210 (45%)*	OS	5	FCM-A	80% vs 64%	Yes; HR NR	0.02
Sinicropo et al. (2006) ¹²¹	158 (49%)*	OS	5	FCM-A	78% vs 64%	Yes; HR 2.27	0.026
Sinicropo et al. (1999) ¹⁶⁵	154 (48%)*	OS	5	FCM-A	93% vs 84%	NS	0.06
Armitage et al. (1991) ¹⁶⁶	139 (42%)	DFS	4.5	FCM-A+F	84% vs 64%	Yes; HR NR	0.01
Chapman et al. (1995) ¹⁶⁷	136 (42%)	OS	5	FCM-A+F	84% vs 65%	Yes; HR NR	0.01
Lanza et al. (1998) ¹⁶⁸	107 (28%)*	DFS	4	FCM-F	97% vs 80%	NS	NS
Buglioni et al. (2001) ¹⁶⁹	94 (48%)	OS	5	FCM-F	NA	NS	NS
Buglioni et al. (2001) ¹⁶⁹	94 (83%)*	OS	5	FCM-F	~85% vs 50%†	Yes; HR 4.48	0.002
Kay et al. (1996) ¹⁷⁰	92 (43%)	OS	7	ICM	76% vs 61%	Yes	0.008
Garrity et al. (2004) ¹⁷¹	91 (NR)	DFS	5	FCM	NA	NS	NS [§]
Zarbo et al. (1997) ¹⁷²	91 (NR)	OS	5	FCM-A	80% vs 75%	NS	NS
Kokal et al. (1989) ¹⁷³	89 (46%)	DFS	4	FCM-A	97% vs 67%	NR	<0.001
Tomoda et al. (1998) ¹⁷⁴	81 (32%)	DFS	3	FCM-F	86% vs 85%	NS	NS
Cosimelli et al. (1998) ¹⁷⁵	68 (34%)	DFS	4	FCM-F	63% vs 55%	NS	NS
Bondi et al. (2009) ¹⁷⁶	66 (39%)*	CSS	5	ICM	NA	NS	0.065
Ahnen et al. (1992) ¹⁷⁷	66 (53%)*	OS	7	FCM-A	80% vs 68%	NS	NS
Nori et al. (1996) ¹⁷⁸	20/20 (60% /20%)*	OS	9	ICM	NA	NR	<0.002

Εικόνα 19. Μελέτες που εκτιμούν την πλοειδία με χρήση κυτταρομετρίας ροής και συσχετίζουν την ανευπλοειδία με τη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με CRC σταδίου II (119)

Οι Sinicropo et al, το 2006, μελέτησαν την σχετική προγνωστική αξία της ανευπλοειδίας και της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) σε αποθηκευμένα μονιμοποιημένα σε παραφίνη δείγματα ιστών 528 ασθενών με CRC σταδίων II-III. Οι ασθενείς με MSI ή με διπλοειδείς όγκους με μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS) είχαν παρόμοια καλή πρόγνωση (βασισμένη στην 5ετή επιβίωση) συγκριτικά με τους ασθενείς με ανευπλοειδείς όγκους (HR 0.65, P = 0.022, and HR 0.62, P = 0.002). (141)

Παρόμοια αποτελέσματα ανέδειξε και μια μεγάλη μετανάλυση 63 μελετών με 10.126 ασθενείς το 2008. Το κύριο συμπέρασμα αυτής της μελέτης ήταν ότι η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση στον κολοορθικό καρκίνο, και πρέπει να εκτιμάται ως προγνωστικός δείκτης σε συνδυασμό με την μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), σε όλες τις κλινικές δοκιμές, ειδικά σε αυτές που περιλαμβάνουν την επικουρική θεραπεία. (142)

Οι Araujo et al, το 2007, σε μια μετανάλυση 49 μη τυχαιοποιημένων μελετών με 8056 ασθενείς, έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της 5ετούς θνητότητας από 43,2% για τους ανευπλοειδείς όγκους σε 29,2 % για τους διπλοειδείς. Παρόμοια μείωση της θνητότητας παρατηρήθηκε στους διπλοειδείς όγκους σταδίου II. Αυτή η παρατήρηση ενίσχυσε την ιδέα

της χρήσης της ανευπλοειδίας ως παράγοντα κινδύνου στους ασθενείς σταδίου II ώστε να συμβάλλει στην απόφαση για χορήγηση χημειοθεραπείας. (143)

Οι Muradon et al, το 2013, εκτίμησαν την 5ετή επιβίωση ασθενών με CRC σταδίων II–III της UK VICTOR trial (n = 822) και μιας ανεξάρτητης Αυστραλιανής κοόρτης (n = 375) σε σχέση με τις μετρήσεις της MSI, την ανευπλοειδία (CIN), και τις μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, FBXW7 και TP53, καθώς με την απώλεια της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα (LOH) 18q. Καμία από τις μεταλλάξεις των γονιδίων δεν αποδείχθηκε να έχει σημαντική προγνωστική αξία, ενώ η MSI (HR 0.58, P = 0.021) και η ανευπλοειδία (HR 1.54, P = 0.005) αποδείχθηκαν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες καλής και κακής πρόγνωσης αντίστοιχα. Υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN), συσχετίστηκαν με μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS). Επιπλέον, οι όγκοι που έφεραν και τα δύο χαρακτηριστικά (MSI+/CIN+) ήταν σπάνιοι (2.7%). Συμπερασματικά, οι συγγραφείς προτείνουν τον χαρακτηρισμό των MSI και CIN σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο σταδίων II και III ώστε να επιλέγονται αυτοί που θα έχουν το μεγαλύτερο όφελος από τη χορήγηση χημειοθεραπείας. (144)

Σε μια πιο πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, από τους Hveem et al, το 2014, η οποία περιλαμβάνει 952 ασθενείς με CRC σταδίων I–III ενός νορβηγικού κέντρου, εκτιμήθηκε η επίπτωση της πλοειδίας των όγκων ανά στάδιο, στην 5-ετή και 10-ετή επιβίωση καθώς και στην πιθανότητα υποτροπής. Η συνολική αρνητική προγνωστική αξία της ανευπλοειδίας σε αυτούς τους ασθενείς ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε ασθενείς σταδίων II–III σε άλλες μελέτες (HR 1.56, P = 0.007). Η πιθανότητα υποτροπής του όγκου ήταν παρόμοια σε ασθενείς με ανευπλοειδείς όγκους σταδίου II και σε αυτούς με ανευπλοειδείς όγκους σταδίου III, αν και η πολυπαραγοντική ανάλυση αποκάλυψε σημαντικά καλύτερη πρόγνωση στους ασθενείς σταδίου II (HR 2.19, P=0.002). Συνοψίζοντας, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα υποτροπής και θανάτου στους ασθενείς σταδίου II. (145)

Οι Laumbert et al, σε μια μετανάλυση του 2015, μελέτησαν την συσχέτιση των επιμέρους σταδίων με την πλοειδία. (146) Η μελέτη αυτή συμπεριλάμβανε 7072 ασθενείς στους οποίους η πλοειδία εκτιμήθηκε με κυτταρομετρία ροής και ανάλυσης εικόνας (image cytometry). Τα ποσοστά της ανευπλοειδίας κυμάνθηκαν από 39–81%. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα ποσοστά ανευπλοειδίας στα δύο τελευταία στάδια (III, IV) συγκριτικά με τα μικρότερα στάδια (I, II) (p=0.0001). Όλες σχεδόν οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν κατέληξαν πως η ανευπλοειδία έχει ένα σημαντικό αντίκτυπο στη συνολική επιβίωση και στο διάστημα

ελεύθερο νόσου. Το συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι η χρωμοσωμική αστάθεια αυξάνεται με την πρόοδο του CRC, η στατιστική ανάλυση ωστόσο δεν ανέδειξε διαφορά στην επιβίωση των ασθενών με διπλοειδείς και ανευπλοειδείς όγκους ανά στάδιο της νόσου. (146)

Οι ίδιοι συγγραφείς είχαν παρατηρήσει σε προηγούμενη μελέτη, το 2013, ότι τα αυξημένα επίπεδα CEA και η ανευπλοειδία αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για μετάχρονες μεταστάσεις. (147)

Ανακεφαλαιώνοντας, μια μεγάλη βάση δεδομένων υποστηρίζει την χρήση της κυτταρικής ανευπλοειδίας ως προγνωστικού δείκτη σε ασθενείς με κολορθικό καρκίνο σταδίου II, με τα αποτελέσματα μεγάλων μελετών που περιλαμβάνουν πολυπαραγοντικές αναλύσεις να αποδεικνύουν ότι η κυτταρική διπλοειδία αποτελεί ισχυρότερο δείκτη καλής πρόγνωσης από τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). (119)

9. Ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells- CTCs)

Μια άλλη εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής είναι η ανίχνευση των CTCs σε δείγματα περιφερικού αίματος. Τα CTCs ανακαλύφθηκαν το 1860, ωστόσο πέρασε περισσότερο από ένας αιώνας μέχρι να καταστεί εφικτή η μέτρησή τους στο αίμα και η εκτίμηση του ρόλου τους στην πρόγνωση των ασθενών με CRC. Τα δεδομένα των μελετών μέχρι σήμερα δείχνουν ότι τα CTCs είναι μια ετερογενής ομάδα κυττάρων που περιλαμβάνει επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, κύτταρα που υφίστανται επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) και καρκινικά βλαστοκύτταρα. Υποστηρίζεται ευρέως η παραδοχή ότι τα καρκινικά βλαστοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη μετάσταση καθώς ένα ποσοστό 20-30% των ασθενών με CRC παρότι υποβάλλονται σε πλήρη χειρουργική εκτομή, εμφανίζουν υποτροπή. Οι πιθανοί μηχανισμοί που θεωρούνται υπεύθυνοι είναι δύο: οι κρυφές μεταστατικές εστίες που συνεχίζουν να αναπτύσσονται μετεγχειρητικά ή τα βιώσιμα καρκινικά κύτταρα με πολλαπλασιαστικό και μεταστατικό δυναμικό που έχουν διασπαρεί στην κυκλοφορία του αίματος από την αρχική θέση του όγκου κατά τη διάρκεια της εκτομής. (148-149) Σε μια συστηματική ανασκόπηση η παρουσία CTCs στο περιφερικό αίμα τουλάχιστον 24 ώρες από την εκτομή στον ορθοκολικό καρκίνο, αποτελούσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα υποτροπής και μειωμένης επιβίωσης. (148) Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των CTCs είναι ενδεικτικός του καρκινικού φορτίου και αυξάνεται με το στάδιο της νόσου. (149) Η ανίχνευση CTCs σε δείγματα

ασθενών με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο είναι ενδεικτική επαναδιασποράς καρκινικών κυττάρων από την μεταστατική εστία. (150)

Η εκτίμηση των CTCs είναι μια αναπτυσσόμενη τεχνική που αναμένεται να συνεισφέρει στον εντοπισμό των ασθενών υψηλού κινδύνου για μετάσταση και υποτροπή και στην εξατομίκευση της θεραπείας.

Οι μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των CTCs είναι η ανάστροφη PCR, οι συστοιχίες μεμβράνης, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, η μικρορευστομηχανική και η κυτταρομετρία ροής. Διάφορες παράμετροι της μεθοδολογίας έχουν μελετηθεί, όπως η ποσότητα του αίματος που απαιτείται, καθώς και ο χρόνος της δειγματοληψίας αναφορικά με τη λήψη χημειοθεραπείας ώστε να επιτευχθούν τα ιδανικά αποτελέσματα για την ανίχνευση των CTCs. Για το διαχωρισμό των CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι επιφανειακοί δείκτες όπως το CD326 (epithelial cell adhesion molecule), οι κυττοκερατίνες (CK19, CK20, CK7), το 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), τα CD26, CD133, CD44 και το CEA. (149)

Το πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής όπως έχει προαναφερθεί, είναι η ικανότητα ανάλυσης στο μονοκυτταρικό επίπεδο που επιτρέπει να αποκλείονται από την ανάλυση αμφισβητούμενοι κυτταρικοί πληθυσμοί οποιαδήποτε στιγμή από τη λήψη του δείγματος, ενώ μπορεί να εντοπίσει ένα κύτταρο στόχο σε λιγότερο από 20ml αίματος. (151) Οι Galizia et al, εφάρμοσαν την κυτταρομετρία ροής για να ανιχνεύσουν CTCs (CD326+, CD45-) σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο πριν και ένα μήνα μετά την χειρουργική εκτομή. (151) Σε 71% των ασθενών ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο αυτή τουλάχιστον 3 CTCs ανά 7,5 ml αίματος. Ο αριθμός των CTCs συσχετίστηκε σημαντικά με το στάδιο και ήταν ανάλογος των επιπέδων του CEA. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι CTCs εντοπίστηκαν σε όλους τους ασθενείς σταδίου IV. Στην πλειοψηφία των ασθενών παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των CTCs μετεγχειρητικά. Ωστόσο, στο 23% ανιχνεύθηκαν CTCs μετεγχειρητικά γεγονός που θέτει αμφιβολίες για το ογκολογικό αποτέλεσμα της ριζικής χειρουργικής εκτομής. Πολλοί ασθενείς που είχαν υψηλό αριθμό CTCs μετεγχειρητικά, εμφάνισαν υποτροπή, δεδομένο που προσδίδει στα CTCs τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως μετεγχειρητικοί δείκτες των ασθενών που έχουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής ώστε να εξατομικεύεται η θεραπεία και η παρακολούθησή τους. (151)

Σε μια αντίστοιχη μελέτη από τους Musina et al, το 2021, εκτιμήθηκε ο αριθμός των CTCs προεγχειρητικά και αμέσως μετά την χειρουργική εκτομή σε δείγμα αίματος που λαμβάνονταν διεγχειρητικά. (152) Ως θετικό όριο για παρουσία CTCs ορίστηκε ≥ 4 CTCs/ 4mL αίματος. Δε

βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των CTCs πριν και αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση πράγμα που θα μπορούσε να αποδοθεί στους χειρουργικούς χειρισμούς του όγκου. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, μόνο το θήλυ φύλο και η εντόπιση του όγκου στο κόλο φάνηκε να έχουν συσχέτιση στατιστικά σημαντικά με την παρουσία CTCs μετεγχειρητικά. (152)

Η ανίχνευση των CTCs είναι μια χρονοβόρα διαδικασία διάρκειας τουλάχιστον 2 ωρών για τους περισσότερους ερευνητές. Οι Lopresti et al, το 2019, παρουσίασαν ένα νέο πρωτόκολλο κυτταρομετρίας ροή με το οποίο η ανάλυση διαρκεί λιγότερο από μία ώρα. Ανάμεσα σε δείγματα ασθενών με κακοήθεια και μαρτύρων η μέθοδος φάνηκε να έχει απόλυτη ακρίβεια ως προς την ανίχνευση των δειγμάτων των ογκολογικών ασθενών. (153)

Δ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί την τρίτη σε συχνότητα κακοήθεια διεθνώς. Η θνητότητα από τη νόσο έχει μειωθεί θεαματικά τις τελευταίες δεκαετίες με τη βελτίωση της εγχειρητικής τεχνικής, την χρήση νέων αποτελεσματικότερων χημειοθεραπευτικών, την προσθήκη της ακτινοθεραπείας και την ανοσοθεραπεία, παραμένει ωστόσο σε υψηλά επίπεδα με ένα εκατομμύριο καταγεγραμμένους θανάτους το 2020. (1) Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πλέον την αναγκαιότητα εξατομίκευσης της θεραπείας μέσω της χρήσης προγνωστικών δεικτών ενδεικτικών της βιολογίας του όγκου κάθε ασθενούς σε μοριακό επίπεδο ώστε να λαμβάνει την ιδανική θεραπεία με τη μικρότερη δυνατή νοσηρότητα και κόστος.

Επί του παρόντος οι προγνωστικοί δείκτες που εφαρμόζονται στη διαχείριση ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο είναι το στάδιο της νόσου, το πηλίκο των εξαιρεθέντων λεμφαδένων (lymph node ratio-LNR), η περινευρική και λεμφαγγειακή διήθηση, η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), το tumor budding, η διήθηση του κυκλοτερούς ορίου εκτομής (circumferential resection margin- CRM), η ανταπόκριση στην προεγχειρητική θεραπεία και η παρουσία μεταλλάξεων στα ογκογονίδια KRAS/NRAS και BRAF. (23-64) Όπως αναλύθηκε, μια ποικιλία μοριακών δεικτών βρίσκονται υπό μελέτη με την κλινική τους αξία ωστόσο να μην έχει ακόμα εδραιωθεί βιβλιογραφικά. (63-102)

Ανευπλοειδία ορίζεται η διαταραχή του φυσιολογικού αριθμού των χρωμοσωμάτων στην αντίστοιχη φάση του κυτταρικού κύκλου ενός κυττάρου και αντικατοπτρίζει διαταραχές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους και εδώ και έναν αιώνα έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση. (155) Όσον αφορά τον ορθοκολικό καρκίνο η ανευπλοειδία, συνδέεται με το κύριο μονοπάτι καρκινογένεσης αυτό της Χρωμοσωμικής Αστάθειας (Chromosomal Instability – CIN) το οποίο διαπιστώνεται στο 85% των CRC. (14-16, 19-26) Μεγάλος αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την προγνωστική αξία της ανευπλοειδίας στον ορθοκολικό καρκίνο ιδίως σε ασθενείς σταδίων II και III όπου η χρήση της χημειοθεραπείας είναι αμφιλεγόμενη. (139-147) Η προγνωστική της αξία δεν έχει ωστόσο εδραιωθεί στην κλινική πράξη.

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στην τεχνολογία των laser και μπορεί να αναλύσει τις ιδιότητες ενός σωματιδίου ή ενός κυττάρου. Από τις κύριες εφαρμογές της είναι η εκτίμηση του κυτταρικού φαινοτύπου και η ανάλυση των παραμέτρων που αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και θάνατο , αποτελώντας έτσι την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκτίμηση της ανευπλοειδίας. (116, 117,119) Τα δεδομένα

αυτά ποσοτικοποιούνται μέσω της χρήσης δεικτών όπως ο DNA-Index και ο Tumor Index (TI) οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιπλέον προγνωστικοί δείκτες. (116-119)

Επιπλέον, η FC μπορεί να εκτιμήσει και ποσοτικοποιήσει την έκφραση επιφανειακών δεικτών όπως οι CD15, CD44, CD133, CD26 οι οποίοι έχουν μελετηθεί ως προγνωστικοί βιοδείκτες στον ορθοκολικό καρκίνο. (67-102, 116,119) Ειδικότερα το CD26 φαίνεται να αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη καθώς φαίνεται να εκφράζεται από τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (cancer stem cells-CSCs) στον CRC επάγοντας έτσι την μεταστατική ικανότητα των όγκων και την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά. Μελέτες δείχνουν ότι οι όγκοι με αυξημένη έκφραση του CD26 έχουν πιο επιθετική βιολογία και χειρότερη πρόγνωση.(77-87) Η μετφορμίνη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιδιαβητικό φάρμακο που δρα στο CD26 ή DDP-4 (dipeptidyl peptidase 4) και φαίνεται να μειώνει την επίπτωση του CRC στους διαβητικούς ασθενείς τύπου II. (12-14,88) Επιπλέον, φαίνεται να βελτιώνει την επιβίωση των διαβητικών ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. (12-14,154) Τα δεδομένα αυτά αυξάνουν ακόμη περισσότερο την αξία της μελέτης του CD26 στον ορθοκολικό καρκίνο όχι μόνο ως προγνωστικού βιοδείκτη αλλά και ως θεραπευτικού στόχου.

Παρά τις εξελίξεις στην ανεύρεση των προγνωστικών δεικτών στον ορθοκολικό καρκίνο, η σημαντικότερη παράμετρος για την επιβίωση των ασθενών σταδίων I-III και επιλεγμένων ασθενών σταδίου IV, παραμένει η ριζική χειρουργική εκτομή του όγκου (R0). (14, 59,60,106-112) Όπως προαναφέρθηκε, για τους όγκους του κόλου και του ανώτερου ορθού η εκτομή οφείλει να συμπεριλαμβάνει τους λεμφαδένες κατά μήκος των τροφοφόρων αγγείων καθώς και ελάχιστη απόσταση εκατέρωθεν του όγκου τουλάχιστον 5 εκ. (59,60, 107) Για τους όγκους του μέσου και κατώτερου ορθού το περιφερικό όριο εκτομής οφείλει να είναι τουλάχιστον 1-2 εκ. σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει προεγχειρητική χημιο-ακτινοθεραπεία ενώ το όριο αυτό δύναται να είναι <1εκ σε ασθενείς που έλαβαν. (108-110) Επιπλέον, μεγάλη σημασία έχει το κυκλοτερές όριο εκτομής (CRM) στους όγκους του ορθού το οποίο οφείλει να είναι τουλάχιστον 1mm. (108-110) Στους όγκους του ορθού που επιδέχονται τοπικής διορθικής εκτομής το καθαρό όριο περιορθικού λίπους που πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στο παρασκεύασμα οφείλει να είναι τουλάχιστον 3mm. (108-110) Η επίτευξη «καθαρού» περιφερικού ορίου στην χειρουργική των όγκων του ορθού είναι αυτή που καθορίζει και το είδος της επέμβασης. Σε όγκους που το απαιτούμενο όριο εμπεριέχει μεγάλο τμήμα του έξω σφιγκτήρα η επέμβαση που πραγματοποιείται είναι η κοιλιοπερινεϊκή εκτομή του ορθού, μια

ακρωτηριαστική επέμβαση όπου αφαιρείται ο πρωκτός και ο ασθενής καταλήγει με μόνιμη τελική κολοστομία. (106,108-110)

Μέχρι σήμερα η διεγχειρητική εκτίμηση των ορίων εκτομής γίνεται με την ταχεία βιοψία, μια διαδικασία που διαρκεί τουλάχιστον 30 λεπτά και βασίζεται στην εμπειρία του παθολογοανατόμου με αποτέλεσμα σε κάποιες περιπτώσεις η τελική διάγνωση να διαφέρει από αυτή της ταχείας βιοψίας. Η ακρίβεια της μεθόδου κυμαίνεται από 95-98% και μειώνεται σε περιπτώσεις ίνωσης ή δεσμοπλαστικής αντίδρασης. (120-123)

Η Διεγχειρητική Κυτταρομετρία Ροής είναι μια καινοτόμα μέθοδος ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου και του περιεχομένου DNA ενός ιστού κατά τη διάρκεια μια χειρουργικής επέμβασης για των χαρακτηρισμό των καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση των ορίων εκτομής. (118,124,125) Εφαρμόστηκε αρχικά στους όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος και στη συνέχεια επεκτάθηκε και σε όγκους άλλους οργάνων με εξαιρετικά αποτελέσματα ως προς την ακρίβεια της εκτίμησης των ορίων εκτομής και με χρόνο εκτίμησης που κυμαίνεται από 7-12 min. (126- 138)

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η εφαρμογή της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής σε αδενοκαρκινώματα του κόλου και του ορθού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η διαγνωστική επάρκεια της μεθόδου(μέσω της χρήσης συγκεκριμένων δεικτών για ποσοτικοποίηση των δεδομένων) ως προς τη ταυτοποίηση του καρκινικού ιστού και κατ' επέκταση η ακρίβειά της ως προς τον προσδιορισμό των ορίων εκτομής ειδικά στην υποκατηγορία των όγκων του ορθού όπου τα όρια καθορίζουν εκτός από την πρόγνωση και το είδος της επέμβασης και κατ' επέκταση την ποιότητα ζωής των ασθενών. Παράλληλα, μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής η έκφραση συγκεκριμένων δεικτών επιφανείας του καρκινικού δείγματος οι οποίοι έχουν μελετηθεί για την προγνωστική τους αξία (CD15, CD24, CD26, CD44, CD133). Όλα τα ανωτέρω δεδομένα συσχετίσθηκαν στη συνέχεια με την επιβίωση των ασθενών καθώς και με τους ήδη γνωστούς εφαρμόσιμους προγνωστικούς δείκτες που αφορούν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά και τη βιολογία των όγκων. Τέλος έγινε συσχέτιση των κυτταρομετρικών δεδομένων με το βαθμό ανταπόκρισης των όγκων στην προεγχειρητική θεραπεία, προκειμένου να ελεγχθεί ενδεχόμενη μελλοντική χρήση τους ως βιοδείκτες πρόβλεψης αυτής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1.ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΑΣ

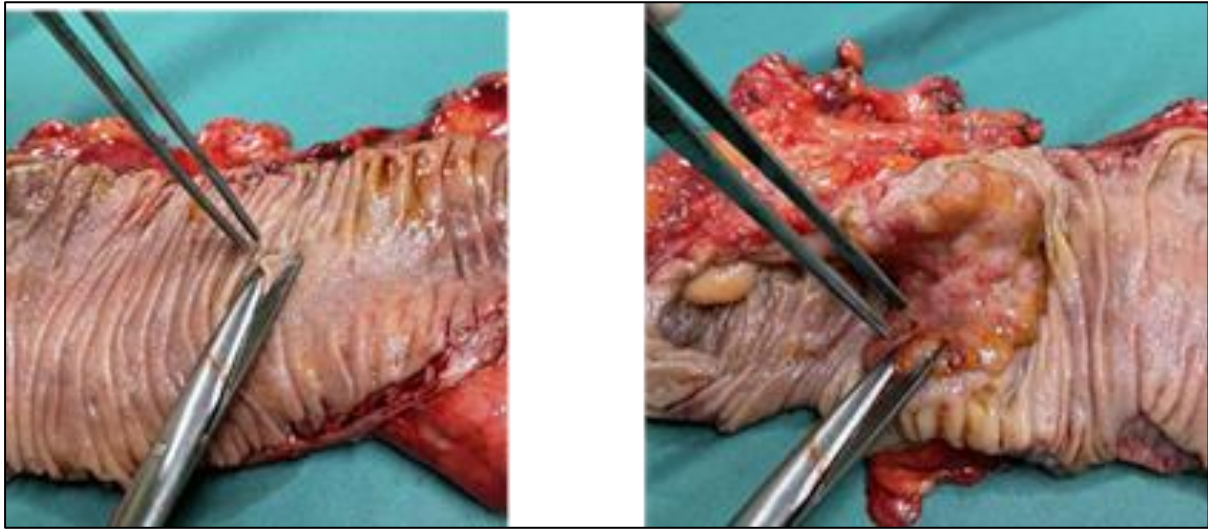
Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν προοπτικά ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη κολεκτομή λόγω αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου, ιστολογικά τεκμηριωμένο με ενδοσκοπική βιοψία. Οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στην Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική Ιωαννίνων το διάστημα 1/2017 έως 8/2021, από έμπειρους χειρουργούς παχέος εντέρου, βάσει των διεθνών κατευθυντήριων οδηγιών για τον CRC. Οι ασθενείς που εντάχθηκαν στην μελέτη ενημερώθηκαν προεγχειρητικά και συμπλήρωσαν την αντίστοιχη δήλωση συγκατάθεσης για την συμμετοχή τους στη μελέτη.

Καταγράφηκαν προς περαιτέρω ανάλυση και συσχέτιση τα χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, φύλο, ατομικό αναμνηστικό, φαρμακευτική αγωγή, εντόπιση του όγκου) καθώς και τα επιμέρους ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του κάθε όγκου (σταδιοποίηση κατά TNM, βαθμός διαφοροποίησης, περινευρική/λεμφαγγειακή διήθηση, βλεννώδες στοιχείο, tumor budding, LNR). Η παρακολούθηση των ασθενών διήρκεσε ως τον Ιανουάριο 2024, οπότε καταχωρήθηκαν επιπλέον ο θάνατος σχετιζόμενος με τη νόσο (cancer-related death), το διάστημα ελεύθερο νόσου (disease-free survival-DFS) καθώς και ο χρόνος εμφάνισης μεταστάσεων ή τοπικών υποτροπών.

Το ερευνητικό πρωτόκολλο κρίθηκε πλήρες και σύμφωνο με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι και της ορθής Κλινικής Πρακτικής (GCP) και εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων (αριθμός πρωτ. 27190/26-10-2017) ενώ έχει καταχωρηθεί στο Clinicaltrials.gov με αριθμό NCT05261542.

Όπως προαναφέρθηκε, οι επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν τυπικές ογκολογικές κολεκτομές όπως ορίζονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες (Γενικό μέρος-Κεφάλαιο 4.1). Μετά την εκτομή του χειρουργικού παρασκευάσματος, ακολουθεί διάνοιξη του εντερικού αυλού από όπου λαμβάνονταν δύο δείγματα ιστού διαστάσεων 3-5 mm³. Το ένα δείγμα αφορά τμήμα του όγκου και το άλλο δείγμα, τμήμα φυσιολογικού εντέρου. Για να αποφευχθεί η «επιμόλυνση» του φυσιολογικού δείγματος με νεοπλασματικά κύτταρα το φυσιολογικό δείγμα λαμβάνεται από τμήμα του εντέρου κεντρικότερα του όγκου όσο το δυνατό πιο

απομακρυσμένα από αυτόν ώστε να μειωθεί κατά το δυνατό το ενδεχόμενο ενδοαυλικής διασποράς. Επιπλέον, η λήψη του κάθε δείγματος γινόταν με διαφορετικά αποστειρωμένα εργαλεία ενώ το δείγμα του φυσιολογικού ιστού μετά τη λήψη του εκπλένονταν με φυσιολογικό ορό (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Δειγματοληψία φυσιολογικού και καρκινικού δείγματος στο εξαιρεθέν εντερικό παρασκεύασμα

Τα σημεία δειγματοληψίας στο παρασκεύασμα σημαίνονταν με ράμμα ώστε να τεκμηριωθεί ιστολογικά η φύση του ιστού που λαμβάνονταν. Το εντερικό παρασκεύασμα στη συνέχεια μονιμοποιείται σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμαλίνης. Τα δείγματα που λαμβάνονταν για κυτταρομετρική ανάλυση, τοποθετούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffer Saline, BD BaculoGold, Cat. No 51-21428, BD Biosciences) το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας των κυττάρων και των χαρακτηριστικών τους. Τα παρασκευάσματα μελετούνταν από έμπειρο παθολογοανατόμο βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών για την μελέτη και σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου. Η σταδιοποίηση στηρίχθηκε στην ταξινόμηση κατά TNM (tumor/node/metastasis) της 8ης έκδοσης της American Joint Committee on Cancer (AJCC). (26)

Επιπλέον της σταδιοποίησης, ο παθολογοανατόμος μελετούσε επισταμένα τα σημεία της δειγματοληψίας, καθώς η παθολογοανατομική διάγνωση ήταν η αναφορά ως προς την ορθότητα της κυτταρομετρικής διάγνωσης. Ειδικότερα, περίξ των σημείων δειγματοληψίας λαμβάνονταν επιπλέον ιστικές τομές των 4mm, ο ιστός μονιμοποιούνταν σε παραφίνη, γινόταν επίστρωση σε αντικειμενοφόρες πλάκες και χρώση με αιματοξυλλίνη-ηωσίνη.

1.2. ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

1.2.1 Διεγχειρητική Ανάλυση Περιεχομένου DNA

Για αύξηση της ακρίβειας της μεθόδου, η ανάλυση πραγματοποιούνταν «τυφλά» καθώς ο κυτταρομέτρης δε γνώριζε την προέλευση του ιστού (υγιής ή καρκινικός) ούτε και τα επιμέρους στοιχεία του ασθενούς και του όγκου. Στα μέτρα ποιοτικού ελέγχου συμπεριλαμβάνεται και η χρήση δειγμάτων ελέγχου από φυσιολογικά μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) για τη βαθμονόμηση του κυτταρόμετρου ροής και τη διασφάλιση της ακριβούς λειτουργίας του. Αυτή η προσέγγιση ενισχύει την αντικειμενικότητα της μεθόδου, επιτρέποντας μια αμερόληπτη αξιολόγηση του περιεχομένου DNA του δείγματος και της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

Δείγματα όγκου και φυσιολογικού ιστού (200-250 μl/τουλάχιστον 1000 κύτταρα/μl) διηθήθηκαν με τη χρήση φίλτρων CellTrics (SysmexFlowCytometry, Europe), προκειμένου να ληφθεί καθαρό ελαιώρημα μονήρων κυττάρων. Τα κυτταρικά ελαιωρήματα χρωματίστηκαν χρησιμοποιώντας ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodine, PI, Cat. No. sc-3541, Santa Cruz Biotechnology) και ακολουθούσε ανάλυση κυτταρικού κύκλου σύμφωνα με το «Ioannina Protocol» μια αντίστοιχη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται ήδη σε όγκους εγκεφάλου. (127) Το PI χρωματίζει το κυτταρικό DNA και εμφανίζει μέγιστη εκπομπή φθορισμού 617 nm, όταν διεγείρεται με λέιζερ 488 nm. Η πειραματική διαδικασία εμπεριέχει την προσθήκη 200 μl διαλύματος χρώσης PI προστέθηκαν σε 100 μl από κάθε κυτταρικό ελαιώρημα σε συνολικό όγκο 300 μl (τελική συγκέντρωση PI 50 μg/ml). Ένα δείγμα ελέγχου από φυσιολογικά μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) απομονώνεται από πλήρες αίμα εφαρμόζοντας βαθμίδωση Ficoll και χρωματίζεται σύμφωνα με το ίδιο πρωτόκολλο όπως τα δείγματα του όγκου. Το περιεχόμενο του DNA των PBMCs και οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου ποσοτικοποιήθηκαν πριν από κάθε διεγχειρητική ανάλυση κυτταρομετρίας ροής ως μέρος του ποιοτικού ελέγχου του κυτταρόμετρου και για να εξασφαλιστεί η σωστή λειτουργία του. Τα ιστογράμματα προκύπτουν από τη μέτρηση 5.000-10.000 χρωματισμένων κυττάρων που αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής BD FACS Calibur (BD Biosciences) και κατέληξαν σε ανάλυση με συντελεστή διακύμανσης 2 έως 4. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με μια αρχική στρατηγική, η οποία περιέχει μια ηλεκτρονική περίφραξη ώστε να εξαιρεθούν τα διπλά κύτταρα.

Τα βασικά βήματα του πρωτοκόλλου συνοψίζονται ως εξής:

I. Προετοιμασία δείγματος:

- Τα δείγματα ιστού διαχωρίστηκαν μηχανικά σε 1 ml PBS χρησιμοποιώντας μια ήπια αλλά ενδεδειγμένη ανάδευση για δημιουργία εναιωρήματος μονήρων κυττάρων.
- Το προκύπτον κυτταρικό εναιώρημα διηθήθηκε μέσω ενός φίλτρου CellTrics 50 μm (Sysmex Flow Cytometry Europe) για να αφαιρεθούν τυχόν εναπομείναντα θραύσματα ιστού ή συσσωματώματα κυττάρων.
- Η συγκέντρωση των κυττάρων ρυθμίστηκε σε περίπου 1×10^6 κύτταρα/ml.

II. Χρώση DNA:

- 100 μl του κυτταρικού εναιωρήματος αναμίχθηκαν με διπλάσιο όγκο διαλύματος χρώσης.
- Το χρωστικό διάλυμα αποτελείται από 50 $\mu\text{g/ml}$ ιωδιούχο προπίδιο (PI, Ap. Κατ. sc-3541, Santa Cruz Biotechnology), 0,1% Triton X-100 και 0,1% κιτρικό νάτριο σε PBS.
- Τα δείγματα μετά από επώαση 3 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και πραγματοποιείται η σύνδεση του PI στο κυτταρικό DNA, κυτταρομετρήθηκαν.

III. Κυτταρομετρική Ανάλυση:

- Τα χρωματισμένα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής BD FACS Calibur (BD Biosciences).
- Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η συλλογή δεδομένων ευθείας διασποράς (forward scatter-FSC), πλευρικής διασποράς (side scatter -SSC) και φθορισμού PI (FL2).
- Από 5000 έως 10.000 συμβάντα αναλύθηκαν για κάθε δείγμα ώστε να διασφαλιστεί η στατιστική επάρκεια.

IV. Ανάλυση δεδομένων:

- Η αρχική συλλογή και ανάλυση των δεδομένων, καθώς και η περαιτέρω ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και ο υπολογισμός του DNA-index, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό CellQuest Pro (BD Biosciences).

Η όλη διαδικασία, από τη συλλογή των δειγμάτων έως την ανάλυση των δεδομένων, βελτιστοποιήθηκε ώστε να μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 10 λεπτά, επιτρέποντας δυνητικά τη λήψη αποφάσεων σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης.

1.2.2. Υπολογισμός κυτταρομετρικών παραμέτρων και δεικτών

Δύο βασικές παράμετροι προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων: ο DNA index (DI) και ο Tumor index (TI). Οι δείκτες αυτοί παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση της πλοειδίας και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των αναλυόμενων κυτταρικών πληθυσμών, αντίστοιχα.

Ο **DNA index** είναι ένα μέτρο της περιεκτικότητας του DNA των κυττάρων σε σχέση με τα φυσιολογικά διπλοειδή κύτταρα. Υπολογίζεται συγκρίνοντας την ένταση φθορισμού των χρωματισμένων καρκινικών κυττάρων (ενδεικτικό της περιεκτικότητας σε DNA) με εκείνη ενός τυπικού διπλοειδούς κυττάρου και συγκεκριμένα προκύπτει ως ο λόγος του γεωμετρικού μέσου της κορυφής G0/G1 του δείγματος του όγκου προς το γεωμετρικό μέσο της κορυφής G0/G1 των φυσιολογικών διπλοειδών κυττάρων. Οι τιμές του DNA index καθόρισαν την ταξινόμηση των όγκων ως εξής: Διπλοειδείς με DNA index 0,95-1,05, Υποδιπλοειδείς με DNA index <0,95 και Υπερπλοειδείς με DNA index >1,05.

Ο **Tumor index (TI)** αποτελεί μέτρο της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας ενός ιστού και υπολογίστηκε ως το άθροισμα του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Αυτός ο δείκτης ποσοτικοποιεί την αναλογία των πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων σε ένα δείγμα αντανακλώντας έτσι το ρυθμό ανάπτυξης του όγκου.

1.2.3. Ανάλυση δύο διαστάσεων για την ανάλυση των επιφανειακών δεικτών σε κύτταρα ορθοκολικού καρκίνου

Η ανάλυση δύο διαστάσεων στην κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση πολλαπλών επιφανειακών δεικτών σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, παρέχοντας ένα λεπτομερές ανοσοφαινοτυπικό προφίλ. Σε μια υποομάδα 45 ασθενών, χρησιμοποιήσαμε την ανάλυση δύο διαστάσεων για την αξιολόγηση επιφανειακών δεικτών και συγκεκριμένα του CD26 ο οποίος φαίνεται να συμμετέχει στη μεταστατική δυναμική του όγκου και εν δυνάμει μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης για τα καρκινικά βλαστοκύτταρα στον καρκίνο του παχέος εντέρου όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 3.5.4 του ειδικού μέρους. Επιπλέον, σε ορισμένα δείγματα μελετήθηκε η έκφραση πολλαπλών επιφανειακών δεικτών που αφορούν τον ορθοκολικό καρκίνο (CD24, CD44, CD133, κυττοκερατίνη. Η ανάλυση δύο διαστάσεων περιλαμβάνει τη χρώση των κυττάρων με αντισώματα συζευγμένα με διαφορετικά

φθοριοχρώματα που στοχεύουν συγκεκριμένους επιτόπους πάνω στα καρκινικά κύτταρα. Με την ανάλυση της έντασης φθορισμού σε δύο κανάλια του κυτταρόμετρου, είναι δυνατό να εντοπιστούν πληθυσμοί κυττάρων που εκφράζουν συνδυασμούς δεικτών, προσφέροντας πληροφορίες για την κυτταρική ετερογένεια μέσα σε έναν όγκο. Στη μελέτη αυτή, η ανάλυση με PI στο κανάλι φθορισμού FL2 συνακολουθείται και από χαρακτηρισμό της έκφρασης ενός επιφανειακού δείκτη στο κανάλι φθορισμού FL1 (όπως το CD26FITC).

Το πρωτόκολλο ανάλυσης της έκφρασης CD26 συνοψίζεται ως εξής:

- I. Προετοιμασία δείγματος:
 - Τα κυτταρικά εναιωρήματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω
- II. Χρώση αντισωμάτων:
 - 1×10^6 κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μ l ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης (PBS + 1% BSA).
 - Προστέθηκαν 5 μ l αντισώματος αντι-CD26 συζευγμένου με FITC (clone L272, BD Biosciences).
 - Τα δείγματα επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Ακολούθησε προσθήκη 500 μ l PBS.
- III. Κυτταρομετρική Ανάλυση:
 - Τα δείγματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής BD FACS Calibur.
 - Τουλάχιστον 10.000 γεγονότα αποκτήθηκαν για κάθε δείγμα που αναλύθηκε
- IV. Ανάλυση δεδομένων:
 - Η έκφραση CD26 ποσοτικοποιήθηκε ως το ποσοστό των θετικών κυττάρων και τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) χρησιμοποιώντας το λογισμικό CellQuest Pro.

1.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS V.23 (IBM) και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το GraphPad Prism V 8.4.2 (GraphPad Software, LLC). Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες στατιστικές μέθοδοι:

Περιγραφική Στατιστική: Τα συνεχή δεδομένα αντιπροσωπεύτηκαν από τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση, τη διάμεσο και το εύρος τους ενώ οι ποιοτικές μεταβλητές συνοψίστηκαν ως συχνότητες και ποσοστά.

Συγκριτικές αναλύσεις: Χρησιμοποιήθηκαν το Mann-Whitney U test (για συγκρίσεις μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων συνεχών μεταβλητών), το Kruskal-Wallis τεστ (για συγκρίσεις μεταξύ τριών ή περισσότερων ομάδων) και τα Chi-square ή Fisher's exact tests (για ποιοτικές μεταβλητές).

Αναλύσεις επιβίωσης: Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συνολικής επιβίωσης (OS) και της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (disease free survival -DFS). Τα Log-rank tests χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των ομάδων και τα μοντέλα αναλογικών κινδύνων Cox για την πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης.

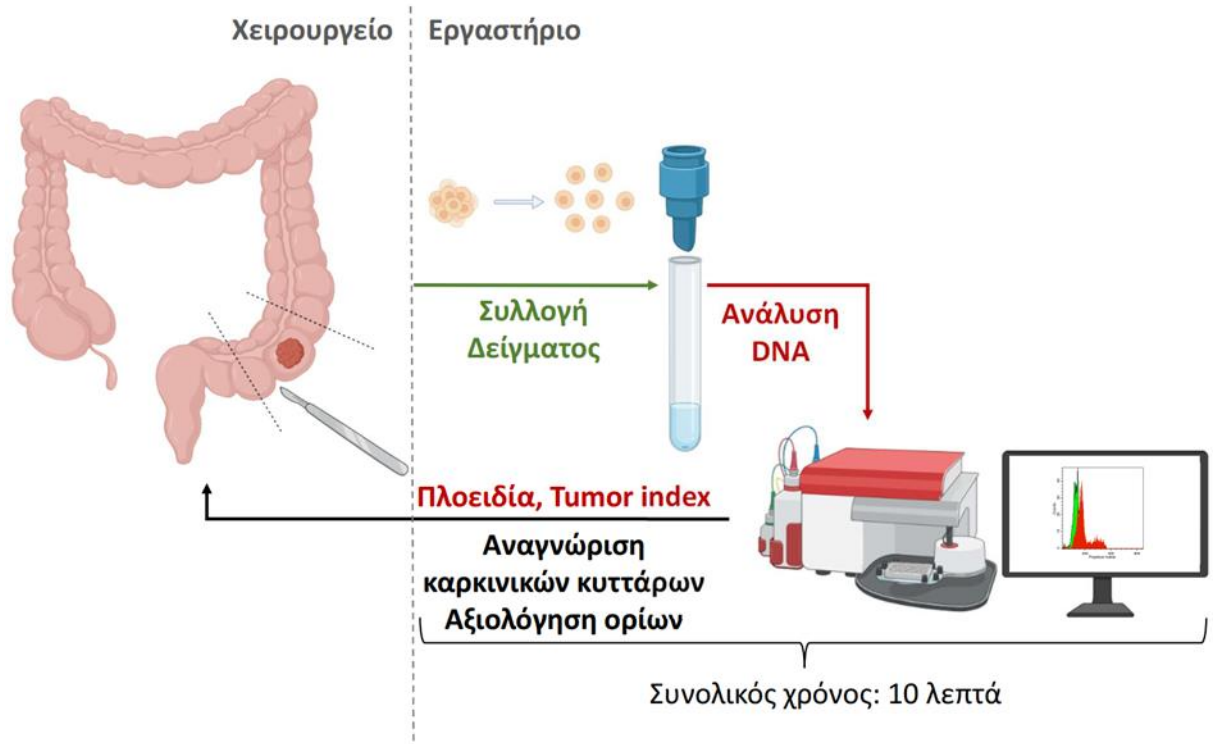
Αναλύσεις συσχέτισης: Οι διμεταβλητές συσχετίσεις αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας και τις μεθόδους Pearson (για κανονικά κατανομημένα δεδομένα) και Spearman (για μη κανονικά κατανομημένα δεδομένα).

Διαγνωστική απόδοση: Η ανάλυση καμπύλης ROC (Receiver Operating Characteristic curve) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας των παραμέτρων της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής. Υπολογίστηκαν η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve -AUC), η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική προγνωστική αξία (positive predictive value-PPV) και η αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value -NPV).

Προγνωστικά Μοντέλα: Η λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων σχετικά με την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$ για όλες τις αναλύσεις ενώ σε περιπτώσεις πολλαπλών συγκρίσεων, εφαρμόσαμε τη διόρθωση Bonferroni όπου αυτό ήταν απαραίτητο.

Η σύνοψη του ερευνητικού πρωτοκόλλου απεικονίζεται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21. Σύνοψη ερευνητικού πρωτοκόλλου

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά εντάχθηκαν στην μελέτη 106 ασθενείς. Τα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Χαρακτηριστικά	CRC(n=106)	Εντοπισμένο ^a (n=61)	Μεταστατικό ^b (n=45)
Ηλικία (μέση)	74	74	79
Φύλο			
Άρρεν	69	25	44
Θήλυ	37	24	13
Στάδιο			
0 [‡]	5	5	
I	20	20	
II	36	36	
III	37		37
IV	8		8
Εντόπιση			
Δεξί κόλο ^c	37	17	20
Αριστερό κόλο ^d	33	16	17
Ορθό	36	28	8
Διαφοροποίηση			
Καλή/Μέτρια		55	32
Χαμηλή/ αδιαφοροποίητο		6	13
Νεοεπικουρική θεραπεία^e	18		
Αδενοκαρκίνωμα Κόλου		1	4
Αδενοκαρκίνωμα Ορθού		12	1

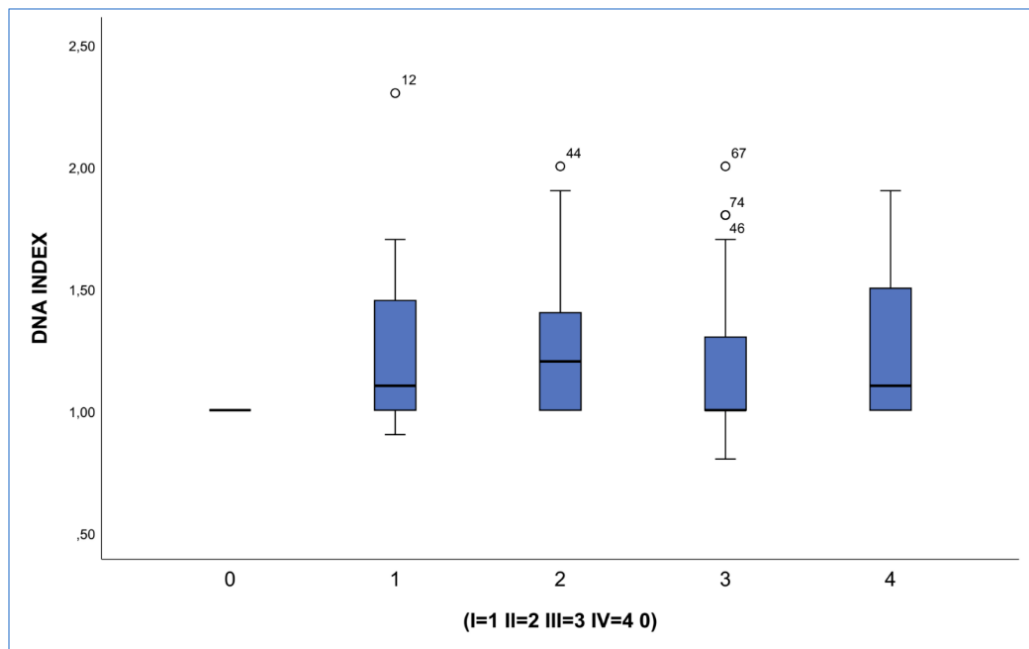
^a CRC Σταδίων 0-II, ^b CRC Σταδίων III-IV, ^c από το τυφλό ως τη σπληνική καμπή, ^d από τη σπληνική καμπή ως την ορθοσιγμοειδική συμβολή, ^e προεγχειρητική χημειο-άκτινο-θεραπεία [‡] Το στάδιο 0 αποτελείται από ασθενείς με μη διηθητικό καρκίνο συμπεριλαμβανομένων 2 ασθενών με pTis, N0, M0 και 3 ασθενών με ypT0-is, N0, M0

Η πλειοψηφία των ασθενών ήταν άνδρες (65.1%), με μέσο όρο ηλικίας τα 74 έτη δεδομένα που συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία για τον CRC, ο οποίος εμφανίζεται συχνότερα σε άνδρες και η επίπτωσή του αυξάνει με την ηλικία.

Η κατανομή των όγκων που μελετήθηκαν ήταν ισότιμη μεταξύ δεξιού, αριστερού κόλου και ορθού, παρέχοντας έτσι ισορροπία στη μελέτη καθώς η εντόπιση του όγκου φαίνεται πως επηρεάζει την πρόγνωση διότι όγκοι διαφορετικών εντοπίσεων έχει φανεί ότι εμφανίζουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Το μεγαλύτερο ποσοστό των όγκων ήταν σταδίων II και III (68.9%). Επιπλέον, 18 ασθενείς (17%) είχαν λάβει προεγχειρητική χημειο- ακτινο-θεραπεία.

Όλα τα δείγματα φυσιολογικού και καρκινικού ιστού μελετήθηκαν με διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής και υπολογίσθηκαν οι δείκτες DNA-index και Tumor-index.

Ο DNA-index συσχετίστηκε με την παρουσία κακοήθειας καθώς ανευπλοειδή κύτταρα εντοπίστηκαν μόνο στα καρκινικά δείγματα (Διάγραμμα 1). Συνολικά 58 δείγματα εμφάνισαν ανευπλοειδία, η πλειοψηφία των οποίων ήταν υπερπλοειδικά με μόνο 4 υποπλοειδικά (πίνακας 8, εικόνες 22, 23, 25, 26).



Διάγραμμα 1. Κατανομή των τιμών του DNA Index ανά στάδιο. Η μέση τιμή ανά στάδιο εμφανίζεται ως οριζόντια γραμμή. Να σημειωθεί ότι το στάδιο 0 που αντιπροσωπεύει όγκους με TRG 0 και Tis έχει μόνο διπλοειδή κύτταρα (DI=1).

Πίνακας 8. Η επίπτωση και το είδος της ανευπλοειδίας ανά στάδιο

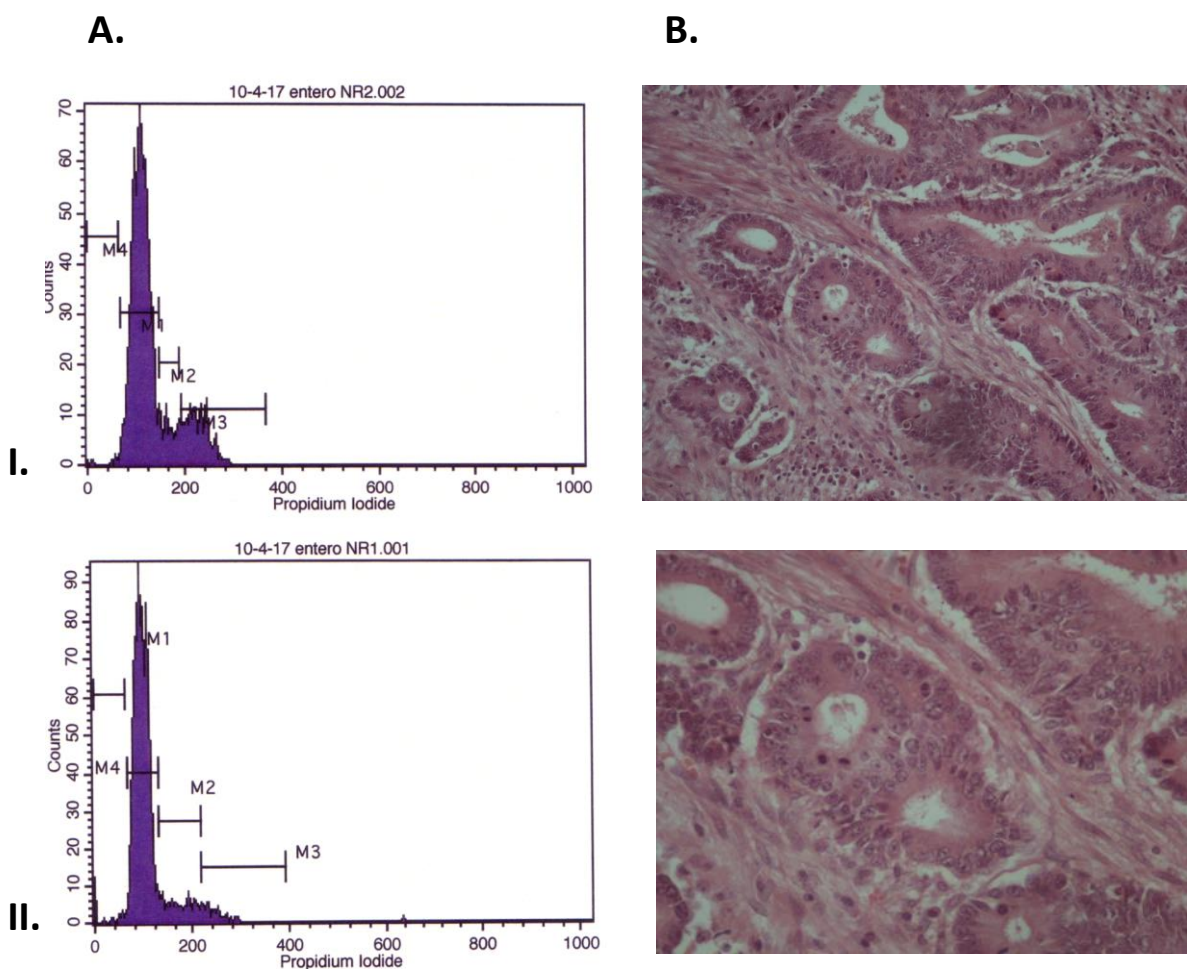
ΠΛΟΕΙΔΙΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (DNA index)	No pts(%)	ΣΤΑΔΙΟ				
		0	I	II	III	IV
ΔΙΠΛΟΕΙΔΙΚΟΙ (0.95 - 1.05)	48 (45%)	5	9	12	19	3
ΥΠΟΠΛΟΕΙΔΙΚΟΙ (<0.95)	4 (4%)	-	1	-	-	3
ΥΠΕΡΠΛΟΕΙΔΙΚΟΙ (>1.05)	54 (51%)	-	10	24	16	4

Δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά των τιμών του DNA index μεταξύ των διαφόρων σταδίων ακόμα όταν εξαιρέθηκαν από την ανάλυση τα δείγματα που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία (Πίνακες 8,9).

Πίνακας 9. Η μέση τιμή του DNA index σε ασθενείς με εντοπισμένο (στάδια 0-II) και μεταστατικό (στάδια III-IV) CRC, έχοντας εξαιρέσει τα δείγματα των ασθενών που έλαβαν νεοεπικυρική θεραπεία

	Εντοπισμένος CRC	Μεταστατικός CRC
DNA index (διάμεση τιμή)	1.1 (εύρος 0.9-2.3)	1 (εύρος 0.9-2)

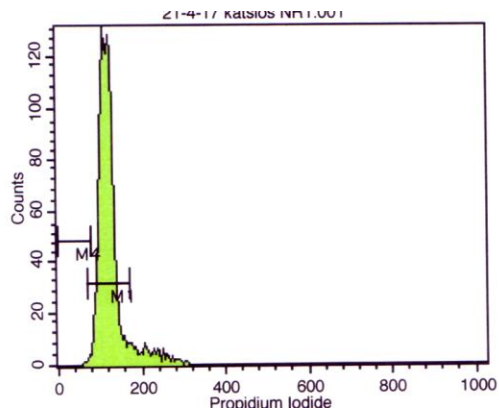
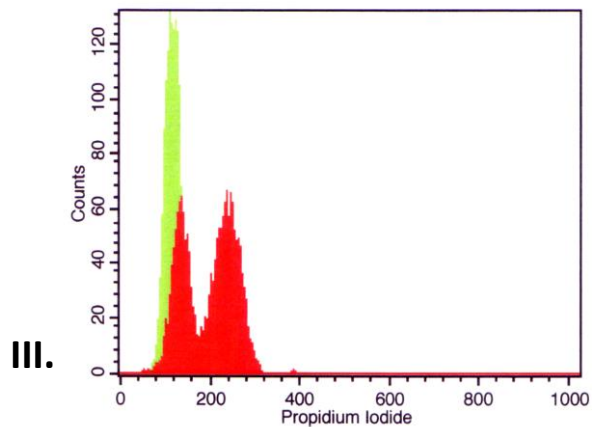
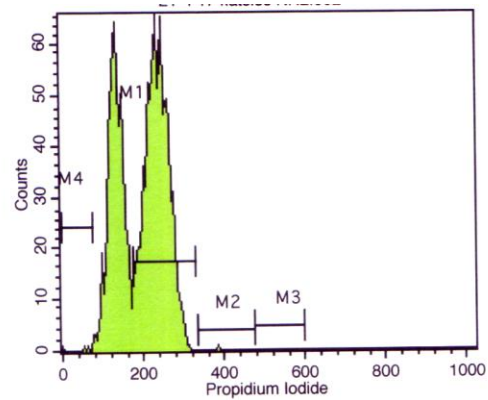
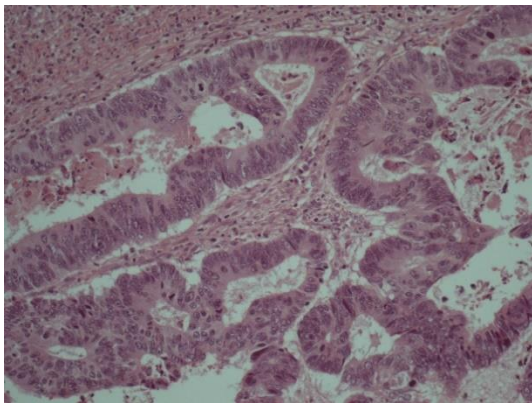
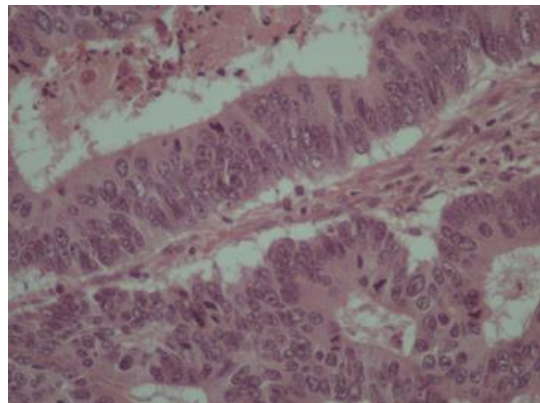
Στις εικόνες 22-26 παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα ιστογραμμάτων iFC με τις αντίστοιχες μικροσκοπικές εικόνες από το σημείο λήψης του καρκινικού δείγματος οι οποίες αποτελούσαν την αναφορά ως προς την ορθότητα της κυτταρομετρικής εκτίμησης.



Εικόνα 22. Αδενοκαρκίνωμα ορθού, μέτριας διαφοροποίησης με βλεννώδη στοιχεία, σταδίου IIIB (T3N1M0) .

A: Ιστογράμματα iFC καρκινικού (I.) και φυσιολογικού ιστού (II). Κυτταρομετρικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε υποπλοειδικό (DI=0.9)

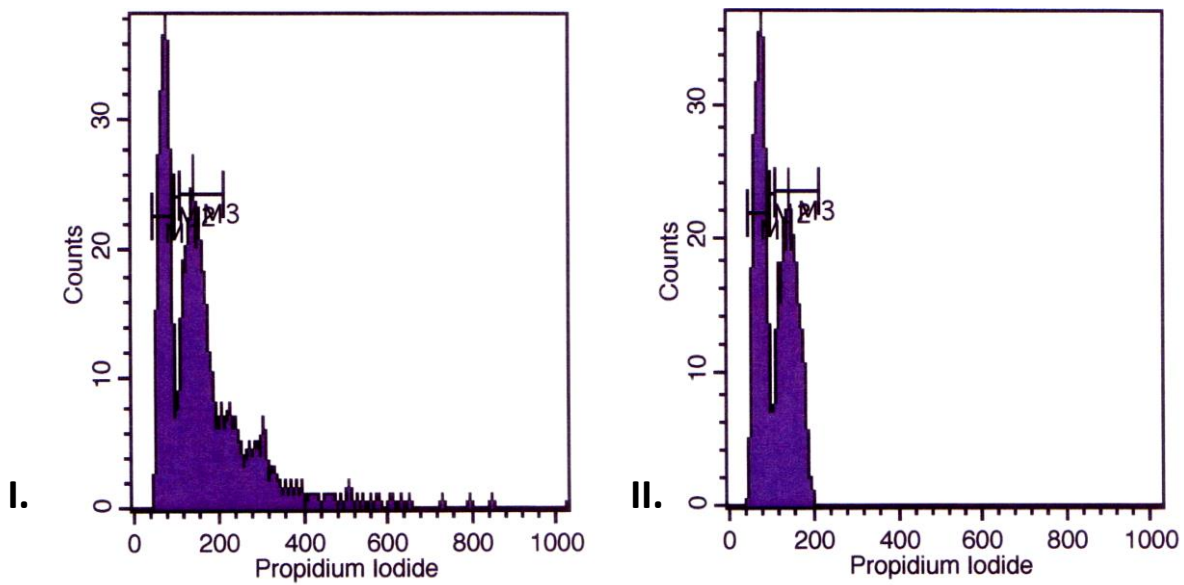
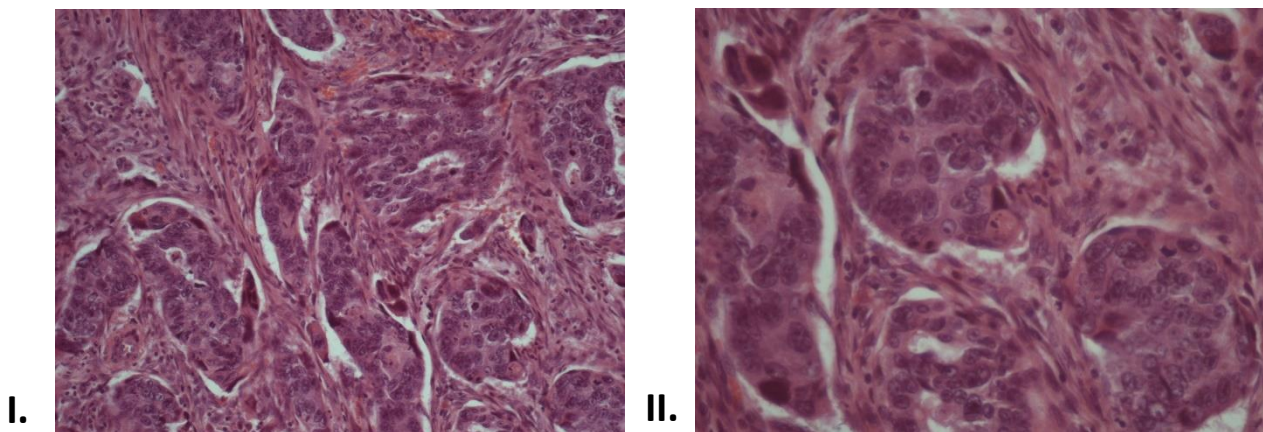
B: Ιστολογικές εικόνες με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (I x 200, II X400) από τα σημεία λήψης του καρκινικού δείγματος.

A.**I.****II.****III.****B.****I.****II.**

Εικόνα 23. Αδενοκαρκίνωμα ορθού, μέτριας διαφοροποίησης, σταδίου II (T3N0M0).

A: Ιστογράμματα iFC καρκινικού (II) και φυσιολογικού ιστού (I) και η αντίστοιχη αλληλοεπικάλυψη (overlay όπου το φυσιολογικό δείγμα απεικονίζεται με πράσινο και το καρκινικό με κόκκινο-III). Κυτταρομετρικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε υπερπλοειδικό (DI=1.75)

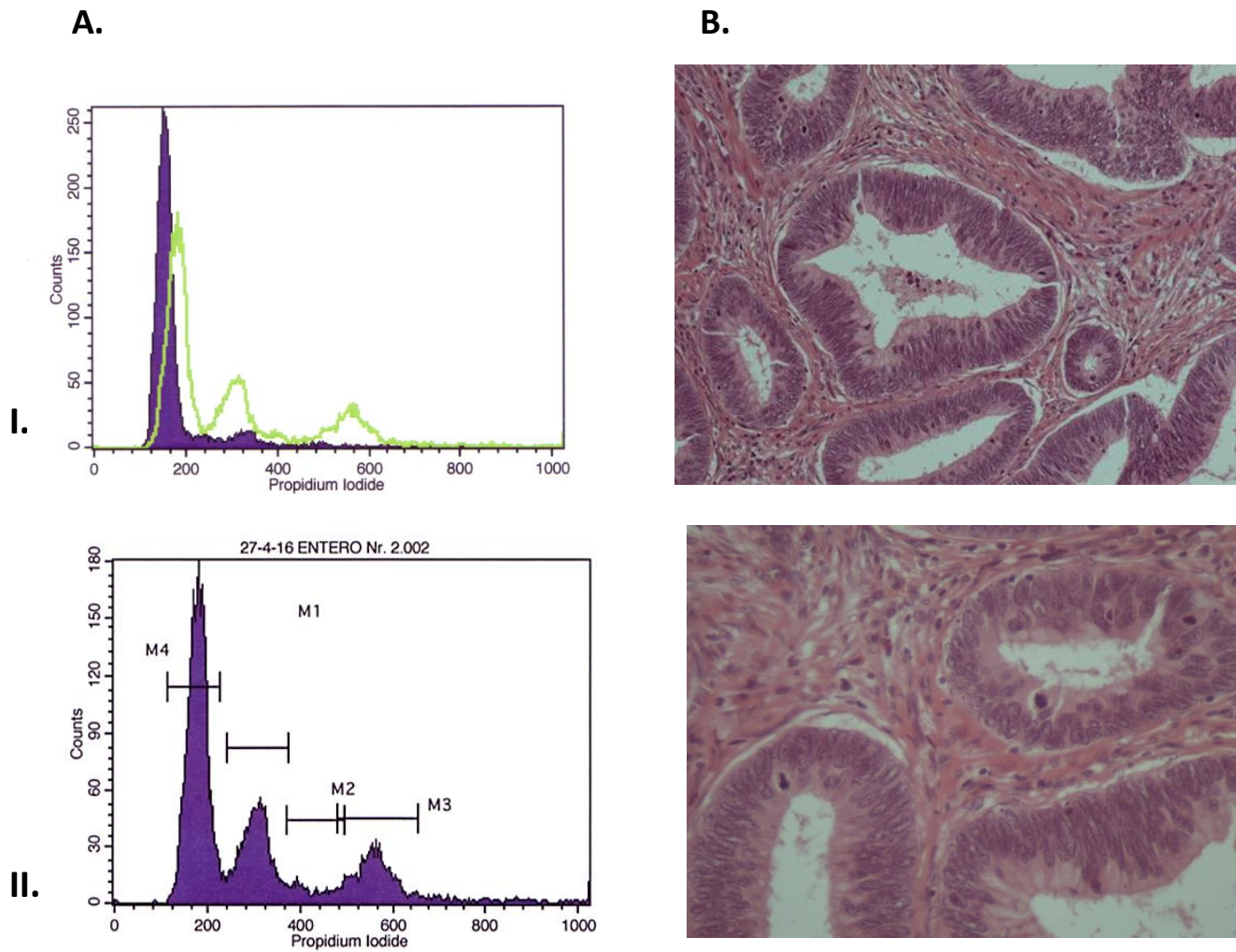
B: Ιστολογικές εικόνες με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (I x 200, II X400) από τα σημεία λήψης του καρκινικού δείγματος.

A.**B.**

Εικόνα 24. Αδενοκαρκίνωμα σιγμοειδούς, χαμηλής διαφοροποίησης , σταδίου IIIc (T4N2M0) .

A: Ιστογράμματα iFC καρκινικού ιστού (I & II). Κυτταρομετρικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε διπλοειδικό (DI=1) με TI=25%

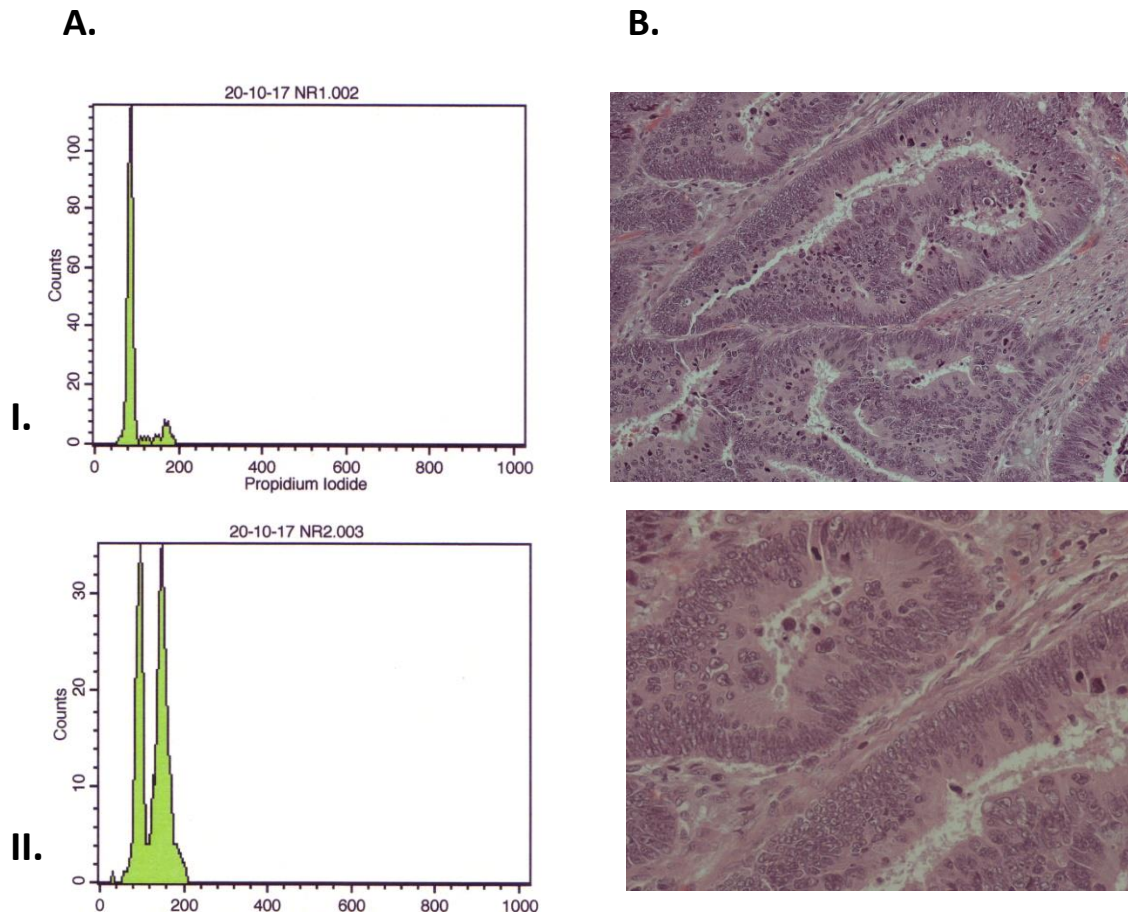
B: Ιστολογικές εικόνες με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (I x 200, II X400) από τα σημεία λήψης του καρκινικού δείγματος όπου παρατηρείται ο αυξημένος αριθμός μιτώσεων.



Εικόνα 25. Αδενοκαρκίνωμα τυφλού, μέτριας διαφοροποίησης με βλεννώδη κύτταρα, σταδίου II (T3N0M0) .

A: Ιστογράμματα iFC καρκινικού (II) και φυσιολογικού ιστού με αλληλοεπικάλυψη του καρκινικού (I). Κυτταρομετρικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε υπερπλοειδικό (DI=1.4)

B: Ιστολογικές εικόνες με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (I x 200, II X400) από τα σημεία λήψης του καρκινικού δείγματος.



Εικόνα 26. Αδενοκαρκίνωμα ορθού, καλής διαφοροποίησης, σταδίου I (T2N0M0) .

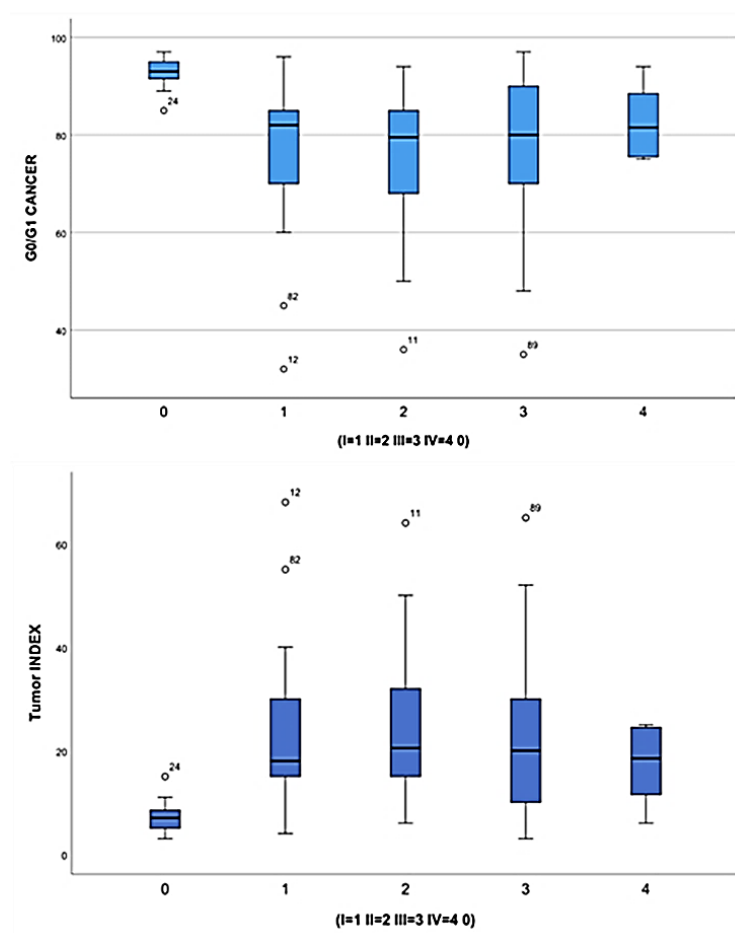
A: Ιστογράμματα iFC καρκινικού (II) και φυσιολογικού ιστού (I). Κυτταρομετρικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε υπερπλοειδικό (DI=1.5)

B: Ιστολογικές εικόνες με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (I x 200, II X400) από τα σημεία λήψης του καρκινικού δείγματος.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και του Tumor index μεταξύ του φυσιολογικού και καρκινικού ιστού κάθε ασθενή.

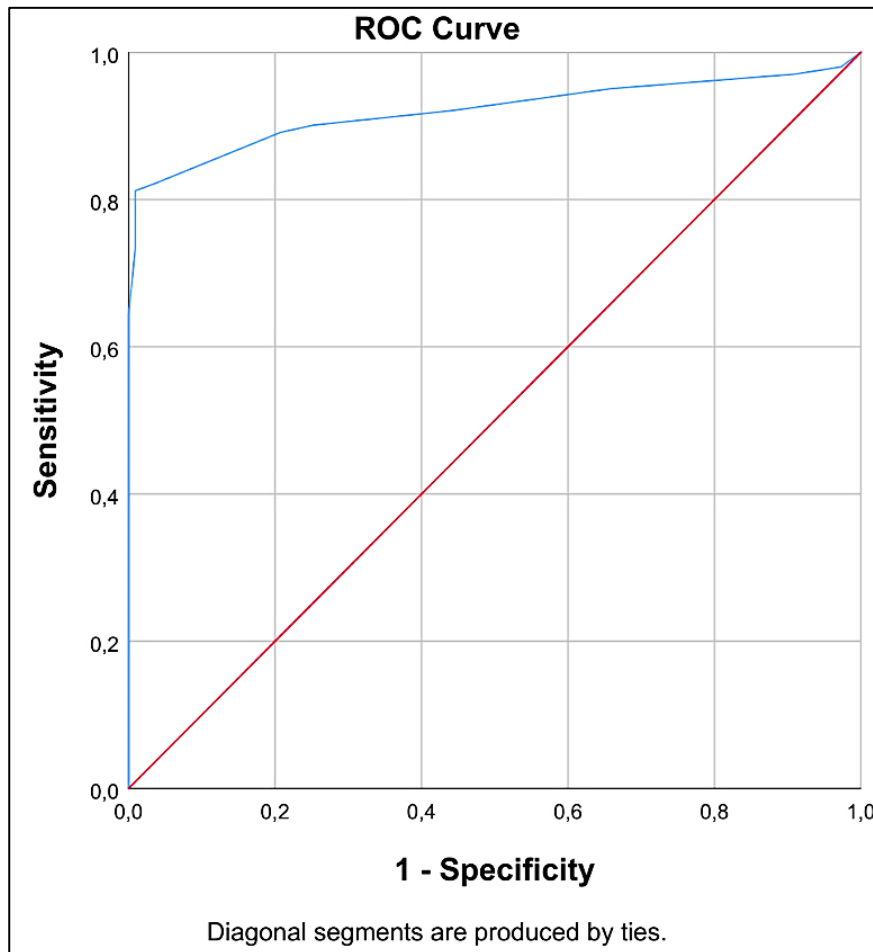
Το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην G0/G1 φάση, το οποίο αντιπροσωπεύει χαμηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, είναι σημαντικά χαμηλότερο ($p<0,05$) σε όλα τα δείγματα καρκινικού ιστού ανεξαρτήτως σταδίου (Διάγραμμα 2Α).

Σε συνάρτηση με το ανωτέρω εύρημα, ο Tumor Index που αντιπροσωπεύει το άθροισμα του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις S και G2/M και είναι αυξημένος σε πολλαπλασιαστικά ενεργά κύτταρα, εμφανίζεται σημαντικά υψηλότερος ($p<0,05$) σε όλα τα καρκινικά δείγματα ανεξαρτήτως σταδίου. Ειδικότερα, η μέση τιμή του TI στα δείγματα φυσιολογικού ιστού είναι 8 ενώ η μέση τιμή για τους όγκους σταδίων I, II, III και IV είναι 25.44, 24.67, 23.36 και 19.14 αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των τιμών του TI ανά στάδιο (Διάγραμμα 2Β).



Διάγραμμα 2. Κατανομή του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων στην G0/G1 (Α) και του Tumor index (Β) ανά στάδιο. Η μέση τιμή ανά στάδιο εμφανίζεται ως οριζόντια γραμμή.

Η δυνατότητα της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής να διακρίνει τον φυσιολογικό από τον καρκινικό ιστό εκτιμήθηκε με χρήση της καμπύλης ROC (receiver operating characteristic) (Διάγραμμα 3). Με ιδανική τιμή διαχωρισμού (cut-off value) το 10,5% για το TI (πίνακας 10), η iFC διακρίνει με 82,2% ευαισθησία και 99,96% ειδικότητα τον καρκινικό ιστό. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι >90% (91,1%) .

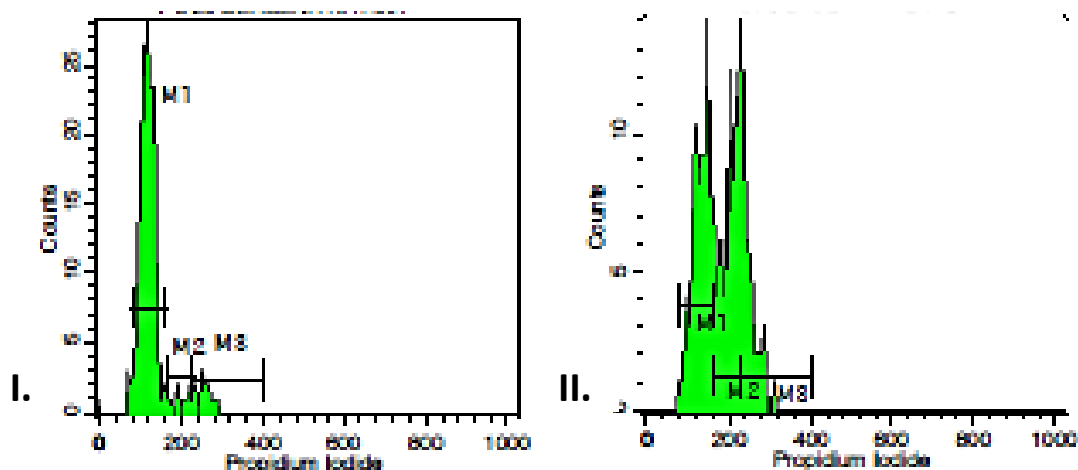


Διάγραμμα 3. Η καμπύλη ROC που απεικονίζει τη διαγνωστική ικανότητα (ευαισθησία και ειδικότητα) της iFC να διαχωρίζει τον υγιή από τον καρκινικό ιστό στον CRC.

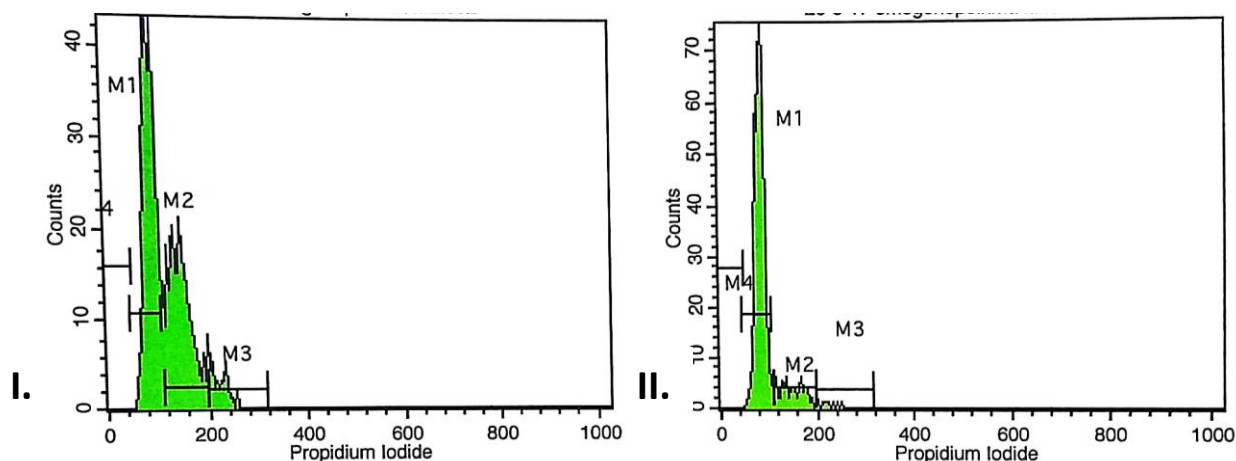
Πίνακας 10. Αποτελέσματα της ανάλυσης Rho

Coordinates of the Curve		
Test Result Variable(s): Tumor INDEX		
Positive if Greater Than or Equal To^a		
TI	Sensitivity	1 - Specificity
2	1	1
3,5	0,98	0,973
4,5	0,97	0,91
5,5	0,95	0,658
6,5	0,931	0,514
7,5	0,921	0,441
8,5	0,901	0,252
9,5	0,891	0,207
10,5	0,822	0,036
11,5	0,812	0,009
12,5	0,772	0,009
13,5	0,752	0,009
14,5	0,733	0,009
15,5	0,644	0
16,5	0,634	0
17,5	0,604	0
18,5	0,554	0
19,5	0,535	0
20,5	0,475	0
21,5	0,465	0
22,5	0,416	0
23,5	0,406	0
24,5	0,386	0
26,5	0,277	0
29	0,257	0
32	0,188	0
34,5	0,178	0
35,5	0,149	0
37	0,139	0
39	0,129	0
42,5	0,099	0
46	0,089	0
48,5	0,079	0
51	0,05	0
53,5	0,04	0
59,5	0,03	0
64,5	0,02	0
66,5	0,01	0
69	0	0

Η αξιολόγηση των ορίων εκτομής είναι ιδιαίτερα σημαντική στη χειρουργική που αφορά τους όγκους του ορθού. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε επιπλέον ανάλυση των παραμέτρων της iFC στην υποκατηγορία των ασθενών με όγκους ορθού (εικόνες 27, 28).

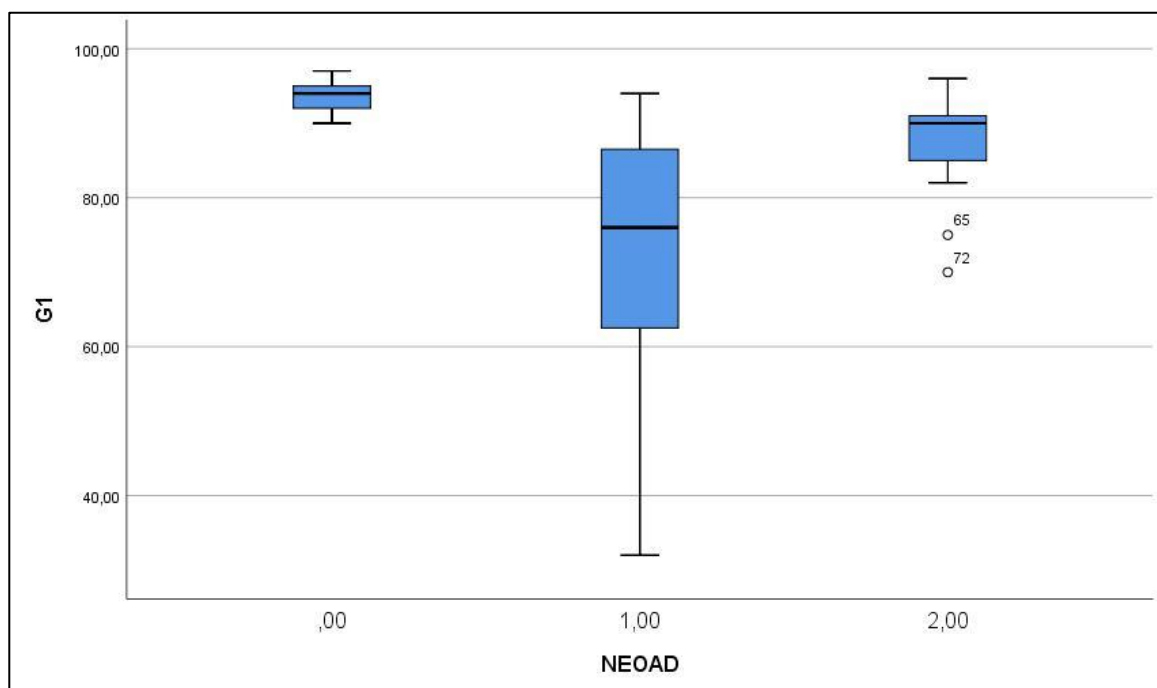


Εικόνα 27. Ιστογράμματα φυσιολογικού (I) και καρκινικού (II) ιστού από δείγματα ασθενή με αδενοκαρκίνωμα ορθού μέτριας διαφοροποίησης σταδίου II (T3N0M0). Στην κυτταρομετρική ανάλυση ο όγκος χαρακτηρίστηκε διπλοειδικός (DI=1) με αυξημένο TI (40%).



Εικόνα 28. Ιστογράμματα καρκινικού (I) και φυσιολογικού (II) δείγματος από αδενοκαρκίνωμα ορθού, μέτριας διαφοροποίησης, σταδίου II (T3N0M0) το οποίο έλαβε νεοεπιχειρουργική θεραπεία με μικρή ανταπόκριση (TRG=3). Στην κυτταρομετρική ανάλυση ο όγκος χαρακτηρίστηκε υπερπλοειδικός (DI=1,6)

Για να χαρακτηρίσουμε το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, αναλύσαμε το ποσοστό των κυττάρων στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου στα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα όγκων του ορθού που έλαβαν ή όχι νεοεπικουρική θεραπεία. Ο μέσος όρος του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην G0/G1 φάση στα δείγματα του φυσιολογικού ιστού, καρκινικού ιστού ασθενών που δεν έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία και του καρκινικού ασθενών που έλαβαν θεραπεία ήταν $93.51\% \pm 0.32\%$, $73.75\% \pm 3.28\%$ and $87.08\% \pm 2.15\%$, αντίστοιχα (Διάγραμμα 4). Η ανάλυση διακύμανσης μεταξύ των τριών ομάδων αποκάλυψε σημαντική διαφορά στο G0/G1 κυτταρικό κλάσμα μόνο μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων που δεν έχουν λάβει νεοεπικουρική θεραπεία.



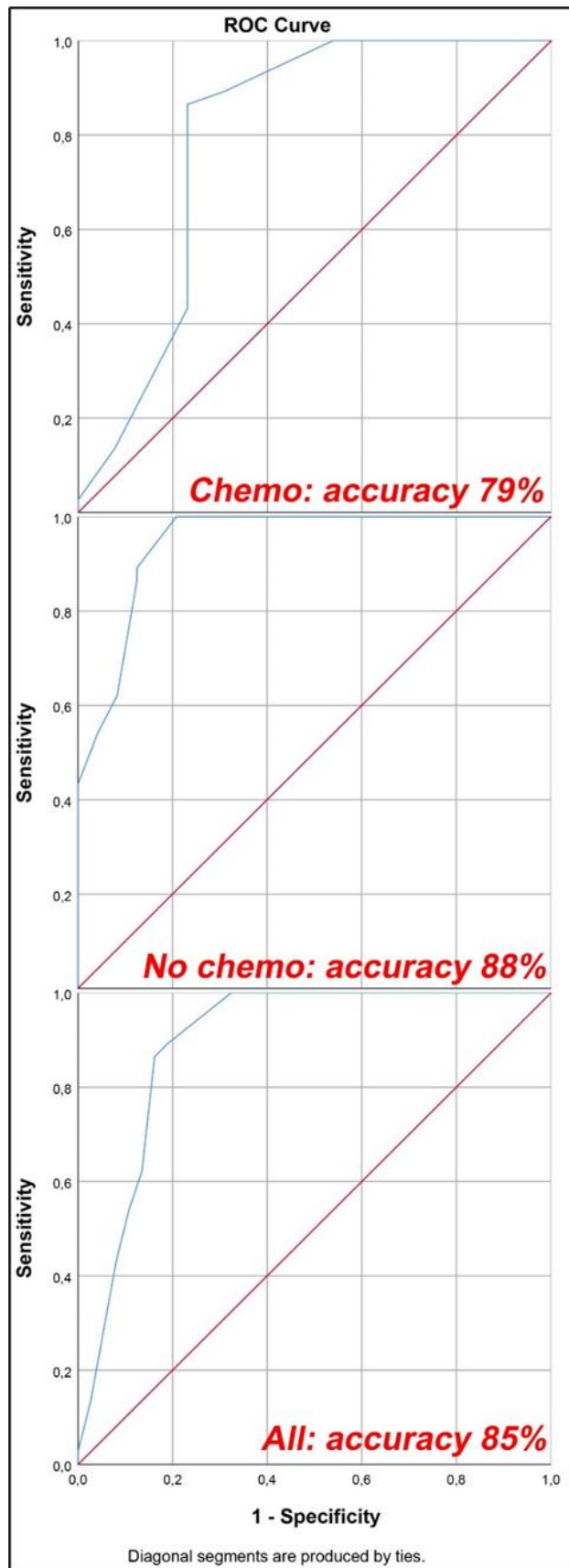
Διάγραμμα 4. Η κατανομή του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη G0/G1 (A) σε δείγματα φυσιολογικού ορθού (0), καρκίνου του ορθού που δεν έλαβε νεοεπικουρική θεραπεία (1,00) και καρκίνου ορθού που έλαβε νεοεπικουρική θεραπεία (2,00). Οι μέσες τιμές απεικονίζονται ως οριζόντιες γραμμές.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν τρεις τύποι ανάλυσης ROC για προσδιορισμό της ακρίβειας της μεθόδου σε ασθενείς με καρκίνο ορθού που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία, σε αυτούς που δεν έλαβαν αλλά και στις δύο ομάδες. Η ακρίβεια της iFC σε αυτές τις υποκατηγορίες ήταν 79%, 88% και 85% αντίστοιχα (Διάγραμμα 5).

Α.

Β.

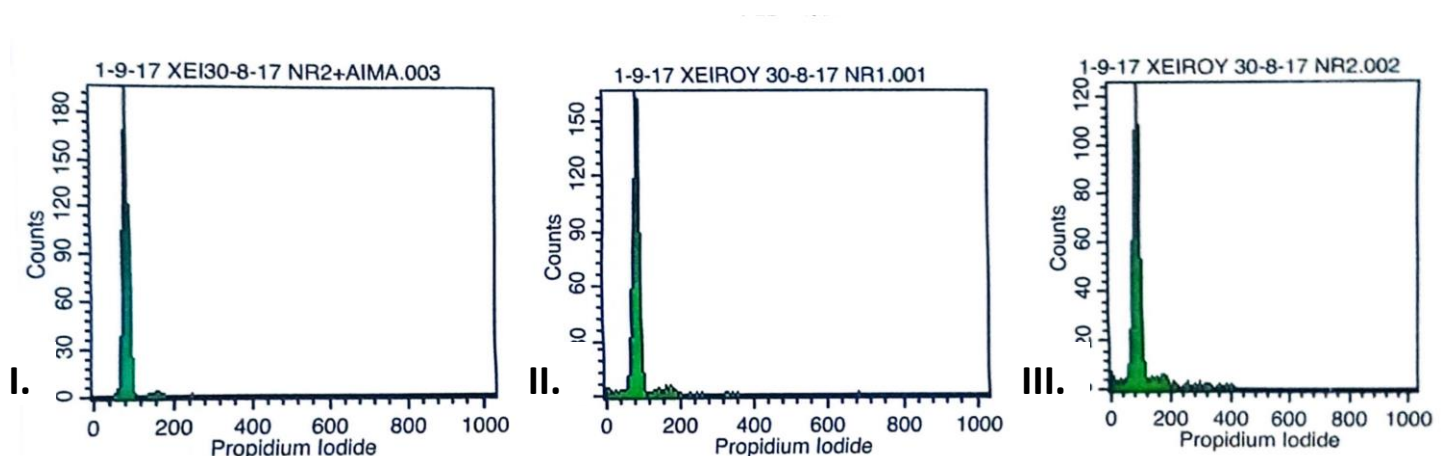
Γ.



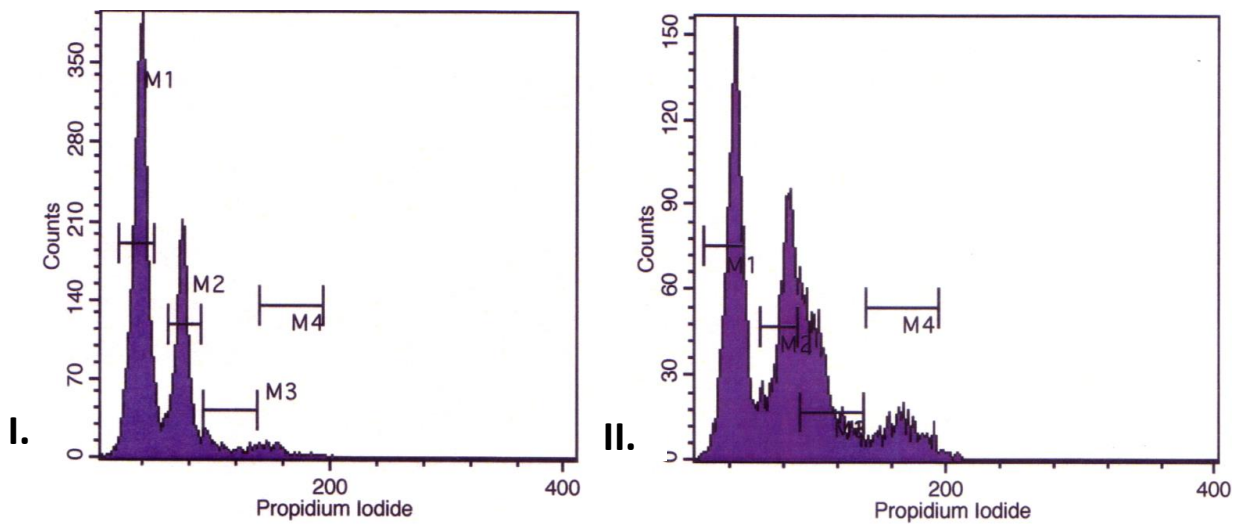
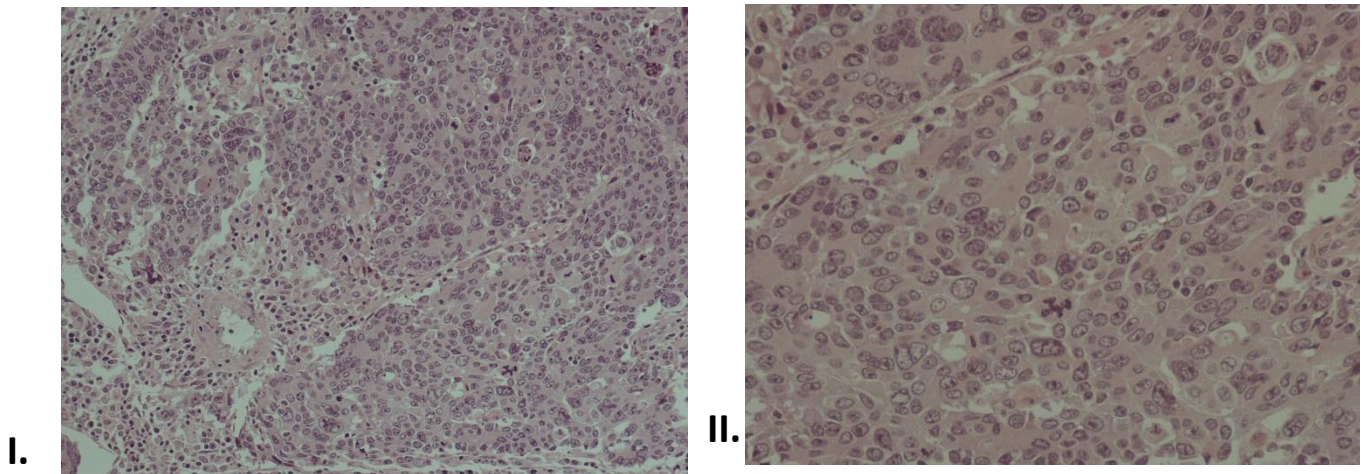
Διάγραμμα 5. Η καμπύλη ROC που απεικονίζει τη διαγνωστική ικανότητα της iFC να διαχωρίζει τον υγιή από τον καρκινικό ιστό στον καρκίνο του ορθού Α) στα δείγματα που έλαβαν νεοεπικουρική χήμειο-ακτινοθεραπεία Β) στα δείγματα χωρίς νεοεπικουρική θεραπεία Γ) στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο ορθού.

Σε επτά δείγματα όγκου, δεν εντοπίστηκε καρκίνος σε κυτταρομετρική ανάλυση. Έξι από αυτά ήταν δείγματα καρκίνου του ορθού που είχαν λάβει νεοεπικουρική χήμειο-ακτινοθεραπεία. Δύο από αυτά τα δείγματα είχαν πλήρη ανταπόκριση χωρίς βιώσιμα καρκινικά κύτταρα στην παθολογοανατομική εξέταση (TRG = 0) σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης TRG AJCC. Όσον αφορά τα υπόλοιπα 4 δείγματα, 2 από αυτά είχαν μέτρια ανταπόκριση (TRG=1) και τα υπόλοιπα φτωχή ανταπόκριση (TRG=2) στην νεοεπικουρική θεραπεία. Στην παθολογοανατομική εξέταση το σημείο λήψης του καρκινικού δείγματος χαρακτηρίστηκε αρνητικό για καρκίνο στο ένα δείγμα ενώ στα λοιπά διαπιστώθηκε υπολειπόμενος καρκίνος ή μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα στα βαθύτερα στρώματα του τοιχώματος του ορθού όπου επικρατούσε έντονη ίνωση (εικόνα 29). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την αναγκαιότητα δειγματοληψίας βαθύτερα από το επιθήλιο σε περιπτώσεις όπου εφαρμόστηκε νεοεπικουρική θεραπεία.

Από την άλλη πλευρά, εννέα δείγματα φυσιολογικού ιστού, αν και σαφώς διαφοροποιήθηκαν από τα καρκινικά, χαρακτηρίστηκαν ως «μολυσμένα με καρκίνο» στην κυτταρομετρική ανάλυση (Εικόνα 30). Η παθολογοανατομική εξέταση του δείγματος του εντέρου σε ένα από τα «μολυσμένα» δείγματα, αποκάλυψε χαμηλόβαθμη δυσπλασία σε τυχαίο φυσιολογικό βλεννογόνο μαζί με δύο σύγχρονους πολύποδες (ένας με υψηλόβαθμη δυσπλασία).



Εικόνα 29. Ιστογράμματα iFC από το αίμα (I), που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό control, σε σύγκριση με το φυσιολογικό (II) και το καρκινικό δείγμα (III) που εμφανίζουν παρόμοια κατανομή, σε αδενοκαρκίνωμα κατώτερου ορθού που έλαβε νεοεπικουρική θεραπεία με TRG=1 (σχεδόν πλήρης ανταπόκριση) με μικρή υπολειμματική εστία (γ)T2N0M0 στην παθολογοανατομική εξέταση και DI=1 χωρίς σαφή εντοπισμό καρκινικών κυττάρων στην εκτίμηση με iFC.

A.**B.**

Εικόνα 30. Αδενοκαρκίνωμα δεξιάς κοιλικής καμπής, χαμηλής διαφοροποίησης, σταδίου II (T3N0M0).

A: Ιστογράμματα iFC φυσιολογικού (I) και καρκινικού (II) ιστού. Κυτταρομετρικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε υπερπλοειδικό (τετραπλοειδικό- $DI=2$). Στο ιστόγραμμα του φυσιολογικού (I) δείγματος, διαφαίνονται στοιχεία «καρκινικής» επιμόλυνσης με ικανό αριθμό κυττάρων να εμφανίζουν έντονη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα.

B: Ιστολογικές εικόνες με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (I x 200, II x 400) από τα σημεία λήψης του καρκινικού δείγματος όπου απεικονίζεται αυξημένος αριθμός μιτώσεων.

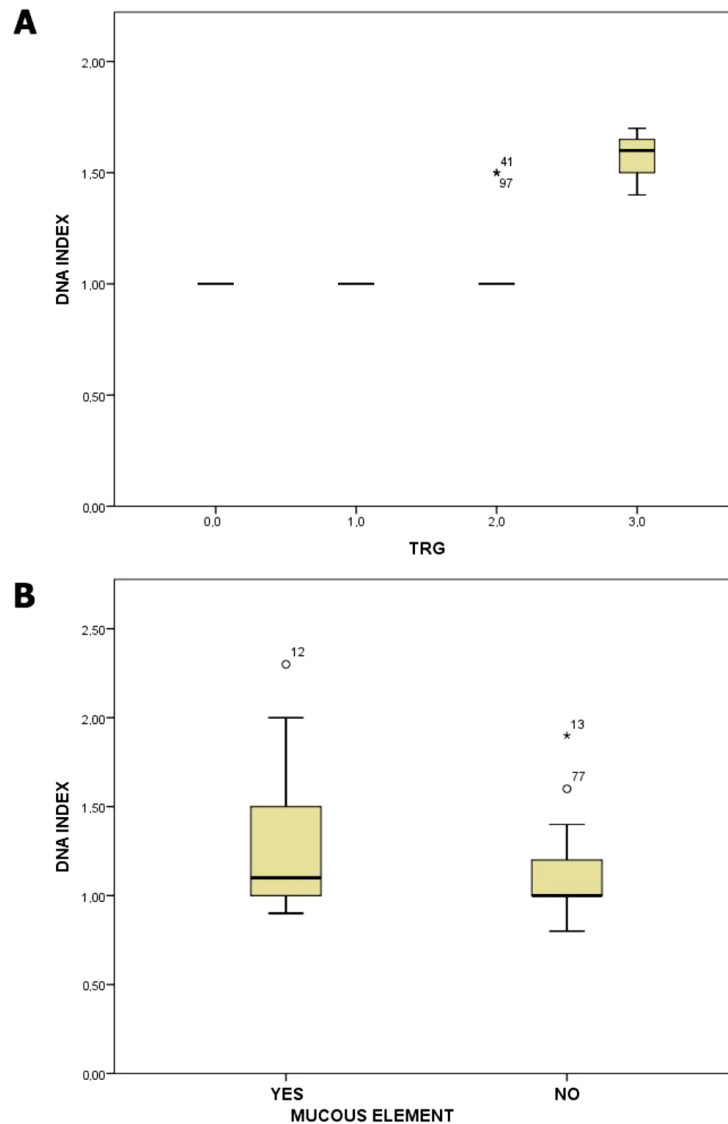
Οι ασθενείς που εντάχθηκαν στην έρευνα παρακολουθήθηκαν ως τον Ιανουάριο 2024. Η μέση περίοδος παρακολούθησης ήταν 35 μήνες (εύρος 4-82 μήνες). Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής, 22 ασθενείς (20.7%) εμφάνισαν τοπική υποτροπή ή/και απομακρυσμένες μεταστάσεις η πλειοψηφία των οποίων είχαν νεοπλάσματα σταδίων III και IV ή υψηλό TRG (ενδεικτικό κακής ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική θεραπεία). Η συνολική επιβίωση (OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (disease-free survival- DFS) ήταν 76% και 72%, αντίστοιχα (Πίνακας 11). Η συνολική επιβίωση συσχετίστηκε αντίστροφα με το στάδιο χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η συσχέτιση αυτή.

Πίνακας 11. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων σε συνάρτηση με τις παραμέτρους υποτροπής/μετάστασης και επιβίωσης.

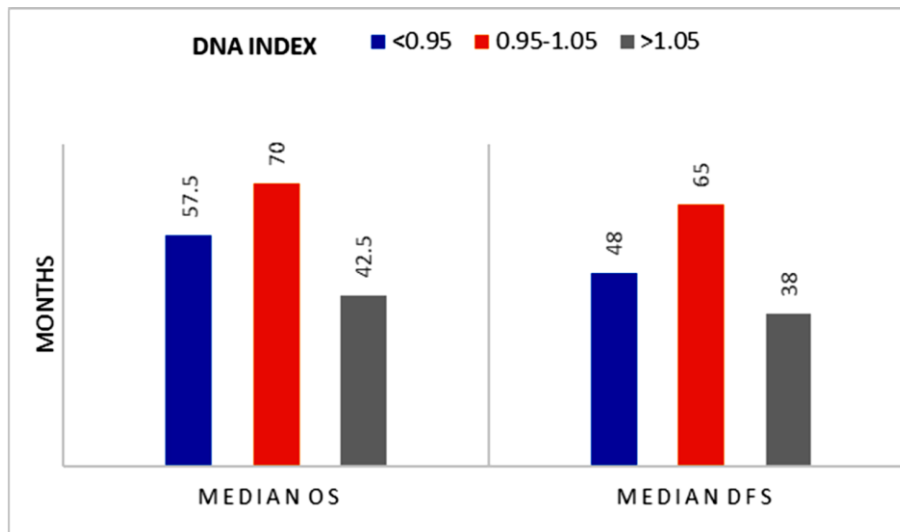
	<i>Ασθενείς (n)</i>	<i>Ca υποτροπή/ μετάσταση (n)</i>	<i>3ετής επιβίωση (n)</i>	<i>3ετής επιβίωση (%)</i>	<i>3 year Ca- related death (n)</i>	<i>3 year DFS (%)</i>
ΦΥΛΟ						
Άρρεν	69	18	51	74	10	62
Θήλυ	37	4	30	81	3	78
ΘΕΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ						
Δεξί κόλον	37	10	28	75	6	65
Αριστερό κόλον	31	7	22	71	6	68
Ορθό	36	5	29	80	1	69
ΣΤΑΔΙΟ						
0	5	0	5	100	0	100
I	20	1	14	70	1	70
II	36	4	32	89	1	80
III	38	13	27	71	7	55
IV	7	4	3	43	4	43
ΝΕΟΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ						
TRG 0	18	2	16	89	1	83
TRG 1	3	0	3	100	0	100
TRG 2	3	0	2	67	0	67
TRG 3	9	1	9	100	0	89
TRG 3	3	1	2	67	1	67
	106	22	81	76	17	72

Αναφορικά με τα κυτταρομετρικά δεδομένα, η περαιτέρω ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του DNA index με τον Tumor index και το TRG ($p: 0.01$) και αρνητική συσχέτιση με την παρουσία του βλεννώδους στοιχείου στον όγκο ($p: 0.05$) (Διάγραμμα 6). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ του DNA index και των υπόλοιπων παραμέτρων που μελετήθηκαν (φύλο, θέση του όγκου, στάδιο, βαθμός διαφοροποίησης, περινευρική και λεμφαγγειακή διήθηση, tumor budding, lymph node ratio [LNR], υποτροπή). Η μέση επιβίωση

(OS) και το διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) ήταν υψηλότερα στους διπλοειδείς όγκους συγκριτικά με τους ανευπλοειδείς, αλλά η διαφορά δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 6. A: Η συσχέτιση του DNA index (ενδεικτικό του περιεχόμενου DNA) και του tumor regression grade (TRG- ενδεικτικό της ανταπόκρισης στην προεγχειρητική θεραπεία). **B:** Η συσχέτιση της ποσότητας του περιεχόμενου DNA του όγκου (DNA index) με την παραγωγή βλέννης από τα καρκινικά κύτταρα. Τα σημεία που σηματοδοτούνται με αριθμούς αντιπροσωπεύουν δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από δύο αποκλίσεις από το μέσο.

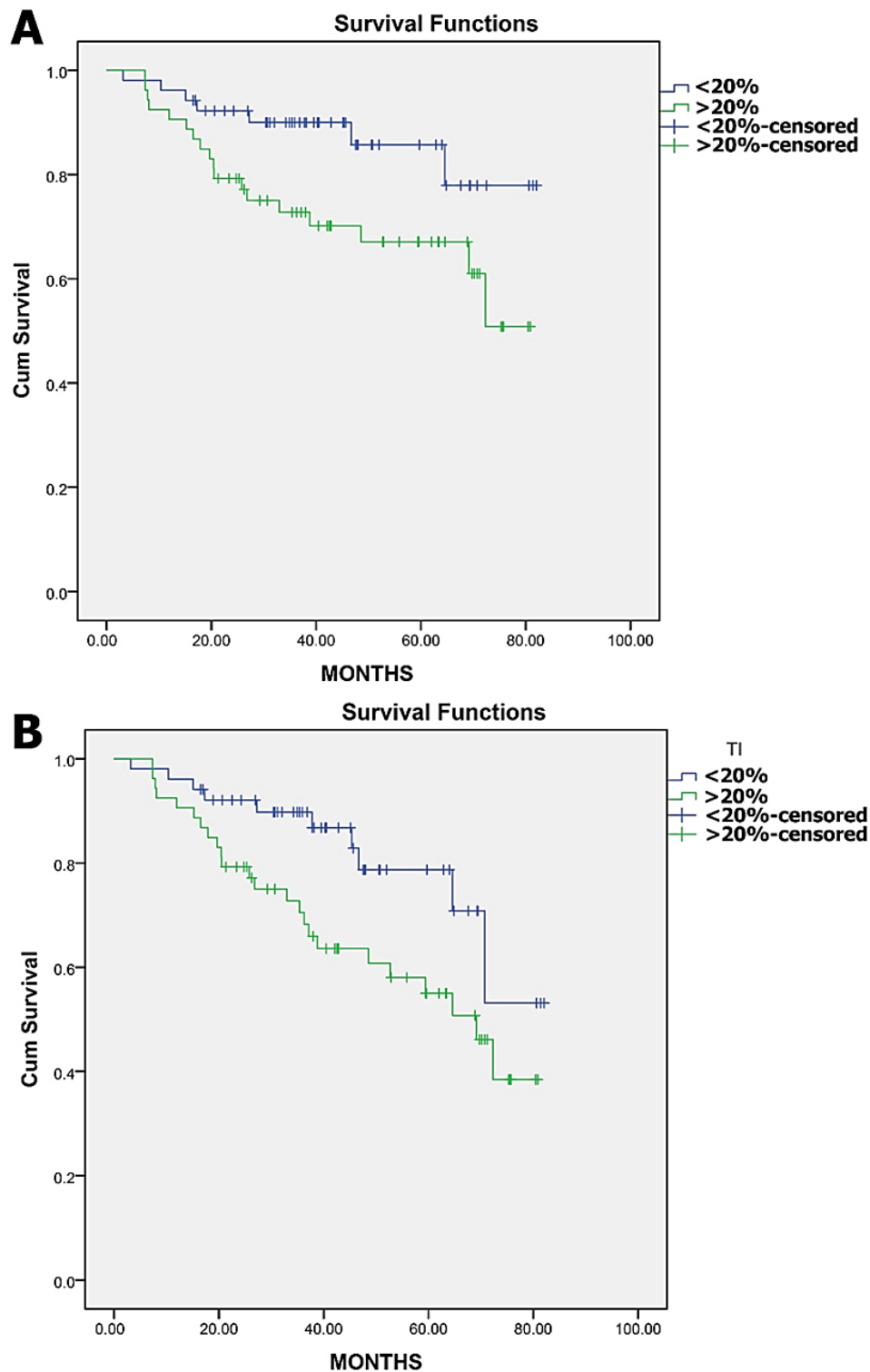


Διάγραμμα 7. Η μέση συνολική επιβίωση (OS) και η επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) σε σχέση με την πλοειδία των όγκων η οποία καθορίζεται από τις τιμές του DNA index.

Κατά την ανάλυση των σχέσεων του Tumor Index , φάνηκε να έχει αυξητική τάση με την πρόοδο του σταδίου του όγκου, αλλά δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική αυτή η συσχέτιση.

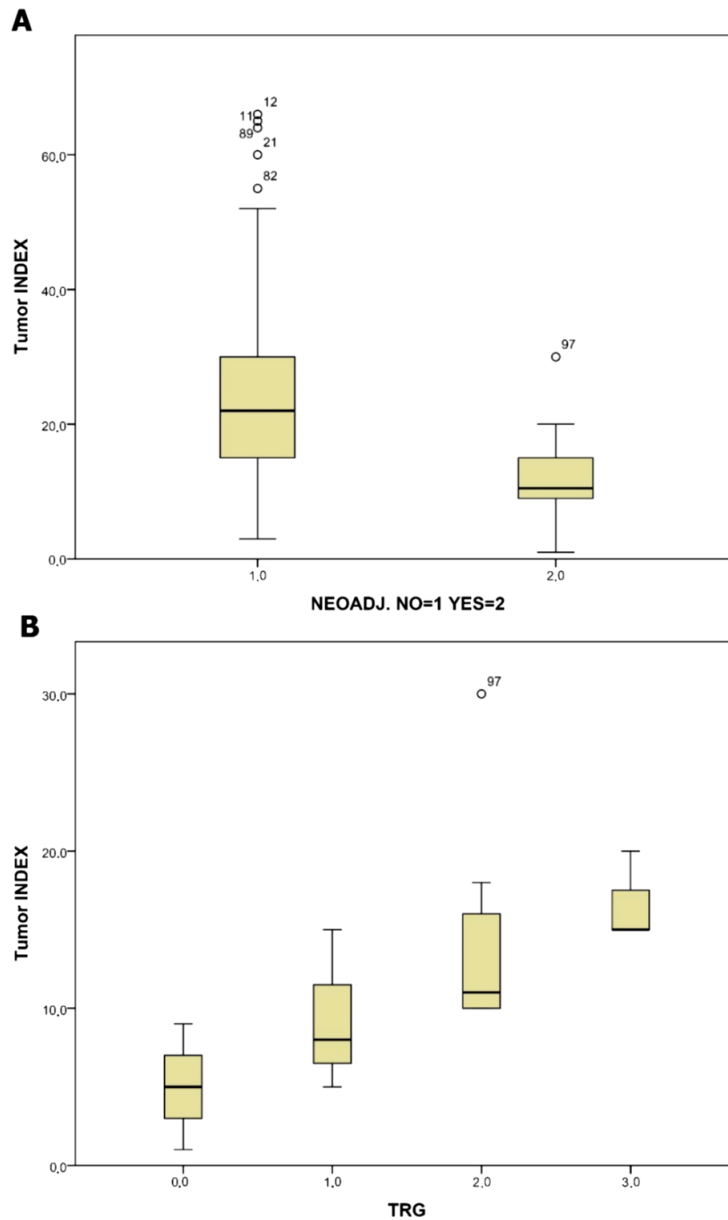
Η μέση τιμή του TI, όπως φάνηκε στην αρχική ανάλυση, ήταν το 20%. Βάσει αυτού, αναλύθηκαν δύο ισοτίμες ομάδες 53 ασθενών με χαμηλό και υψηλό TI συγκριτικά με το μέσο. Η τιμές του TI συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με την επιβίωση με τιμή ορίου το μέσο 20%. Όπως προκύπτει από τις καμπύλες επιβίωσης (διάγραμμα 8), υψηλότερες τιμές TI οδηγούν σε χειρότερη συνολική επιβίωση (OS) και μικρότερη επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS).

Επιπλέον, σημαντικές συσχετίσεις φάνηκαν μεταξύ του TI και της χορήγησης ($p:0.05$) όπως και της ανταπόκρισης (βάσει του TRG) ($p: 0.01$) στη νεοεπικουρική θεραπεία. Οι ασθενείς που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία και αυτοί που είχαν καλύτερη ανταπόκριση εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές TI όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 8. Α: Η καμπύλη επιβίωσης Kaplan–Meier που απεικονίζει τη συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο διαχωρίζοντάς τους βάσει χαμηλού και υψηλού TI. Το διάγραμμα αυτό συγκρίνει τις πιθανότητες συνολικής επιβίωσης ανάμεσα στις δύο ομάδες, τονίζοντας τις διαφορές στην εξέλιξη των ασθενών βάσει της κατηγοριοποίησης του TI.

Β: Η καμπύλη επιβίωσης Kaplan–Meier που απεικονίζει την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο υψηλού και χαμηλού TI. Η καμπύλη αυτή αναδεικνύει το χρόνο επιβίωσης χωρίς υποτροπή ή πρόοδο της νόσου, προβάλλοντας την προγνωστική αξία των τιμών του TI.



Διάγραμμα 9. Α: Η κατανομή των τιμών του TI ανάμεσα στα δείγματα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία και αυτών που δεν έλαβαν.

Β: Η κατανομή των τιμών του TI σε σχέση με το βαθμό ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική θεραπεία όπως αυτός αντικατοπτρίζεται στο TRG. Χαμηλότερες τιμές TI σχετίζονται με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία (μικρότερο TRG). Η στατιστική σημαντικότητα των συσχετίσεων ($p < 0.05$) αναδεικνύεται και στα δύο διαγράμματα. Τα σημεία που σηματοδοτούνται με αριθμούς αντιπροσωπεύουν δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από δύο αποκλίσεις από το μέσο.

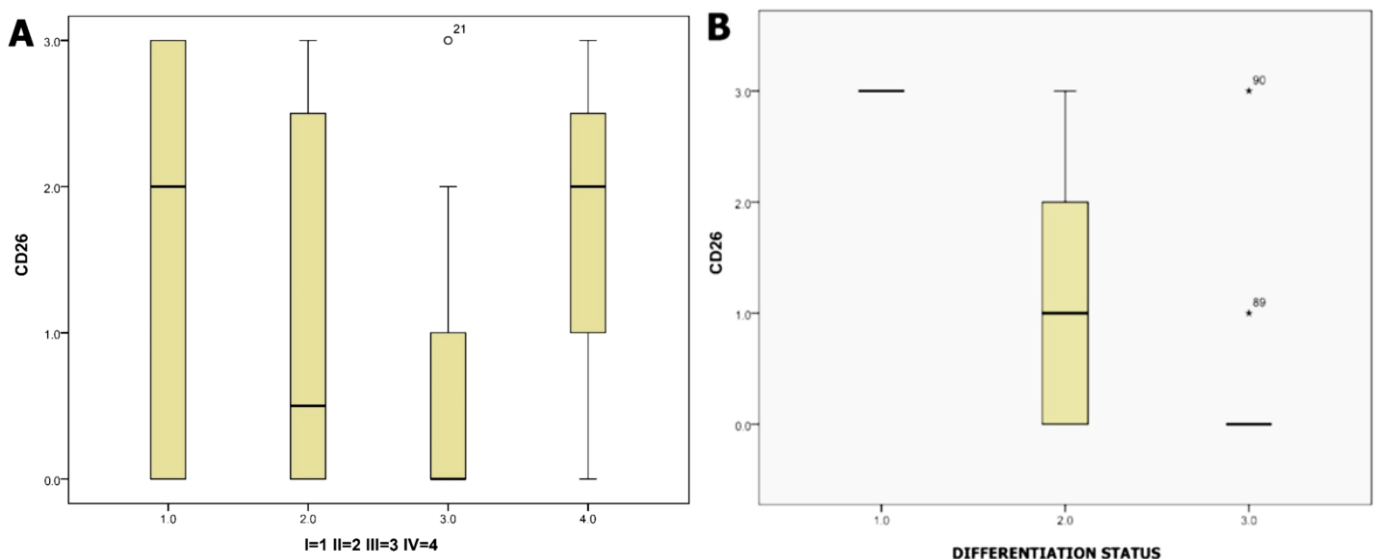
Η μελέτη της έκφρασης του επιφανειακού δείκτη CD26 πραγματοποιήθηκε σε 45 ασθενείς τα χαρακτηριστικά των οποίων συνοψίζονται στον πίνακα 12.

Η ανάλυση της έκφρασης του CD26 στα καρκινικά κύτταρα δεν ανέδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις υπό μελέτη παραμέτρους παρά μόνο με το στάδιο της νόσου καθώς και με τον βαθμό διαφοροποίησης (Διάγραμμα 10). Παραδόξως, στην παρούσα

μελέτη διαπιστώθηκε αρνητική στατιστική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του CD26 με το στάδιο του όγκου όπως και με το βαθμό διαφοροποίησης ($p: 0.05$).

Πίνακας 12. Τα χαρακτηριστικά του υποπληθυσμού των ασθενών στους οποίους μελετήθηκε η έκφραση του CD26

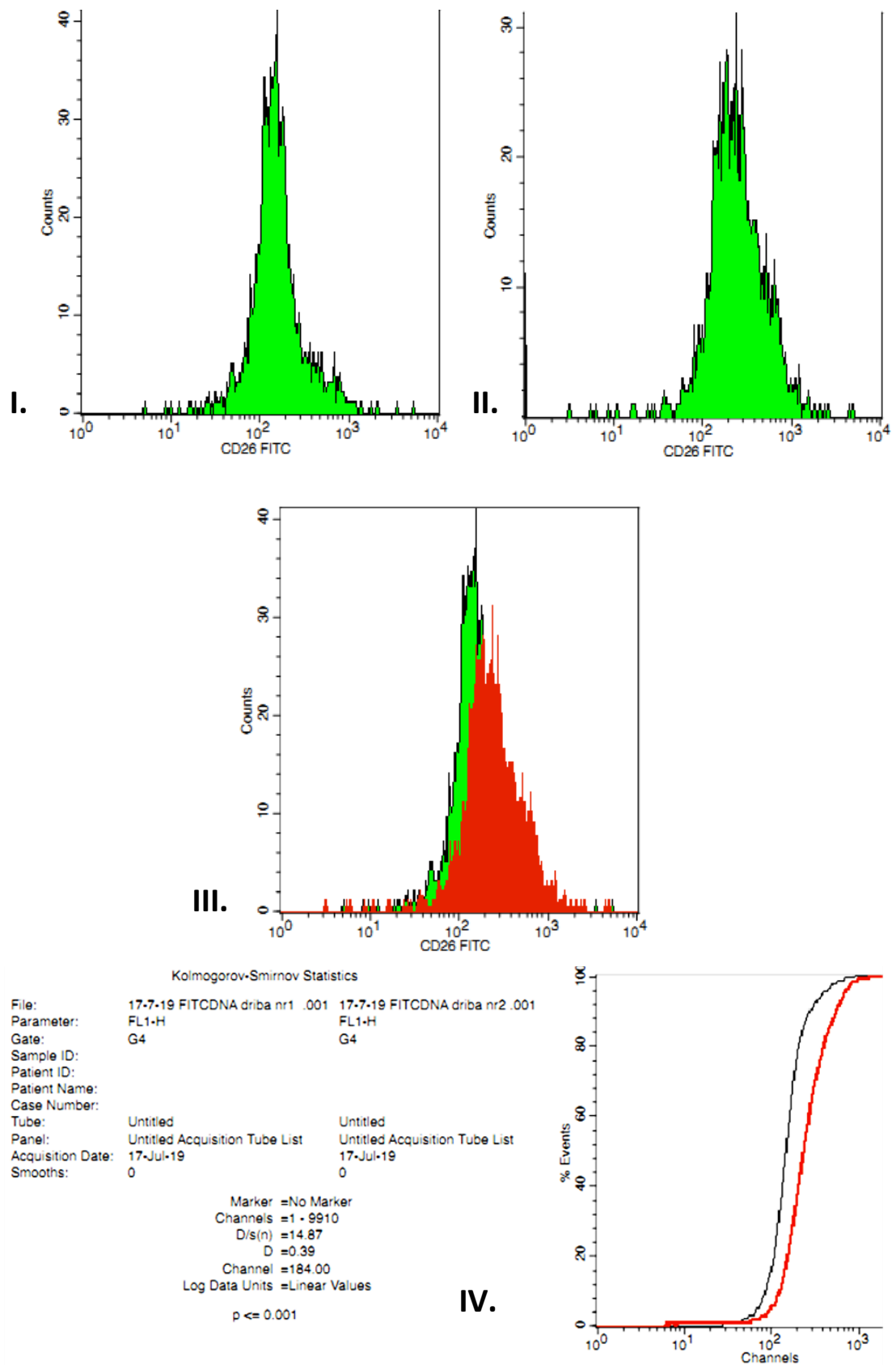
CD26 ασθενείς	Αριθμός
ΦΥΛΟ	
Άρρεν	29
Θήλυ	16
ΕΝΤΟΠΙΣΗ	
Δεξί κόλον	16
Αριστερό κόλον	16
Ορθό	13
ΣΤΑΔΙΟ	
0	0
I	10
II	16
III	16
IV	3
ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	
Καλή	1
Μέτρια	35
Χαμηλή	9
ΝΕΟΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	
TRG 0	0
TRG 1	0
TRG 2	2
TRG 3	3
ΣΥΝΟΛΟ	45

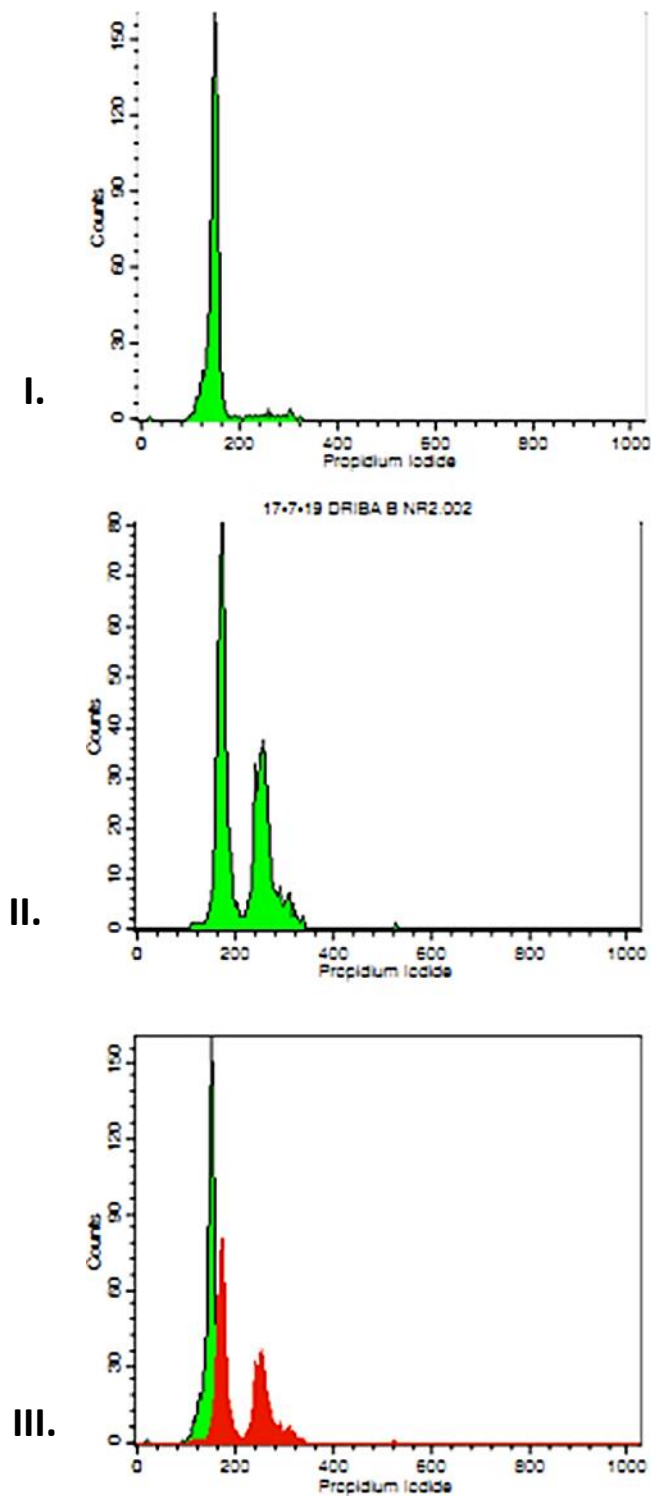


Διάγραμμα 10. Τα επίπεδα έκφρασης του CD26 από τα καρκινικά κύτταρα διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες : απουσία (0), χαμηλή (1), μέτρια (2), υψηλή (3) έκφραση. **A:** Η κατανομή της έκφρασης του CD26 αναλογικά με το στάδιο (1 = stage I, 2 = stage II, 3 = stage III, 4 = stage IV), **B:** Η συσχέτιση της έκφρασης του CD26 με το βαθμό διαφοροποίησης (οι αριθμοί στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχούν ως εξής : 1 = καλή , 2 = μέτρια, 3 = χαμηλή διαφοροποίηση).

Παράδειγμα ιστογράμματος της μελέτης των επιπέδων έκφρασης του CD26 με iFC παρατίθεται στη εικόνα 31.

A.



B.

Εικόνα 31. Ιστογράμματα μελέτης με iFC δείγματος αδενοκαρκινώματος ανώτερου ορθού μέτριας διαφοροποίησης, σταδίου II (T3N0M0).

A: Ανάλυση δύο διαστάσεων για την εκτίμηση της έκφρασης του CD26 στο φυσιολογικό (I) και το καρκινικό δείγμα (II). Πρόκειται για όγκο με υψηλή έκφραση του δείκτη όπως φαίνεται παραστατικά στην επικάλυψη (III) και το διάγραμμα του κυτταρόμετρου (IV).

B: Μονοδιάστατη ανάλυση για εκτίμηση της πλοειδίας: ιστόγραμμα φυσιολογικού δείγματος (I), καρκινικού δείγματος (II) και το overlay των δύο (III). Πρόκειται για υπερπλοειδικό δείγμα με $DI=1,1$

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι διαταραχές στο περιεχόμενο του κυτταρικού DNA (πολυπλοειδία, ανευπλοειδία) είναι μια γνωστή αιτία καρκινογένεσης.(119) Η κατάσταση της πλοειδίας έχει μελετηθεί για πολλά χρόνια ως προγνωστικός δείκτης σε μια σειρά κακοηθειών. (119) Ο ορθοκολικός καρκίνος (CRC) είναι μια πολύπλοκη ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μια σειρά γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων που οδηγούν στην ογκογένεση. Η παθογένεση του CRC είναι γενικά κατανοητό ότι ακολουθεί μια εξέλιξη από καλοήθεις αδενωμάτωδεις πολύποδες σε κακοήθη καρκινώματα, μια διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές μεταλλάξεις και την ενεργοποίηση ογκογόνων οδών. (14-22) Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) είναι η πλέον κοινή οδός (80%) και η κύρια αιτία της γονιδιωματικής αστάθειας που οδηγεί στην ανευπλοειδία. (14-22) Ο ρόλος της ανευπλοειδίας στον καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC), μελετήθηκε για πρώτη φορά πριν από σχεδόν τέσσερις δεκαετίες. (156) Έκτοτε, έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σχετικά με την περιεκτικότητα σε DNA στον ορθοκολικό καρκίνο με τη συντριπτική πλειοψηφία να επικεντρώνεται στο ρόλο της ανευπλοειδίας ως προγνωστικού και βιοδείκτη ειδικά στο στάδιο II CRC. (139-147)

Η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την εκτίμηση και ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου DNA είναι η κυτταρομετρία ροής. (116,119) Πρόκειται για μια μέθοδο με μεγάλη ακρίβεια ,ταχεία και οικονομική η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο εύρος ιστών (φρέσκους, φρεσκοκατεψυγμένους και μονιμοποιημένους σε παραφίνη). (119, 143) Ειδικότερα, τα πλεονεκτήματα της μεθόδου έγκεινται στο ότι η κυτταρομετρική ανάλυση είναι βασισμένη σε μονήρη κύτταρα, μεγιστοποιώντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου σε επίπεδο ενός κυττάρου. Επιπλέον, είναι γρήγορη και προσφέρει τη δυνατότητα ανάλυσης μεμονομένων κυτταρικών πληθυσμών. Με αυτόν τον τρόπο, η κλωνική επέκταση του καρκίνου μπορεί να μελετηθεί ως υποπληθυσμοί με διαφορετικά γενετικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά. (116, 117,119) Η διεγχειρητική εφαρμογή της Κυτταρομετρίας Ροής, με βάση τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα, συμβάλλει στον ακριβή χαρακτηρισμό των ορίων του όγκου και στη δυνατότητα πλήρους εκτομής, που είναι ο κύριος στόχος στη Χειρουργική Ογκολογία. (124) Η εφαρμογή της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής στις ενδοκράνιες βλάβες είχε ως αποτέλεσμα την μοριακή ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των χειρουργικών ορίων τους σε 6 λεπτά ανά δείγμα. (126-130) Η iFC έχει εφαρμοστεί επίσης στα νεοπλάσματα της κεφαλής και του τραχήλου (133,134), του μαστού (131,132), του γυναικολογικού συστήματος (137) και της ουροδόχου κύστης (138) με πολύ καλά αποτελέσματα τόσο στον χαρακτηρισμό των

καρκινικών κυττάρων όσο και στην ανίχνευση των ορίων εκτομής. Επιπλέον, έχουν δημοσιευτεί και πρώιμες μελέτες της εφαρμογής της μεθόδου σε όγκους ήπατος (135) και παγκρέατος (136).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εισάγει τη χρήση της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής ως διαγνωστικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των αδενοκαρκινωμάτων του κόλου και του ορθού, προσφέροντας μια νέα προοπτική στην εξατομικευμένη αντιμετώπιση των ασθενών. Η τυφλή κυτταρομετρική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε διεγχειρητικά σε δείγματα φυσιολογικού και καρκινικού ιστού παχέος εντέρου και ορθού με υψηλή ακρίβεια (91,1%) στην αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων ακόμη και σε πρώιμους όγκους (T1, in situ) την καθιστά ελπιδοφόρα διαγνωστική μέθοδο.

Οι πρωτοποριακές πτυχές αυτής της μελέτης αναδεικνύουν την iFC όχι μόνο ως μέθοδο ακριβούς διάγνωσης, αλλά και ως μέσο καθορισμού των ορίων εκτομής, και κατ'επέκταση ως ένα χρήσιμο εργαλείο για τη λήψη αποφάσεων κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης, ιδιαίτερα στους όγκους του ορθού. Αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι τα χειρουργικά όρια επηρεάζουν άμεσα την πρόγνωση, τη χειρουργική στρατηγική και την ποιότητα ζωής των ασθενών. (46,52, 54,55,107-112) Η φιλοσοφία της διατήρησης του οργάνου στις επεμβάσεις που αφορούν τον καρκίνο του ορθού κερδίζει έδαφος τις τελευταίες δεκαετίες. Το άπω όριο εκτομής σε καρκίνο του κατώτερου ορθού περιορίζεται πλέον σε 1 cm ή λιγότερο όταν έχει χορηγηθεί νεοεπικουρική θεραπεία. (108,109) Αυτοί οι συμβιβασμοί έχουν γίνει αποδεκτοί προκειμένου να αποφευχθούν ακρωτηριαστικές επεμβάσεις (όπως η κοιλιοπερινεϊκή εκτομή-APR) που καταλήγουν σε μόνιμη κολοστομία και μείωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Ο χαρακτηρισμός του περιφερικού ορίου εκτομής είναι ζωτικής σημασίας για τον καθορισμό της ογκολογικής επάρκειας της επέμβασης και η iFC θα μπορούσε να αποτελέσει μια χρήσιμη μέθοδο για την ταχεία αξιολόγησή του κατά τη διάρκεια του χειρουργείου. Η χρήση της iFC θα μπορούσε επίσης να επεκταθεί και στον καθορισμό του ακτινωτού ορίου εκτομής το οποίο είναι μια επιπλέον σημαντική παράμετρος που σχετίζεται με την πρόγνωση και την πιθανότητα υποτροπής στον ορθοκολικό καρκίνο ενώ χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης ποιότητας στη χειρουργική του καρκίνου του ορθού με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες να συνιστούν αρνητικά όρια (>1 mm) για όλους τους ασθενείς με CRC που υποβάλλονται σε εκτομή. (46,52-55) Τέλος, η iFC μπορεί να εφαρμοσθεί και στον καθορισμό των ορίων στις τοπικές διαπρωκτικές εκτομές όγκων του ορθού (όπου τα απαιτούμενα όρια είναι τουλάχιστον 3mm) μιας και η μέθοδος φαίνεται να έχει υψηλή

ακρίβεια (91,1%) στην αναγνώριση καρκινικών κυττάρων ακόμη και σε πρώιμους όγκους (T1, in situ).

Η ακρίβεια της iFC είναι περιορισμένη σε περιπτώσεις καρκίνου του ορθού, όπου έχει προηγηθεί νεοεπικουρική θεραπεία (79% έναντι 88%). Η νεοεπικουρική θεραπεία φαίνεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, όπως διαφαίνεται στη συγκριτική ανάλυση της διακύμανσης της αναλογίας των κυττάρων που βρίσκονται στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία δε παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών (μη καρκινικών) και καρκινικών κυττάρων που έχουν λάβει νεοεπικουρική θεραπεία.

Μια άλλη έμμεση επίπτωση της επίδρασης της νεοεπικουρικής θεραπείας στο δυναμικό της κακοήθειας διαφαίνεται στις τιμές του Tumor Index ανά στάδιο. Ο Tumor Index (TI) σε προχωρημένα στάδια μπορεί να φαίνεται παρόμοιος ή ελαφρώς χαμηλότερος από ό,τι στα στάδια I και II, επειδή εμπεριέχουν την πλειοψηφία των περιστατικών που υποβλήθηκαν σε νεοεπικουρική θεραπεία.

Η νεοεπικουρική CRT, ανάλογα με τον βαθμό ανταπόκρισης, μπορεί ακόμη και να εξαφανίσει καρκινικά κύτταρα ειδικά στην επιφανειακή στιβάδα του τοιχώματος του εντέρου και να τα αντικαταστήσει από ινώδη ουλώδη ιστό. Στην παρούσα μελέτη, σε επτά δείγματα όγκου, δεν εντοπίστηκε καρκίνος στην κυτταρομετρική ανάλυση. Έξι από αυτά ήταν δείγματα καρκίνου του ορθού με νεοεπικουρική χημειοακτινοθεραπεία, δύο από τα οποία είχαν πλήρη ανταπόκριση χωρίς βιώσιμα καρκινικά κύτταρα στην μικροσκοπική εξέταση (TRG = 0). Στα υπόλοιπα δείγματα εντοπίστηκαν καρκινικά κύτταρα σε ομάδες ή μεμονωμένα σε βαθύτερα στρώματα του τοιχώματος περιβαλλόμενα από ίνωση κατά την παθολογοανατομική εξέταση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την αναγκαιότητα τροποποίησης του τρόπου της δειγματοληψίας σε περιπτώσεις όπου εφαρμόστηκε νεοεπικουρική θεραπεία. Η λήψη περισσότερων από μία βιοψίες και πιθανώς βαθύτερων εντός του αναλυόμενου ιστού φαίνεται αναγκαία ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια της μεθόδου σε αυτή την υποκατηγορία ασθενών. Επιπλέον η τροποποίηση της τεχνικής της δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας βούρτσισμα (brushing) ή αναρρόφηση με λεπτή βελόνα (FNA), πιθανά να συνεισφέρει στη βελτίωση των αποτελεσμάτων.

Από την άλλη πλευρά, εννέα δείγματα φυσιολογικού ιστού, αν και σαφώς διαφοροποιήθηκαν από τα καρκινικά, χαρακτηρίστηκαν ως «μολυσμένα με καρκίνο» στην κυτταρομετρική ανάλυση. Η έννοια του “Field cancerization” περιγράφεται στη βιβλιογραφία ως το φαινόμενο

στο οποίο ο ιστολογικά φυσιολογικός ιστός σε ένα όργανο έχει προδιάθεση να υποστεί καρκινική εξαλλαγή και θα μπορούσε να δώσει μια πιθανή εξήγηση για αυτό το εύρημα. (157) Επιγενετικά συμβάντα, όπως αλλαγές της κατάστασης μεθυλίωσης σε ογκοκατασταλτικά γονίδια που διαταράσσουν την έκφρασή τους είναι γνωστά πρώιμα συμβάντα στον μετασχηματισμό του ιστού του παχέος εντέρου που οδηγούν σε ογκογένεση. (15,16,20,21,24) Αν και οι γενετικές αλλοιώσεις είναι συχνές στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, σπάνια εντοπίζονται σε φυσιολογικό ιστό του παχέος εντέρου. (158) Ως πρώιμο συμβάν στον ορθοκολικό καρκίνο, τα επιγενετικά συμβάντα προτείνονται ως πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης σε αρκετές μελέτες. (159) Αυτές οι αλλαγές θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε υψηλότερο ποσοστό διπλασιασμού σε ιστολογικά φυσιολογικά κύτταρα του παχέος εντέρου το οποίο μπορεί να εντοπισθεί στην κυτταρομετρική ανάλυση. Αυτή η υπόθεση παρέχει μια πιθανή συσχέτιση του τοπίου της γονιδιακής μετάλλαξης και του μοριακού προφίλ του ιστού του παχέος εντέρου με τις παραμέτρους της iFC προκειμένου να εντοπίζονται οι ασθενείς με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής νωρίς μετά ή κατά τη διάρκεια της επέμβασης. Η κλινική σημασία των ευρημάτων αυτών πρέπει να διερευνηθεί στη μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών. Για την ενίσχυση των προαναφερθέντων, η παθολογοανατομική εξέταση του δείγματος του εντέρου σε ένα από τα «μολυσμένα» δείγματα, αποκάλυψε χαμηλή δυσπλασία σε τυχαίο φυσιολογικό βλεννογόνο μαζί με δύο σύγχρονους πολύποδες (ένας με υψηλόβαθμη δυσπλασία).

Ο υπολογισμός του DNA index χρησιμοποιείται επί του παρόντος για την ανίχνευση της ανευπλοειδίας. Η ανευπλοειδία, αποτέλεσμα γονιδιωματικής αστάθειας, χαρακτηριστικό του καρκίνου, είναι η παρουσία μη φυσιολογικού αριθμού χρωμοσωμάτων μέσα σε ένα κύτταρο. (119,160) Στον CRC, η ανευπλοειδία συχνά προκύπτει από βλάβες στο μιτωτικό σημείο ελέγχου, που οδηγεί σε διαταραχές στη χρωμοσωμική διάσπαση. (16) Αυτή η γονιδιωματική αστάθεια προάγει την ετερογένεια του όγκου, επιτρέποντας την επιλογή πιο επιθετικών κλώνων καρκινικών κυττάρων. (17) Η ανευπλοειδία έχει συσχετιστεί με αυξημένο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, αποφυγή απόπτωσης και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό. (17, 119) Η μελέτη αυτή παρατήρησε 51% επίπτωση ανευπλοειδίας σε ασθενείς με CRC, που έρχεται σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. (146,147) Παρά την επίπτωσή της, η προγνωστική σημασία της ανευπλοειδίας στον ορθοκολικό καρκίνο παραμένει αμφιλεγόμενη και επί του παρόντος δεν είναι ευρέως αποδεκτή ως προγνωστικός βιοδείκτης. (16,17,142-147,160) Οι Laubert et al., στη μετανάλυσή τους, έδειξαν ότι υπάρχει μια τάση προς ανευπλοειδία στα μεγαλύτερα στάδια του CRC, αλλά μόνο στις μισές από τις μελέτες που

αναλύθηκαν είχε σημαντικό προγνωστικό αντίκτυπο για τη συνολική, σχετιζόμενη με τη νόσο επιβίωση (OS) και την επιβίωση χωρίς υποτροπές (DFS).(146) Στη στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με διπλοειδείς όγκους είχαν μεγαλύτερο OS και DFS, κάτι που συμφωνεί με τη σχετική βιβλιογραφία, αν και δεν είχε στατιστική σημαντικότητα. (141,143) Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της ανευπλοειδίας ως βιοδείκτη και υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

Επιπλέον, ο DNA index εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το TRG και τους βλεννώδεις όγκους. Οι υπερπλοειδείς όγκοι σχετίζονταν με κακή ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία και απουσία βλεννωδών κυττάρων σε σύγκριση με τους διπλοειδείς. Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι των όγκων που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου του σταδίου, δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τον DNA Index.

Ο Tumor Index, ένα μέτρο του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων, χρησιμεύει ως μέθοδος ποσοτικοποίησης των κρίσιμων χαρακτηριστικών του καρκίνου. (160) Αυτός ο δείκτης αντανakλά τον ρυθμό με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται και επεκτείνονται, παρέχοντας πληροφορίες για τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου. Ένας υψηλός TI είναι συχνά ενδεικτικός ενός πιο επιθετικού φαινοτύπου καρκίνου, που χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη και υψηλότερη πιθανότητα μετάστασης. (27,127) Με την ποσοτικοποίηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων, ο TI προσφέρει πολύτιμες προγνωστικές πληροφορίες που θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν τις θεραπευτικές αποφάσεις και να συμβάλλουν στην εξατομίκευσή τους. Στην παρούσα μελέτη, ο Tumor Index συσχετίστηκε σημαντικά με το OS, το DFS και με τη χορήγηση και ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία. Στην παρούσα ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε η διάμεση τιμή TI του πληθυσμού της μελέτης ως τιμή αποκοπής (cut off value) ώστε να αποφευχθεί τυχόν εισαγόμενη μεροληψία επιλογής με βάση τα κλινικά δεδομένα με σκοπό η κατηγοριοποίηση των ασθενών να βασίζεται αποκλειστικά σε δεδομένα κυτταρομετρίας ροής, ανεξάρτητα από το στάδιο του όγκου και τη βιολογία της νόσου. Κατ' αυτό τον τρόπο, με βάση τη διάμεση τιμή, οι δύο ομάδες αποτελούνταν από ίσο αριθμό 53 ασθενών με χαμηλό και υψηλό TI.

Διάφοροι παράγοντες, κλινικοί, απεικονιστικοί και μοριακοί, έχουν μελετηθεί σχετικά με την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία, κυρίως σε όγκους του ορθού. Η ικανότητα πρόβλεψης του TRG είναι πολύ σημαντική για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και την εξατομίκευσή της ανά ασθενή. (161) Από την αναζήτηση στη διεθνή βιβλιογραφία, δεν

υπάρχει αντίστοιχη μελέτη που να συσχετίζει το ρόλο του DNA Index και του Tumor Index με το βαθμό ανταπόκρισης στην νεοεπικουρική θεραπεία (TRG) και, επιπλέον, τον προγνωστικό ρόλο του TI στην επιβίωση ασθενών με CRC. Αν οι συσχετισμοί αυτοί επιβεβαιωθούν περαιτέρω, η FC μπορεί να αναδειχθεί ως εργαλείο πρόβλεψης της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας κατά τη χειρουργική παρέμβαση, επιτρέποντας τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών στρατηγικών.

Το CD26/DPP4 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε πολλά είδη ιστών και κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Το CD26 μπορεί να λειτουργήσει ως καταστολέας ή ενεργοποιητής ογκογονιδίων ανάλογα με το μικροπεριβάλλον του όγκου. (81) Σε ορισμένες μελέτες η έκφραση του CD26 συσχετίστηκε θετικά με το στάδιο του όγκου CRC, τον βαθμό διαφοροποίησης και την ανάπτυξη μετάστασης και διερευνήθηκε ο ρόλος του ως προγνωστικού παράγοντα κακής έκβασης μετά από θεραπευτική εκτομή. (79,81) Σε μια άλλη σειρά μελετών παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με CRC και σακχαρώδη διαβήτη που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς DPP4 εμφάνισαν σημαντικά καλύτερη 5ετή επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) από αυτούς που δεν λάμβαναν αγωγή και σε σύγκριση με τους αντίστοιχους που έλαβαν μετφορμίνη. (86-88,162) Αυτά τα δεδομένα ενισχύουν το ρόλο του CD26 στον CRC ως νέου προγνωστικού βιοδείκτη χρήσιμου στην εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθηκε η έκφραση του CD26 σε 45 ασθενείς. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες, δεν επιβεβαιώσαμε καμία θετική συσχέτιση της έκφρασης του CD26 με προχωρημένο στάδιο CRC, διαφοροποίηση όγκου, μετάσταση ή πιθανότητα υποτροπής και επιβίωσης. Αξιοσημείωτα, υπήρξε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με το στάδιο και τη διαφοροποίηση του CRC ($p: 0,05$). Το μικρό μέγεθος δείγματος (45 ασθενείς) μπορεί να έπαιξε σημαντικό ρόλο στα παρουσιαζόμενα αποτελέσματα, αν και υπήρχε καλή αντιπροσώπευση κάθε σταδίου CRC σε αυτήν την κοόρτη.

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της κυτταρομετρίας ροής (FC) στην κλινική διαχείριση του CRC είναι η ικανότητά της να παρέχει γρήγορα και αξιόπιστα διεγχειρητικά αποτελέσματα. Η iFC επιτρέπει την άμεση ανάλυση των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του DNA index και της ανευπλοειδίας, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη θεραπευτική στρατηγική διεγχειρητικά. Επιπλέον, τα γρήγορα διεγχειρητικά αποτελέσματα μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό ασθενών με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής, διευκολύνοντας έτσι πιο επιθετικές και στοχευμένες μετεγχειρητικές παρεμβάσεις. Η δυνατότητα της κυτταρομετρίας ροής να παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες

για τη βιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου, σε συνδυασμό με την ακρίβεια στη διάγνωση και την πρόγνωση, ανοίγει νέους ορίζοντες στην εξατομικευμένη ιατρική. Η εφαρμογή της σε μεγαλύτερες, πολυκεντρικές μελέτες θα μπορούσε να ενισχύσει την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Επιπλέον, η ενσωμάτωσή της σε πρωτόκολλα κλινικής πρακτικής θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τη στρατηγική αντιμετώπισης των ασθενών, παρέχοντας προσαρμοσμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με βάση τα ευρήματα της iFC.

Τέλος, οι μελέτες για την αξιολόγηση της μακροχρόνιας επιβίωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών που διαγνώστηκαν και αντιμετωπίστηκαν με τα δεδομένα της iFC θα μπορούσαν να παράσχουν πολύτιμα δεδομένα για τη συνολική αξία της στην ογκολογική φροντίδα. Παράλληλα, η συνεργασία με άλλες διαγνωστικές μεθόδους, όπως η μοριακή απεικόνιση και η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την αποτελεσματικότητα των προγνωστικών δεικτών που παρέχει η iFC. Η διεπιστημονική προσέγγιση της έρευνας αυτής, που συνδυάζει την κλινική ιατρική, την ογκολογία και τη βιολογία του καρκίνου, την καθιστά ιδιαίτερα σημαντική, ενώ η δυνατότητα άμεσης κλινικής εφαρμογής των ευρημάτων της, προσφέρει ελπίδα για βελτίωση της φροντίδας των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζεται τη η εφαρμογή της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής ως διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο στη μελέτη του ορθοκολικού καρκίνου. Έχοντας ήδη καθιερωμένο ρόλο στη χειρουργική αφαίρεση άλλων κακοηθειών, η διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής εισάγεται ως ακριβής διαγνωστική μέθοδος στη μελέτη του ορθοκολικού καρκίνου με υψηλή ακρίβεια (91,1%) στην αναγνώριση καρκινικών κυττάρων ακόμη και σε πρώιμους όγκους. Η ακρίβεια της μεθόδου μειώνεται σε όγκους του ορθού (85%) πράγμα που πιθανά οφείλεται στην ανάγκη τροποποίησης της μεθόδου δειγματοληψίας στην περιπτώσεις χορήγησης νεοεπικουρικής θεραπείας. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν την iFC ένα πολύτιμο εργαλείο για την διεγχειρητική εκτίμηση των ορίων εκτομής, ιδιαίτερα στους όγκους του κατώτερου ορθού όπου ο χαρακτηρισμός τους αποκτά όλο και μεγαλύτερη σημασία προκειμένου να εφαρμοστούν εγχειρητικές τεχνικές για διατήρηση του πρωκτού χωρίς ωστόσο να υπονομεύεται η ογκολογική επάρκεια της επέμβασης.

Η ποσοτικοποίηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των όγκων μέσω του Tumor Index και η συσχέτισή του με τις παραμέτρους επιβίωσης προσέφερε ένα επιπλέον προγνωστικό δείκτη στη μελέτη του ορθοκολικού καρκίνου εφαρμόσιμου διεγχειρητικά ή άμεσα μετεγχειρητικά. Συγκεκριμένα, στη μελέτη μας οι ασθενείς με $TI < 20\%$ είχαν εμφανώς καλύτερη 5-ετή επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με όγκους με $TI \geq 20\%$ (82% vs 61% για την OS και 78% vs 55% για DFS).

Η εκτίμηση της πλοειδίας του όγκου μέσω του DNA Index δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση του δείκτη με το στάδιο της νόσου τονίζοντας την πολυπλοκότητα των γεγονότων που οδηγούν στην ογκογένεση και πρόοδο της νόσου. Η συσχέτιση ωστόσο του DNA index με την ανταπόκριση στην νεοεπικουρική θεραπεία ήταν μια σημαντική παρατήρηση που δείχνει πως η χρωμοσωμική αστάθεια μπορεί να επηρεάσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα στον ορθοκολικό καρκίνο.

Επιπλέον, σημαντικές συσχετίσεις φάνηκαν μεταξύ του TI και της χορήγησης ($p: 0.05$) όπως και της ανταπόκρισης ($p: 0.01$) στη νεοεπικουρική θεραπεία. Οι ασθενείς που έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία και αυτοί που είχαν καλύτερη ανταπόκριση εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές TI. Τα αποτελέσματά αυτά επισημαίνουν τη δυνατότητα της iFC ως πολύτιμου εργαλείου για την πρόγνωση και τον σχεδιασμό θεραπείας για ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο.

Η δυνατότητες της iFC δεν περιορίζονται στον χαρακτηρισμό της πλοειδίας και του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των όγκων αλλά επεκτείνονται και στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιφανειακών δεικτών. Στη δική μας σειρά εκτιμήθηκε η έκφραση του CD26 ενός δείκτη που έχει μελετηθεί ως προς την προγνωστική και θεραπευτική του αξία στον ορθοκολικό καρκίνο. Πιθανά λόγω του μικρού δείγματος των ασθενών, οι συσχετίσεις της έκφρασης του CD26 στην παρούσα μελέτη έδειξε αντικρουόμενα αποτελέσματα συγκριτικά με προηγούμενες δημοσιεύσεις.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η iFC είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στη χειρουργική του ορθοκολικού καρκίνου. Προσφέροντας ταχεία και ακριβή αξιολόγηση των ορίων εκτομής και παρέχοντας σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες, η iFC θα μπορούσε να συμβάλει σε πιο εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις και δυνητικά βελτιωμένα αποτελέσματα για τους ασθενείς.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη επικύρωση των αποτελεσμάτων και την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης κλινικής εφαρμογής

τους. Οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να στοχεύουν στη διεξαγωγή πολυκεντρικών δοκιμών, στη βελτιστοποίηση τεχνικών δειγματοληψίας, στην συσχέτιση των δεδομένων της iFC με άλλους μοριακούς δείκτες και στην αξιολόγηση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητάς στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή παρέχει μια ισχυρή βάση για την περαιτέρω ανάπτυξη και εφαρμογή της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής στη χειρουργική του ορθοκολικού καρκίνου. Η τεχνική δείχνει πολλά υποσχόμενη για τη βελτίωση της χειρουργικής ακρίβειας, καθορισμό της πρόγνωσης και την καθοδήγηση των θεραπευτικών αποφάσεων. Καθώς προχωράμε προς μια εποχή ολοένα και πιο εξατομικευμένης φροντίδας για τον καρκίνο, εργαλεία όπως η iFC που μπορούν να παρέχουν γρήγορες, λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία του όγκου τη στιγμή της θεραπείας, μπορεί να διαδραματίσουν κρίσιμο ρόλο στη βελτιστοποίηση των στρατηγικών αντιμετώπισης και στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο ορθοκολικός καρκίνος εμφανίζει ολοένα και μεγαλύτερη επίπτωση και θνητότητα τις τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που υποδεικνύει την αναγκαιότητα ανάπτυξης νέων προγνωστικών δεικτών για την πρόβλεψη της επιτυχίας της θεραπείας με σκοπό τη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αναλυτική τεχνική για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του κυτταρικού φαινοτύπου. Η διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής (iFC) χρησιμοποιεί την κυτταρομετρία ροής για ανάλυση του κυτταρικού DNA και των φάσεων του κυτταρικού κύκλου από ιστούς που λαμβάνονται διεγχειρητικά, με σκοπό την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων και την αξιολόγηση των ορίων εκτομής. Διάφοροι τύποι καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκράνιων κακοηθειών, όγκων της κεφαλής και τραχήλου, του μαστού και άλλων, έχουν αξιολογηθεί με την iFC. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε ένα διεγχειρητικό πρωτόκολλο κυτταρομετρίας ροής για την ανίχνευση κυττάρων ορθοκολικού καρκίνου και την αξιολόγηση των ορίων εκτομής. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η συσχέτιση των κυτταρομετρικών παραμέτρων με την επιβίωση των ασθενών.

Υλικά και μέθοδοι: Αυτή η προοπτική μελέτη περιλαμβάνει 106 ασθενείς με χειρουργικά εξαιρεσιμο ορθοκολικό καρκίνο. Διεγχειρητικά λαμβάνονταν από το εντερικό παρασκεύασμα δείγμα φρέσκου φυσιολογικού και καρκινικού ιστού, το οποίο άμεσα μελετούνταν τυφλά με κυτταρομετρία ροής, με σκοπό αρχικά τον καθορισμό του καρκινικού δείγματος και στη συνέχεια τον προσδιορισμό των επιμέρους κυτταρομετρικών παραμέτρων (DNA & Tumor Index). Έγινε καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών, των ιστολογικών δεδομένων και των κυτταρομετρικών παραμέτρων. Επιπλέον, σε μια υποομάδα 45 ασθενών, υπολογίστηκε με iFC, η έκφραση του CD26 στα καρκινικά δείγματα. Τα δεδομένα αυτά συσχετίστηκαν με τα χαρακτηριστικά των όγκων, τα ιστολογικά ευρήματα, την ανταπόκριση στη θεραπεία, την μετάσταση/υποτροπή και, τέλος, με την επιβίωση των ασθενών για τον εντοπισμό πιθανών νέων βιοδεικτών.

Αποτελέσματα: Η iFC αποδείχτηκε ότι, με τιμή αποκοπής (cut-off value) 10,5% για τον TI, μπορεί να διακρίνει με ακρίβεια (~91%) την παρουσία καρκινικών κυττάρων (82.2%

ευαισθησία και 99.9% ειδικότητα) στο σύνολο των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. Στον υποπληθυσμό των ασθενών με καρκίνο του ορθού η ακρίβεια της μεθόδου μειώνεται στο 88% σε αυτούς που δεν έλαβαν νεοεπικουρική θεραπεία και στο 79% για αυτούς που έλαβαν. Ο δείκτης Tumor index (TI) συσχετίστηκε θετικά με το βαθμό ανταπόκρισης στη νεοεπικουρική θεραπεία. Οι ασθενείς με υψηλό TI έχουν στατιστικά σημαντική μείωση της επιβίωσης.

Η συνολική επιβίωση (OS) και η επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) στην ομάδα μελέτης μας ήταν 76% και 72%, αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια της 7ετούς περιόδου παρακολούθησης. Οι διπλοειδείς όγκοι είχαν καλύτερη διάμεση επιβίωση από τους ανευπλοειδείς. Ο DNA index είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον Tumor index και με την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία. Ομοίως, ο Tumor index συσχετίστηκε σημαντικά με την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία. Οι ασθενείς με υψηλότερο Tumor index είχαν χειρότερα ποσοστά επιβίωσης. Τα επίπεδα CD26 δεν συσχετίστηκαν με καμία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν και παραδόξως, συσχετίστηκαν αρνητικά με το στάδιο του όγκου και το βαθμό διαφοροποίησης.

Συμπέρασμα: Η iFC είναι μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος κυτταρικής ανάλυσης. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι όσον αφορά τον ορθοκολικό καρκίνο, η iFC είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων και την αξιολόγηση των ορίων εκτομής, καθιστώντας την ένα χρήσιμο εργαλείο στις επεμβάσεις όπου τα όρια εκτομής έχουν σημασία. Επιπλέον, οι δείκτες DNA index και Tumor Index φαίνεται να έχουν δυνητική εφαρμογή ως προγνωστικοί βιοδείκτες της ανταπόκρισης του όγκου στη νεοεπικουρική θεραπεία και την επιβίωση ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο.

THE ROLE OF FLOW CYTOMETRY IN THE MANAGEMENT OF COLORECTAL CANCER AND THE DEVELOPMENT OF PROGNOSTIC AND PREDICTIVE BIOMARKERS

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) is still accompanied by significant mortality, which poses the necessity of novel markers to predict treatment success and patient survival. Flow Cytometry is an analytical technique for the precise quantification of cellular phenotype. Intraoperative Flow Cytometry (iFC) utilizes flow cytometry during surgery for tissue DNA content/ploidy and cell cycle distribution analysis to identify cancer cells and to evaluate the tumor margins. Various types of cancers, including intracranial, head and neck, breast and liver malignancies have been evaluated with iFC. In the current study, we present an intraoperative Flow Cytometry protocol for colorectal cancer cell detection and potential resection margin evaluation. In addition, we evaluated the prognostic and survival impact of flow cytometry (FC) in CRC patients.

Materials and methods: This prospective study includes 106 colorectal cancer patients in which samples from cancer and normal colon epithelium were collected intraoperatively and comparatively assessed with iFC. Patients' demographics, tumor data and cytometry parameters were assessed. DNA and tumor index were calculated. In a subgroup of 46 patients, the CD26 expression on tumor cells was estimated. These parameters were compared with patients' tumor characteristics as stage, histology data, responsiveness to treatment, metastasis/recurrence, and, finally, patients' survival to identify possible new biomarkers.

Results: We have demonstrated that a cut-off value of 10.5% for tumor-index (fraction of cells in S and G2/M cell cycle phases) predicts with ~91% accuracy (82.2% sensitivity and 99.9% specificity) the presence of cancer cells. Evaluation of tumor margins by iFC in the subpopulation of rectal cancer patients with or without neoadjuvant therapy, revealed an accuracy of 79% and 88%, respectively. The overall survival and the disease-specific survival in our study group were 76% and 72%, respectively, during the 7-year follow-up period. Diploid tumors had better median survival than the aneuploid ones. The DNA index had significant correlation to the tumor index and response to neoadjuvant treatment. Similarly, the tumor

index was also significantly related to the response to neoadjuvant treatment. Patients with a higher tumor index had worst survival rates. Surprisingly, CD26 levels were not associated with any of the parameters examined and were negatively related to tumor stage and differentiation.

Conclusion: FC is a rapid and reliable method of cell analysis. In CRC, it has been used for prognostic and diagnostic purposes. Our data supports that regarding colorectal cancer, iFC is a useful adjunct method for tumor cell identification and probably margin evaluation, which could be utilized in rectal cancer treatment in the era of organ sparing procedures. In this study, we have also shown that DNA and tumor index could become predictive biomarkers of tumor response to neoadjuvant treatment and survival of resectable CRC patients.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

CRC	Colorectal Cancer	Ορθοκολικός καρκίνος
MSI	Microsatellite Instability	Μικροδορυφορική αστάθεια
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	
VEGF	Vascular endothelial growth factor	
CIMP	CpG island methylator phenotype	
DFS	Disease Free Survival	Διάστημα ελεύθερο νόσου
OS	Overall Survival	Συνολική επιβίωση
AJCC-UICC	American Joint Committee on Cancer International Union Against Cancer	
LVI	Lymphovascular Invasion	Λεμφαγγειακή διήθηση
PNI	Perineural Invasion	Περινευρική διήθηση
LYN	Lymph Node Yield	
LNR	Lymph Node Ratio	
CRM	Circumferential Resection Margin	Κυκλοτερές (ακτινωτό) όριο εκτομής
ctDNA	Circulating tumor DNA	
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes	
CSS	Cancer Specific Survival	
CSCs	Cancer Stem Cells	Καρκινικά Βλαστοκύτταρα
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase	
CRT	Chemo-Radio Therapy	Χημειο-Ακτινοθεραπεία
SCPRT	Short Course Preoperative Radio Therapy	
TNT	Total Neoadjuvant Therapy	
FC	Flow Cytometry	Κυτταρομετρία Ροής
iFC	Intraoperative Flow Cytometry	Διεγχειρητική Κυτταρομετρία ροής
TI	Tumor Index	
DI	DNA Index	
CTCs	Circulating Tumor Cells	
CRD	Cancer Related Death	

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
2. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatis O, Are C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol*. 2017 Apr;115(5):619–30.
3. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. Vol. 14, *Przegląd Gastroenterologiczny*. Termedia Publishing House Ltd.; 2019. p. 89–103.
4. Steliarova-Foucher E, O’Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, Rosso S, Forman D, et al. The European Cancer Observatory: A new data resource. *Eur J Cancer*. 2015 Jun;51(9):1131–43.
5. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jun;18(6):1688–94.
6. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*. 2015 May;21(17):5167–75.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7–30.
8. Rosa M De, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics , diagnosis and management of colorectal cancer (Review). 2015;1087–96.
9. Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining Risk of Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease : An Updated Meta-analysis of Population-based Cohort Studies. 2013;19(4):789–99.
10. Song M, Chan AT. Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):275–289. doi:10.1016/j.cgh.2018.07.012
11. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010 Nov;376(9754):1741–50.
12. Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, Ntzani EE, Ioannidis JPA. Type 2 diabetes and cancer : umbrella review of meta-analyses of observational studies. 2015;7607(January):1–11.
13. Pang Y, Kartsonaki C, Guo Y, Chen Y, Yang L, Bian Z, et al. Diabetes, plasma glucose and incidence of colorectal cancer in Chinese adults: a prospective study of 0.5 million people. *J Epidemiol Community Health* (1978). 2018 Oct;72(10):919–25.
14. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10207):1467–80. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
15. Al-sohaily, Sam S, Biankin A, Leong R, Kohonen-corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. 2012;27:1423–31
16. Malki A, Elruz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Moustafa A eddin al. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis : Recent Insights and Advancements. 2021;
17. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer : a review. 2018;110–6.
18. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jun;8(6):415–24.

19. Fearon EF, Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. 1990;61:759–67.
20. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-2460. doi:10.1056/NEJMra0804588
21. Church J. Molecular genetics of colorectal cancer. *Semin Colon Rectal Surg*. 2016;27(4).
22. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ. Genetic pathways , prevention , and treatment of sporadic colorectal cancer ABSTRACT : 2014;1(6).
23. Nojadeh JN, Sharif SB, Akhinia E. Review article:MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER. 2018;159–68.
24. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 2007 Jan;56(1):140-8
25. Chen K, Collins G, Wang H, Wei J, Toh T. Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. 2021;5356–83.
26. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2018;25(6):1454–5. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6462-1>
27. Bali C, Georvasili VK. Intraoperative Flow Cytometry in Colorectal Cancer. In: Alexiou G, Vartholomatos G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Cham; 2023. p. 293–307. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>
28. Huang A, Yang Y, Shi J, Li Y, Xu J, Cheng Y, et al. Mucinous adenocarcinoma: A unique clinicopathological subtype in colorectal cancer. 2021;13(12):1567–84.
29. Luo C, Cen S, Ding G, Wu W. Mucinous colorectal adenocarcinoma : clinical pathology and treatment options. 2019;1–13.
30. Feng H, Lyu Z, Zheng J, et al. Association of tumor size with prognosis in colon cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database analysis. *Surgery*. 2021;169(5):1116-1123. doi:10.1016/j.surg.2020.11.011
31. Derwinger K, Kodeda K, Bexe-Lindskog E, Taflin H. Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2010;49(1):57-62. doi:10.3109/02841860903334411
32. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol*. 2015;30(9):1059-1067. doi:10.14670/HH-11-633
33. (CAP) CoAP. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. 2020. Available online: <https://documents.cap.org/protocols/cp-gilower-colonrectum-resection-20-4100.pdf> (accessed on 15 August 2021)
34. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-188. doi:10.1111/his.13975
35. Yuan H, Dong Q, Zheng B, Hu X, Xu JB, Tu S. Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(28):46565-46579. doi:10.18632/oncotarget.15425

36. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(12):1816-1821. doi:10.1097/PAS.0b013e3181816083
37. Al-Sukhni, E.; Attwood, K.; Gabriel, E.M.; LeVea, C.M.; Kanehira, K.; Nurkin, S.J. Lymphovascular and perineural invasion are associated with poor prognostic features and outcomes in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Int. J. Surg.* 2017, 37, 42–49
38. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer.* 2009;115(15):3379-3391. doi:10.1002/cncr.24396
39. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice?. *Hum Pathol.* 2016;47(1):4-19. doi:10.1016/j.humpath.2015.08.007
40. Dawson H, Galuppini F, Träger P, et al. Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference 2016 recommendations on tumor budding in stage I-IV colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2019;85:145-151. doi:10.1016/j.humpath.2018.10.023
41. Betge J, Harbaum L, Pollheimer MJ, et al. Lymph node retrieval in colorectal cancer: determining factors and prognostic significance. *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(7):991-998. doi:10.1007/s00384-017-2778-8
42. Foo CC, Ku C, Wei R, et al. How does lymph node yield affect survival outcomes of stage I and II colon cancer?. *World J Surg Oncol.* 2020;18(1):22. Published 2020 Jan 29. doi:10.1186/s12957-020-1802-6
43. Lee CHA, Wilkins S, Oliva K, Staples MP, McMurrick PJ. Role of lymph node yield and lymph node ratio in predicting outcomes in non-metastatic colorectal cancer. *BJS Open.* 2018;3(1):95-105. Published 2018 Aug 8. doi:10.1002/bjs5.96
44. Mechera R, Schuster T, Rosenberg R, Speich B. Lymph node yield after rectal resection in patients treated with neoadjuvant radiation for rectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2017;72:84-94. doi:10.1016/j.ejca.2016.10.031
45. Scott KW, Grace RH. Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma before and after fat clearance. *Br J Surg.* 1989;76(11):1165-1167. doi:10.1002/bjs.1800761118
46. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;31(10):1291-1305. doi:10.1016/j.annonc.2020.06.022
47. Bromham N, Kallioinen M, Hoskin P, Davies RJ; Guideline Committee. Colorectal cancer: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2020;368:m461. Published 2020 Mar 2. doi:10.1136/bmj.m461
48. Ceelen W, Van Nieuwenhove Y, Pattyn P. Prognostic value of the lymph node ratio in stage III colorectal cancer: a systematic review. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(11):2847-2855. doi:10.1245/s10434-010-1158-1
49. Pyo JS, Kim JH, Lee SY, Baek TH, Kang DW. Metastatic Lymph Node Ratio (mLNR) is a Useful Parameter in the Prognosis of Colorectal Cancer; A Meta-Analysis for the Prognostic Role of mLNR. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(10):673. Published 2019 Oct 4. doi:10.3390/medicina55100673
50. Jiang C, Wang F, Guo G, et al. Metastatic lymph node ratio as a prognostic indicator in patients with stage IV colon cancer undergoing resection. *J Cancer.* 2019;10(11):2534-2540. Published 2019 Jun

2. doi:10.7150/jca.29216

51. Peschard F, Benoist S, Julié C, et al. The ratio of metastatic to examined lymph nodes is a powerful independent prognostic factor in rectal cancer. *Ann Surg*. 2008;248(6):1067-1073. doi:10.1097/SLA.0b013e31818842ec

52. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(3):329-359. Published 2021 Mar 2. doi:10.6004/jnccn.2021.0012

53. Detering R, Rutgers MLW, Bemelman WA, Hompes R, Tanis PJ. Prognostic importance of circumferential resection margin in the era of evolving surgical and multidisciplinary treatment of rectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Surgery*. 2021;170(2):412-431. doi:10.1016/j.surg.2021.02.029

54. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Association of Radial Margin Positivity With Colon Cancer. *JAMA Surg*. 2015;150(9):890-898. doi:10.1001/jamasurg.2015.1525

55. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer?. *J Clin Oncol*. 2008;26(2):303-312. doi:10.1200/JCO.2007.12.7027

56. Toh JWT, Phan K, Reza F, Chapuis P, Spring KJ. Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2021;36(8):1573-1596. doi:10.1007/s00384-021-03874-1

57. Clarke CN, Kopetz ES. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(6):660-667. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.077

58. Phipps AI, Alwers E, Harrison T, et al. Association Between Molecular Subtypes of Colorectal Tumors and Patient Survival, Based on Pooled Analysis of 7 International Studies. *Gastroenterology*. 2020;158(8):2158-2168.e4. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.029

59. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386-1422. doi:10.1093/annonc/mdw235

60. Baum M, Fallowfield L, Farewell V, Macbeth F, Treasure T. NICE Guidelines: management of colorectal cancer metastases. *Br J Surg*. 2020;107(9):e357. doi:10.1002/bjs.11789

61. Cefali M, Epistolio S, Palmarocchi MC, Frattini M, De Dosso S. Research progress on KRAS mutations in colorectal cancer. *J Cancer Metastasis Treat* 2021;7:26. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2021.61>

62. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, et al. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(10):12153-12168. Published 2012 Sep 25. doi:10.3390/ijms131012153

63. Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: Updates and challenges. Vol. 12, Cancers. MDPI AG; 2020.

64. Assis JV De, Coutinho LA, Oyeyemi IT, Timothy O. Diagnostic and therapeutic biomarkers in colorectal cancer : a review. 2022;12(2):661–80.

65. Galon J, Pagès F, Marincola FM, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*. 2012;10:205. Published 2012 Oct 3. doi:10.1186/1479-5876-10-205
66. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;391(10135):2128-2139. doi:10.1016/S0140-6736(18)30789-X
67. Villar Portela S, Vázquez Martín C, Muinelo Romay L, Cuevas E, Gil Martín E, Fernández Briera A. sLea and sLex expression in colorectal cancer: implications for tumourigenesis and disease prognosis. *Histol Histopathol*. 2011;26(10):1305–16.
68. Jung T, Jeong J, Park B. The Expression of CD10 and CD15 Is Progressively Increased during Colorectal Cancer Development. 2013;340–7.
69. Giordano G, Febbraro A, Tomaselli E, Sarnicola ML, Parcesepe P, Parente D, et al. Cancer-related CD15/FUT4 overexpression decreases benefit to agents targeting EGFR or VEGF acting as a novel RAF-MEK-ERK kinase downstream regulator in metastatic colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res [Internet]*. 2015;34(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-015-0225-7>
70. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*. 2004;35(3):255-262. doi:10.1023/b:hijo.0000032357.16261.c5
71. Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, Gansukh T, Bellach J, Altevogt P, et al. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6574–81.
72. Choi D, Lee HW, Hur KY, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009;15(18):2258-2264. doi:10.3748/wjg.15.2258
73. Sagiv E, Memeo L, Karin A, et al. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2006;131(2):630-639. doi:10.1053/j.gastro.2006.04.028
74. Okano M, Konno M, Kano Y, et al. Human colorectal CD24+ cancer stem cells are susceptible to epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*. 2014;45(2):575-580. doi:10.3892/ijo.2014.2462
75. Seo KJ, Kim M, Kim J. Prognostic implications of adhesion molecule expression in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(4):4148-4157. Published 2015 Apr 1.
76. Nersisyan S, Ahlers AK, Lange T, et al. Low expression of CD24 is associated with poor survival in colorectal cancer. *Biochimie*. 2022;192:91-101. doi:10.1016/j.biochi.2021.10.004
77. Dang NH, Morimoto C. CD26: an expanding role in immune regulation and cancer. *Histol Histopathol*. 2002;17(4):1213-1226. doi:10.14670/HH-17.1213
78. Enz N, Vliegen G, De Meester I, Jungraithmayr W. CD26/DPP4 - a potential biomarker and target for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2019;198:135-159. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.02.015
79. Pang R, Law WL, Chu ACY, Poon JT, Lam CSC, Chow AKM, et al. Article A Subpopulation of CD26 + Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity in Human Colorectal Cancer. *Stem Cell [Internet]*. 2010;6(6):603–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.001>
80. Cheung AHK, Iyer DN, Lam CSC, Ng L, Wong SKM, Lee HS, et al. Emergence of CD26+ cancer stem

cells with metastatic properties in colorectal carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).

81. Lam CS-C, Cheung AH-K, Wong SK-M, Wan TM-H, Ng L, Chow AK-M, et al. Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):e98582.
82. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, et al. Prognostic relevance of stromal CD26 expression in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Int J Clin Oncol.* 2016;21(2):350-358. doi:10.1007/s10147-015-0902-8
83. De Chiara L, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal J, et al. CD26-Related Serum Biomarkers: sCD26 Protein, DPP4 Activity, and Anti-CD26 Isotype Levels in a Colorectal Cancer-Screening Context. *Dis Markers.* 2020;2020:4347936. Published 2020 Jan 21. doi:10.1155/2020/4347936
84. De Chiara L, Barcia-Castro L, Gallardo-Gómez M, et al. Evaluation of Blood Soluble CD26 as a Complementary Biomarker for Colorectal Cancer Screening Programs. *Cancers (Basel).* 2022;14(19):4563. Published 2022 Sep 20. doi:10.3390/cancers14194563
85. De Chiara L, Rodríguez-Piñero AM, Cordero OJ, et al. Postoperative serum levels of sCD26 for surveillance in colorectal cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(9):e107470. Published 2014 Sep 11. doi:10.1371/journal.pone.0107470
86. Femia AP, Raimondi L, Maglieri G, Lodovici M, Mannucci E, Caderni G. Long-term treatment with Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, reduces colon carcinogenesis and reactive oxygen species in 1,2-dimethylhydrazine-induced rats. *Int J Cancer.* 2013;133(10):2498-2503. doi:10.1002/ijc.28260
87. Amritha CA, Kumaravelu P, Chellathai DD. Evaluation of Anti Cancer Effects of DPP-4 Inhibitors in Colon Cancer- An Invitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(12):FC14-FC16. doi:10.7860/JCDR/2015/16015.6979
88. Yorifuji N, Inoue T, Iguchi M, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin suppresses mouse colon tumorigenesis in type 2 diabetic mice. *Oncol Rep.* 2016;35(2):676-682. doi:10.3892/or.2015.4429
89. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:708036. doi:10.1155/2012/708036
90. Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, et al. Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4541-4550. doi:10.1074/jbc.M307356200
91. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(24):10158-10163. doi:10.1073/pnas.0703478104
92. Qu J, Jiang Y, Liu H, et al. Prognostic Value of E-cadherin-, CD44-, and MSH2-associated Nomograms in Patients With Stage II and III Colorectal Cancer. *Transl Oncol.* 2017;10(2):121-131. doi:10.1016/j.tranon.2016.12.005
93. Seo KJ, Kim M, Kim J. Prognostic implications of adhesion molecule expression in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(4):4148-4157. Published 2015 Apr 1.
94. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007;445(7123):106-110. doi:10.1038/nature05372
95. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007;445(7123):111-115. doi:10.1038/nature05384

96. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2111-2120. doi:10.1172/JCI34401
97. Wang C, Xie J, Guo J, Manning HC, Gore JC, Guo N. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2012;28(4):1301-1308. doi:10.3892/or.2012.1951
98. Zhou JY, Chen M, Ma L, Wang X, Chen YG, Liu SL. Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*. 2016;7(7):7657-7666. doi:10.18632/oncotarget.7084
99. Abbasian, Mahdi & Mousavi, Elham & Arab, Zahra & Sahebkar, Amirhossein. (2018). The most reliable surface marker for the identification of colorectal cancer stem-like cells: A systematic review and meta-analysis: ABBASIAN et al.. *Journal of Cellular Physiology*. 234. 10.1002/jcp.27619.
100. Galizia G, Gemei M, Del Vecchio L, et al. Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Arch Surg*. 2012;147(1):18-24. doi:10.1001/archsurg.2011.795
101. Choi D, Lee HW, Hur KY, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009;15(18):2258-2264. doi:10.3748/wjg.15.2258
102. Jing F, Kim HJ, Kim CH, Kim YJ, Lee JH, Kim HR. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int J Oncol*. 2015;46(4):1582-1588. doi:10.3892/ijo.2015.2844
103. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004;54(1):8-29. doi:10.3322/canjclin.54.1.8
104. Nordlinger B, Benoist S. Benefits and risks of neoadjuvant therapy for liver metastases. *J Clin Oncol*. 2006;24(31):4954-4955. doi:10.1200/JCO.2006.07.9244
105. Domingo E, Ramamoorthy R, Oukrif D, et al. Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. *J Pathol*. 2013;229(3):441-448. doi:10.1002/path.4139
106. Doherty GM. Current Diagnosis & Treatment Surgery [Internet]. 14th ed. Access Medicine. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015 [cited 2023 Sep 16]. Available from :<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1202§ionid=71514817>
107. E. X, N. G, C. T, P. T, L. V, M. T, et al. Clinical practice guidelines for the surgical management of colon cancer: A consensus statement of the hellenic and cypriot colorectal cancer study group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol* [Internet]. 2016;29(1):3–17. Available from: <http://www.annalsgastro.gr/index.php/annalsgastro/article/download/2360/1658%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18a&NEWS=N&AN=607690440>
108. Xynos E, Tekkis P, Gouvas N, Vini L, Chrysou E, Tzardi M, et al. Clinical practice guidelines for the surgical treatment of rectal cancer: A consensus statement of the hellenic society of medical oncologists (hesmo). *Ann Gastroenterol*. 2016;29(2):103–26.
109. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017 Jul;28:iv22–40.

110. Keller DS, Berho M, Perez RO, Wexner SD, Chand M. The multidisciplinary management of rectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. 2020 Jul 1;17(7):414–29. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41575-020-0275-y>
111. Heald RJ, Husband EM, Ryall RDH. The mesorectum in rectal cancer surgery—the clue to pelvic recurrence? *British Journal of Surgery*. 1982 Oct;69(10):613–6
112. Bordeianou L, Maguire LH, Alavi K, Sudan R, Wise PE, Kaiser AM. Sphincter-Sparing Surgery in Patients with Low-Lying Rectal Cancer: Techniques, Oncologic Outcomes, and Functional Results. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [Internet]. 2014 May 13;18(7):1358–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4057635/>
113. Golshani G, Zhang Y. Advances in immunotherapy for colorectal cancer: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2020;13:1756284820917527. Published 2020 Jun 1. doi:10.1177/1756284820917527
114. Chen HY, Feng LL, Li M, et al. College of American Pathologists Tumor Regression Grading System for Long-Term Outcome in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer. *Oncologist*. 2021;26(5):e780–e793. doi:10.1002/onco.13707
115. Habr-Gama A, Perez RO, Sao Juliao GP, et al. Nonoperative approaches to rectal cancer: a critical evaluation. *Semin Radiat Oncol* 2011;21:234–239.
116. Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis*. 1998;5(1):56–61.
117. Tzanoudaki M, Konsta E. Basic Principles of Flow Cytometry. In: Alexiou G, Vartholomatos G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Cham; 2023. p. 9–31. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>
118. Markopoulos GS. Sample-Data Analysis. In: Alexiou G, Vartholomatos G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Cham; 2023. p. 33–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>
119. Danielsen HE, Pradhan M, Novelli M. Revisiting tumour aneuploidy-the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(5):291–304.
120. Jaafar H. (2006). Intra-operative frozen section consultation: concepts, applications and limitations. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 13(1), 4–12.
121. Novis DA, Zarbo RJ. Interinstitutional comparison of frozen section turnaround time. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121:559
122. Winther C, Graem N. Accuracy of frozen section diagnosis: a retrospective analysis of 4785 cases. *APMIS*. 2011;119(4-5):259–262. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02725.x
123. Khoury W, Abboud W, Hershkovitz D, Duek SD. Frozen section examination may facilitate reconstructive surgery for mid and low rectal cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110(8):997–1001.
124. Vartholomatos G, Alexiou G. Basic Principles. In: Vartholomatos G, Alexiou G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Nature; 2023. p. 49–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>
125. Vartholomatos G, Vartholomatos E. Chapter 5 Sample: Data Analysis. In: Vartholomatos G, Alexiou G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Nature; 2023. p. 57–67. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>

126. Alexiou GA, Vartholomatos E, Goussia A, et al. DNA content is associated with malignancy of intracranial neoplasms. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(9):1784-1787. doi:10.1016/j.clineuro.2013.04.015
127. Alexiou GA, Vartholomatos G, Goussia A, et al. Fast cell cycle analysis for intraoperative characterization of brain tumor margins and malignancy. *J Clin Neurosci.* 2015;22(1):129-132. doi:10.1016/j.jocn.2014.05.029
128. Shioyama, T., Muragaki, Y., Maruyama, T., Komori, T., & Iseki, H. (2013). Intraoperative flow cytometry analysis of glioma tissue for rapid determination of tumor presence and its histopathological grade: clinical article. *Journal of neurosurgery*, 118(6), 1232–1238. <https://doi.org/10.3171/2013.1.JNS12681>
129. Alexiou GA, Vartholomatos G, Kobayashi T, Voulgaris S, Kyritsis AP. The emerging role of intraoperative flow cytometry in intracranial tumor surgery. *Clin Neurol Neurosurg.* 2020;192:105742. doi:10.1016/j.clineuro.2020.105742
130. Saito T, Muragaki Y, Shioyama T, et al. Malignancy Index Using Intraoperative Flow Cytometry is a Valuable Prognostic Factor for Glioblastoma Treated With Radiotherapy and Concomitant Temozolomide. *Neurosurgery.* 2019;84(3):662-672. doi:10.1093/neuros/nyy089
131. Vartholomatos G, Harissis H, Andreou M, et al. Rapid Assessment of Resection Margins During Breast Conserving Surgery Using Intraoperative Flow Cytometry. *Clin Breast Cancer.* 2021;21(5):e602-e610. doi:10.1016/j.clbc.2021.03.002
132. Andreou M, Vartholomatos E, Harissis H, Markopoulos GS, Alexiou GA. Past, Present and Future of Flow Cytometry in Breast Cancer - A Systematic Review. *EJIFCC.* 2019;30(4):423-437. Published 2019 Nov 25.
133. Vartholomatos G, Basiari L, Exarchakos G, et al. Intraoperative flow cytometry for head and neck lesions. Assessment of malignancy and tumour-free resection margins. *Oral Oncol.* 2019;99:104344. doi:10.1016/j.oraloncology.2019.06.025
134. Kastanioudakis I, Basiari L. Intraoperative Flow Cytometry in Head and Neck Malignancies. In: Vartholomatos G, Alexiou G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Nature; 2023. p. 245–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>
135. Markopoulos GS, Glantzounis GK, Goussia AC, et al. Touch Imprint Intraoperative Flow Cytometry as a Complementary Tool for Detailed Assessment of Resection Margins and Tumor Biology in Liver Surgery for Primary and Metastatic Liver Neoplasms. *Methods Protoc.* 2021;4(3):66. Published 2021 Sep 15. doi:10.3390/mps4030066
136. Markopoulos GS, Goussia A, Bali CD, Messinis T, Alexiou GA, Vartholomatos G. Resection Margins Assessment by Intraoperative Flow Cytometry in Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* Published online March 18, 2022. doi:10.1245/s10434-022-11645-7
137. Anastasiadi Z, Mantziou S, Akrivis C, et al. Intraoperative Flow Cytometry for the Characterization of Gynecological Malignancies. *Biology (Basel).* 2022;11(9):1339. Published 2022 Sep 11. doi:10.3390/biology11091339
138. Paliouras A, Markopoulos GS, Tsampalas S, et al. Accurate Characterization of Bladder Cancer Cells with Intraoperative Flow Cytometry. *Cancers (Basel).* 2022;14(21):5440. Published 2022 Nov 4. doi:10.3390/cancers14215440

139. Grabsch H, Kerr D, Quirke P. Is there a case for routine clinical application of ploidy measurements in gastrointestinal tumours? *Histopathology*. 2004;45(4):312–34.
140. Stoian M, Indrei L, Stoian B. Aneuploidia: Marker of malignant colorectal adenomatous polyps. *Clin Res Trials*. 2020;6(3):1–6
141. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, et al. Prognostic Impact of Microsatellite Instability and DNA Ploidy in Human Colon Carcinoma Patients. *Gastroenterology*. 2006;131(3):729–37.
142. Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*. 2008;57(7):941-950. doi:10.1136/gut.2007.135004
143. Araujo SEA, Bernardo WM, Habr-Gama A, Kiss DR, Cecconello I. DNA ploidy status and prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis of published data. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(11):1800–10.
144. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol*. 2013;108 (11):1785–93.
145. Hveem TS, Merok MA, Pretorius ME, Novelli M, Bævre MS, Sjo OH, et al. Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(8):2159–64.
146. Laubert T, Freitag-Wolf S, Linnebacher M, König A, Vollmar B, Habermann JK. Stage-specific frequency and prognostic significance of aneuploidy in patients with sporadic colorectal cancer—a meta-analysis and current overview. *Int J Colorectal Dis*. 2015;30 (8):1015–28.
147. Laubert T, Bente V, Freitag-Wolf S, Voulgaris H, Oberländer M, Schillo K, et al. Aneuploidy and elevated CEA indicate an increased risk for metachronous metastasis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28(6):767–75.
148. Peach G, Kim C, Zacharakis E, Purkayastha S, Ziprin P. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: A systematic review. *Br J Cancer* [Internet]. 2010;102(9):1327–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605651>
149. Hardingham JE, Grover P, Winter M, Hewett PJ, Price TJ, Thierry B. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer—20 years of progress. *Mol Med*. 2015;21(Supplement 1):S25–31.
150. Nanduri LK, Hissa B, Weitz J, Schölch S, Bork U. The prognostic role of circulating tumor cells in colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2019;19(12):1077–88. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1699065>
151. Galizia G, Gemei M, Orditura M, Romano C, Zamboli A, Castellano P, et al. Postoperative Detection of Circulating Tumor Cells Predicts Tumor Recurrence in Colorectal Cancer Patients. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(10):1809–18.
152. Muşină AM, Zlei M, Mentel M, et al. Evaluation of circulating tumor cells in colorectal cancer using flow cytometry. *J Int Med Res*. 2021;49(9):300060520980215. doi:10.1177/0300060520980215
153. Lopresti A, Malergue F, Bertucci F, Liberatoscioli ML, Garnier S, DaCosta Q, et al. Sensitive and easy screening for circulating tumor cells by flow cytometry. *JCI Insight*. 2019;4(14):1–14.

154. Tarhini Z, Manceur K, Magne J, Mathonnet M, Jost J, Christou N. The effect of metformin on the survival of colorectal cancer patients with type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2022;12(1):12374. Published 2022 Jul 20. doi:10.1038/s41598-022-16677-3
155. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):478-487. doi:10.1038/nrm2718
156. R. Wolley, K. Schreiber, L. Koss, M. Karas, A. Sherman, DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior, *J. Natl. Cancer Inst.* 69 (1) (1982) 15–22.
157. D.P. Slaughter, H.W. Southwick, W. Smejkal, Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin, *Cancer* 6 (5) (1953) 963–968.
158. H. Lee-Six, S. Olafsson, P. Ellis, R.J. Osborne, M.A. Sanders, L. Moore, et al., The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells, *Nature* 574 (7779) (2019) 532–537.
159. D. Rebello, E. Rebello, M. Custodio, X. Xu, S. Gandhi, H.K. Roy, Field carcinogenesis for risk stratification of colorectal cancer, *Adv. Cancer Res.* 151 (2021) 305–344.
160. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, 144, 646–674.
161. Li, M.; Xiao, Q.; Venkatachalam, N.; Hofheinz, R.D.; Veldwijk, M.R.; Herskind, C.; Ebert, M.P.; Zhan, T. Predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: From biomarkers to tumor models. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2022**, 14, 1–23.
162. Ng, L.; Foo, D.C.C.; Wong, C.K.H.; Man, A.T.K.; Lo, O.S.H.; Law, W.L. Repurposing dpp-4 inhibitors for colorectal cancer: A retrospective and single center study. *Cancers* **2021**, 13, 3588.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Georvasili VK, Markopoulos GS, Batistatou A, Mitsis M, Messinis T, Lianos GD, Alexiou G, Vartholomatos G, Bali CD. Detection of cancer cells and tumor margins during colorectal cancer surgery by intraoperative flow cytometry. *Int J Surg*. 2022 Aug;104:106717. doi: 10.1016/j.ijso.2022.106717. Epub 2022 Jun 17. PMID: 35724804.
- Georvasili V, Markopoulos G, Lampri E, Lianos G, Vartholomatos G, Mitsis M, Bali C. Could Flow Cytometry Provide New Prognostic Markers in Colorectal Cancer? *J Clin Med*. 2024 Aug 13;13(16):4753. doi: 10.3390/jcm13164753. PMID: 39200895; PMCID: PMC11355755.
- Bali C, Georvasili VK, Mitsis M, Vartholomatos G, Markopoulos GS. A response to 'A commentary on "Detection of cancer cells and tumor margins during colorectal cancer surgery by intraoperative flow cytometry"'. *Int J Surg*. 2023 Nov 1;109(11):3740-3741. doi: 10.1097/JS9.0000000000000667. PMID: 37737905; PMCID: PMC10651240.
- Georvasili V, Markopoulos G, Mitsis M, Lampri E, Lianos G, Vartholomatos G, Bali C. Intraoperative flow cytometry: a new study method and prognostic tool in colorectal cancer. *HJS* 2024, suppl 1;94:16

ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΣ ΒΙΒΛΙΟ

- Bali C, Georvasili VK. Intraoperative Flow Cytometry in Colorectal Cancer. In: Alexiou G, Vartholomatos G, editors. *Intraoperative Flow Cytometry* [Internet]. Springer Cham; 2023. p. 293–307. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33517-4>

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Β. Γεωρβασίλη, Χ. Μπαλή, Μ. Μήτσης, Θ. Μεσσήνης, Α. Μπατιστάτου, Γ. Μαρκόπουλος, Γ. Λιανός, Γ. Αλεξίου, Γ. Βαρθολομάτος « ΕΝΔΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ». 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, Βόλος 11-13/5/2018.
- Βάια Γεωρβασίλη, Χριστίνα Μπαλή, Θωμάς Μεσσήνης, Άννα Μπατιστάτου, Γεώργιος Αλεξίου, Γεώργιος Βαρθολομάτος⁴, Γεώργιος Μαρκόπουλος « ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΗΣ ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΕ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ

ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ». 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, Ιωάννινα 28-29/5/2021.

- Βάϊα Γεωρβασίλη, Γεώργιος Μαρκόπουλος, Μιχάλης Μήτσης, Άννα Μπατιστάτου, Γεώργιος Λιανός, Γεώργιος Αλεξίου, Γεώργιος Βαρθολομάτος, Χριστίνα Μπαλή «Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΝΕΩΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ» 33^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα 11-15/11/2023
- Βάϊα Γεωρβασίλη, Γεώργιος Μαρκόπουλος, Μιχάλης Μήτσης, Ευαγγελή Λάμπρη, Γεώργιος Λιανός, Γεώργιος Βαρθολομάτος, Χριστίνα Μπαλή « Ο ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ» 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος, Ιωάννινα 10-12/10/2024
- Βάϊα Γεωρβασίλη, Γεώργιος Μαρκόπουλος, Μιχάλης Μήτσης, Ευαγγελή Λάμπρη, Γεώργιος Λιανός, Γεώργιος Βαρθολομάτος, Χριστίνα Μπαλή «ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ: ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ», 16^ο Ελλαδοκυπριακό Συνέδριο, Πάφος 22-24/11/24
- Georvasili V, Markopoulos G, Lampri E, Vartholomatos G, Bali C. Intraoperative flow cytometry, a promising method for rapid margin evaluation in colorectal cancer: case presentation. COLORECTAL THRIVE 2025, Fribourg, Switzerland, 30/3-2/4/2025

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΜΕΝΗ ΟΜΙΛΗΤΡΙΑ

- Β. Γεωρβασίλη «Η εμπειρία της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου». Στρογγυλή Τράπεζα: Διεγχειρητική κυτταρομετρία ροής. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, Ιωάννινα 28-29/5/2021.
- Β. Γεωρβασίλη. ΔΚΡ και καρκίνος ΓΕΣ. Στρογγυλή τράπεζα: Η χρησιμότητα της Διεγχειρητικής Κυτταρομετρίας Ροής (ΔΚΡ) στην εκτίμηση των ορίων εκτομής στη χειρουργική ογκολογία.- 33^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα 11-15/11/2023

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

- Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης: Βάϊα Γεωρβασίλη, Γεώργιος Μαρκόπουλος, Μιχάλης Μήτσης, Ευαγγελή Λάμπρη, Γεώργιος Λιανός, Γεώργιος Βαρθολομάτος, Χριστίνα Μπαλή « Ο ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ» 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος, Ιωάννινα 10-12/10/2024
- Καλύτερη προφορική ανακοίνωση στον διαγωνισμό του Hellenic Journal of Surgery: Βάϊα Γεωρβασίλη, Γεώργιος Μαρκόπουλος, Μιχάλης Μήτσης, Ευαγγελή Λάμπρη, Γεώργιος Λιανός, Γεώργιος Βαρθολομάτος, Χριστίνα Μπαλή «ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ: ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ», 16^ο Ελλαδοκυπριακό Συνέδριο, Πάφος 22-24/11/24