



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σχέση των miRNAs ως πιθανών διαγνωστικών και προγνω-
στικών δεικτών στον ορθοκολικό καρκίνο**

POST GRADUATE THESIS

**Relevance of microRNAs as potential diagnostic and prognostic tumor
markers in colorectal cancer**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ/NAME OF STUDENT

Σταματία Νικολάου

Stamatia Nikolaou

ΟΝΟΜΑΤΑ ΕΙΣΗΓΗΤΩΝ/NAMES OF THE SUPERVISORS

Φραγκίσκη Ανθούλη

Fragkiski Anthouli

Πέτρος Παπαγιώργης

Petros Papagiorgis

ΑΙΓΑΛΕΩ/EGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Relevance of microRNAs as potential diagnostic and prognostic tumor markers

STAMATIA NIKOLAOU

19007

dml19007@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

FRAGKISKI ANTHOULI

SECOND SUPERVISOR

PETROS PAPAGIORGIS

THIRD SUPERVISOR

DIMITRIS CHANIOTIS

EGALEO 2021

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι
Εξεταστική Επιτροπή:

| A/α | ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ | ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ | ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ |
|------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | Φραγκίσκη Ανθούλη-Αναγνωστοπούλου | Καθηγήτρια/ Α επιβλέπων | |
| 2 | Πέτρος Παπαγιώργης | Λέκτορας/ Β επιβλέπων | |
| 3 | Δημήτριος Χανιώτης | Καθηγητής / Γ επιβλέπων | |

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Σταματία Νικολάου

10/1/2022

X

Σταματία Νικολάου



Υπογραφή από: STAMATIA NIKOLAOU

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές μου κα Φραγκίσκη Ανθούλη και τον κ Πέτρο Παπαγιώργη για την βοήθεια και τον χρόνο που διέθεσαν για εμένα.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στήριξε σε κάθε επιλογή μου και πίστεψε σε εμένα.

Αφιερώσεις

Στον πολυαγαπημένο μου πατέρα που έφυγε νωρίς πριν με δει να προσδεύω μέσω της διπλωματικής μου εργασίας

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα microRNAs (miRNAs) είναι μια κατηγορία μικρών μορίων RNAs, μεγέθους 20-24 νουκλεοτιδίων, τα οποία παράγονται στο κύτταρο και δε μεταφράζονται. Μέχρι πρόσφατα, η ύπαρξη και ο ρόλος τους στο κύτταρο ήταν άγνωστα.

Τελευταία, έχουν σχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου στους οποίους εντοπίζονται μεταβολές στην παραγωγή των μορίων αυτών, οδηγώντας είτε στην καταστολή είτε στην επαγωγή της καρκινογένεσης, ανάλογα τα mRNAs που στοχεύει κάθε miRNA.

Όσον αφορά τον ορθοκολικό καρκίνο, ορισμένα miRNAs που εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος και σε ιστούς που έχουν απομονωθεί από βιοψίες εμφανίζουν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα παραγωγής τους, είτε αυξημένα είτε μειωμένα σε σχέση με φυσιολογικά άτομα.

Σκοπός: Η εργασία αυτή βασίστηκε στα τελευταία δεδομένα της βιβλιογραφίας στη σχέση των miRNAs ως διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών στον ορθοκολικό καρκίνο.

Μέθοδος: Χρησιμοποιήθηκαν άρθρα και κλινικές μελέτες της τελευταίας δεκαπενταετίας από τις διεθνείς βάσεις Medline, Google Scholar, Scopus, σχετικά με τα miRNAs και τη σημασία τους για τη διάγνωση και πρόγνωση του ορθοκολικού καρκίνου και εκτιμήθηκε η διαγνωστική/προγνωστική τους αξία.

Αποτελέσματα: Στην πλειοψηφία των μελετών παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση πολλών miRNAs, τόσο μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων, αλλά και μεταξύ των διαφόρων σταδίων εξέλιξης της νόσου. Τα πιο μελετημένα μόρια είναι τα miRNAs που ανήκουν στην ομάδα 17~92 και εντοπίζονται αυξημένα σε δείγματα ασθενών, τόσο στον ίδιο τον ιστό, αλλά και στον ορό και στα κόπρανα και η αύξηση τους σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Αυξημένο εμφανίστηκε σε πολλές μελέτες και το 21a. Αντίθετα, miRNAs όπως το miR-143 και miR-145 εντοπίζονται μειωμένα σε ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα. Τέλος, έχουν βρεθεί miRNAs τα οποία δίνουν τη δυνατότητα πρόβλεψης της νόσου (miR-451), αλλά και την αντίδραση στη χημειοθεραπεία (miR-31).

Συμπεράσματα: Αν και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για την εύρεση νέων miRNAs που αλλάζουν τα πρότυπα έκφρασής τους στον ορθοκολικό καρκίνο, η χρήση τους ακόμα δεν έχει καθιερωθεί σε κλινικό επίπεδο. Είναι σημαντικό να γίνουν περαιτέρω μελέτες για την ανακάλυψη αξιόπιστων miRNAs, τα οποία θα δίνουν τη δυνατότητα

διάγνωσης, πρόγνωσης αλλά και εύρεσης της κατάλληλης θεραπείας εγκαίρως, για την εμφάνιση καλύτερων αποτελεσμάτων.

Abstract

Introduction: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small molecules of RNAs, 20-24 nucleotides in size, that are produced in the cell and are not translated. Until recently, their existence and role in the cell was unknown. The last years, miRNAs have been associated with various types of cancer in which changes in the production of these molecules are detected, leading to either suppression or induction of carcinogenesis, depending on the mRNAs that each miRNA targets.

In colorectal cancer, some miRNAs found in the bloodstream and in tissues isolated from biopsies show significant changes in their production levels, either increased or decreased compared with normal individuals. in protein.

Purpose: This project was based on the latest data in the literature on the relationship of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in colorectal cancer.

Method: Articles and clinical studies from the last fifteen years from the international Medline, Google Scholar, Scopus databases on mRNAs and their importance for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer were used and their diagnostic / prognostic value was assessed.

Results: In the majority of studies, differential expression of many miRNAs was observed, both between healthy individuals and patients, but also between the various stages of disease progression. The most studied molecules are the miRNAs of the 17 ~ 92 cluster which are found increased in samples of patients, both in the tissue itself, but also in the serum and feces and are correlated with poor prognosis. Many studies showed that miR-21 appears to be upregulated in CRC as well. In contrast, miRNAs such as miR-143 and miR-145 are found to be less common in patients than in healthy individuals. Finally, miRNAs have been found that can predict disease (miR-451), and the response to chemotherapy (miR-31).

Conclusion: Although several studies have been performed to find new miRNAs that change their expression patterns in colorectal cancer, their use has not yet been established at the clinical level. It is important to carry out further studies to discover reliable miRNAs, which will enable the diagnosis, prognosis and finding the appropriate treatment in time, for better results.

Περιεχόμενα

| | |
|---|-----------|
| Δήλωση περί λογοκλοπής | iv |
| Ευχαριστίες | vi |
| Αφιερώσεις | viii |
| Περίληψη | x |
| Abstract | xii |
| Συνομογραφίες | xv |
| Πρόλογος..... | 1 |
| 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 3 |
| 1.1 Ο ορθοκολικός καρκίνος CRC | 3 |
| 1.1.1 Γενικά | 3 |
| 1.1.2 Επιδημιολογία | 4 |
| 1.1.3 Παράγοντες κινδύνου και Προκαρκινωματώδεις καταστάσεις | 11 |
| 1.1.4 Μοριακή Βιολογία του Καρκίνου | 14 |
| 1.1.5 Κλινική εικόνα ασθενών | 19 |
| 1.1.6 Διάγνωση | 21 |
| 1.1.7 Αντιμετώπιση | 23 |
| 1.2 Τα miRNAs | 26 |
| 1.2.1 Ορισμός miRNAs | 26 |
| 1.2.2 Βιογένεση των miRNAs..... | 26 |
| 1.2.3 Τρόπος δράσης και λειτουργία των miRNAs | 30 |
| 1.2.4 Φυσιολογία και συσχέτιση με ασθένειες..... | 31 |
| 1.2.5. Τα miRNAs στον καρκίνο..... | 36 |
| 1.3 Βιοδείκτες στον CRC..... | 38 |
| 1.3.1 Ορισμός βιοδεικτών και χρήση τους σε κλινικό επίπεδο | 38 |
| 1.3.2 Καρκινικοί δείκτες..... | 40 |
| 1.3.3 Βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα σε ασθενείς με CRC | 44 |
| 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 49 |
| 2.1.1 Τα miRNAs ως βιοδείκτες..... | 49 |
| 2.1.2 Τα miRNAs ως βιοδείκτες στον καρκίνο | 50 |
| 2.2 Σκοπός | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3 Μέθοδος..... | 52 |
| 2.4 Αποτελέσματα..... | 53 |
| 2.5 Συζήτηση - Συμπεράσματα | 64 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 68 |

Συντομογραφίες

| | Αγγλική ορολογία | Ελληνική ορολογία |
|------------|--|--|
| MOODLE | Modular object oriented dynamic learning environment | Αρθρωτό αντικειμενοστραφές δυναμικό περιβάλλον εκπαίδευσης |
| miRNA/miR | micro-Ribonucleic acid | Μικρό-Ριβονουκλεϊκό οξύ |
| CRC | Colon Rectal Cancer | Ορθοκολικός καρκίνος |

Πρόλογος

Ο ορθοκολικός καρκίνος ή καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους τύπους καρκίνου στον παγκόσμιο πληθυσμό σήμερα και πρόκειται για μια από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας. Είναι ο τρίτος πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου παγκοσμίως, ο οποίος εμφανίζεται συχνότερα σε ηλικιωμένους, αν και η νοσηρότητα και η θνησιμότητά του μεταξύ των νεότερων ανθρώπων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια.

Η ανάπτυξη όγκων στο παχύ έντερο προκύπτουν από ένα συνδυασμό μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση διαφόρων όγκων στα κύτταρα του παχέος εντέρου όπως το Kras, το TP53 και το Rb1, τα οποία έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση πολλών ειδών καρκίνου σε διάφορους ιστούς και όργανα. Σε συνδυασμό με τις συνθήκες του εξωτερικού περιβάλλοντος, επάγεται ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων του εντέρου τα οποία οδηγούνται στην δημιουργία δομών που καλούνται αδενώματα, ή πολύποδες. Τα αδενώματα αυτά μπορούν να είναι είτε καλοήθη, είτε κακοήθη. Στην περίπτωση των κακοηθών αδενωμάτων, το γενετικό υλικό των κυττάρων είναι πιο επιρρεπές στην απόκτηση νέων μεταλλάξεων, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να προσδώσουν στο αδένωμα την ικανότητα μετάβασης σε καρκίνωμα. Κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, εμπλέκονται αρκετοί σημαντικοί μηχανισμοί σηματοδότησης του κυττάρου, όπως το μονοπάτι της μιτογόνου πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), και το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt. Μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες των 2 αυτών μονοπατιών επάγουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μια κατηγορία μικρών μορίων RNAs, μεγέθους 20-24 νουκλεοτιδίων, τα οποία παράγονται στο κύτταρο και δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνη. Μέχρι πρόσφατα, η ύπαρξη και ο ρόλος τους στο κύτταρο ήταν άγνωστος. Μετά από πολλές μελέτες βρέθηκε ότι ο κύριος ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν την παραγωγή πρωτεϊνών, μέσω της πρόσδεσής τους με τα συμπληρωματικά μόρια mRNA που κωδικοποιούν τις εκάστοτε πρωτεΐνες. Έχουν σχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου στους οποίους εντοπίζονται μεταβολές στην παραγωγή των μορίων αυτών, οδηγώντας είτε στην καταστολή είτε στην επαγωγή της καρκινογένεσης, ανάλογα τα mRNAs που στοχεύει κάθε miRNA.

Όσον αφορά τον ορθοκολικό καρκίνο, ορισμένα miRNAs που εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος και σε ιστούς που έχουν απομονωθεί από βιοψίες εμφανίζουν

σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα παραγωγής τους, είτε αυξημένα είτε μειωμένα σε σχέση με φυσιολογικά άτομα. Οι μεταβολές στα επίπεδα των μορίων προσδίδουν στα μόρια αυτά την ιδιότητα των βιοδεικτών τόσο για την πρόβλεψη της ανάπτυξης καρκίνου, όσο και για τη διάγνωση του τύπου καρκίνου και τον καθορισμό της έκβασης και της θεραπείας. Ως αποτέλεσμα, ο σωστός προσδιορισμός και καθορισμός συγκεκριμένων μορίων miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο για την πρόγνωση, τη διάγνωση και τη θεραπεία των διαφόρων μορφών ορθοκολικού καρκίνου.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ο ορθοκολικός καρκίνος CRC

1.1.1 Γενικά

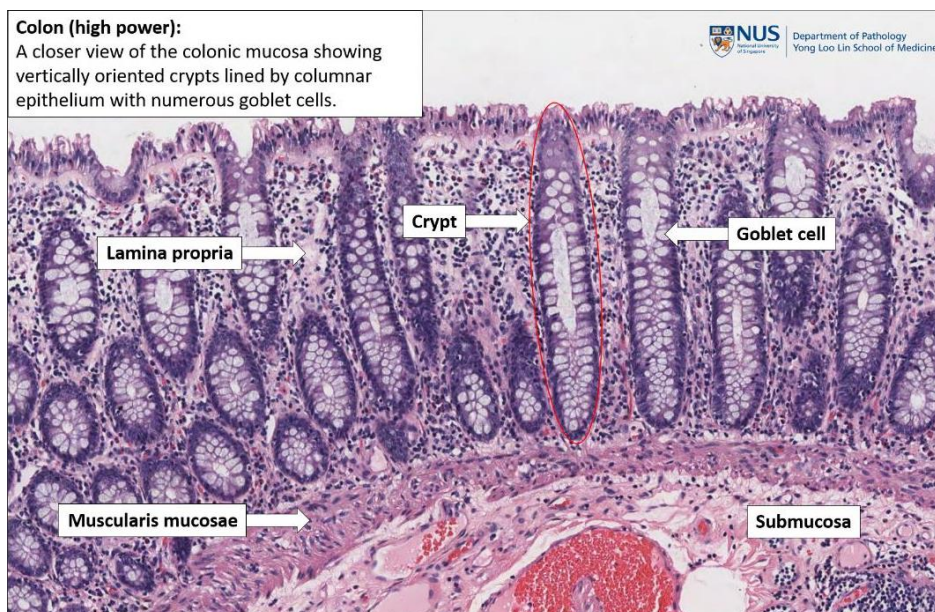
Ο ορθοκολικός καρκίνος ή καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού (colorectal cancer, CRC) είναι η τρίτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στον κόσμο και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά στις αναπτυσσόμενες χώρες. Γνωστό κι ως αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, ο CRC αναπτύσσεται συνήθως από τα αδενικά, επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου.

Ο καρκίνος προκύπτει όταν ορισμένα κύτταρα του επιθηλίου αποκτούν μια σειρά γενετικών ή επιγενετικών μεταβολών που τους προσδίδουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα¹.

Με ανεξέλεγκτα αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και ικανότητας επιβίωσης, αυτά τα υπερπολλαπλασιαστικά κύτταρα δημιουργούν ένα καλοήθες αδένωμα, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνωμα και να κάνει μετάσταση σε άλλους/α ιστούς και όργανα².

Η κύρια λειτουργία του παχέος εντέρου είναι η επαναπορρόφηση του νερού και των εναπομείναντων μετάλλων και θρεπτικών ουσιών. Το παχύ έντερο περιέχει ποικίλη μικροχλωρίδα που μπορεί να διαλύσει τα υπόλοιπα άμυλα και πρωτεΐνες. Προκειμένου να διευκολυνθεί η απορρόφηση, ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου είναι αρχιτεκτονικά διατεταγμένος ως ένα στρώμα από βαθείς, πυκνά διατεταγμένους, ευθείς σωληνώδεις αδένες που δεν εκτείνονται ως λάχνες στον εντερικό αυλό (κρύπτες Lieberkühn) (Εικόνα 1). Τα βλαστικά κύτταρα του εντέρου και τα προγονικά κύτταρα βρίσκονται στο κάτω μέρος της κρύπτης και διαιρούνται δίνοντας γένεση τόσο σε πολυδύναμα κύτταρα όσο και σε επιθηλιακά κύτταρα που απαρτίζουν το παχύ έντερο και σταδιακά μεταναστεύουν από την κρύπτη και προς τα πάνω^{3,4}.

Το επιθήλιο του παχέος εντέρου είναι ένα απλό κυλινδρικό επιθήλιο που αποτελείται από δύο βασικούς κυτταρικούς τύπους, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις ξεχωριστές λειτουργίες της απορρόφησης του νερού και της έκκρισης βλέννας. Κοντά στην κορυφή των μεγάλων εντερικών αδένων βρίσκονται τα κύτταρα που είναι κυρίως υπεύθυνα για την απορρόφηση του νερού, ενώ η βάση είναι γεμάτη με κύτταρα Goblet που παράγουν βλέννα, γεγονός κρίσιμο για τη λίπανση και προώθηση των όλο και πιο στερεοποιημένων περιττωμάτων. Παρόντα είναι και εντεροενδοκρινή κύτταρα⁴.



Εικόνα 1 Φυσιολογικός βλεννογόνος του παχέος εντέρου. (Πηγή: Pathweb Online Resource, Department of Pathology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore)

Ο CRC περιλαμβάνει στην πραγματικότητα μια πολύ ετερογενή ομάδα ασθενειών που προκαλούνται από μια μεγάλη ποικιλία μεταβολών και μεταλλάξεων. Επειδή δεν προκαλούνται όλοι οι CRC από παρόμοιες μεταλλάξεις, είναι δύσκολο να σχεδιαστεί μια μοριακή θεραπεία για την αντιμετώπιση όλων⁵.

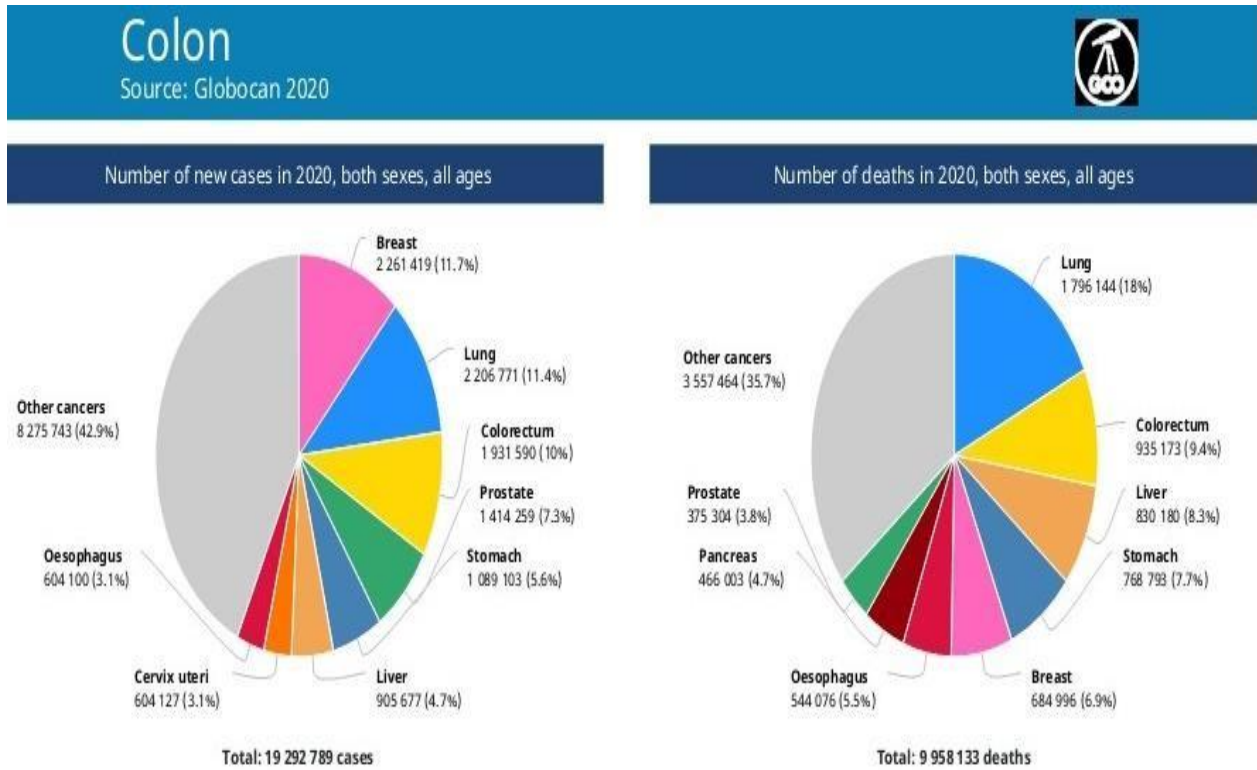
Η χειρουργική επέμβαση παραμένει η κύρια πορεία θεραπείας σε περιπτώσεις έγκαιρης διάγνωσης, αλλά δεν είναι πλέον αποτελεσματική σε προχωρημένες περιπτώσεις, όπου ο καρκίνος έχει κάνει μετάσταση, όπως συμβαίνει σε περίπου 25% των διαγνώσεων⁶. Σε αυτούς τους ασθενείς, η αποτελεσματικότητα των νέων, κυτταροτοξικών θεραπειών περιορίζεται από την ταχεία ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα και τη συνεπαγόμενη υποτροπή του καρκίνου⁷.

1.1.2 Επιδημιολογία

Συχνότητα και Θνησιμότητα

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του GLOBOCAN 2020, ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ο τρίτος σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνου παγκοσμίως (10%), μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (11.4%) και τον καρκίνο του μαστού (11.7%) για όλες τις ηλικίες και για τα δύο φύλα, ενώ αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου (9.4%) από όλες τις μορφές

καρκίνου παγκοσμίως, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (18%), για όλες τις ηλικίες και για τα δύο φύλα (Εικόνα 2)⁸.



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση του αριθμού νέων περιπτώσεων και θανάτων από ορθοκολικό καρκίνο το έτος 2020, παγκοσμίως (κίτρινο χρώμα) (πηγή: *The Global Cancer Observatory, December 2020*)

Συγκεκριμένα για την Ελλάδα, σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του GLOBOCAN 2020, ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ο τέταρτος σε συχνότητα καρκίνος στους άνδρες (12.5%), μετά από τους καρκίνους της ουροδόχου κύστης (13.3%), προστάτη (17.1%) και πνεύμονα (18.7%), ευθυνόμενος για 4.530 νέες περιπτώσεις (εικόνα 3).

Αντίθετα, στις γυναίκες, αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία καρκίνου (11.9%), μετά τον καρκίνο του μαστού (27.5%), ευθυνόμενος για 3.365 νέες περιπτώσεις (εικόνα 3).

Αξιοσημείωτο είναι, ότι ο ορθοκολικός καρκίνος ήταν για το έτος 2020, ο δεύτερος σε συχνότητα καρκίνος (12.2%) μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα (13.9%) και για τα δύο φύλα, ευθυνόμενος για 7.895 νέες περιπτώσεις (εικόνα 3).

Επί συνόλου 33.166 θανάτων από καρκίνο στην Ελλάδα κατά το έτος 2020, ο μεν καρκίνος του κόλου, ευθύνεται για 3.431 θανάτους (10.3%), ο δε του ορθού για 499 αντίστοιχα (1.5%), και συνολικά για 3.930 θανάτους (11.8%).

Οι πέντε συχνότερες εντοπίσεις καρκίνου στην Ελλάδα το έτος 2020 παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1)⁸.

Πίνακας 1. Οι 5 συχνότερες εντοπίσεις καρκίνου ανάλογα με το φύλο μεμονωμένα και αμφότερα στην Ελλάδα το έτος 2020

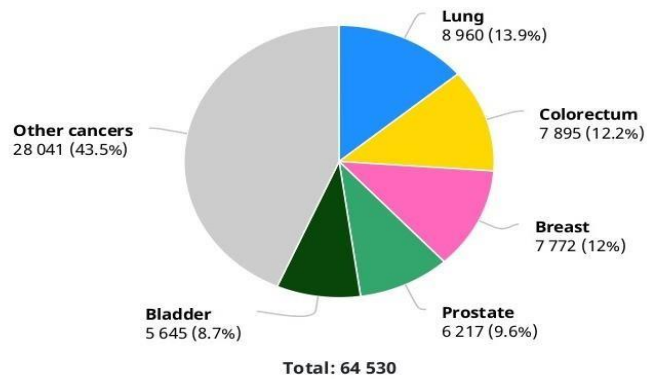
| ΑΝΔΡΕΣ | ΓΥΝΑΙΚΕΣ | ΑΝΔΡΕΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΣ |
|------------------------|---------------------|----------------------------|
| Πνεύμονας | Μαστός | Πνεύμονας |
| Προστάτης | Παχύ έντερο | Παχύ έντερο |
| Ουροδόχος κύστη | Πνεύμονας | Μαστός |
| Παχύ έντερο | Μήτρα (σώμα) | Προστάτης |
| Πάγκρεας | Πάγκρεας | Ουροδόχος κύστη |

Πηγή: [The Global Cancer Observatory, March 2021](#)

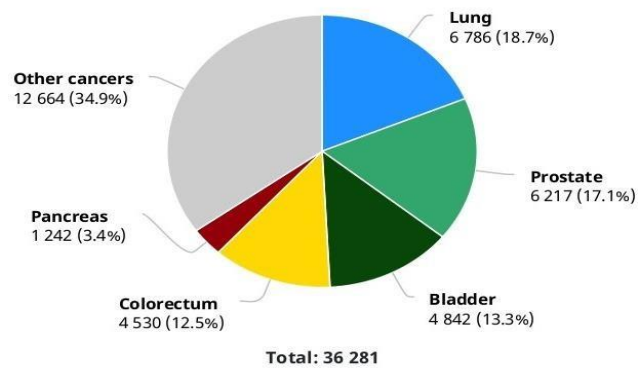
Greece

Source: Globocan 2020

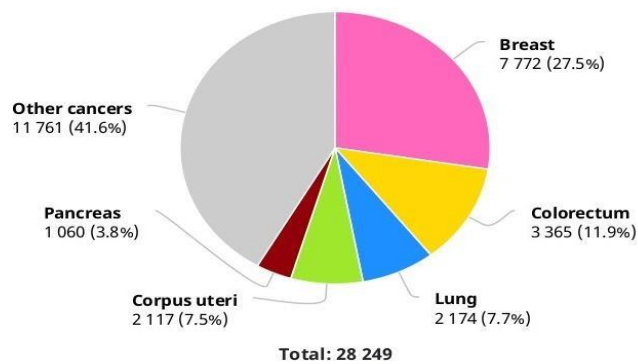
Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Number of new cases in 2020, males, all ages

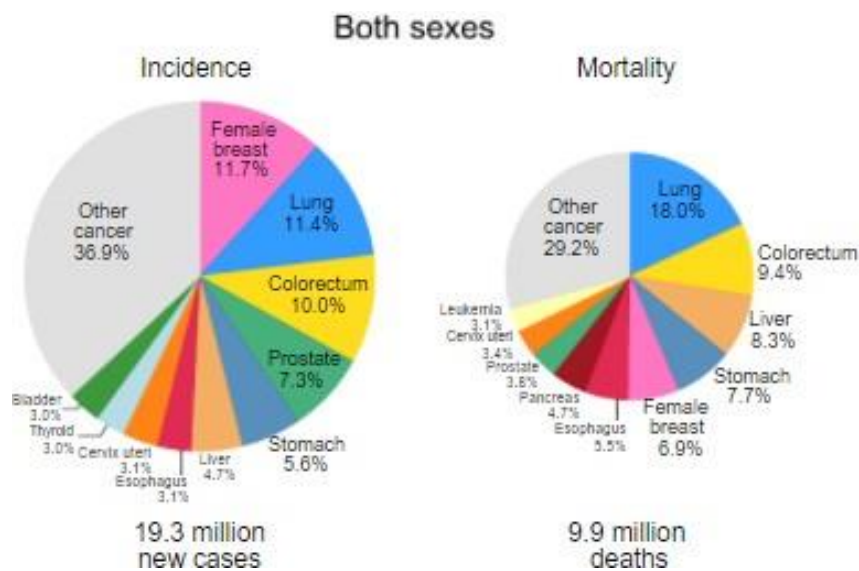


Number of new cases in 2020, females, all ages

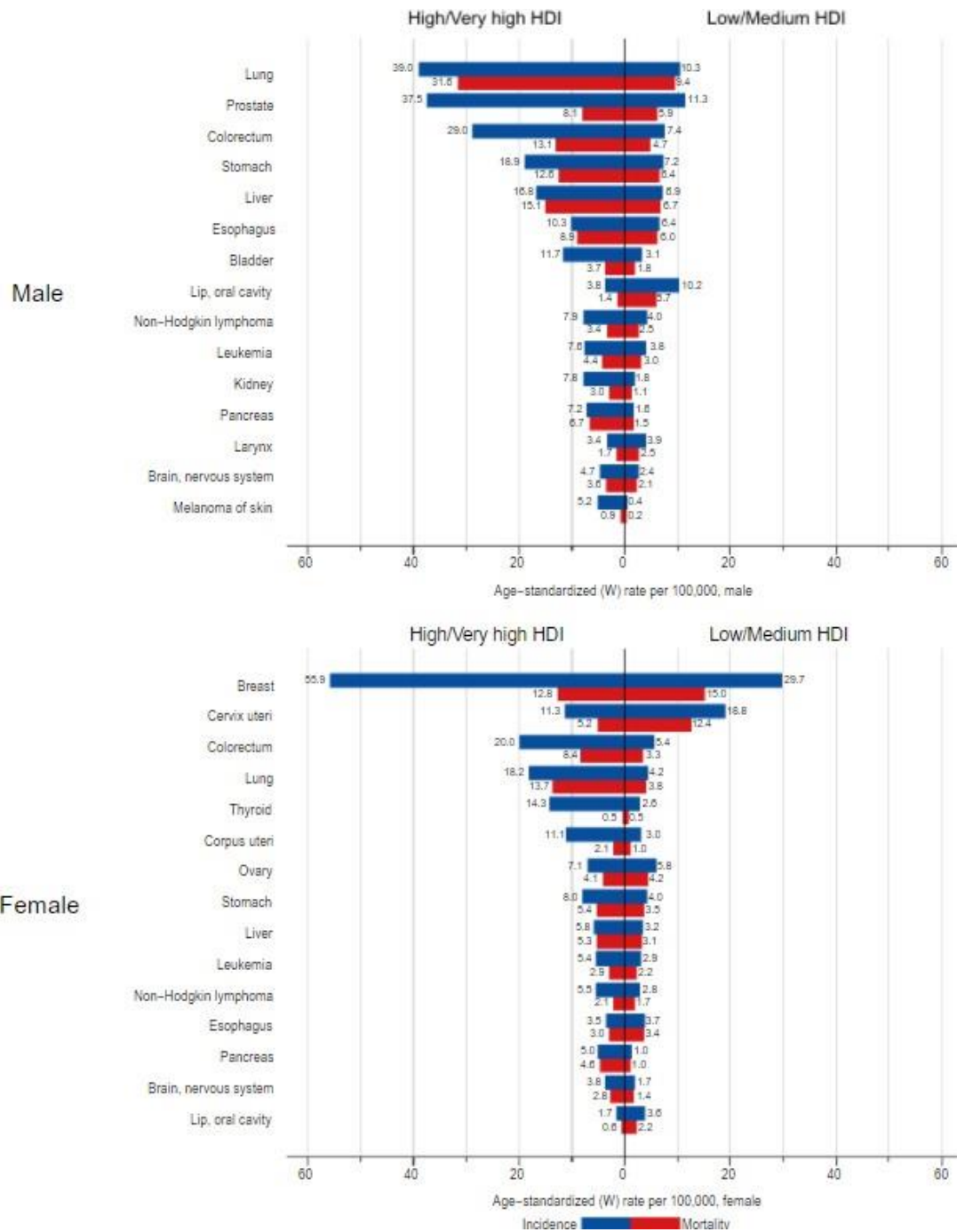


Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση του αριθμού νέων περιπτώσεων στον άνδρα, στη γυναίκα και στα δύο φύλα από ορθοκολικό καρκίνο το έτος 2020, στην Ελλάδα (κίτρινο χρώμα) (Πηγή: The Global Cancer Observatory, March 2021)

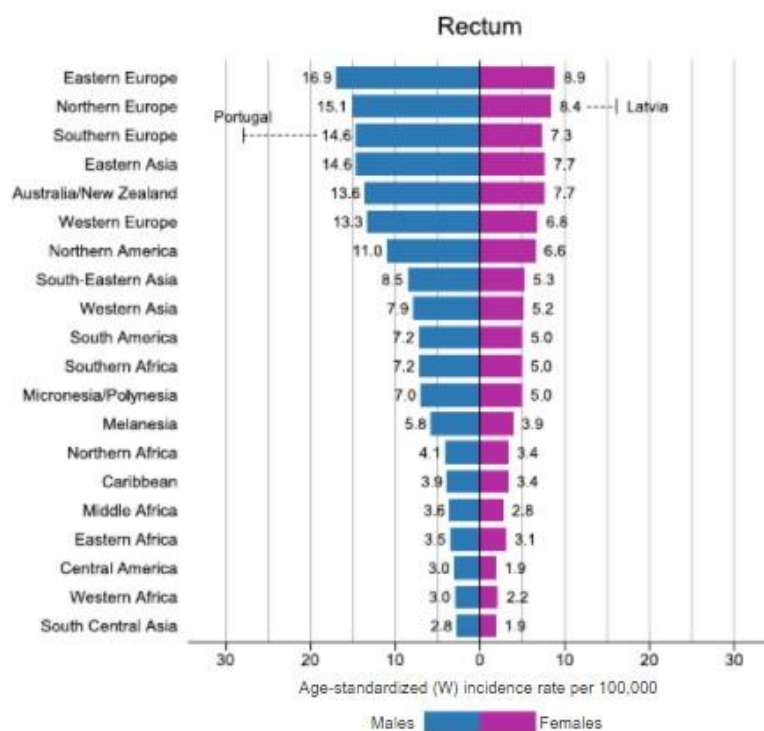
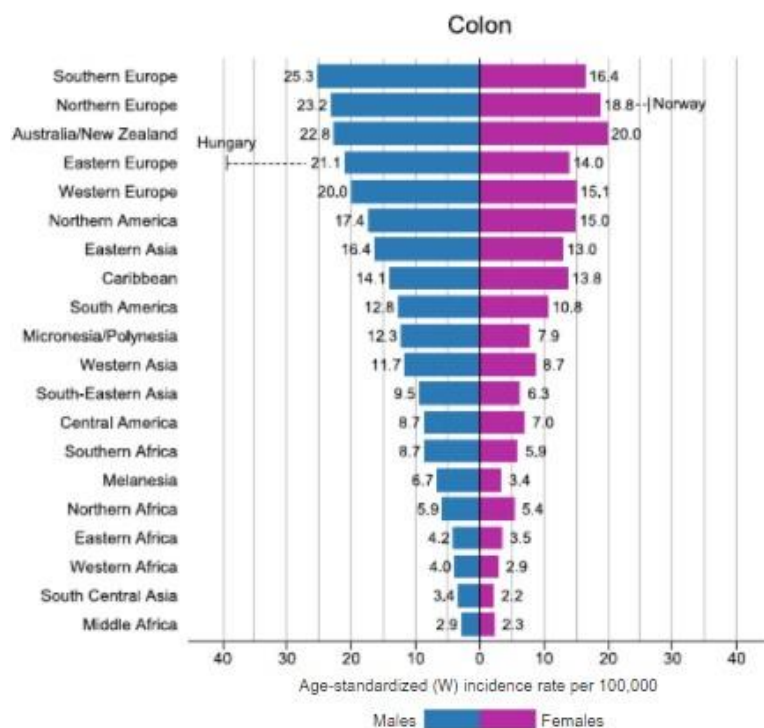
Πάνω από 1,9 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου του παχέος εντέρου (συμπεριλαμβανομένου του ορθού) και 935.000 θάνατοι εκτιμήθηκαν για το 2020, αντιπροσωπεύοντας περίπου ένα στα 10 περιστατικά καρκίνου και θανάτων. Συνολικά, ο ορθοκολικός καρκίνος κατατάσσεται τρίτος από άποψη συχνότητας, αλλά δεύτερος από άποψη θνησιμότητας (Εικόνα 4). Η συχνότητα εμφάνισης είναι περίπου 4 φορές υψηλότερη στις ανεπτυγμένες χώρες, σε σύγκριση με τις αναπτυσσόμενες χώρες. Ωστόσο, υπάρχει μικρότερη διακύμανση στα ποσοστά θνησιμότητας, λόγω της υψηλότερης θνησιμότητας στις χώρες που βρίσκονται σε μεταβατικό στάδιο (Εικόνα 5). Υπάρχει περίπου 9 φορές διακύμανση στα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του κόλου ανά παγκόσμια περιοχή, με τα υψηλότερα ποσοστά σε Ευρωπαϊκές περιοχές, Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία και Βόρεια Αμερική, και συγκεκριμένα με την Ουγγαρία και τη Νορβηγία να κατατάσσονται πρώτες σε άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα (Εικόνα 6). Τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του ορθού έχουν παρόμοια παγκόσμια κατανομή, αν και τα ποσοστά στην Ανατολική Ασία κατατάσσονται μεταξύ των υψηλότερων (Εικόνα 6). Τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του κόλου και του ορθού τείνουν να είναι χαμηλά στις περισσότερες περιοχές της Αφρικής και στη Νότια-Κεντρική Ασία⁸.



Εικόνα 4 Κατανομή περιπτώσεων και θανάτων για τους 10 πιο συνηθισμένους καρκίνους το 2020 συνολικά και για τα δύο φύλα (κίτρινο χρώμα) (Πηγή: Sung et al., 2020).



Εικόνα 5 Συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα μεταξύ χωρών με υψηλό δείκτη HDI και χωρών με χαμηλό δείκτη HDI, των 15 πιο συνηθισμένων καρκίνων για το 2020 μεταξύ ανδρών και γυναικών (Πηγή: Sung et al., 2020).



Εικόνα 6 Συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως ανά περιοχή για τους καρκίνους του κόλου και του ορθού, στους άνδρες και στις γυναίκες (Πηγή: Sung et al., 2020).

Επιβίωση

Οι βελτιώσεις στη θεραπεία του CRC οδήγησαν σε μείωση της θνησιμότητας από CRC σε μεγάλο αριθμό εθνών, ακόμη και σε ύπαρξη αυξημένης συχνότητας εμφάνισης.

Σημαντικός παράγοντας που συνέβαλλε στην αύξηση της επιβίωσης ήταν η απομάκρυνση των πολυπόδων, καθώς και άλλων προσπαθειών έγκαιρης ανίχνευσης, όπως κολonosκόπηση, υπολογιστική τομογραφία (CT), ανοσοϊστοχημεία κοπράνων και εξέταση κοπράνων για αίμα (Faecal Occult Blood Test - FOBT).

Η εισαγωγή καλύτερων εξετάσεων προσυμπτωματικού ελέγχου, μπορεί να είχε αρχικά αυξήσει τα ποσοστά συχνότητας, λόγω διάγνωσης μίας προηγουμένως μη διαγνωσμένης νόσου, αλλά μείωσε, μακροπρόθεσμα, τη θνησιμότητα χάρη στην απομάκρυνση των προ-καρκινικών ή μη μεταστατικών πολυπόδων⁹.

Οι διακυμάνσεις στην επιβίωση σε ένα έθνος μπορεί να εξαρτώνται από τη φυλή και την κοινωνική κατάσταση. Στις ΗΠΑ, οι Αφροαμερικανοί και οι ιθαγενείς Αμερικανοί, οι μειονεκτούσες μειονότητες που συχνά έχουν λιγότερη πρόσβαση σε ποιοτική υγειονομική περίθαλψη, προληπτικούς ελέγχους και υγιεινές τροφές, εμφανίζουν χαμηλότερη επιβίωση σε όλα τα στάδια του CRC¹⁰.

1.1.3 Παράγοντες κινδύνου και Προκαρκινωμάτωσης καταστάσεις

Ο ορθοκολικός καρκίνος αρχίζει συνήθως με τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου, με αποτέλεσμα τους γνωστούς πολύποδες, οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν σταδιακά για 10-20 χρόνια πριν γίνουν καρκινικοί. Η πιο κοινή μορφή είναι ένα αδένωμα ή πολύποδας που προέρχεται από τα εντεροκύτταρα του επιφανειακού επιθηλίου, των οποίων η λειτουργία είναι να παράγουν τη βλέννα στο παχύ έντερο. Μόνο περίπου το 10% όλων των αδενωμάτων εξελίσσονται σε καρκίνο, αν και ο κίνδυνος αυξάνεται καθώς ο πολύποδας μεγαλώνει. Ο καρκίνος που προκύπτει από τέτοιους πολύποδες είναι γνωστός ως αδενοκαρκίνωμα και αντιπροσωπεύει το 96% όλων των CRC¹¹.

Οι CRC που αναπτύσσονται στο τοίχωμα του παχέος εντέρου ή του ορθού μπορούν να διεισδύσουν στο αίμα ή στα λεμφικά αγγεία, επιτρέποντας τη μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα μέσω του αίματος ή στους κοντινούς λεμφαδένες. Ο βαθμός εισβολής καθορίζει τα στάδια και συνεπώς την πρόγνωση κατά τη διάγνωση του CRC¹².

Σταδιοποίηση ορθοκολικού καρκίνου

Η American Joint Committee on Cancer (AJCC) το 2018 διέκρινε τον ορθοκολικό καρκίνο σε 5 στάδια, ανάλογα με την έκταση του όγκου και τη διήθηση στα εσωτερικά στρώματα, τη διασπορά του κοντά σε κόμβους του λεμφικού συστήματος και τις απομακρυσμένες

μεταστάσεις (αιματογενείς) των καρκινικών κυττάρων (tumor, Nodes, Metastasis, TNM). Το σύστημα TNM δίνει σημαντικές πληροφορίες για το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής.

Στο στάδιο 0 αντιστοιχούν οι *in situ* ή ενδοβλεννογόνοιοι καρκίνοι. Πρόκειται για πολύποδες που δεν έχουν διηθήσει ακόμη το τοίχωμα του κόλου ή του ορθού και δεν έχουν περάσει την βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα.

Στο στάδιο I αντιστοιχούν οι τοπικοί καρκίνοι. Πρόκειται για όγκους οι οποίοι έχουν διεισδύσει στη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα του παχέος εντέρου και έχουν αναπτυχθεί στην υποβλεννογόνια περιοχή εντός του τοιχώματος, αλλά δεν έχουν ακόμη επεκταθεί πέρα από αυτό. Επιπλέον, δεν έχουν διασπαρεί κοντά σε λεμφαδένες και σε πιο μακρινές περιοχές, έχουν δηλαδή μηδενική μεταστατικότητα.

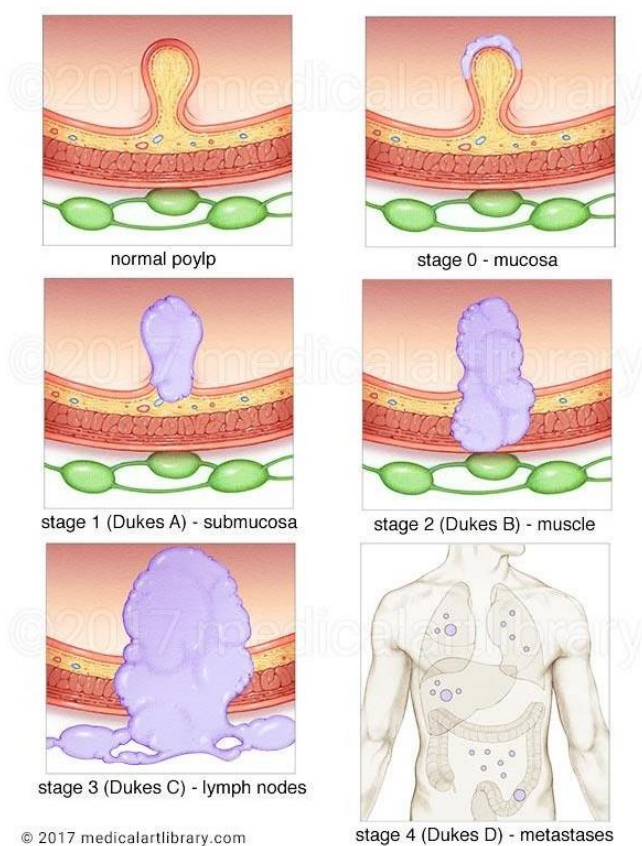
Στο στάδιο II ο όγκος έχει αναπτυχθεί διαμέσω των στρωμάτων του τοιχώματος του παχέος εντέρου και μπορεί να έχει επεκταθεί και σε γειτονικούς ιστούς και όργανα, αλλά δεν έχει ακόμα μεταναστεύσει σε λεμφαδένες και απομακρυσμένα όργανα.

Στο στάδιο III ξεκινάει η διασπορά σε λεμφαδένες, ή σε περιοχές κοντά σε αυτούς. Στο στάδιο αυτό, με την εξέλιξη της νόσου αυξάνεται ο αριθμός των λεμφαδένων της περιοχής τους οποίους προσεγγίζουν κύτταρα του όγκου, αλλά ακόμα δεν έχει εμφανιστεί μετάσταση σε απομακρυσμένο όργανο.

Στο στάδιο IV εντοπίζονται οι μεταστατικοί καρκίνοι, εκείνοι που έχουν μεταναστεύσει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, σε απομακρυσμένα όργανα, όπως στους πνεύμονες ή στο ήπαρ ή ακόμη σε απομακρυσμένες περιοχές του περιτοναίου.¹³

Πίνακας 2. Στάδια εξέλιξης της νόσου. Πηγή: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>

| ΣΤΑΔΙΑ | ΟΓΚΟΣ (Tumor, T) | ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ (Nodes, N) | ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ (Metastasis, M) | ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ |
|-------------|------------------|-----------------------|---------------------------|---|
| 0, I | T1, T2 | N0 | M0 | Νόσος στο εντερικό τοίχωμα (βλεννογόνο και υποβλεννογόνο χιτώνα) |
| II | T3, T4 | N0, N1 | M0 | Νόσος που μπορεί να διαπερνά το εντερικό τοίχωμα (μυϊκό) ή και να επεκτείνεται σε γειτονικούς ιστούς και όργανα |
| III | T1, T2, T3, T4 | N1, N2 | M0 | Επέκταση στους λεμφαδένες |
| IV | T1, T2, T3, T4 | N1, N2 | M1 | Μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα |



Εικόνα 7 Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Πηγή: medicalartlibrary.com).

Ορισμένες επιλογές διατροφής και τρόπου ζωής μπορούν να προωθήσουν την εντερική φλεγμονή και να τροποποιήσουν την εντερική μικροχλωρίδα για να επάγουν μια ανοσοαπόκριση, με τελικό αποτέλεσμα να διευκολύνουν την ανάπτυξη του πολύποδα και τη μετατροπή σε καρκίνο.

Επιπλέον, κληρονομικές ή σποραδικές μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να παρέχουν σε ορισμένα βλεννογόνα κύτταρα ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα και να επάγουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και τελικά την καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP). Πρόκειται για ένα κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου του παχέος εντέρου, που προκαλείται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο APC (adenomatous polyposis coli) και χαρακτηρίζεται από την πρώιμη ανάπτυξη εκατοντάδων έως χιλιάδων αδενωμάτων σε όλο το μήκος του παχέος εντέρου. Εάν δεν αντιμετωπιστεί, υπάρχει σχεδόν 100% πιθανότητα εξέλιξης σε καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) έως την ηλικία των 35-40 ετών, καθώς και αυξημένος κίνδυνος για διάφορες άλλες κακοήθειες. Η αλλαγή του τρόπου ζωής, οι γενετικοί έλεγχοι, η έγκαιρη εξέταση του κόλου και του ορθού, καθώς και ορισμένες χειρουργικές επεμβάσεις αποτελούν πολλά υποσχόμενους τρόπους στην πρόληψη και την αντιμετώπιση του CRC¹².

1.1.4 Μοριακή Βιολογία του Καρκίνου

Η εμφάνιση του ορθοκολικού καρκίνου είναι πιθανό να προκληθεί από διαταραχές στο DNA ενός κυττάρου, είτε με τη μορφή μεταλλάξεων στην αλληλουχία του, είτε σε επιγενετικές τροποποιήσεις.

Χρωματοσωματική αστάθεια

Η κυριότερη αιτία εμφάνισης και εξέλιξης της νόσου είναι η χρωμοσωματική αστάθεια (Chromosomal Instability, CIN). Η χρωμοσωματική αστάθεια αντιστοιχεί σε αλλαγές που συμβαίνουν στη δομή των χρωμοσωμάτων, αυξάνοντας ή μειώνοντας το μέγεθος είτε ολόκληρου του χρωμοσώματος είτε τμήματός του, οδηγώντας σε καταστάσεις ανευπλοειδίας. Η συχνότητα εμφάνισης CIN σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο αντιστοιχεί στο 85% περίπου, καθιστώντας τη χρωμοσωματική αστάθεια τη συχνότερη διαταραχή που οδηγεί σε CRC¹³.

Η χρωμοσωματική αστάθεια έχει σχετιστεί με μεταλλάξεις σε γνωστά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το APC, TP53, PIK3CA, BRAF και KRAS.

- Το γονίδιο Adenomatous Polyposis Coli (APC) είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 στη θέση 5q21-q22. Φυσιολογικά, παράγεται μια πρωτεΐνη μήκους 312kDa η οποία αλληλεπιδρά με μια ποικιλία πρωτεϊνών, όπως η β-κατενίνη, η GSK3β (glucogen synthase kinase 3β) και η Bub κινάσες. Η πρόσδεση του APC με τη β-κατενίνη και σε συνδυασμό με τη GSK3β και την AXIN σε φυσιολογικές συνθήκες, οδηγεί στη φωσφορυλίωση και την αποδόμηση της β-κατενίνης, αποτρέποντας την είσοδό της στον πυρήνα. Η μετάλλαξη του APC γονιδίου ωστόσο, οδηγεί στο σχηματισμό μιας διαφορετικής πρωτεΐνης, με μικρότερο βαθμό συγγένειας με τη β-κατενίνη. Ως αποτέλεσμα, η β-κατενίνη δεν προσδέεται το ίδιο σταθερά και είναι πλέον ελεύθερη να εισέλθει στον πυρήνα, όπου θα ενεργοποιήσει γονίδια που ρυθμίζονται από το μονοπάτι της Wnt σηματοδότησης και έχουν σχετιστεί με τις διαδικασίες της ογκογένεσης, όπως το MYC, η κυκλίνη D1, ο VEGF κλπ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του APC αποτελούν το αρχικό φαινόμενο ογκογένεσης στον CRC, ενώ η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού συναντάται σε σχεδόν όλους τους όγκους με χρωμοσωματική αστάθεια, ακόμα κι αν δεν έχει πραγματοποιηθεί μετάλλαξη στο γονίδιο APC¹⁴.
- Το KRAS είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο με σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Συγκεκριμένα, το γονίδιο του KRAS παράγει μια πρωτεΐνη 21kDa η οποία έχει ενεργότητα GTPασης, δηλαδή διαθέτει ένα μόριο GTP προσδεμένο. Όσο η πρωτεΐνη είναι συνδεδεμένη με GTP, βρίσκεται στην ενεργή μορφή της. Απενεργοποιείται όταν το GTP υποστεί υδρόλυση και μετατραπεί σε GDP. Διαθέτει την ικανότητα επαγωγής πολλαπλασιασμού μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών των MAP κινασών. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του KRAS έχουν βρεθεί μεταλλάξεις οι οποίες μειώνουν τη συχνότητα υδρόλυσης του GTP με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να παραμένει συνεχώς ενεργοποιημένη και να επάγει μιτωτικά γεγονότα στο κύτταρο. Σε άτομα που πάσχουν από CRC βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του KRAS σε περίπου 50% των περιπτώσεων^{13,14}.
- Το TP53 είναι ένα από τα πιο γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών τύπων καρκίνου. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα

17 και η πρωτεΐνη που παράγεται, η p53 είναι μεταγραφικός παράγοντας γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA και με την απόκριση του κυττάρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Σε ασθενείς με CIN στους όγκους βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό που οδηγούσαν σε απενεργοποίηση του ήταν παρούσες στο 60%. Απώλεια της πρωτεΐνης p53 οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και στην απώλεια των μηχανισμών απόπτωσης του κυττάρου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του όγκου^{13,14}.

- Το PI3K είναι μια κινάση λιπιδίων η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφατυδιλοινσιτόλη, συμμετέχοντας σε μια ποικιλία μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας A της πρωτεΐνης, PIK3CA έχουν σχετιστεί με τα μεταγενέστερα στάδια του ορθοκολικού καρκίνου, καθώς η συγκεκριμένη υπομονάδα ρυθμίζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της απενεργοποίησης πρωτεϊνών που σχετίζονται με τους μηχανισμούς απόπτωσης, όπως ο FOXO1 και η οικογένεια των Rac GTPασών. Μεταλλάξεις στην υπομονάδα που οδηγούν σε αυξημένη λειτουργία αναστέλλουν την απόπτωση αλλά και επάγουν τον πολλαπλασιασμό, μέσω της ενεργοποίησης του Akt μονοπατιού αλλά και της mTOR σηματοδότησης, υπεύθυνα μονοπάτια για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό εντοπίζεται σε 10- 20% των ασθενών με CRC, ενώ συχνά συνυπάρχει με μετάλλαξη στο γονίδιο του KRAS¹⁴.
- Εκτός από τα παραπάνω γονίδια τα οποία είναι γνωστά για τη συμμετοχή τους σε διάφορους τύπους καρκίνου, η χρωμοσωματική αστάθεια έχει σχετιστεί και με την απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss Of Heterozygosity) στην περιοχή 18q. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται αρκετά ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το DCC και SMAD2 και SMAD4. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας οδηγεί στη μειωμένη έκφραση των γονιδίων αυτών με αποτέλεσμα την προώθηση του όγκου. LOH εντοπίζεται περίπου στο 70% των όγκων CRC, αλλά μόνο σε μεταγενέστερα στάδια. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης, καθώς τα άτομα με LOH εμφανίζουν χαμηλότερο προσδόκιμο ζωής^{13,14}.

Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability-MSI) είναι ένας μηχανισμός συσσώρευσης μεταλλάξεων στο DNA που βασίζεται σε δυσλειτουργία του μηχανισμού αντιγραφής του κυττάρου. Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες κατά την αντιγραφή είναι επιρρεπείς σε λάθη της DNA πολυμεράσης, η οποία μπορεί να προσπεράσει κάποια νουκλεοτίδια, όταν η αλληλουχία είναι επαναλαμβανόμενη. Φυσιολογικά, το φαινόμενο αυτό επιδιορθώνεται από το Mismatch Repair (MMR) σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 και PMS2. Οι πρωτεΐνες αυτές φυσιολογικά ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους, αναγνωρίζουν και επιδιορθώνουν τα λάθη της DNA πολυμεράσης, ενώ ακόμα μπορούν και να καταστρέφουν την περιοχή της θυγατρικής αλυσίδας που έχει κατασκευαστεί λανθασμένα και να δημιουργούν μια νέα που θα συνδέεται 100% με τη μητρική αλυσίδα.

Μεταλλάξεις στα γονίδια των MMR πρωτεϊνών οδηγούν σε μειωμένη δραστηριότητα των πρωτεϊνών, μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των λαθών κατά την αντιγραφή και κατ' επέκταση σε μικροδορυφορική αστάθεια. Ως αποτέλεσμα, τα λάθη στην αντιγραφή του μικροδορυφορικού DNA δε διορθώνονται και διατηρούνται στις επόμενες γενιές, προκαλώντας μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου στα κοντινά γονίδια, ενώ παράλληλα προστίθενται και νέες μεταλλάξεις στην περιοχή.

Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA εντοπίζεται σε 15% περίπου των όγκων του παχέος εντέρου και σχεδόν σε όλους του κληρονομικούς καρκίνους. Η εμφάνιση αστάθειας οφείλεται συχνότερα στη σίγαση του γονιδίου MLH1 μέσω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή και συνήθως αντιστοιχούν σε όγκους με υψηλό βαθμό μεθυλίωσης. Επιπλέον, σε ασθενείς με MSI όγκους εντοπίζεται αρκετά συχνά η μετάλλαξη BRAF^{V600E}, η αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη στη θέση 600 του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF με το γλουταμινικό οξύ, καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο TGFBR2, υποδοχέα των κυττάρων που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Γενικά, από την αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA φαίνεται να επηρεάζεται ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, καθώς έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (GRB1, TCF4, WISP3, ACVR2, IGF2R, AXIN2, και CDX), τον κυτταρικό κύκλο ή την απόπτωση (CASP5, PRDM2, BCL10, PTEN, PA2G4, και FAS) καθώς και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA (MBD4, BLM, CHK1, MLH3, RAD50, MSH3, and MSH6).

Η ταξινόμηση των όγκων όπου εντοπίζεται μικροδορυφορική αστάθεια πραγματοποιείται με τη χρήση ενός πίνακα μικροδορυφορικών δεικτών που κατασκευάστηκε από την NCI / Bethesda.

Συγκεκριμένα, αν στον όγκο εντοπίζεται μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης σε συγκεκριμένα γονίδια σε ποσοστό άνω του 30%, ο όγκος κατηγοριοποιείται ως MSI-high, ενώ αν το ποσοστό είναι χαμηλότερο του 30% κατηγοριοποιείται ως MSI-low. Τέλος, όγκοι οι οποίοι εμφανίζουν σταθερότητα στο μικροδορυφορικό DNA κατηγοριοποιούνται ως MSS. Για παράδειγμα, όγκοι στους οποίους εντοπίζεται μετάλλαξη σε κάποιο από τα MMR γονίδια ή η μετάλλαξη BRAF^{V600E} ανήκουν στην κατηγορία των MSI-high όγκων^{13,14}.

Μεθυλίωση νησιδίων CpG (CpG island methylator phenotype, CIMP)

Μια κατηγορία τροποποιήσεων είναι οι μεθυλίωσεις του DNA σε ειδικές θέσεις. Συγκεκριμένα, κατά τη μεθυλίωση, μια μεθυλομάδα προστίθεται στα νουκλεοτίδια κυτοσίνης τα οποία εντοπίζονται σε νησίδια CpG. Τέτοια νησίδια εντοπίζονται στις αρχές πολλών γονιδίων, συγκεκριμένα στις περιοχές των υποκινητών γονιδίων που συμμετέχουν στην εξέλιξη του όγκου, κυρίως σε ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Διαταραχές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA στις αλληλουχίες των υποκινητών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αναστέλλουν τη μεταγραφή και συνεπώς την έκφραση τέτοιων γονιδίων κι επάγουν την κυτταρική αύξηση που οδηγεί σε νεοπλασία. Μάλιστα, η μεθυλίωση σε υποκινητές με νησίδια CpG μπορεί να παρατηρηθεί και στα αρχικά στάδια εξέλιξης του όγκου. Η CIMP συνυπάρχει με την MSI στις σποραδικές (μη κληρονομικές) περιπτώσεις ορθοκολικού καρκίνου που εμφανίζουν MSI, οι οποίες προκαλούνται από αδρανοποίηση του γονιδίου MLH-1 λόγω υπερμεθυλίωσης (όπως έχει ήδη αναφερθεί).

Για το συγκεκριμένο μηχανισμό καρκινογένεσης έχει εδραιωθεί η ορολογία CpG island methylator phenotype (CIMP). Με το πρότυπο αυτό μελετήθηκε ουσιαστικά ο βαθμός μεθυλίωσης σε όγκους ασθενών με CRC. Συγκεκριμένα, με τη χρήση οκτώ δεικτών, οι όγκοι του CRC ταξινομούνται σε τρεις υποομάδες, τη CIMP-low (CIMP-L), τη CIMP-high (CIMP-H) και τη CIMP-negative. Οι όγκοι CIN κατά κανόνα είναι MSS και CIMP low ή negative.

Συνήθως, οι παραπάνω διαταραχές μπορούν να συνδυαστούν και να καθορίσουν την εξέλιξη της νόσου. Οι διαταραχές αυτές είναι υπεύθυνες για τη μετατροπή των οδοντωτών αδενωμάτων σε καρκινώματα^{13,14}.

1.1.5 Κλινική εικόνα ασθενών

Συμπτώματα ορθοκολικού καρκίνου

Τα συμπτώματα είναι συχνότερα και εμφανίζονται σε πιο προχωρημένο στάδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπου η πρόγνωση είναι χειρότερη, ενώ είναι λιγότερο συχνά και εμφανή στις αρχές της νόσου.

A. Τα κοινά συμπτώματα είναι:

- κοιλιακός πόνος (συχνότητα 44%),
- αλλαγή στις συνήθειες του εντέρου (συχνότητα 43%),
- εντερορραγία (συχνότητα 40%),
- αδυναμία ή δυσφορία (συχνότητα 20%) και
- ακούσια απώλεια βάρους (συχνότητα 6%).

B. Τα λιγότερο κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν:

- ναυτία και έμετο,
- ανορεξία και
- κοιλιακή διάταση¹⁵.

Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη θέση του καρκίνου, το μέγεθος του καρκίνου και την παρουσία μεταστάσεων.

Οι καρκίνοι του αριστερού τμήματος του παχέος εντέρου είναι πιο πιθανό να προκαλέσουν μερική ή πλήρη εντερική απόφραξη, από τους καρκίνους του δεξιού παχέος εντέρου, επειδή ο αριστερός εντερικός αυλός είναι στενότερος και τείνει να περιέχει καλύτερα σχηματισμένα κόπρανα, λόγω της επαναπορρόφησης νερού στο εγγύς κόλον.

Η μερική απόφραξη προκαλεί δυσκοιλιότητα, ναυτία, κοιλιακή διάταση και κοιλιακό άλγος. Παραδόξως η μερική απόφραξη περιστασιακά προκαλεί διαλείπουσα διάρροια, καθώς τα κόπρανα κινούνται πέρα από το σημείο απόφραξης. Επίσης η εντερορραγία εμφανίζεται συχνότερα στους καρκίνους του αριστερού τμήματος ενώ οι όγκοι του δεξιού τμήματος παρουσιάζουν συχνότερα μικροσκοπική αιμορραγία (αναιμία) ¹⁶.

Ενδείξεις ορθοκολικού καρκίνου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου τείνει να μην εμφανίζει ενδείξεις έως ότου φτάσει σε προχωρημένο στάδιο. Η αναιμία από γαστρεντερική αιμορραγία μπορεί να προκαλέσει ωχρότητα δέρματος.

Η αναιμία λόγω ανεπάρκειας σιδήρου μπορεί να προκαλέσει κοιλονυχία, η οποία εκδηλώνεται με εύθραυστα, σχήματος κουταλιού νύχια, γλωσσίτιδα που εκδηλώνεται με διόγκωση και αλλαγή χρώματος της γλώσσας και χειλίτιδα, που εκδηλώνεται με πρήξιμο ή σχισμές στα χείλη.

Η υπολευκωματιναιμία μπορεί να εκδηλωθεί κλινικά ως περιφερικό οίδημα, ασκίτης ή οίδημα ανά σάρκα (διάχυτο πρήξιμο μαλακών ιστών κυρίως στο κάτω σωματικό μέρος). Οι ήχοι του εντέρου υποδηλώνουν γαστρεντερική απόφραξη.

Ένα σπάνιο εύρημα που υποδηλώνει προχωρημένη ασθένεια είναι μία ψηλαφητή κοιλιακή μάζα, ενώ όχι σπάνια, ο καρκίνος του ορθού μπορεί να είναι ψηλαφητός με δακτυλική ορθική εξέταση.

Άλλα φυσικά ευρήματα, αν και σπάνια, θα πρέπει να αναζητηθούν συστηματικά, συμπεριλαμβανομένου του ψηλαφητού λεμφαδένα του Virchow στον αριστερό υπερκλείδιο βόθρο, ηπατομεγαλία από ηπατικές μεταστάσεις και μεσοπλεύρια απώλεια μυών (καχεξία)¹⁵.

Εργαστηριακά ευρήματα

Οι ασθενείς που υποπτεύονται καρκίνο του παχέος εντέρου θα πρέπει να κάνουν εξετάσεις αίματος, συμπεριλαμβανομένου αιμοδιαγράμματος με προσδιορισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων, ηλεκτρολυτών ορού και γλυκόζης, αξιολόγηση των βιοχημικών παραμέτρων της ηπατικής λειτουργίας και δοκιμασία πήξης.

Περίπου οι μισοί από τους ασθενείς που έχουν καρκίνο του παχέος εντέρου είναι αναιμικοί¹⁷.

Η αναιμία, ωστόσο, είναι συχνό σύμπτωμα πολλών νοσημάτων, επομένως μόνο μια σχετικά μικρή ομάδα ασθενών που έχουν αναιμία, έχουν και καρκίνο του παχέος εντέρου. Ωστόσο, σε περίπτωση σιδηροπενικής αναιμίας απροσδιόριστης αιτίας, απαιτείται αξιολόγηση για καρκίνο του παχέος εντέρου, ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους¹⁸.

Οι συνήθεις βιοχημικές παράμετροι της ηπατικής λειτουργίας συνήθως βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων σε ασθενείς που έχουν καρκίνο του παχέος εντέρου.

Σε ηπατικές μεταστάσεις, ωστόσο, τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό και η αφυδρογονάση του γαλακτικού στον ορό μπορεί να αυξηθούν¹⁶.

Τα επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) στον ορό δεν είναι χρήσιμος δείκτης για την αναγνώριση CRC, λόγω ανεπαρκούς ευαισθησίας, ειδικά σε ασθενείς που έχουν πρώιμο και πολύ πιθανά θεραπεύσιμο καρκίνο του παχέος εντέρου.

Μετά από πλήρη εκτομή του καρκίνου του παχέος εντέρου, το επίπεδο CEA στον ορό σχεδόν πάντα ομαλοποιείται και η έλλειψη ομαλοποίησης μετεγχειρητικά υποδηλώνει ελλιπή εκτομή. Μια συνεχής και προοδευτική αύξηση μετά την μετεγχειρητική ομαλοποίηση υποδηλώνει έντονα την υποτροπή του καρκίνου¹⁹.

Οι ασθενείς που εμφανίζουν αυτό το εύρημα υποβάλλονται σε ταχεία κολονοσκόπηση επιτήρησης, με σκοπό να αποκλειστεί η πιθανότητα υποτροπής του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς και σε κοιλιακή απεικόνιση, για να αποκλειστούν πιθανές μεταστάσεις¹⁵.

Συμπερασματικά το CEA αποτελεί καθιερωμένο δείκτη παρακολούθησης της μετεγχειρητικής εξέλιξης της νόσου αλλά επίσης και της ανταπόκρισής του στην χημειοθεραπεία.

1.1.6 Διάγνωση

Κολονοσκόπηση

Η κολονοσκόπηση είναι μια εξαιρετικά ειδική εξέταση για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Κατά την κολονοσκόπηση, οι πολύποδες απομακρύνονται και υποβάλλονται σε βιοψία για ιστολογική διάγνωση. Ο πρώιμος καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να εμφανιστεί σε έναν αδενωματώδη πολύποδα και, επομένως, μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθεί με κολονοσκόπηση από έναν μη κακοήγη αδενωματώδη πολύποδα. Για παράδειγμα, ένα αδένωμα με πλάτος 2cm έχει πιθανότητα περίπου 40% να εξελιχθεί σε καρκίνωμα.

Οι παράγοντες κινδύνου για την εξέλιξη ενός πολύποδα σε καρκίνωμα περιλαμβάνουν το μεγάλο μέγεθος και τον αυξανόμενο αριθμό πολύποδων του παχέος εντέρου.

Ο προχωρημένος καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζεται συνήθως ως μια μεγάλη, εξωφυτική μάζα ή ως εντερική στένωση. Ωστόσο, μια στένωση στο παχύ έντερο μπορεί να είναι καλοήθης.

Υποψία κακοήθειας υπάρχει όταν μία στένωση του παχέος εντέρου είναι φλεγμονώδης, ασύμμετρη, εύθρυπτη και έχει ακανόνιστα ή εκτεταμένα όρια. Η εικόνα της κολλοσκοπησης είναι ενδεικτική αλλά όχι οριστική.

Η ιστολογική εξέταση πολλαπλών βιοψιών του παχέος εντέρου και η κυτταρολογική ανάλυση δειγμάτων στένωσης είναι συνήθως διαγνωστικές¹⁸.

Αξονική τομογραφία (CT)

Η CT είναι η συνήθης μέθοδος για την κοιλιακή απεικόνιση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Η CT είναι σχετικά ακριβής στην ανίχνευση ηπατικών μεταστάσεων, με ακρίβεια περίπου 85% και είναι πολύ πιο ευαίσθητη μέθοδος στην ανίχνευση μεγάλων από μικρών ηπατικών αλλοιώσεων²⁰.

Μαγνητική τομογραφία (MRI)

Η μαγνητική τομογραφία είναι πιο ακριβής από την CT στην ανίχνευση ηπατικών μεταστάσεων, ιδιαίτερα μικρών μεταστάσεων, από καρκίνο του παχέος εντέρου λόγω της έντονης αντίθεσης μεταξύ μεταστάσεων και του φυσιολογικού ήπατος στη μαγνητική τομογραφία²¹. Η χορήγηση παραγόντων αντίθεσης, όπως το υπερπαραμαγνητικό οξείδιο του σιδήρου, βελτιώνει περαιτέρω την ευαισθησία της εξέτασης.

Η μαγνητική τομογραφία είναι επίσης πιο ειδική για να διαφοροδιαγνώσει ηπατικές μεταστάσεις από ηπατικά αιμαγγειώματα ή/και κύστες. Παρά αυτά τα πλεονεκτήματα, η CT είναι η τυπική εξέταση, λόγω του χαμηλότερου κόστους, της μεγαλύτερης διαθεσιμότητας του μηχανήματος και της ευρύτερης διαθέσιμης εμπειρίας στην ερμηνεία της εικόνας.

Παραδοσιακά, η μαγνητική τομογραφία προορίζεται για τον χαρακτηρισμό διφορούμενων ηπατικών αλλοιώσεων, που ανιχνεύονται από κοιλιακό υπερηχογράφημα ή CT²².

Υπερηχογράφημα (Ultrasonography)

Το διορθικό υπερηχογράφημα (Transrectal ultrasound, TRUS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διακρίνει μεταξύ των επιπέδων του ορθικού τοιχώματος και έτσι να ανιχνεύσει το βάθος της διείσδυσης του όγκου και της περιφερικής εξάπλωσης.

Η τεχνική δεν περιλαμβάνει ιονίζουσα ακτινοβολία και είναι σχετικά φθηνή για να εκτελεστεί.

Ένας πρώιμος όγκος του κόλου εμφανίζεται συνήθως ως μάζα χαμηλής πυκνότητας με σαφώς περιγεγραμμένη σκίαση.

Άλλα ευρήματα περιλαμβάνουν εντοπισμένη πάχυνση του τοιχώματος του κόλου, ακανόνιστο περίγραμμα, έλλειψη φυσιολογικής περισταλτικότητας και απουσία φυσιολογικής εμφάνισης των επιπέδων του τοιχώματος του παχέος εντέρου²².

1.1.7 Αντιμετώπιση

Ενδοσκοπική θεραπεία

Ορισμένοι πρώιμοι καρκίνοι αντιμετωπίζονται μόνο με τοπική θεραπεία. Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των πρώιμων καρκίνων του παχέος εντέρου έχει αυξηθεί λόγω των προγραμμάτων screening για τον συγκεκριμένο καρκίνο.

Κατά τη διάγνωση, οι κακοήθεις πολύποδες πρέπει να αφαιρεθούν ενδοσκοπικά με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπεται η ακριβής αξιολόγηση των παραγόντων υψηλού κινδύνου (βάθος διήθησης, διαφοροποίηση, λεμφική διήθηση).

Η απόφαση για επικουρική χειρουργική επέμβαση με μεσεντερική λεμφαδενοκτομή είναι πρόκληση και εξαρτάται από τον εκτιμώμενο ογκολογικό και εγχειρητικό κίνδυνο και τις προτιμήσεις του ασθενούς²³.

Χειρουργική θεραπεία

Η χειρουργική επέμβαση είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπευτικής προσέγγισης για τον ορθοκολικό καρκίνο.

Η ποιότητα της εκτομής του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι ζωτικής σημασίας και μπορεί να εκτιμηθεί με αντικειμενικές παραμέτρους.

Μετεγχειρητικές μελέτες απεικόνισης έδειξαν ότι η χειρουργική ποιότητα θα μπορούσε να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω, τονίζοντας τη σημασία της εκπαίδευσης και της εξειδίκευσης των χειρουργών²⁴.

Η λαπαροσκοπική επέμβαση έχει γίνει η τυπική τεχνική για τον καρκίνο του κόλου σε πολλές χώρες παγκοσμίως, με αποδεδειγμένα βραχυπρόθεσμα οφέλη σε τυχαίοποιημένες μελέτες, καθώς και πληθυσμιακές μελέτες.

Η χειρουργική επέμβαση για τον καρκίνο του ορθού είναι πιο περίπλοκη, λόγω της περιορισμένης προσβασιμότητας και της περίπλοκης ανατομίας της λεκάνης.

Η ολική μεσοορθική εκτομή είναι η τυπική προσέγγιση για αντιμετώπιση του καρκίνου του ορθού, ενώ η περαιτέρω επέκταση της εκτομής (κοιλιοπερινεϊκή εκτομή με

μόνιμη κολοστομία) εξαρτάται από την εμπλοκή του εξωτερικού συμπλέγματος σφικτήρα και άλλων γειτονικών δομών.

Στον καρκίνο του ορθού, ο ρόλος της συμβατικής λαπαροσκοπικής χειρουργικής εξακολουθεί να συζητείται..

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως επείγον περιστατικό με απόφραξη ή διάτρηση. Η απόφραξη του παχέος εντέρου μπορεί να αντιμετωπιστεί με αποσυμπίεση μέσω προσωρινής κολοστομίας ή τοποθέτησης ενδοπροσθέσεων (stents), μετά τις οποίες η κατάσταση του ασθενούς μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά. Ακολουθεί σε επόμενο στάδιο η χειρουργική εκτομή του όγκου, εφόσον δε βρίσκεται σε ανεγχείρητο στάδιο²⁵.

Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία είναι μια θεραπεία που χρησιμοποιεί ακτίνες υψηλής ενέργειας (όπως ακτίνες Χ) ή σωματίδια για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων.

Χρησιμοποιείται συχνότερα για τη θεραπεία του καρκίνου του ορθού από τον καρκίνο του κόλου. Για ορισμένους καρκίνους του κόλου και του ορθού, η θεραπεία με χημειοθεραπεία ταυτόχρονα μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα της ακτινοθεραπείας.

Η χρήση αυτών των δύο θεραπειών ταυτόχρονα ονομάζεται χημειοακτινοθεραπεία. Η μείωση του κινδύνου που επιτυγχάνεται με προεγχειρητική ακτινοθεραπεία εξαρτάται από το κλινικό στάδιο και την ποιότητα της χειρουργικής επέμβασης.

Η μείωση του μεγέθους του όγκου επιτυγχάνεται στους περισσότερους ασθενείς και πλήρης ανταπόκριση, πλήρης εξαφάνιση του όγκου-στόχου και ολοκληρωτική θεραπεία, εμφανίζεται σε ποσοστό τουλάχιστον 15-20%. Το χρονικό διάστημα έως τη χειρουργική επέμβαση εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης, αλλά είναι γενικά 8-10 εβδομάδες ^{26,27}.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρατήρηση της πλήρους κλινικής ανταπόκρισης μετά τη χημειοακτινοθεραπεία, γνωστή ως στρατηγική παρακολούθησης και αναμονής (“watch and wait”), έχει θέσει τη βάση για θεραπευτικές προσεγγίσεις διατήρησης του ορθού, με παράλειψη ριζικής χειρουργικής επέμβασης αλλά ταυτόχρονα στενή παρακολούθηση²⁸.

Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία είναι θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα που μπορούν είτε να ενεθθούν, είτε να ληφθούν από το στόμα. Αυτά τα φάρμακα ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και φτάνουν στα περισσότερα μέρη του σώματος.

Οι τρέχουσες χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν:

- i) θεραπεία με χρήση ενός μόνο χημειοθεραπευτικού παράγοντα, η οποία βασίζεται κυρίως στην 5-φθοριοουρακίλη (5-FU) και
- ii) σχήματα πολλαπλών παραγόντων που περιέχουν ένα ή περισσότερα φάρμακα, όπως οξαλιπλατίνη (OX), ιρινοτεκάνη (IRI) και καπεσιταβίνη (CAP).

Παρόλο που οι μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι η θεραπεία με έναν παράγοντα δεν είναι λιγότερο αποτελεσματική από τα συνδυασμένα σχήματα όσον αφορά τη συνολική επιβίωση, τα συνδυασμένα σχήματα θεραπείας FOLFOX (5-FU + OX), FOXFIRI (5-FU + IRI) και CAPOX (CAP + OX) παραμένουν οι κύριες προσεγγίσεις στη θεραπεία πρώτης γραμμής, ενώ οι ασθενείς που ενέχουν χαμηλό κίνδυνο σταδιακής επιδείνωσης συνιστώνται να λαμβάνουν θεραπεία με έναν παράγοντα. Καθοριστικός παράγοντας για την απόφαση χορήγησης χημειοθεραπείας είναι το στάδιο της νόσου. Χημειοθεραπεία χορηγείται στα στάδια III και IV καθώς και σε ορισμένες περιπτώσεις του σταδίου II.

Κατά την επιλογή πρόσθετων παραγόντων, η αποτελεσματικότητα είναι παρόμοια, ενώ μόνο οι ανεπιθύμητες ενέργειες ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών θεραπειών.

Ωστόσο, η χημειοθεραπεία σχετίζεται με ορισμένους περιορισμούς, όπως,

- η συστηματική τοξικότητα,
- το μη ικανοποιητικό ποσοστό απόκρισης,
- η απρόβλεπτη έμφυτη και επίκτητη αντίσταση και
- η χαμηλή ειδικότητα έναντι του όγκου.

Ως εκ τούτου, είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων για τη βελτίωση ή ακόμη και την αντικατάσταση της υπάρχουσας χημειοθεραπείας για τον ορθοκολικό καρκίνο²⁹.

1.2 Τα miRNAs

1.2.1 Ορισμός miRNAs

Τη δεκαετία του 90, από πολλά εργαστήρια παρατηρήθηκε η παραγωγή μορίων RNA τα οποία δε διέθεταν κάποια από τις μέχρι τότε λειτουργίες που είχαν τα μόρια RNA που ήταν γνωστά μέχρι τότε, όπως για παράδειγμα η μετάφραση, η χρήση τους στην πρωτεϊνοσύνθεση ως μόρια tRNA, συστατικά των ριβοσωμάτων κλπ. Συγκεκριμένα, στην προνύμφη του *C. elegans* βρέθηκε ότι από το γονίδιο *lin-14*, το οποίο είχε συσχετιστεί με την ανάπτυξη των προνυμφών, παράγονται 2 μόρια RNA τα οποία δεν κωδικοποιούνταν σε πρωτεΐνη. Σε συνέχεια των μελετών, βρέθηκε ότι το μέγεθος του ενός μορίου αντιστοιχούσε σε 22 νουκλεοτίδια και του δεύτερου σε 61 νουκλεοτίδια, το οποίο φαίνεται να αποτελεί το πρόδρομο μόριο για το σχηματισμό του μικρότερου.

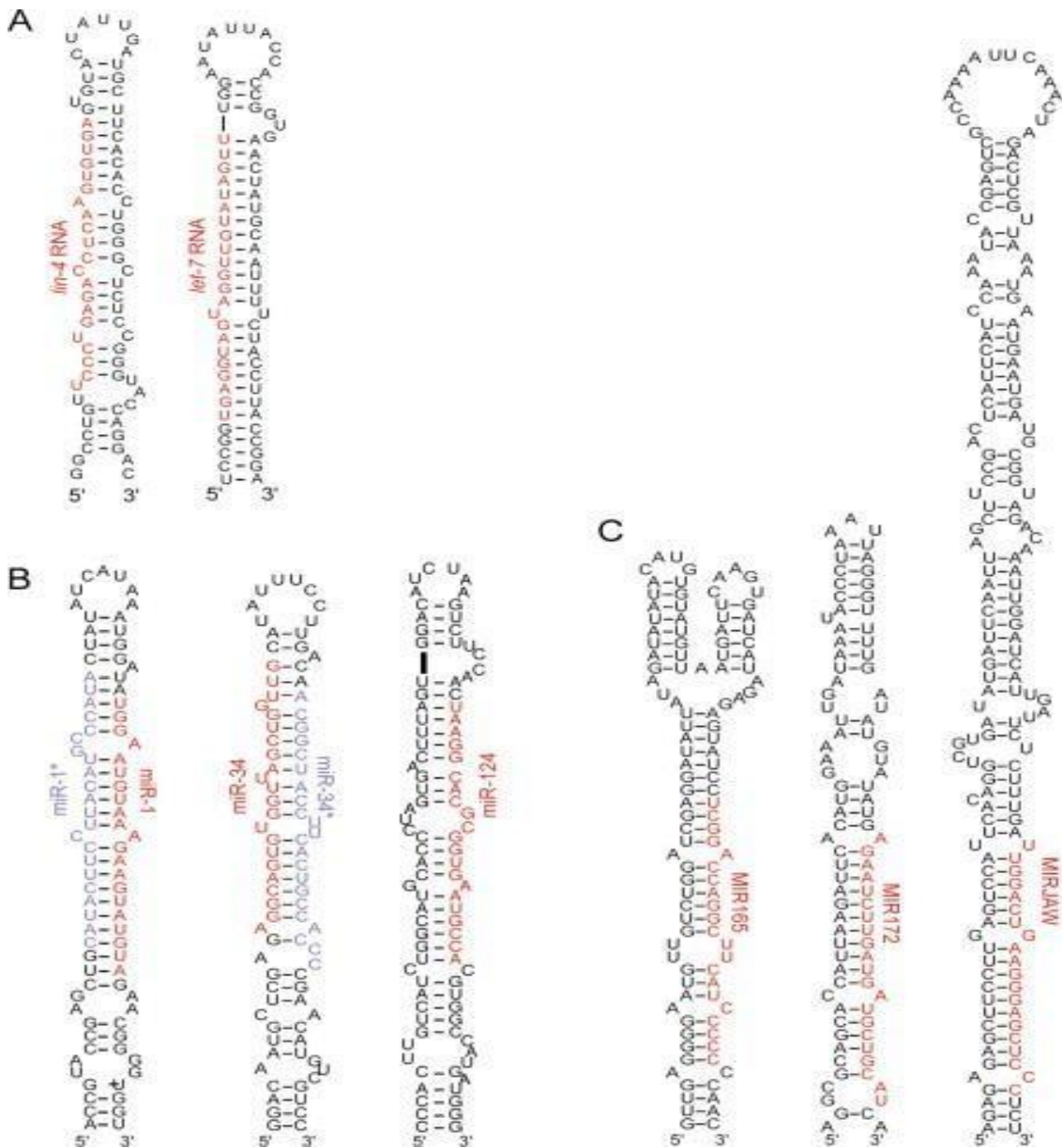
Σήμερα, το μόριο των 22 νουκλεοτιδίων αποτελεί το ιδρυτικό μέλος μιας κατηγορίας RNAs micro- RNAs (miRNAs, miRs). Τα miRNAs είναι μικρά, μη κωδικά μόρια RNA μήκους 20- 30 νουκλεοτιδίων που παράγονται από συγκεκριμένα γονίδια, τόσο στους ζωικούς, αλλά και στους φυτικούς οργανισμούς και στα σωματικά και στα γαμετικά κύτταρα. Ανήκουν στην κατηγορία των μικρών RNAs, μαζί με τα short interfering RNAs (siRNAs) και τα piwi-interacting RNAs (piRNAs). Δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών, δηλαδή τα μόρια αυτά δε μεταφράζονται από τα ριβοσώματα στο εσωτερικό του κυττάρου. Ωστόσο, τα μόρια και των 3 υποκατηγοριών διαθέτουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων και του γονιδιώματος. Συγκεκριμένα, ρυθμίζουν τη δομή χρωματίνης, το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση, τη διαδικασία της μεταγραφής και της επεξεργασίας του RNA, τη σταθερότητα των μορίων RNA καθώς και τη διαδικασία της μετάφρασης.³¹

1.2.2 Βιογένεση των miRNAs

Τα miRNAs παράγονται από ειδικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα του εκάστοτε οργανισμού με τη διαδικασία της μεταγραφής. Η πλειοψηφία των αλληλουχιών αυτών βρίσκεται αρκετά απομακρυσμένα σε σχέση με τα γονίδια του οργανισμού που κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Ένα μικρό ποσοστό ωστόσο παράγεται από ορισμένα ιντρόνια γονιδίων, τα οποία μέσω της διαδικασίας της συναρμογής αποκόπτονται από το πρόδρομο μόριο mRNA. Τα μόρια αυτά κατά προτίμηση έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με τα προβλεπόμενα

mRNAs, υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφή των περισσότερων από αυτά τα miRNA δεν ελέγχονται από τους δικούς τους υποκινητές αλλά από τους υποκινητές του γονιδίου. Συνήθως, η δράση του miRNA σχετίζεται άμεσα με το γονίδιο από το mRNA του οποίου αποκόπτεται, προσδίδοντας με τον τρόπο αυτό ρυθμιστικό ρόλο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τέλος, κάποια γονίδια που κωδικοποιούν μόρια miRNAs εντοπίζονται συσσωρευμένα σε περιοχές του γονιδιώματος, οδηγώντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι τα μόρια αυτά μεταγράφονται συντονισμένα και αποτελούν μέρος ενός κιστρονίου. Τα miRNAs, όπως όλα σχεδόν τα μόρια RNA σε έναν οργανισμό, εμφανίζουν τόσο ιστοειδικό, όσο και χρονικό πρότυπο έκφρασης και παραγωγής, καθώς και διαφορές όσον αφορά την ταχύτητα παραγωγής και αποδόμησης και τον αριθμό των αντιγράφων στο κύτταρο.^{31,32}

Τα μόρια που παράγονται κατά τη διαδικασία της μεταγραφής είναι πρόδρομα και καλούνται pri-miRNAs. Τα μόρια αυτά είναι πολύ μεγαλύτερα από τα τελικά μόρια των 20 νουκλεοτιδίων και φαίνεται να σχηματίζουν δομές βρόγχου αμέσως μετά την παραγωγή τους. Το πρόδρομο μόριο μπορεί να έχει μήκος έως και 1kb. Το ένζυμο που φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφή των γονιδίων των pri-miRNA είναι η DNA πολυμεράση II.³²



Εικόνα 8 Δομή βρόγχων πρόδρομου μορίου miRNA σε *C. elegans*, θηλαστικά και φυτά. Στην εικόνα φαίνονται διαφορετικοί βρόγχοι που παράγονται στα διάφορα μόρια, καθώς και με κόκκινο χρώμα η αλληλουχία του ώριμου miRNA. Πηγή: Bartel, D. P. (2004). *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell*, 116(2), 281-297.

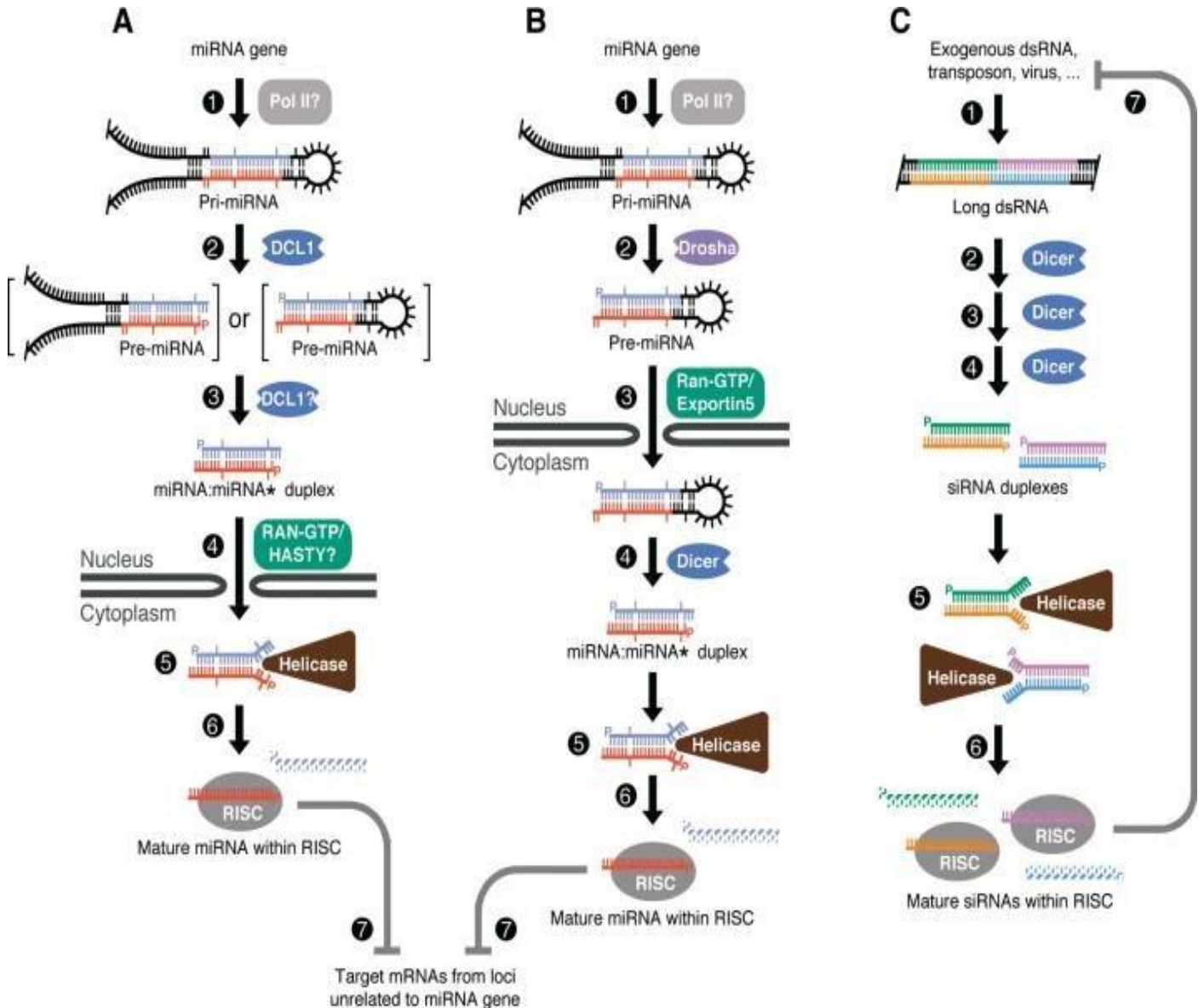
Αμέσως μετά την παραγωγή των μεταγράφων από τα γονίδια και τις αλληλουχίες του DNA, τα pri-miRNAs υπόκεινται στη διαδικασία της ωρίμανσης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε 2 στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το οποίο λαμβάνει χώρα στον πυρήνα αμέσως μετά τη μεταγραφή και περιλαμβάνει τη διάσπαση του pri-miRNA, και ελευθερώνει ένα ενδιάμεσο βρόγχο μεγέθους μεταξύ 60 και 70 νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι γνωστό ως πρόδρομο miRNA, ή το προ-miRNA. Η διαδικασία αυτή επιτελείται από τη δράση του

ενζύμου Drosha/DGCR8 το οποίο έχει ενεργότητα RNAσης III, δηλαδή δρα ως περιοριστική ενδονουκλεάση, αποκόπτοντας τα δυο άκρα του pri-miRNA, σε περιοχές κοντά στη δομή του βρόγχου. Η αλληλεπίδραση των DGCR8 με τα pri-miRNAs συμβαίνει μέσω της αναγνώρισης μιας δευτερεύουσας δομής φουρκέτας που πλαισιώνεται από μονόκλωνο RNA και οδηγεί σε διάσπαση από τον DGCR8 για την απελευθέρωση ενός προδρόμου φουρκέτας. Το μόριο αυτό, το οποίο έχει ένα ελεύθερο 5' άκρο και μια μονόκλωνη αλληλουχία 2-3 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο.³²

Μόλις ένα pri-miRNA υποβάλλεται σε επεξεργασία σε μια πρόδρομη φουρκέτα (pre-miRNA) στον πυρήνα, θα εξαχθεί μέσω ενεργούς μεταφοράς από τον πυρήνα στο κυτόπλασμα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Ran-GTP και του μεταφορέα Εξπορτίνη 5³³. Το μόριο στο κυτταρόπλασμα θα υποστεί το δεύτερο στάδιο τροποποίησης. Συγκεκριμένα, θα υποστεί τροποποιήσεις από το ένζυμο Dicer, το οποίο θα διασπάσει περαιτέρω το pre-miRNA. Το ένζυμο αυτό έχει μεγάλο εύρος αναγνώρισης μορίων καθώς μπορεί να διασπάσει δίκλινα μόρια RNA οποιουδήποτε μήκους, αρκεί να έχουν μια μονόκλωνη περιοχή 2 με 3 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους. Σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA, όπως η πρωτεΐνη PACT ή η TRBP που εντοπίζεται στον άνθρωπο, ρυθμίζει τη διαδικασία της ωρίμανσης αλλά και την αφθονία του συγκεκριμένου μορίου το κυτταρόπλασμα. Μετά τη δράση νουκλεάσης του Dicer, το pre-miRNA είναι πλέον ώριμο και έτοιμο να επιτελέσει τη διεργασία του.³⁴

Το ώριμο miRNA πλέον, δεν είναι ικανό να δράσει μόνο του και να επιτελέσει τις διάφορες διεργασίες για το οποίο είναι υπεύθυνο. Για το λόγο αυτό, προσδένεται σε ειδικές ριβοπρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (Argonauits, Ago). Πρόκειται για το περιοριστικό βήμα της διαδικασίας, καθώς η φόρτωση του miRNA στην πρωτεΐνη Αργοναύτη δεν είναι απλή και ακολουθεί μια σειρά από βήματα που απαιτούν βοήθεια από άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των συνοδών και ενέργειας από το ATP. Όπως με κάθε άλλο στάδιο της βιογένεσης του miRNA, η φόρτωση του miRNA μπορεί επίσης να επηρεαστεί από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του δίκλωνου μορίου miRNA, όπως η παρουσία φωσφορικής ομάδας στο 5' άκρο, η ταυτότητα του τελευταίου νουκλεοτιδίου και η σταθερότητα του δίκλωνου μορίου. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθορίζουν επίσης ποιος από τους δύο κλώνους φορτώνεται κατά προτίμηση στον Αργοναύτη και λειτουργεί ως ώριμο miRNA, ενώ ο αντιπαράλληλος κλώνος, ή miRNA *, συνήθως αποδομείται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Το σύμπλοκο του miRNA με την πρωτεΐνη Αργοναύτη αποκαλείται RNA-

Induced Silencing Complex (RISC) και είναι έτοιμο πλέον να επιτελέσει τη λειτουργία του.



34

Εικόνα 9 Βιογένεση των miRNAs, ωρίμανση και δέσμευση στο σύμπλοκο RISC. Πηγή: Bartel, D. P. (2004). *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell*, 116(2), 281-297.

1.2.3 Τρόπος δράσης και λειτουργία των miRNAs

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η δράση των miRNAs στο κύτταρο έχει ρυθμιστικό ρόλο. Οι κύριες διεργασίες που επιτελούν αφορούν την αναστολή της μετάφρασης, είτε μέσω της καταστροφής του ώριμου mRNA που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, είτε μέσω της εμπόδισης της μετάφρασης του εκάστοτε μορίου. Συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση του miRNA στο σύμπλοκο RISC, το miRNA προσδέεται σε ένα μόριο RNA με βάση

τον κανόνα της Συμπληρωματικότητας των Βάσεων. Αν η αλληλουχία του miRNA ταιριάζει απόλυτα με κάποιο τμήμα της αλληλουχίας του RNA, τότε το σύμπλοκο επάγει την καταστροφή του RNA διασπώντας το σε μικρότερα τμήματα τα οποία δεν είναι λειτουργικά. Αν δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικά τα τμήματα, το μόριο δεν πέπτεται, αλλά παραμένει συνδεδεμένο με το σύμπλοκο λόγω μεγάλου ποσοστού συμπληρωματικότητας. Ως αποτέλεσμα, το μόριο RNA δε μπορεί να είναι λειτουργικό για το κύτταρο εφόσον το σύμπλοκο RISC βρίσκεται προσδεμένο πάνω του, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να προσδεθεί κάποιο ριβόσωμα και να παράξει την πρωτεΐνη που αυτό κωδικοποιεί. Σχεδόν όλα τα miRNAs που έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής είναι συμπληρωματικά με αλληλουχίες που εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του mRNA, περιοχή απαραίτητη για τη μετάφραση του mRNA, ενώ έχουν βρεθεί και αλληλεπιδράσεις miRNAs με υποκινητές γονιδίων, 5'UTRs ή κωδικές αλληλουχίες του mRNA. Ένα μόριο miRNA μπορεί να στοχεύει περισσότερα από ένα μόρια RNA, καθώς στις αμετάφραστες περιοχές και στις περιοχές των υποκινητών που προσδέονται εντοπίζονται συχνά οι ίδιες αλληλουχίες. Επιπλέον, η δράση των miRNAs μπορεί να αλλάξει αν ληφθεί υπόψη η στοιχειομετρία των μορίων RNA στο κύτταρο, αλλά και στα διάφορα διαμερίσματα. Με τον τρόπο αυτό, μόρια miRNA μπορούν να κυκλοφορούν μεταξύ διαφόρων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων (π.χ. πυρήνας, κυτταρόπλασμα και μιτοχόνδρια) υπό συνθήκες στρες (π.χ. νηστεία ή υποξία), τροποποιώντας έτσι είτε τους ρυθμούς μεταγραφής και μετάφρασης των mRNA- στόχων εντός συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων ή ακόμα και να εκκρίνονται από το κύτταρο και να δρουν ως παρακρινείς παράγοντες που μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων.³⁵

1.2.4 Φυσιολογία και συσχέτιση με ασθένειες

Τα miRNAs αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση, την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί από την εποχή της ανακάλυψής τους, σχετίζουν τα miRNAs με ένα μεγάλο εύρος βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης, της οργανογένεσης και της αντιμετώπισης λοιμώξεων, κυρίως ιικών. Παράλληλα, τα miRNAs έχουν σχετιστεί και με καταστάσεις παθοφυσιολογίας, όπως η μυϊκή δυσλειτουργία, η διαταραχή στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, διαταραχές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και την εμφάνιση μεταβολικών και καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς και καρκίνου.^{36,37}

Τα miRNAs στην ανάπτυξη

Το πρώτο miRNA που ανακαλύφθηκε από τους ερευνητές ήταν το *lin-4* στο *C. elegans*. Το miRNA αυτό προσδένεται στην 3' UTR του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LIN-14, καταστέλλοντας τη μετάφραση του mRNA και τελικά την παραγωγή της πρωτεΐνης, στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης της προνύμφης του *C. elegans*. Η καταστολή της παραγωγής της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σηματοδοτεί τη μετάβαση της ανάπτυξης της προνύμφης από το πρώτο στάδιο στο δεύτερο, μέσω αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα της προνύμφης και επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση. Σε επόμενες μελέτες, ανακαλύφθηκε μια ομάδα miRNAs, η οικογένεια των let-7 miRNAs, τα οποία επάγουν με παρόμοιο τρόπο με το *lin-4* τη μετάβαση από το δεύτερο στάδιο της ανάπτυξης της προνύμφης, στο τελικό στάδιο του ενήλικου ατόμου σε *C. elegans*.³²

Τα δεδομένα αυτά έδωσαν το έναυσμα στους ερευνητές για την αποσαφήνιση του ρόλου των διαφόρων miRNAs καθώς και της διαφορικής τους έκφρασης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού, από το σχηματισμό του εμβρύου μέχρι την ενήλικη ζωή. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι η παραγωγή των miRNAs διαφέρει σημαντικά τόσο μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων, ή των προγονικών κυττάρων τα οποία θα διαφοροποιηθούν στον τελικό ιστό, όσο και στο χρονικό περιθώριο στο οποίο τα επίπεδά τους είναι αυξημένα. Για παράδειγμα, miRNAs τα οποία διαθέτουν καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό των διαφόρων ειδών ιστών και οργάνων είναι ανενεργά στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, ενώ η έκφρασή τους αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής δραστηριότητας και διαφέρει μεταξύ των κυττάρων που θα οδηγήσουν στη δημιουργία διαφορετικών ιστών. Η έκφραση των miRNAs πραγματοποιείται σε συγκεκριμένους ιστούς και όργανα καθώς και σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης του οργανισμού, αλλά και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές όπου επιτελείται μια διεργασία και οδηγούν στην καταστολή της παραγωγής πρωτεϊνών απαραίτητων για τις αναπτυξιακές δραστηριότητες του κάθε κυττάρου και ιστού.⁶ Παραδείγματα που υποδεικνύουν το ρόλο των miRNAs στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση αποτελούν η διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων με τη δράση των miR-150, miR-17, miR-20a και miR-106a, η διαφοροποίηση των μυοβλαστών στους διαφόρους τύπους μυϊκού κυττάρου με τη δράση του miR-1. Τέλος η συσχέτιση της δημιουργίας των πνευμόνων με την έκφραση των miR-

154 και miR- 335 υποδεικνύουν ότι η έκφραση των miRNAs είναι απαραίτητη για τη διαδικασία του σχηματισμού των οργάνων και του σωματικού προτύπου. ³⁷

Τα miRNAs στο μεταβολισμό

Εκτενείς μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποσαφήνιση του ρόλου των miRNAs σε διάφορα στάδια των μεταβολικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, τα miRNAs miR-9 και miR-375 παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στον οργανισμό, καθώς υπερέκφρασή τους οδηγεί σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και ως αποτέλεσμα μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα. Επιπλέον, το miR- 122 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά το γονίδιο του ενζύμου 3- υδρόξυ- 3- μεθυλγλουταρικού οξέος, καθιστώντας το ένα θετικό ρυθμιστή στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Η καταστολή έκφρασης του miR-122 στο ήπαρ των ανθρώπων πιστεύεται ότι θα μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στους ανθρώπους για την καταπολέμηση των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης και λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς και την αποτροπή εμφάνισης μεταβολικών νοσημάτων όπως η στεάτωση του ήπατος και το λιπώδες ήπαρ, την υπερχοληστερολαιμία και το μεταβολικό σύνδρομο. Τέλος, τα miRNAs συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των κυττάρων του λιπώδους ιστού, καθώς το miR- 143 το οποίο ρυθμίζει το γονίδιο ERK5 παρουσιάζεται αυξημένο κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, ενώ απουσία του προκαλεί διαταραχές στην δημιουργία διαφοροποιημένου λιπώδους ιστού, γεγονός που προκαλεί προβλήματα υγείας. ³⁷

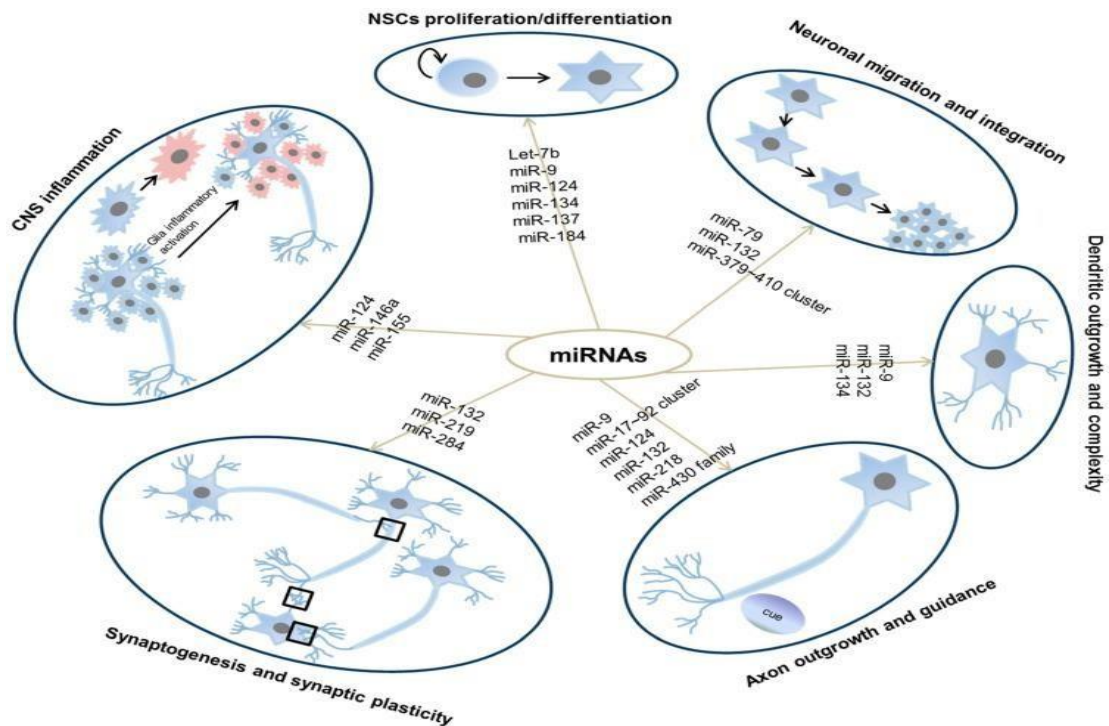
Τα miRNAs των ιών

Έχουν βρεθεί μόρια miRNAs σε ποικίλα είδη ιών, όπως ο Epstein–Barr virus (EBV), ο ερπητοϊός που σχετίζεται με σάρκωμα Kaposi, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός καθώς και σε άλλα είδη ερπητοϊών. Τα μόρια miRNAs παράγονται από το γονιδίωμα του ιού, ωστόσο δε φαίνεται να έχει την ίδια δράση στον ιό καθαυτό, όπως συμβαίνει στους υπόλοιπους οργανισμούς. Το ιικό miRNA πιθανά να μη ρυθμίζει ενδογενώς την έκφραση γονιδίων, αλλά να είναι απαραίτητο για μακροχρόνιες λοιμώξεις οι οποίες βρίσκονταν για καιρό σε λανθάνουσα φάση. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι τα miRNAs των ιών αποτελούν απαραίτητα μόρια για την αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και ιού. ³⁷

Τα miRNAs στο ΚΝΣ

Η δημιουργία και η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στους οργανισμούς και ιδιαίτερα στα θηλαστικά είναι μια διαδικασία αρκετά σημαντική για την ανάπτυξη του οργανισμού, η οποία πραγματοποιείται μέσω συντονισμένων διεργασιών στα προγονικά νευρικά κύτταρα του οργανισμού και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή μεταγραφικών δικτύων, αλλαγών στην κυτταρική σηματοδότηση και δομική οργάνωση. Τα miRNAs συμμετέχουν ενεργά και σε αυτή τη διαδικασία. Η παραγωγή miRNAs στον εγκέφαλο είναι μεγάλη, ενώ εντοπίζεται ιστοειδική και χρονική ρύθμιση τους για την παραγωγή του κατάλληλου πρότυπου έκφρασης και τη σωστή τελική ανάπτυξη του εγκεφάλου. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από νευροεπιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα της ακτινωτής γλοίας παράγουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο miRNAs το καθένα, με σκοπό τη δημιουργία των κατάλληλων δομών και κυττάρων του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, τα miR-134 και miR-184 συμβάλλουν στη διατήρηση της πολυδυναμίας των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό, ενώ τα miRNAs της οικογένειας let-7 (let-7a/let-7b), miR-9, miR-137 και miR-124 συμμετέχουν στη διαφοροποίηση. Η ομάδα miR379-410 είναι υπεύθυνη για τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και το σχηματισμό του εγκεφαλικού φλοιού. Επιπλέον, ποικιλία miRNAs συμβάλλουν ενεργά στη δημιουργία δενδριτών και την αύξηση των νευραξόνων, έτσι ώστε να καταλήξουν στο σωστό σημείο, στη δημιουργία συνάψεων και τη συναπτική πλαστικότητα, καθώς και στην ανάπτυξη των κυττάρων της μικρογλοίας, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανοσοαπόκριση στο ΚΝΣ.³⁸

Δυσλειτουργία κάποιου ή κάποιων μορίων miRNAs μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νευρολογικών διαταραχών. Συγκεκριμένα, οι ασθένειες αυτές διακρίνονται σε νευροαναπτυξιακές, όπως ο αυτισμός και το σύνδρομο Rett, νευροψυχιατρικές, όπως κατάθλιψη και σχιζοφρένεια και νευροεκφυλιστικές όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, η ασθένεια Huntington κλπ.³⁸



Εικόνα 10 Πρότυπα έκφρασης miRNAs στις διάφορες κατηγορίες κυττάρων του εγκεφάλου και διαδικασίες στις οποίες συμβάλλουν. Πηγή: Cao, D. D., Li, L., & Chan, W. Y. (2016). *MicroRNAs: key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases*.

Τα miRNAs στο καρδιαγγειακό σύστημα

Τα miRNAs φαίνεται να συμμετέχουν στη δημιουργία και τη σωστή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς σε παθολογικές καταστάσεις εντοπίζεται απορρύθμιση τους. Συγκεκριμένα, σε καταστάσεις όπως η υπερτροφία, στο καρδιακό έμφραγμα, στην αθηροσκλήρωση και τη στεφανιαία νόσο. Πολλά miRNA έχουν αναφερθεί ότι εμπλέκονται σε όλα τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, συμπεριλαμβανομένης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, των αγγειακών κυττάρων λείου μυός και την ενεργοποίηση μονοκυττάρων. Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια που επηρεάζει την ικανότητα της καρδιάς να γεμίζει και να εξάγει σωστά το αίμα από τις κοιλίες. Αρκετά miRNA έχουν ανακαλυφθεί να συμβάλουν στην καρδιακή ανεπάρκεια, με πιο γνωστό το miR-665. Το miR320 ελέγχει την καρδιακή λιποτοξικότητα σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη. Τα miR340-5p, miR-34a-5p και miR-320 εμφανίζουν υπερέκφραση στην καρδιά ασθενών με διαβήτη τύπου II που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια. Αρκετά μέλη της οικογένειας miRNA let-7 έχει

αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων. Για παράδειγμα, το miRNA let-7i εμφανίζει διαταραχή στην έκφραση σε καταστάσεις διατατικής καρδιομυοπάθειας και στεφανιαίας νόσου, ενώ τα miRNAs let-7b και let-7d σχετίζεται με την εμφάνιση αθηρωματικής πλάκας σε ασθενείς με διαβήτη. Τέλος, το let-7i φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την παθολογία του καρδιαγγειακού συστήματος³⁹.

1.2.5. Τα miRNAs στον καρκίνο

Η συμβολή των miRNAs, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, συμβάλλει σε μια ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών υπεύθυνων για τη διεκπεραίωση σημαντικών διεργασιών, ενώ η απορρύθμισή τους οδηγεί στην εμφάνιση μεγάλου αριθμού ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η μελέτη του ρόλου των miRNAs στον καρκίνο έχει αναδυθεί τα τελευταία χρόνια, ενώ οι ερευνητές θεωρούν ότι τα μόρια αυτά θα είναι πιθανοί στόχοι τόσο για την πρόβλεψη, όσο και για τη θεραπεία του. Τα πρώτα μόρια miRNA που εντοπίστηκαν σε κάποια μορφή καρκίνου ήταν τα miR-15a και miR-16-1. Τα μόρια αυτά εντοπίστηκαν απορρυθμισμένα σε δείγματα ασθενών που έπασχαν από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL). Σε επόμενες μελέτες, βρέθηκε ότι το miR-155 αποτελεί μόριο το οποίο έχει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου, αποδεικνύοντας οριστικά τον θεμελιώδη ρόλο που διαδραματίζουν αυτά τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA στην ανάπτυξη καρκίνου. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα miRNAs ρυθμίζουν πολλές διεργασίες σχετικές με τον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διήθησης, καθώς η ικανότητά τους να στοχεύουν έως και αρκετές εκατοντάδες μόρια mRNAs υποστηρίζει την ιδέα ότι η απορρύθμιση στην έκφραση ενός miRNA μπορεί να διαταράξει ένα πλήθος οδών σηματοδότησης στο κύτταρο και να επηρεάσει βαθιά την εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου. Μεγάλος αριθμός μελετών έχουν αποδείξει ότι αλλαγές στο προφίλ έκφρασης των miRNAs μπορούν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη τόσο της εμφάνισης, όσο και της θεραπείας, αλλά και την απόκριση στα διάφορα φάρμακα για τη θεραπεία, καθώς η απορρύθμιση ορισμένων μορίων miRNAs φαίνεται να οδηγούν σε αντίσταση σε διάφορες θεραπείες.⁴⁰

Μόρια miRNAs μπορούν να έχουν προστατευτικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων, καταστέλλοντας τη δράση γονιδίων που επάγουν την εμφάνιση καρκίνου, όπως τα γονίδια Ras, Myc και HmgA2. Τα γονίδια αυτά καλούνται ογκογονίδια, έχουν δηλαδή την ικανότητα να επάγουν την εμφάνιση καρκίνου, μέσω της παραγωγής πρωτεϊνών που

επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των κυττάρων. Η ανώμαλη έκφραση των γονιδίων αυτών που προκαλείται συνήθως από μεταλλάξεις στα γονίδια τους οδηγεί στην καρκινογένεση. Τα miRNAs που στοχεύουν τα προϊόντα έκφρασης των γονιδίων αυτών, καταστρέφουν τα διαθέσιμα μόρια στο κύτταρο, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των γονιδίων, διατηρώντας τα επίπεδα στα φυσιολογικά όρια κι αποτρέποντας την εμφάνιση των δυσμενών συνεπειών. Τα miRNAs που έχουν βρεθεί να συμβάλουν στην καταστολή της έκφρασης των ογκογονιδίων είναι τα miR-15a και miR16-1, τα miRNAs της οικογένειας miR-34, τα miRNAs της οικογένειας τα miRNAs της οικογένειας miR-200 και τα miRNAs της οικογένειας let- 7. ⁴⁰

Τα miRNAs μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην έναρξη και την πρόοδο των καρκίνων. Για παράδειγμα, το miR-21 είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα miRNA που ρυθμίζονται με τον καρκίνο. Υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους συμπαγών όγκων, όπως στο μαστό, στις ωοθήκες, στον τράχηλο, στο κόλον, στον πνεύμονα, στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στον οισοφάγο, στον προστάτη, στο πάγκρεας και στο θυρεοειδή αδένα, ενώ θεωρείται ότι συμμετέχει και στον μηχανισμό εμφάνισης λευχαιμιών. Το miR-21 καταστέλλει την έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και ονομάζονται ογκοκατασταλτικές. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παράγουν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν αρνητικά τις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και αύξησης των κυττάρων, με αποτέλεσμα να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ της ενεργοποίησης και της απενεργοποίησης των σηματοδοτικών οδών και μηχανισμών συντήρησης των κυττάρων. Το miR-21 συγκεκριμένα, ρυθμίζει τον παράγοντα αγγειογένεσης PTEN, τις πρωτεΐνες SPRY1 και 2, RECK και PDCD4 οι οποίες συμβάλλουν σε βασικά βήματα της ογκογένεσης, της διήθησης και της μετάστασης. Τα miR-221/222 ελέγχουν πρωτεΐνες όπως η Kip1, ο Bcl-2, ο PTEN, ο αναστολέας μεταλλοπρωτεΐνάσης 3 (TIMP3), το FOXO3, το PUMA και ο υποδοχέας οιστρογόνου-άλφα, ER-α, οι οποίες συμμετέχουν στους μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της απόπτωσης. Απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs και κατ' επέκταση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι παραπάνω πρωτεΐνες οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου όπως γλοιοβλάστωμα, καρκινώματα θηλοειδών θυρεοειδούς, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνος του μαστού, του προστάτη και του παγκρέατος. ⁴⁰

Τέλος, μια άλλη οικογένεια ογκογονικών miRNAs είναι η οικογένεια miR-17-92, η οποία αποτελείται από τα miR-17, miR-18a, miR-19a , miR-20a, miR-19b-1 και miR-92a. Η

πρώτη συσχέτιση αυτής της οικογένειας με τον καρκίνο αποδείχθηκε σε λεμφώματα Β κυττάρων, ενώ η απορρύθμιση αυτών των miRNAs και οι στόχοι τους έχουν περιγραφεί σε συμπαγείς όγκους όπως, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του παχέος εντέρου, νευροβλαστώματα, μυελόβλαστωμα και καρκίνος του στομάχου. ⁴⁰

Η καθολική υπομεθυλίωση είναι μια συχνή επιγενετική τροποποίηση που παρατηρείται σε διάφορους όγκους. Οι ερευνητές έχουν αναφέρει υπομεθυλίωση πολλών σημαντικών ομάδων miRNA γεγονός που οδηγεί στην επανενεργοποίηση των αντίστοιχων miRNAs. ενώ η υπερμεθυλίωση DNA για συγκεκριμένες περιοχές των σχετιζόμενων με τον υποκινητή νησιδίων CpG που οδηγεί σε σίγαση των ογκοκατασταλτικών miRNA που καταστέλλουν τον όγκο είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών ανθρώπινων καρκίνων.

Αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης μπορούν να οδηγήσουν σε απορρυθμισμένη έκφραση όλων των γονιδίων στόχων που ελέγχονται από τα μόρια miRNAs που τροποποιούνται. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση της αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί μόρια miRNAs αποτελεί κύριο μηχανισμό υπεύθυνο για την απορρύθμιση του miRNA κατά την ανάπτυξη όγκου. Επιπλέον, οι τροποποιήσεις στις ιστόνες του γονιδίου είναι πιθανό να εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των miRNAs. ⁴⁰

1.3 Βιοδείκτες στον CRC

1.3.1 Ορισμός βιοδεικτών και χρήση τους σε κλινικό επίπεδο

Ως βιοδείκτες καλούνται μια ευρεία υποκατηγορία ιατρικών στοιχείων τα οποία αποτελούν αντικειμενικές ενδείξεις μιας συγκεκριμένης ιατρικής κατάστασης. Πρόκειται για στοιχεία τα οποία μπορούν να απομονωθούν από τον ασθενή και να αναλυθούν με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Η χρήση των βιοδεικτών σε κλινικό επίπεδο είναι ένα αναδυόμενο κομμάτι της έρευνας σήμερα, καθώς η ύπαρξη τους φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα στην πρόγνωση και τη διάγνωση ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, στα πρώιμα στάδια της νόσου. Η ύπαρξη βιοδεικτών είναι πολλά υποσχόμενη σε σχέση με τη μέχρι τώρα κλινική διάγνωση, η οποία βασίζεται στην ανάλυση ιατρικών συμπτωμάτων, τα οποία περιορίζονται σε ενδείξεις υγείας ή ασθένειας τις οποίες αντιλαμβάνονται οι ίδιοι οι ασθενείς και συνεπώς δεν εμφανίζουν αντικειμενικότητα. Υπάρχουν αρκετοί ακριβέστεροι ορισμοί των βιοδεικτών στη βιβλιογραφία τα οποία αλληλοεπικαλύπτονται σημαντικά. Το 1998, το National Institutes of Health

Biomarkers Definitions Working Group όρισε την έννοια των βιοδεικτών ως «ένα χαρακτηριστικό που μετράται αντικειμενικά και αξιολογείται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθογόνων διεργασιών ή φαρμακολογικών απαντήσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση». Στη συνέχεια, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει δηλώσει ότι ο ολοκληρωμένος ορισμός των βιοδεικτών περιλαμβάνει «σχεδόν κάθε μέτρηση που αντανακλά μια αλληλεπίδραση μεταξύ ενός βιολογικού συστήματος και ενός δυνητικού κινδύνου, που μπορεί να είναι χημικός, φυσικός ή βιολογικός».

Παραδείγματα βιοδεικτών σε κλινικό επίπεδο μπορούν να αποτελέσουν τα πάντα, από τη μέτρηση των παλμών της καρδιάς και της αρτηριακής πίεσης, έως και τις γνωστές σε όλους εξετάσεις αίματος, βιοχημικές, μικροβιολογικές κλπ. Οι τιμές έχουν οριστεί από ένα μεγάλο αριθμό ατόμων που δεν πάσχουν από κάποιο νόσημα και οι τιμές τους θεωρούνται φυσιολογικές. Αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα τέτοιων βιοδεικτών υποδεικνύουν κάποια διαταραχή ή και την ύπαρξη παθολογικής κατάστασης που δεν είναι διακριτές από τη μελέτη των ιατρικών συμπτωμάτων του ασθενούς μόνο. Η χρήση βιοδεικτών, και ιδίως βιοδεικτών εργαστηριακών μετρήσεων, στην κλινική έρευνα είναι πολύ πρόσφατη και οι βέλτιστες προσεγγίσεις αυτής της πρακτικής βρίσκονται ακόμη σε στάδιο ανάπτυξης. Το βασικό ζήτημα είναι ο προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ κάθε δεδομένου μετρήσιμου βιοδείκτη και σχετικών κλινικών τελικών σημείων.

Η χρήση των βιοδεικτών σε κλινικές δοκιμές πραγματοποιείται μέσω της υποκατάστασής τους ως τελικά σημεία. Τα επίπεδα ενός βιοδείκτη είναι αυτά που υποδηλώνουν το στάδιο της ασθένειας και τη σοβαρότητά της και θα καθορίσουν ποια είναι τα τελικά σημεία της κάθε έρευνας. Όμως, δεν είναι όλοι οι βιοδείκτες υποκατάστατα τελικά σημεία, ούτε προορίζονται όλοι να είναι. Για να θεωρηθεί ένα υποκατάστατο τελικό σημείο, πρέπει να υπάρχουν σταθερές επιστημονικές ενδείξεις όπως επιδημιολογικές, θεραπευτικές ή / και παθοφυσιολογικές, ότι ένας βιοδείκτης προβλέπει με συνέπεια και ακρίβεια ένα κλινικό αποτέλεσμα, είτε ένα όφελος είτε μια βλάβη.

Επίσης, είναι απαραίτητη η μελέτη του οποιουδήποτε βιοδείκτη όσον αφορά τη φυσιολογική του δράση στον οργανισμό, καθώς και η αλληλεπίδρασή του με άλλες, ανεξάρτητες από την εμφάνιση της νόσου διεργασίες στον οργανισμό. Ορισμένοι βιοδείκτες πιθανά να σχετίζονται με κλινικά τελικά σημεία υπό περιορισμένες μόνο συνθήκες, δηλαδή, μπορεί να εμπλέκονται σε μια ποικιλία πολλαπλών αλληλένδετων ασθενειών, ή οι

βιοδείκτες μπορεί να είναι έμμεσα σημάδια μιας οδού που δεν είναι θεμελιώδους σημασίας για τις βασικές διαδικασίες της νόσου.

Εκτός από τη χρήση τους στη διάγνωση και την πρόγνωση, οι βιοδείκτες αποτελούν και σημαντικά στοιχεία για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Υπάρχουν ορισμένα πλεονεκτήματα στη χρήση βιοδεικτών ως υποκατάστατων τελικών σημείων σε δοκιμές. Οι βιοδείκτες μπορούν να παρέχουν στους ερευνητές ενδιάμεσα στοιχεία σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα θεραπειών, ενώ συλλέγονται πιο εύκολα και με ακρίβεια κλινικά δεδομένα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται καθιερωμένοι βιοδείκτες ως υποκατάστατα τελικά σημεία για να μειωθεί ο κίνδυνος βλάβης σε άτομα καθώς τα πρώιμα δεδομένα που παρέχονται από τους βιοδείκτες μπορούν να επιτρέψουν στους ερευνητές να σταματήσουν τις παρεμβάσεις που είναι δυνητικά επιβλαβείς για τα άτομα. Σε άλλες περιπτώσεις, οι βιοδείκτες μπορούν απλά να επιτρέψουν στους ερευνητές να σχεδιάσουν μικρότερες, πιο αποτελεσματικές μελέτες, μειώνοντας τον αριθμό των ατόμων που εκτίθενται σε μια δεδομένη πειραματική θεραπεία.

Ο προσδιορισμός των βιοδεικτών απαιτεί τον προσδιορισμό της συνάφειας και της εγκυρότητας. Η συνάφεια αναφέρεται στην ικανότητα ενός βιοδείκτη να παρέχει κατάλληλες κλινικές σχετικές πληροφορίες. Η εγκυρότητα αναφέρεται στην ανάγκη χαρακτηρισμού της αποτελεσματικότητας ή της χρησιμότητας ενός βιοδείκτη ως υποκατάστατου τελικού σημείου. Η εγκυρότητα συνήθως εντοπίζεται σε ένα φάσμα και δεν είναι απόλυτη.⁴¹

1.3.2 Καρκινικοί δείκτες

Ως καρκινικοί δείκτες ορίζονται τα μόρια του κυττάρου, των οποίων το πρότυπο έκφρασης εμφανίζεται διαφορετικό μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, αποτελώντας χρήσιμα εργαλεία διάγνωσης καρκίνου, αλλά και πρόγνωσης της έκβασης της νόσου. Πρόκειται για μόρια DNA, RNA και πρωτεϊνών που αυξάνονται ή μειώνονται κι εντοπίζονται στον ίδιο τον καρκινικό ιστό, μετά από βιοψία, ή στο αίμα ως ελεύθερα μόρια ή σε μορφή εξωσωμάτων. Τα μόρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο σε ασθενείς για την αποσαφήνιση της κατάστασής τους.

Οι καρκινικοί δείκτες κατηγοριοποιούνται σε 3 βασικές ομάδες: τους διαγνωστικούς, τους προγνωστικούς και τους προβλεπτικούς. Κάθε ομάδα δεικτών διαθέτει διαφορετικό ρόλο σε κλινικό επίπεδο. Όσον αφορά τους διαγνωστικούς δείκτες, πρόκειται για μόρια τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον υγίη και συνήθως με συνδυασμό κλινικών ευρημάτων συμβάλλουν στη διάγνωση του τύπου καρκίνου. Οι προγνωστικοί δείκτες εντοπίζονται σε μεταγενέστερο στάδιο, κι εφόσον έχει γίνει ήδη η διάγνωση καρκίνου και αφορά μέτρο της πρόγνωσης της έκβασης της νόσου στον ασθενή. Αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης προγνωστικών βιοδεικτών μεταξύ ασθενών που πάσχουν από τον ίδιο τύπο καρκίνου, μπορούν να υποδείξουν την πιθανότητα επιβίωσης τα επόμενα χρόνια. Τέλος, οι προβλεπτικοί δείκτες είναι καρκινικοί δείκτες οι οποίοι αφορούν την απόκριση του ασθενούς που έχει διαγνωστεί με κάποιο τύπο καρκίνου στη θεραπεία που του χορηγείται, αλλά και στην εύρεση της καταλληλότερης θεραπείας, ανάλογα με το μοριακό προφίλ του ασθενή.

Επιπλέον, σε κλινικό επίπεδο χρησιμοποιούνται πλέον και άλλες δυο κατηγορίες καρκινικών δεικτών, οι δείκτες παρακολούθησης και οι δείκτες προσδιορισμού κινδύνου. Όσον αφορά τους δείκτες παρακολούθησης, πρόκειται για μόρια τα οποία σε περίπτωση ανίχνευσης σηματοδοτούν την πιθανή υποτροπή της νόσου και τη μη ικανοποιητική απόκριση στη θεραπεία, ενώ οι δείκτες προσδιορισμού κινδύνου εξετάζονται σε υγίη άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου, για την εύρεση της πιθανότητας νόσησης σε μεταγενέστερο στάδιο.

Εκτός από τα επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών, έχουν βρεθεί και αρκετά μόρια miRNAs τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο σε καρκινικούς ιστούς. Ενδεικτικά, κάποια γνωστά miRNAs που έχουν βρεθεί σε διάφορους όγκους αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3. miRNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου. Πηγή: Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Developmental biology*, 302(1), 1 -12. Liu, B., Shyr, Y., Cai, J., & Liu, Q. (2018). *Interplay between miRNAs and host genes and their role in cancer. Briefings in functional genomics*, 18(4), 255–266. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz002>

| Τύπος καρκίνου | miRNA | Αλλαγή έκφρασης | Γονίδιο-στόχος |
|----------------|---------|-----------------|----------------|
| Εγκέφαλος | miR-21 | Αύξηση | |
| | miR-221 | Μείωση | |

| | | | |
|---------------------------------|--|--------|------|
| | miR-181 | | |
| Μαστός | miR-106b/25 miR-125 miR-145 miR-155 miR-34b miR-126 miR149 miR-185 miR189 miR-218 miR-335 miR-338 miR-340 miR-634 | Μείωση | |
| | miR-21 miR-9 miR-181 | Αύξηση | |
| Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία | miR-15 miR-16 | Μείωση | Bcl2 |
| Γαστρεντερικό σύστημα | miR-9 miR-23b miR-101 miR-153 | Μείωση | |

| | | | |
|--------------------|--|--------|------------|
| | miR-218 miR-335 miR-488 | | |
| | miR-21 miR-224/452 miR-340 | Αύξηση | |
| Ήπαρ | miR-199 miR-195 miR-200 miR-125 miR-335 miR-346 | Μείωση | |
| | miR-21 miR-95 | Αύξηση | |
| Πνεύμονας | miR-17-92 miR-21 miR-224/452 | Αύξηση | RAS MYC |
| | let-7 miR-125b miR-126 miR-326 | Μείωση | |
| Λέμφωμα | miR-155 miR-17-92 | Αύξηση | BIC |
| Θυρεοειδής αδέννας | miR-221 miR-222 miR-146 miR-181 miR- | Αύξηση | KIT |

| | | | |
|-----------|--|--------|-------|
| Όρχεις | miR-372 miR-373 | Αύξηση | LAST2 |
| Προστάτης | miR-27b miR-30c miR-33a miR-34b miR-152 miR-224/452 miR-449a/b | Μείωση | |

1.3.3 Βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα σε ασθενείς με CRC

Η ετερογένεια του ορθοκολικού καρκίνου βασίζεται σε διαφορετικές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σημαντικές για την επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Ως αποτέλεσμα, μη λειτουργικές πρωτεΐνες οδηγούν σε διαφορετικό προφίλ κυττάρων τα οποία δεν ελέγχουν τις διεργασίες τους και μετατρέπονται σε καρκινικά. Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1.1, μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, BRAF κλπ, μεταλλάξεις που προκαλούν αστάθεια στο μικροδορυφορικό DNA καθώς και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου. Σε κάθε κατάσταση, η πρόγνωση της νόσου διαφέρει, καθιστώντας την εύρεση των μεταλλάξεων τους πρώτους βιοδείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόγνωση και τη διάγνωσή της, καθώς και τη χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας, έτσι ώστε η νόσος να αντιμετωπιστεί με επιτυχία. Ωστόσο, η αξιολόγηση των μεταλλάξεων αυτών φαίνεται να μην εμφανίζουν επαρκή ακρίβεια κι ευαισθησία, καθώς πολλές μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις μπορεί να εμφανιστούν και σε μεταγενέστερα στάδια και να αλλάξουν ολοκληρωτικά την έκβαση της νόσου, χωρίς να ληφθούν υπόψιν από την αρχή.

Σήμερα, έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός μορίων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, ωστόσο λίγα από αυτά έχουν εγκριθεί για τη χρήση σε κλινικό επίπεδο, εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειας των τύπων καρκίνου. Τα δυο βασικά μόρια τα οποία εντοπίζονται στον ορό και χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση σε κλινικό επίπεδο

είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) και το καρκινικό αντιγόνο 19-9 (CA19-9).⁴² Ωστόσο, τα μόρια αυτά εντοπίζονται μόνο σε αρχικά στάδια καρκίνου καθώς και σε χαμηλό ποσοστό ασθενών. Η ανάγκη για νέα μόρια βιοδεικτών είναι μεγάλη, για το λόγο αυτό νέοι πιθανοί βιοδείκτες δοκιμάζονται έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση, την πρόβλεψη της έκβασης και τη χρήση της κατάλληλης θεραπείας.⁴² Τρία παραδείγματα βιοδεικτών που εξετάζονται το τελευταίο διάστημα για χρήση ως βιοδείκτες είναι το μήκος των τελομερών, η δραστικότητα του ενζύμου τελομεράσης και η συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων στο κύτταρο. Τόσο το μήκος των τελομερών όσο και η δραστικότητα του ενζύμου τελομεράσης παρουσιάζουν αλλαγές κατά την εξέλιξη του καρκίνου, καθιστώντας τα καλούς υποψηφίους για χρήση ως βιοδείκτες ^{42,43}

Για την ανίχνευση του ορθοκολικού καρκίνου σε ασθενείς πραγματοποιείται λήψη δείγματος είτε από τον ίδιο τον ιστό με σιγμοειδοσκόπηση με επεμβατική μέθοδο, είτε με την ανίχνευση μορίων στο αίμα και στα κόπρανα με μη επεμβατική μέθοδο. Οι ερευνητές που ασχολούνται με τον ορθοκολικό καρκίνο εστιάζουν την έρευνά τους σε καινοτόμες ιδέες για τον εντοπισμό μοριακών δεικτών για την ανάπτυξη πολύ ακριβών, μη επεμβατικών τρόπων ανίχνευσης της νόσου. Αρκετές κατηγορίες μορίων έχουν δοκιμαστεί για την πιθανή χρήση τους για την ανίχνευση CRC: DNA, πρωτεΐνες, μόρια mRNA και microRNAs (miRNAs), και έχουν αποδειχθεί ότι είναι αρκετά ελπιδοφόρα σε μελέτες βιοδεικτών πρώιμης φάσης. Ωστόσο, μέχρι τώρα, μόνο δύο τεστ, η μέτρηση της αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα και δείκτες με βάση το DNA πληρούν τα προ-κλινικά και κλινικά κριτήρια που απαιτούνται για την αποτελεσματική μεταφορά τους από το εργαστήριο στο κλινικό περιβάλλον.

Αμέσως μετά τη διάγνωση της νόσου, είναι απαραίτητη η αξιολόγηση της πρόγνωσης της για τον κάθε ασθενή εξατομικευμένα, έτσι ώστε να γίνει γνωστό το στάδιο της νόσου στην οποία βρίσκεται καθώς και την εκτίμηση της πιθανής εξέλιξης και την αναζήτηση του καλύτερου τρόπου αντιμετώπισης. Η τρέχουσα πρακτική για την αξιολόγηση της πρόγνωσης βασίζεται σε ακτινογραφικές τεχνικές (CT, MRI) και παθολογοανατομικά δεδομένα (TNM, λεμφοαγγειακή, περιτοναϊκή και φλεβική διήθηση), με την TNM να παραμένει το ισχυρότερο προγνωστικό εργαλείο. Ωστόσο, όχι μόνο κανένα από τα προγνωστικά εργαλεία που αναφέρονται παραπάνω δεν παρέχει σαφή ένδειξη για το ποια από αυτές τις περιπτώσεις CRC είναι πιο επιρρεπής σε υποτροπή, δίνει μεταστάσεις ή αποδεικνύεται ανθεκτική στη χημειοθεραπεία, αλλά επίσης δεν είναι κατάλληλα για εξατομικευμένη

θεραπεία του κάθε ασθενή. Για το λόγο αυτό, η αξιολόγηση πολλών μορίων και γονιδιακών αλλαγών ως προγνωστικοί βιοδείκτες αυξάνονται ολοένα και περισσότερο, οδηγώντας όλο και πιο κοντά σε μια εξατομικευμένη θεραπεία.

Τέλος, η εύρεση βιοδεικτών για τη σωστή αντιμετώπιση της νόσου σε κάθε ασθενή αποτελεί το τελικό στάδιο στην κλινική αντιμετώπιση της νόσου. Κάθε ασθενής εμφανίζει διαφορετική απόκριση σε κάθε θεραπευτική αγωγή, με αποτέλεσμα μια μορφή θεραπείας να μην είναι απαραίτητα επωφελής σε όλους. Είναι σημαντικό να υπάρχουν ορισμένοι βιοδείκτες για την πρόβλεψη της απόκρισης του κάθε ασθενούς στη θεραπεία, έτσι ώστε η κατάλληλη μορφή θεραπείας να χρησιμοποιείται στο σωστό ασθενή.

Παρόλο που υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία βιοδεικτών, η καλύτερη δυνατή παρακολούθηση της νόσου του ασθενούς δεν έχει ακόμη επιτευχθεί. Για αυτόν τον λόγο, καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια από ερευνητές σε όλο τον κόσμο προκειμένου να εντοπιστούν νέοι δείκτες που θα είναι σε θέση να οδηγήσουν σε μια καλύτερη, παρακολούθηση των ασθενειών. ⁴⁴

Πίνακας 4. Βιοδείκτες στον ορθοκολικό καρκίνο. Πηγή: Nikolouzakis, T. K., Vassilopoulou, L., Fragkiadaki, P., Mariolis Sapsakos, T., Papadakis, G. Z., Spandidos, D. A., ... & Tsioussis, J. (2018). Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients. Oncology reports, 39(6), 2455-2472.

| | Διάγνωση | Πρόγνωση | Πρόβλεψη |
|--------------|---|--|---|
| Ιστός | Κυτοκερατίνες CDX2 Βιλίνη β-κατενίνη Mucins Καντερίνη 1 Special AT-rich sequence binding protein- 2 HER2 | BRAF MSI CEA MUC2 SATB2 CK20vCDX2 VEGF IMP3 TNIK p53 miRNAS | KRAS/NRAS MSI BRAF p53 CD133 |
| Ορός | Μεταβολές στο DNA (CIN, MSI, | CEA (πριν και μετά την εγχείρηση) | |

| | | | |
|---------|---|-----------------|--|
| | CIMP, ctDNA, Μεταλλάξεις APC) miRNAs | CA 19-9 CTCs | |
| Κόπρανα | Hb κοπράνων, DNA κοπράνων miRNAs | | |

Στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι πιο γνωστοί βιοδείκτες για τον ορθοκολικό καρκίνο, τόσο οι καθιερωμένοι, οι οποίοι αναγράφονται με κόκκινο, όσο κι αυτοί που έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να εδραιωθούν ως αποτελεσματικοί βιοδείκτες στα επόμενα χρόνια. Όσον αφορά τη διάγνωση, οι δείκτες που εντοπίζονται στους ιστούς συνεισφέρουν στον χαρακτηρισμό του ιστού ως καρκινικού, καθώς εντοπίζονται διαφορές μεταξύ καρκινικών και μη ιστών. Στον ορό και στα κόπρανα, οι δείκτες αυτοί βοηθούν στη διάγνωση της νόσου με χρήση μη επεμβατικών μεθόδων. Όσον αφορά την πρόγνωση της νόσου, μέχρι πρότινος εξετάζονται μεταλλάξεις στα γονίδια BRAF, KRAS και NRAS, τα οποία αποτελούν βασικά ογκογονίδια και έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, η μικροδορυφορική αστάθεια του DNA(MSI) αποτελεί επίσης καθιερωμένο δείκτη πρόγνωσης. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε τη χρήση του CEA στον ορό των ασθενών, τα επίπεδα των οποίων πριν και μετά την αφαίρεση του όγκου μπορεί να μας δείξει την εξέλιξή της. Τέλος, όσον αφορά την πρόβλεψη, οι καθιερωμένοι δείκτες είναι το MSI και τα KRAS/NRAS, ενώ τα υπόλοιπα στοιχεία του πίνακα βρίσκονται ακόμα υπό μελέτη.

MSI: όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA προέρχεται από μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 και εντοπίζεται συχνά σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο. Εντοπίζεται σε περίπου 15% των ασθενών και στα στάδια I και II σχετίζεται με καλή πρόγνωση και εκτιμάται ότι οι ασθενείς στα στάδια αυτά δε χρειάζεται να υποβληθούν σε χημειοθεραπεία. Αν όμως εντοπιστεί σε μεταγενέστερα στάδια, η πρόγνωση είναι κακή.⁴⁵

BRAF μεταλλάξεις: Το γονίδιο BRAF είναι ένα πρώτο ογκογονίδιο το οποίο έχει σχετιστεί με την εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου. Μεταλλάξεις του γονιδίου, με συχνότερη τη μετάλλαξη V600E εντοπίζονται σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με μεταστατικό

καρκίνο σε ποσοστό 8-10%. Συνήθως για την αξιολόγηση της πρόγνωσης, η μετάλλαξη αυτή συνδυάζεται με το MSI και διαθέτει κακή πρόγνωση.⁴⁵

RAS μεταλλάξεις: Η οικογένεια των γονιδίων RAS (KRAS, HRAS, NRAS) ανήκουν στα πρωτο-ογκογονίδια. Μεταλλάξεις τους, με βασικότερο το γονίδιο KRAS, οδηγούν στην εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ορθοκολικού. Είναι κύριος βιοδείκτης κλινικής χρησιμότητας σε ασθενείς με μεταστατικούς όγκους καθώς μεταλλάξεις σε γονίδια της οικογένειας είναι παρούσες στο 50% περίπου των περιπτώσεων.⁴⁵

Οι 3 κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελούν τους καθιερωμένους καρκινικούς δείκτες CRC. Ωστόσο, σημαντικό είναι να ελέγχονται συνδυαστικά και όχι ανεξάρτητα, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η συνύπαρξη τουλάχιστον 2 εξ αυτών έχει χειρότερη πρόγνωση απ' ότι όταν εντοπίζονται ανεξάρτητα.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1.1 Τα miRNAs ως βιοδείκτες

Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη των miRNAs ως βιοδείκτες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών πολλών εργαστηρίων στον κόσμο. Η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκαν miRNAs ως βιοδείκτες ήταν το 2008 από τους Lawrie et al. για την εξέταση διάχυτου λεμφώματος μεγάλων Β κυττάρων στον ορό των ασθενών και από τότε, η πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για πολλές ασθένειες.

Αυτή η νέα κατηγορία μορίων διαθέτει μια σειρά από πλεονεκτήματα που θα μπορούσαν να τα μετατρέψουν σε ιδανικούς υποψήφιους βιοδείκτες σε μια ποικιλία παθήσεων. Είναι εύκολα προσβάσιμα από τους ιατρούς καθώς μπορούν να εξαχθούν από υγρές βιοψίες αίματος, ούρων και υγρών του σώματος με μη επεμβατικές μεθόδους. Επιπλέον εμφανίζεται υψηλή ειδικότητα, όσον αφορά τον τύπο προέλευσης των ιστών ή των κυττάρων, καθώς και υψηλή ειδικότητα, όσον αφορά τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των φυσιολογικών και των παθολογικών καταστάσεων, καθώς επίσης και συσχέτιση με την εξέλιξη της νόσου, τη διαφοροποίηση των σταδίων του καρκίνου, ακόμη με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επιπλέον, οι τεχνολογίες για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων υπάρχουν ήδη και η ανάπτυξη νέων τεχνικών απαιτεί πολύ λίγο χρόνο και αρκετά χαμηλό κόστος.

Ένα άλλο πλεονέκτημα των miRNAs έγκειται στο ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα πολλαπλών σημείων για ακριβή διάγνωση, καθοδηγούμενη θεραπεία και αξιολόγηση της απόκρισης στη θεραπεία. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τον καρκίνο, μια εντελώς ετερογενή ασθένεια, όπου θα ήταν προτιμότερη μια προσέγγιση πολλαπλών σημείων.

Ωστόσο, η έρευνα των miRNAs ως βιοδεικτών βρίσκεται ακόμη στα αρχικά της στάδια, επομένως προς το παρόν, τα ευρήματα γενικά στερούνται επαναληψιμότητας. Υπάρχουν πολλές αναφορές μεταξύ διαφορετικών ομάδων που έχουν αναλύσει τους ίδιους όγκους. Προκειμένου να επιλυθεί αυτό το ζήτημα, πρέπει να αναπτυχθούν τυποποιημένα πρωτόκολλα τόσο για τα αρχικά στάδια της διαδικασίας, όπως συλλογή δειγμάτων,

μεταφορά και αποθήκευση, όσο και ανάλυση δεδομένων για την ποικιλία των τεχνολογικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται. ⁴⁶

2.1.2 Τα miRNAs ως βιοδείκτες στον καρκίνο

Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη της παθογένειας του καρκίνου καθώς και η αναζήτηση τρόπων διάγνωσης και θεραπείας ελκύουν ολοένα και περισσότερους ερευνητές στην προσπάθεια αποσαφήνισης. Τα miRNAs έχουν αποδειχθεί σημαντικά μόρια στη διάγνωση και την πρόγνωση διαφόρων τύπων καρκίνου, ενώ πολλές μελέτες που δημοσιεύονται αναδεικνύουν το ρόλο των miRNAs ως μόρια βιοδείκτες σε διάφορους τύπους καρκίνου. Κατά την καρκινογένεση, η έκφραση κάποιων μορίων ώριμων ή πρόδρομων miRNA παρουσιάζει ανώμαλα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Με την τεχνολογία της αλληλούχισης Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), πραγματοποιούνται αναλύσεις υψηλής απόδοσης όσον αφορά τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης RNA. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, είτε σε μορφή υπερέκφρασης είτε σε μορφή υποέκφρασης σε μια ευρεία ποικιλία κακοήθων καρκίνων του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος, του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του προστάτη, του γλοιώματος και του ορθοκολικού καρκίνου.

Αν και οι αιτίες που οδηγούν στην απορρύθμιση των miRNAs στον καρκίνο δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως, πιθανό είναι να οφείλονται σε διάφορους καθορισμένους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, των γονιδιωματικών μεταλλάξεων, των επιγενετικών αλλαγών και των αλλαγών στη βιογένεση του miRNA. Συγκεκριμένα, ορισμένα γονίδια miRNA εντοπίζονται συχνά σε εύθραυστες θέσεις και γονιδιωματικές περιοχές που σχετίζονται με τον καρκίνο. Με δεδομένο τους σημαντικούς ρόλους των σχετιζόμενων με τον καρκίνο miRNA που προσδιορίζονται σε διάφορους τύπους καρκινικών κυτταρικών σειρών και κλινικών δειγμάτων από όγκους, οι ανωμαλίες στην έκφραση των miRNAs φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς δείκτες για κλινικές εφαρμογές.

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε τύπους καρκίνου που προέρχονται από διαφορετικό είδος κυττάρων, εντοπίζονται διαφορετικά προφίλ έκφρασης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση της προέλευσης του όγκου.

Για παράδειγμα, σε μια έρευνα που προσπαθεί να εντοπίσει καρκίνους με άγνωστο ιστοί πρωτογενούς προέλευσης χρησιμοποιώντας πλατφόρμα microarray για την αξιολόγηση των εκφράσεων 47 miRNAs σε 101 δείγματα από πρωτογενείς ή μεταστατικούς καρκίνους, συνολικά, η ακρίβεια έφτασε τους 100 % για πρωτοπαθείς καρκίνους και 78% για μεταστατικούς καρκίνους.

Το προφίλ των miRNAs σε ασθενείς με καρκίνο και ειδικά με κακοήθεις όγκους συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στον προσδιορισμό του υποτύπου του όγκου και κατ' επέκταση στη χορήγηση της καταλληλότερης θεραπείας. Σε έναν μεγάλο αριθμό κλινικών μελετών αναδεικνύεται ότι το προφίλ των miRNA είναι σε θέση να χρησιμεύσουν ως ένα ακριβές εργαλείο ταξινόμησης για διαφορετικού τύπου καρκίνους σε παθολογικά και κυτταρολογικά δείγματα. Επιπλέον, η ανάγκη των βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς η επιβίωση και η πρόγνωση των ασθενών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο του όγκου κατά τη στιγμή της ανίχνευσης, με μια έγκαιρη διάγνωση να σχετίζεται συνήθως με μια καλύτερη πρόγνωση.

Συνοπτικά, με βάση τις διαφορές στα προφίλ έκφρασης miRNA που εντοπίζονται σε ανθρώπινους καρκίνους, τα miRNAs αποτελούν σημαντικά μόρια για την κατανόηση της ανάπτυξης του καρκίνου. Κάποια μόρια miRNAs εμφανίζουν ανώμαλη έκφραση σε διάφορα είδη όγκων, ενώ συγκεκριμένοι τύποι καρκίνων συχνά εκφράζουν τα αποκλειστικά τους πρότυπα miRNA που αναφέρονται στους ιστούς προέλευσής τους. Τα προφίλ miRNA που εντοπίζονται σε διάφορους τύπους όγκων αποτελούν το «miRNome» και χαρακτηρίζει την κακοήθη κατάσταση και καθορίζει ορισμένα από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους όπως βαθμός, στάδιο, επιθετικότητα, αγγειακή διήθηση και δείκτη πολλαπλασιασμού.⁴⁷

2.2 Σκοπός

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η σχέση των miRNAs, ως πιθανοί βιοδείκτες στον ορθοκολικό καρκίνο. Θα αναλυθούν μελέτες που περιέχουν δεδομένα για miRNAs και την έκφρασή τους:

- i) σε πρώιμα και σε τελικά στάδια της νόσου
- ii) όσον αφορά τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη αποτελεσματικότητας στην θεραπεία της νόσου.

Στόχος της μελέτης αυτής είναι η διερεύνηση των μέχρι τώρα γνωστών μορίων miRNAs που επηρεάζονται στον ορθοκολικό καρκίνο έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης της νόσου σε κλινικό επίπεδο, καθώς και πρόγνωσης της και πρόβλεψης της αποτελεσματικότητας συγκεκριμένων θεραπειών.

2.3 Μέθοδος

Για την παρούσα μελέτη, θα χρησιμοποιηθούν δεδομένα που θα συλλεχθούν από άρθρα και κλινικές μελέτες της τελευταίας δεκαπενταετίας από τις διεθνείς βάσεις NCBI Pubmed, Google Scholar και Scopus. Τα στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση των μελετών ήταν “miRNAs”, “colorectal cancer”, “CRC”, “biomarkers” και “prognosis”. Συλλέχθηκαν 128 άρθρα που αφορούσαν τόσο τα miRNAs ως βιοδείκτες σε διάφορους τύπους καρκίνου, αλλά και βιοδείκτες που μελετήθηκαν συγκεκριμένα στον CRC. Οι μελέτες που αναλύθηκαν περιορίστηκαν σε δημοσιεύσεις που κλινικές μελέτες, ερευνητικές εργασίες και βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις που αφορούν κάποια από τα παραπάνω στοιχεία. Όλες οι μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν δημοσιεύτηκαν σε χρονικό διάστημα των τελευταίων 15 ετών σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά και αφορούν αποκλειστικά μελέτες που σχετίζονται με τα miRNAs και το ρόλο τους για τη διάγνωση και πρόγνωση του ορθοκολικού καρκίνου. Οι συγκεκριμένες μελέτες αφορούσαν ανθρώπους (και όχι πειραματόζωα) και ήταν γραμμένες στην αγγλική γλώσσα. Οι μελέτες που αφορούσαν άλλους καρκίνους εκτός του ορθοκολικού, δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανωτέρω έρευνα.

Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί ανάλυση της πιθανής χρήσης των συγκεκριμένων miRNAs ως προς τη διαγνωστική, και την προβλεπτική και προγνωστική τους αξία, δηλαδή ποια από αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο για τη διάγνωση της νόσου σε πρώιμα στάδια ή ακόμα και πριν την εμφάνιση της, καθώς και την καλή ή κακή πρόγνωση για τον ασθενή σε μεταγενέστερα στάδια εμφάνισης της (χρήση ως προγνωστικός δείκτης), όπως και για τη δυνατότητα εφαρμογής κατάλληλης στοχευμένης θεραπείας (χρήση ως προβλεπτικός δείκτης).

2.4 Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία αναζητήθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία τα miRNAs τα οποία έχουν βρεθεί να απορρυθμίζονται σε ασθενείς που πάσχουν από ορθοκολικό καρκίνο. Αναλύθηκαν 23 ερευνητικές μελέτες, τόσο πειραματικές, όσο και επιστημονικές ανασκοπήσεις ερευνών. Τα δεδομένα που βρέθηκαν ταξινομούνται στους παρακάτω πίνακες (1α, 1β, 2, 3, 4). Τα miRNAs διαχωρίζονται με βάση το δείγμα στο οποίο εντοπίζονται, αν δηλαδή πρόκειται για miRNAs τα οποία εντοπίζονται στον όγκο, miRNAs τα οποία είναι κυκλοφορούντα, εντοπίζονται δηλαδή στον ορό των ασθενών, καθώς και miRNAs τα οποία εντοπίζονται στα κόπρανα. Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται τα miRNAs που έχουν βρεθεί ότι απορρυθμίζονται στους διάφορους τύπους δειγμάτων, καθώς και αν η απορρύθμιση αφορά την αύξηση ή τη μείωση των επιπέδων τους σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα.

Πίνακας 5α miRNAs που αυξάνουν την έκφρασή τους σε ιστικά δείγματα όγκων ασθενών.

| miRNA | Μεταβολή | Βιβλιογραφική αναφορά |
|-----------|-----------------|--------------------------------|
| miR-15 | Αύξηση επιπέδων | 49, 65 |
| miR-31 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 53, 54 |
| miR-183 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 53, 54 |
| miR-17-3p | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 54, 60, 62 |
| miR-18a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 54, 58, 62, 63 |

| | | |
|----------------|-----------------|------------------------------------|
| miR-20a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 52, 53, 54, 60, 62, 63 |
| miR-92 | Αύξηση επιπέδων | 48, 52, 54, 60, 63 |
| miRNA-92a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 60, 63 |
| miRNA-185 | Αύξηση επιπέδων | 48 |
| hsa-miR-18b | Αύξηση επιπέδων | 54 |
| hsa-miR-7 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 54, 60 |
| hsa-let 7g | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 53 |
| hsa-miR-19a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 62, 63 |
| hsa-miR-19b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 62, 63 |
| hsa-miR-21 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 58, 60, 63 |
| hsa-miR-25 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 53 |
| hsa-miR-29a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 54, 60 |
| hsa-miR-29b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51 |
| hsa-miR-30e-3p | Αύξηση επιπέδων | 54 |
| hsa-miR-31 | Αύξηση επιπέδων | 52, 53, 54, 63 |
| hsa-miR-32 | Αύξηση επιπέδων | 48, 51 |
| hsa-miR-33a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51 |
| hsa-miR-34a | Αύξηση επιπέδων | 48, 51, 53 |
| hsa-miR-93 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 53, |
| hsa-miR-95 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 54, 62 |
| hsa-miR-96 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 53 |
| hsa-miR-101 | Αύξηση επιπέδων | 48 |
| hsa-miR-103 | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| hsa-miR-106a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 60, 62, 68, 69 |
| hsa-miR-106b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 62 |
| hsa-miR-124b | Αύξηση επιπέδων | 53 |
| hsa-miR-130b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60 |
| hsa-miR-135a | Αύξηση επιπέδων | 48, 51, 53 |

| | | |
|----------------|-----------------|------------------------|
| hsa-miR-135b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 62 |
| hsa-miR-142-3p | Αύξηση επιπέδων | 49, 53 |
| hsa-miR-142-5p | Αύξηση επιπέδων | 55 |
| hsa-miR-155b | Αύξηση επιπέδων | 51,60 |
| hsa-miR-181b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 60, 65 |
| hsa-miR-182 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 54 |
| hsa-miR-183 | Αύξηση επιπέδων | 49, 51, 53, 54, 60 |
| hsa-miR-191 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 65 |
| hsa-miR-148a | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| hsa-miR-200c | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 61, 65 |
| hsa-miR-203 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 60 |
| hsa-miR-220 | Αύξηση επιπέδων | 54 |
| miR-221 | Αύξηση επιπέδων | 49, 62 |
| hsa-miR-222 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 62 |
| hsa-miR-223 | Αύξηση επιπέδων | 48, 51, 62 |
| hsa-miR-224 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 54, 60, 62 |
| miR-410 | Αύξηση επιπέδων | 63 |
| miR-452 | Αύξηση επιπέδων | 63 |
| miR-598 | Αύξηση επιπέδων | 63 |
| hsa-miR-378 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51 |

Πίνακας 1β miRNAs που μειώνουν την έκφρασή τους σε ιστικά δείγματα όγκων ασθενών.

| | | |
|------------|-----------------|-----------------------------------|
| Let- 7a | Μείωση επιπέδων | 48, 51, 53 |
| miRNA-133b | Μείωση επιπέδων | 48, 51, 52, 53, 58 |
| miR-143 | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 54, 58, 60 |
| miR-145 | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51, 52, 53, 54, 60, 63 |
| hsa-miR-1 | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51, 53 |

| | | |
|------------------------|-----------------|------------------------|
| hsa-miR-30a (3p et 5p) | Μείωση επιπέδων | 48, 51, 53, 63 |
| miR-34 | Μείωση επιπέδων | 60, 63 |
| hsa-miR-125a | Μείωση επιπέδων | 48, 53 |
| hsa-miR-126 | Μείωση επιπέδων | 48, 51, 53, 60 |
| hsa-miR-133a | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51, 53 |
| hsa-miR-191 | Μείωση επιπέδων | 53 |
| hsa-miR-192 | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51, 53, 64, 65 |
| miR-194 | Μείωση επιπέδων | 54, 64, 65 |
| hsa-miR-195 | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51, 60 |
| miR-198 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| hsa-miR-215 | Μείωση επιπέδων | 48, 51, 64, 65 |
| miR-296 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| hsa-miR-342 | Μείωση επιπέδων | 48, 51 |
| miR-375 | Μείωση επιπέδων | 51, 58 |
| miR-383 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| hsa-miR-497 | Μείωση επιπέδων | 48, 49 |
| miR-769 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| miR-3666 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| miR-7702 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| hsa-miR-30c | Μείωση επιπέδων | 48, 49, 51 |
| miR-126 | Μείωση επιπέδων | 51 |
| miR-124a | Μείωση επιπέδων | 51, 53 |
| miR-137 | Μείωση επιπέδων | 51 |
| miR-139 | Μείωση επιπέδων | 51, 60 |
| miR-99a | Μείωση επιπέδων | 63 |
| miR-128 | Μείωση επιπέδων | 63 |
| miR-149 | Μείωση επιπέδων | 63 |

Πίνακας 6 miRNAs με μεταβολές στην έκφρασή τους στον ορό ασθενών.

| miRNA | Μεταβολή | Βιβλιογραφική αναφορά |
|-------|----------|-----------------------|
|-------|----------|-----------------------|

| | | |
|----------------|-----------------|---|
| miRNA-1229 | Αύξηση επιπέδων | 52 |
| miR-18a | Αύξηση επιπέδων | 60, 67 |
| miR-19b | Αύξηση επιπέδων | 60 |
| miR-20a | Αύξηση επιπέδων | 60,63 |
| miRNA-1246 | Αύξηση επιπέδων | 52 |
| miRNA-223 | Αύξηση επιπέδων | 52, 60 |
| miR-221 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 57, 60 |
| miR-21 | Αύξηση επιπέδων | 49, 52, 60, |
| miR-92a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 53, 57, 60, 62, 67, 69, 70 |
| miR-222 | Αύξηση επιπέδων | 49, 62 |
| miR-Let-7e | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| miR-17-3p | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 53, 57, 60, 62 |
| miR-19a | Αύξηση επιπέδων | 49, 60, 67 |
| miR-22 | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| miR-23a | Αύξηση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-29a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 57, 58, 60 |
| miR-95 | Αύξηση επιπέδων | 49, 62 |
| miR-15a | Αύξηση επιπέδων | 60 |
| miR-409-3p | Αύξηση επιπέδων | 56, 60 |
| hsa-miR-142-5p | Αύξηση επιπέδων | 55 |
| miR-153 | Αύξηση επιπέδων | 62 |
| miR-373 | Αύξηση επιπέδων | 62 |
| miR-203 | Αύξηση επιπέδων | 60 |
| miR-24 | Μείωση επιπέδων | 52, 60 |
| miR-25 | Μείωση επιπέδων | 56 |
| miR-7 | Μείωση επιπέδων | 56, 60 |
| miR-31 | Μείωση επιπέδων | 60 |
| miRNA-93 | Μείωση επιπέδων | 56, 60 |
| miRNA-320a | Μείωση επιπέδων | 52, 60 |
| miRNA-423-5p | Μείωση επιπέδων | 52, 60 |

| | | |
|------------|-----------------|--------|
| miR-10a | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-141 | Μείωση επιπέδων | 49,57 |
| miR-150 | Μείωση επιπέδων | 49,52 |
| miR-188-3p | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-192 | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-224 | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-425 | Μείωση επιπέδων | 49, 60 |
| miR-451 | Μείωση επιπέδων | 66 |
| miR-495 | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-572 | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-601 | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-720 | Μείωση επιπέδων | 49 |
| miR-760 | Μείωση επιπέδων | 49, 60 |

Πίνακας 7. miRNAs με μεταβολές στην έκφρασή τους στα κόπρανα ασθενών.

| miRNA | Μεταβολή | Βιβλιογραφική αναφορά |
|-----------|-----------------|-----------------------|
| miR-21 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 53, 60 |
| miR-17 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60 |
| miR-18a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 52, 60 |
| miR-19a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60 |
| miR-19b-1 | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60 |
| miR-20a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60, 63 |
| miR-92 | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| miR-92a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60 |
| miR-96 | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| miR-106a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 51, 53 |
| miR-106b | Αύξηση επιπέδων | 49, 51 |
| miR-135a | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60 |

| | | |
|------------|-----------------|----------------|
| miR-135b | Αύξηση επιπέδων | 48, 49, 60, 52 |
| miR-144 | Αύξηση επιπέδων | 49, 60 |
| miR-200 | Αύξηση επιπέδων | 59 |
| miR-203 | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| miR-221 | Αύξηση επιπέδων | 52, 60 |
| miR-326 | Αύξηση επιπέδων | 49 |
| miR-29a | Μείωση επιπέδων | 49, 52, 60 |
| miR-143 | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-145 | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-16 | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-125b | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-126 | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-320 | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miR-484-5p | Μείωση επιπέδων | 49, 52 |
| miRNA-223 | Μείωση επιπέδων | 52 |
| miRNA-224 | Μείωση επιπέδων | 52, 60 |

Στους παραπάνω πίνακες αναφέρονται τα πιο συνηθισμένα miRNAs, η έκφραση των οποίων εμφανίζεται μειωμένη ή αυξημένη σε ασθενείς που πάσχουν από CRC. Όπως φαίνεται, υπάρχουν κοινά miRNAs τα οποία εντοπίζονται τόσο στον ίδιο τον όγκο και τον ιστό που έχει υποστεί τη βλάβη, αλλά και στον ορό και τα κόπρανα των ασθενών. Σε πολλές μελέτες αναφέρονται συχνά τα miRNAs miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-21, miR-29a, miR-92a, miR-106a/b, miR-135a/b, hsa-miR-181b, hsa-miR-200c, miR-203, miR-224, miR-143 και miR-145 και miR-192. Τα miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-21, miR-29a, miR-92a, miR-106a/b, miR-135a/b, hsa-miR-181b, hsa-miR-200c, miR-203, miR-224 εμφανίζονται αυξημένα σε κάθε περίπτωση στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Αντίθετα, η έκφραση των miR-143, miR-145 και miR-192 εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με τις ομάδες των υγιών ατόμων.

Επιπλέον, τα miRNAs miR-29a, miR-95, miR- 192 και miR-222 εντοπίζονται από κοινού στους ιστούς και στον ορό των ασθενών αλλά όχι στα κόπρανα, ενώ αντίστοιχα τα miR-18a, miR-19b, miR- 20a, miR-106a, miR-126, miR-135, miR-143 και miR-145 εντοπίζονται απορρυθμισμένα (μειωμένα ή αυξημένα επίπεδα) στους ιστούς και τα κόπρανα των ασθενών αλλά δεν συναντώνται στον ορό σε επαρκή αριθμό μελετών.

Πίνακας 8 miRNAs που έχουν βρεθεί ως πιθανοί προγνωστικοί και διαγνωστικοί δείκτες.

| miRNA | Είδος δείγμα- τος | Μεταβολή | Χρήση | Βιβλιογραφική Αναφορά |
|---|----------------------|----------|---|-----------------------------|
| miRNA-29a | Ορός | Αύξηση | Αναγνώριση CRC από τα πρώ- ιμα στάδια | 53 |
| miRNA-185 | Ιστός | Αύξηση | Μεταστατικότητα και κακή πρόγνωση | 49 |
| hsa-miR-15b, hsa- miR-181b, hsa- miR-191, hsa-miR- 200c | Ιστός | Αύξηση | Αλληλεπίδραση με μεταλλάξεις στο p53 γονίδιο και/ή επαγωγή καρκινογένεσης | 65 |
| miRNA-133b | Ιστός | Μείωση | Μεταστατικότητα και κακή πρόγνωση | 49 |
| miRNA-17~92 cluster, (miRNA- 17, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-20a, miRNA-19b, και miRNA-92a) | Ιστός | Αύξηση | Κακή πρόγνωση | 50,52, 53, 54, 57, 59,68 |

| | | | | |
|---|-------|--|--|------------|
| miRNA-20a, let7a, miRNA-1229, miRNA-1246, miRNA-150, miRNA-223, και miRNA-23a | Ορός | Αύξηση- Μείωση επιπέδων μετά την αφαίρεση του όγκου | Δείκτης επιτυχίας επέμβασης | 50, 52, 63 |
| miRNA-19a | Ορός | Αύξηση | Κακή πρόγνωση- υποτροπή νόσου | 67 |
| miR-106a | Ιστός | Αύξηση | Μετανάστευση και μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων | 68 |
| miRNA-24, miRNA-320a, και miRNA-423-5p | Ορός | Μείωση- Αύξηση επιπέδων μετά την αφαίρεση του όγκου | Δείκτης επιτυχίας επέμβασης | 52 |
| miRNA-320 και miR-498 | Ιστός | Μείωση | Κακή πρόγνωση σε προχωρημένο στάδιο | 49, 51 |
| miRNA- 1914, miRNA-1915 | Ιστός | Αύξηση | Απόκριση σε θεραπεία | 52 |
| miRNA-21 | Ορός | Αύξηση | Αύξηση του όγκου και πολλαπλασιασμός. Μεταστατικότητα. Αντίσταση στη χημειοθεραπεία Συσχέτιση με μικρότερο DFS σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου II, αλλά | 49 ,59 |

| | | | | |
|-------------------------------|-------|--|--|--------|
| | | | όχι στην ομάδα του καρκίνου του ορθού σταδίου II. | |
| miRNA-375 | Ιστός | Αύξηση | Μείωση της αύξησης του όγκου | 52 |
| miRNA-142-5p | Ιστός | Μείωση στο στάδιο III Αύξηση κατά τη χημειοθεραπεία | Αναγνώριση σταδίου της νόσου κι έκβαση της θεραπείας- συσχέτιση με την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων | 52, 55 |
| miR-203 | Ιστός | Αύξηση | Κακή έκβαση της νόσου | 60, 63 |
| miR-200c | Ιστός | Αύξηση | Μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων- Κακή πρόγνωση | 61, 65 |
| miR-17-3p και miR-92 | Ορός | Αύξηση | Μείωση μετά την εγχείρηση- Δείκτης επιτυχίας επέμβασης | 62 |
| miR-192, miR -194 και miR-215 | Ιστός | Μείωση | Πολλαπλασιασμός και αύξηση όγκου | 64 |
| miR-451 | Ιστός | Μείωση | Αντίσταση στη θεραπεία | 66 |
| miR-31 | Ιστός | Μείωση | Έκβαση νόσου- Καλύτερη έκβαση στη θεραπεία με anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα | 59 |

Στον Πίνακα 4 αναγράφονται τα miRNAs τα οποία έχουν βρεθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες της νόσου, αλλά και για την πρόγνωση της έκβασης της ασθένειας. Συγκεκριμένα, τα πιο συνηθισμένα miRNAs που φαίνονται απορρυθμισμένα είναι αυτά που ανήκουν στο σύμπλεγμα miRNA-17~92 δηλαδή τα miRNA-17, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-20a, miRNA-19b, και miRNA-92a. Τα miRNAs αυτά, εντοπίζονται συχνά να υπερεκφράζονται σε όγκους ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και όσο μεγαλύτερη η αύξησή τους, τόσο πιο κακή είναι η πρόγνωση. Συγκεκριμένα, το miRNA-18a αυξάνεται σταθερά κατά την ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου, ενώ το miRNA-92a έχει σχετιστεί αρνητικά με την επιβίωση του ασθενή. Μαζί με το miRNA-29a

αποτελούν καλούς βιοδείκτες για τη διάγνωση του ορθοκολικού καρκίνου στα πρώιμα στάδια της νόσου.^{50,51} Μελέτες έχουν δείξει ότι η ευαισθησία του miRNA-92a για τη διάγνωση του ορθοκολικού καρκίνου αγγίζει το 89%, ενώ η ειδικότητα το 71,2%. Το miRNA-29a διαθέτει ευαισθησία 69% και ειδικότητα 89,1%. Το miRNA-17 αποτελεί έναν καλό βιοδείκτη για το διαχωρισμό του ορθοκολικού καρκίνου από τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς τα επίπεδα του εμφανίζονται αυξημένα στον ορό ασθενών που πάσχουν από καρκίνο στο ορθό σε σχέση με τους ασθενείς με όγκο στο παχύ έντερο. Η ευαισθησία του miRNA-17 στους όγκους ασθενών αγγίζει το 64%, ενώ η ειδικότητά του το 70%. Το miRNA-20a οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό του CRC και εμφανίζεται σημαντικά αυξημένο σε ασθενείς με CRC νεότερους των 40 ετών.

Εκτός από τα miRNAs τα οποία χρησιμοποιούνται για τη διάκριση τόσο της ίδιας της νόσου, όσο και του σταδίου στην οποία αυτή βρίσκεται, έχουν βρεθεί και κάποια miRNAs τα οποία υποδηλώνουν την απόκριση του ασθενή στην εκάστοτε θεραπεία. Για παράδειγμα, το miRNA-21 έχει σχετιστεί με την έκβαση της θεραπείας.

Τα αυξημένα επίπεδα του miRNA-21 στον ορό του αίματος υποδηλώνουν την ανάπτυξη αντίστασης στη χημειοθεραπεία και στη χορήγηση φαρμάκων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καταπολέμηση του όγκου, όπως η φθοροουρακίλη, η οξαλιπλατίνη και η διφθορο-κουρκουμίνη. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιούνται μελέτες στις οποίες διερευνάται ο τρόπος με τον οποίο η αύξηση της έκφρασης μπορεί να επαναφέρει την ευαισθησία στις ουσίες αυτές. Επιπλέον, το miRNA-31 αποτελεί δείκτη πρόγνωσης της θεραπείας με anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα. Έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στο γονίδιο Kras μια με την ταυτόχρονη χορήγηση κετουξιμάμπης (anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα), τα χαμηλά επίπεδα του miR-31 υποδηλώνουν μεγαλύτερη διάρκεια επιβίωσης χωρίς την επιδείνωση της νόσου σε σχέση με ασθενείς με υψηλά επίπεδα του συγκεκριμένου miRNA καθιστώντας το πιθανό αξιόπιστο βιοδείκτη για την έκβαση της θεραπείας.

Τέλος, σημαντικό ρόλο διαθέτουν κάποια miRNAs όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου μετά από χειρουργική επέμβαση. Για παράδειγμα, τα miRNA-20a, let7a, miRNA-1229, miRNA-1246, miRNA-150, miRNA-21, miRNA-223, και miRNA-23a στον ορό του ασθενούς εντοπίζονται αυξημένα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ανθρώπους. Ωστόσο, μετά τη χειρουργική επέμβαση, τα επίπεδα τους επανέρχονται στις φυσιολογικές τιμές.

Πιθανά, τα miRNAs αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την εμφάνιση δευτερογενών ή μεταστατικών όγκων.⁵⁰

2.5 Συζήτηση - Συμπεράσματα

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ένας από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου που εμφανίζεται τόσο σε άντρες, όσο και σε γυναίκες παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισής του τον κατατάσσει στην τρίτη θέση παγκοσμίως, ενώ τα ποσοστά εμφάνισης ολοένα και αυξάνονται. Στα πρώιμα στάδια της νόσου, ο ορθοκολικός καρκίνος μπορεί να καταπολεμηθεί. Ωστόσο, ακόμα λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς στο εσωτερικό των κυττάρων του παχέος εντέρου που οδηγούν στην καρκινογένεση. Επιπλέον, μέχρι σήμερα, η θεραπεία που χρησιμοποιείται βασίζεται σε ουσίες και τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καταπολέμηση του καρκίνου, χωρίς να είναι υποσχόμενο πάντα κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό, η έρευνα στο αντικείμενο του ορθοκολικού καρκίνου αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της βιολογίας του καρκίνου.

Όπως συμβαίνει και στους περισσότερους τύπους καρκίνου, το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η νόσος στον εκάστοτε ασθενή διαθέτει σημαντικό ρόλο όσον αφορά στην έκβαση της θεραπείας. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση ενός τρόπου ο οποίος να επιβεβαιώνει την ύπαρξη της νόσου στα πρώιμα στάδιά της. Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί διάφορα βιομόρια όπως πρωτεΐνες, RNA κλπ, τα οποία σχετίζονται με κάποιο γνωστό ή άγνωστο τρόπο με την εμφάνιση ασθενειών. Τα μόρια αυτά ονομάζονται βιοδείκτες και απορρύθμιση των επιπέδων τους στον ασθενή συμβάλλουν στη διάγνωση της νόσου αλλά και στην χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας.

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι μια νόσος που εξελίσσεται σε αρκετά στάδια, ενώ έχει παρατηρηθεί μεγάλο ποσοστό μεταστατικότητας σε ασθενείς με CRC, κυρίως στο ήπαρ. Ανάλογα το στάδιο της νόσου, η θεραπεία που ακολουθείται δύναται να διαφέρει. Η επιλογή της θεραπείας σε κάθε ασθενή πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψιν το σκοπό της θεραπείας, τον τύπο και το χρόνο χορήγησης προηγούμενης θεραπείας. Σημαντικό ρόλο για την εύρεση της κατάλληλης θεραπείας αποτελεί το προφίλ μεταλλάξεων του ασθενή και η ανθεκτικότητα σε κάθε ουσία, ειδικά όταν αυτά χορηγούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα στάδια της νόσου και η πιθανότητα μεταστατικότητας αλλά και η

χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένη. Για το λόγο αυτό, η ανάγκη εύρεσης νέων βιομορίων τα οποία θα υποδεικνύουν με ακρίβεια τα παραπάνω στοιχεία είναι ολοένα και πιο μεγάλη για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου.⁴⁷

Τα miRNAs είναι μια κατηγορία μικρών μη κωδικοποιημένων μορίων RNA, τα οποία διαθέτουν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή και τη μετάφραση διαφόρων πρωτεϊνών στα κύτταρα. Απορρύθμιση των επιπέδων των miRNAs (αύξηση ή μείωση), έχει βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, αλλά και σε διάφορα στάδια. Αποτελούν συνεπώς σημαντικούς βιοδείκτες, τόσο για τη διάγνωση, όσο και την πρόγνωση της έκβασης της ασθένειας.

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη συσχέτιση των miRNAs με τον ορθοκολικό καρκίνο. Η έρευνα του συγκεκριμένου κλάδου είναι μεγίστης σημασίας καθώς η άμεση διάγνωσή του μπορεί να αποτρέψει συχνά την ανάπτυξή του σε μη αναστρέψιμο στάδιο. Έχουν βρεθεί miRNAs τα οποία εμφανίζονται ειδικά στα κύτταρα του παχέος εντέρου, όταν αυτά γίνονται καρκινικά, τα οποία με κάποιο τρόπο συμμετέχουν στους μηχανισμούς παθογένεσης. Επιπλέον, μη επεμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης miRNAs, από τον ορό και τα κόπρανα, συμβάλλουν στην άμεση και ανώδυνη διάγνωση της νόσου.

Τα miRNAs τα οποία έχουν σχετιστεί με τον ορθοκολικό καρκίνο από διάφορους ερευνητές συγκεντρώνονται στους ανωτέρω πίνακες (1α, 1β, 2,3 και 4). Από αυτά, ομάδες miRNAs, όπως τα miRNA-17~92 (miR-92, miR-92a, miR-21 και miR-19a) συμβάλλουν στη διάγνωση της νόσου αλλά και στην πρόγνωση της έκβασής της (διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες). Τα miR-21, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-21, miR-29a, miR-92a, miR-106a/b, miR-135a/b, hsa-miR-181b, hsa-miR-200c, miR-203, miR-224 και εμφανίζονται αυξημένα σε κάθε περίπτωση στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Αντίθετα, η έκφραση των miR-192, miR-143 και miR-145 εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με τις ομάδες των υγιών ατόμων.

Άλλη ομάδα miRNAs που έχουν βρεθεί να υποδεικνύουν την απόκριση στη στοχευμένη θεραπεία, (προβλεπτικοί δείκτες) είναι το miRNA-1914, miRNA-1915, miRNA-21, miRNA-142-5p, miR-451 και το miR-31. Κάποια miRNAs αποτελούν δείκτες της επιτυχίας της αφαίρεσης του όγκου, όπως τα miRNA-20a, let7a, miRNA-1229, miRNA-1246, miRNA-150, miRNA-223, και miRNA-23a, miRNA-24, miRNA-320a, και miRNA-423-5p και της

πιθανής ανάπτυξης δευτερογενών ή μεταστατικών εστιών με βασικότερο τα miR-106a και miR-200c.

Όπως είναι εμφανές, η αναζήτηση miRNAs που εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σε σχέση με τα υγιή άτομα, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό όπλο στη φαρέτρα των κλινικών γιατρών και των επιστημόνων. Η αναζήτησή τους θα μπορέσει να αποτρέψει σε μεγάλο βαθμό την εμφάνιση όγκων σε προχωρημένο στάδιο, ενώ θα βοηθήσει και στην ανάπτυξη νέων, πιο εξειδικευμένων φαρμάκων και ουσιών για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά, αυξάνοντας τα ποσοστά επιτυχίας της θεραπείας, σε σχέση με τις γενικευμένες θεραπείες που επικρατούν την περίοδο αυτή.

Αν και μέχρι στιγμής, κανένα miRNA δεν έχει εγκριθεί για κλινική χρήση στον ορθοκολικό καρκίνο, ορισμένα miRNAs όπως τα miRNA-17~92 και τα miRNA-143 και miRNA-145 εμφανίζονται αρκετά υποσχόμενα, τόσο για τη διάγνωση, όσο και για την πρόγνωση και την έκβαση της νόσου.

Φυσικά, η αναζήτηση και νέων miRNAs αλλά και η αποσαφήνιση των μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται αποτελούν μέχρι και σήμερα απαραίτητο τομέα ερευνών σε πολλά εργαστήρια.

Πιθανώς, με τη χρήση των miRNAs ως προγνωστικούς και διαγνωστικούς, αλλά και προβλεπτικούς δείκτες όπως τα miR-451 και miR-31, τα επίπεδα θνησιμότητας των ασθενών από ορθοκολικό καρκίνο να μπορέσουν να μειωθούν σημαντικά, είτε μέσω της άμεσης διάγνωσης, είτε μέσω της κατάλληλης θεραπείας.

Οι βιοδείκτες μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την επιλογή των στρατηγικών θεραπείας για τους ασθενείς με CRC. Ωστόσο, ειδικά στο CRC, οι περισσότεροι από αυτούς τους δείκτες μπορεί να ενημερώσουν τους κλινικούς γιατρούς για τη συνολική πρόγνωση της νόσου, αλλά αποτυγχάνουν να καθοδηγήσουν τις θεραπευτικές αποφάσεις.

Πράγματι, οι περισσότεροι από αυτούς τους βιοδείκτες, εκτός από τα γονίδια KRAS και BRAF και την κατάσταση MSI, επί του παρόντος δεν προβλέπουν με ακρίβεια την απόκριση στη θεραπεία.

Ως εκ τούτου, απαιτούνται επείγοντως πρόσθετες μελέτες για τον εντοπισμό και την επικύρωση νέων βιοδεικτών, προκειμένου να βελτιωθούν τα αποτελέσματα για τους

ασθενείς με CRC. Ειδικά με τη σημασία της ανοσοθεραπείας στις θεραπείες για τον καρκίνο, καθίσταται περισσότερο σημαντικό να καθοριστούν νέοι βιοδείκτες που προβλέπουν την αποτελεσματικότητα των θεραπειών με βάση τη ανοσοποιητική απόκριση στους ασθενείς.

Με την ταχεία εξέλιξη των μοριακών εξετάσεων, καθώς και τη συνεχή βελτίωση της κατανόησης του CRC και της μοριακής εξέλιξής του, ελπίζουμε ότι θα εισέλθουμε σε μια νέα εποχή προσαρμοσμένων θεραπειών στις οποίες οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται συνήθως επιτρέπουν την ακριβέστερη θεραπεία των ασθενών.⁴⁸

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterol.* 2014;5(1):26–30.
2. Hong SN. Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intest Res* 2018;16(3):327-337.
3. Peifer M. Colon construction. *Nature.* 2002;420(6913):274–275.
4. Kostouros A, Koliarakis I, Natsis K, Spandidos DA, Tsatsakis A, Tsiaoussis J. Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders. *Int J Mol Med.* 2020;46(1):27–57.
5. Sideris M, Papagrigroriadis S. Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2014;34(5):2061–2068.
6. Kekelidze M, D’Errico L, Pansini M, Tyndall A, Hohmann J. Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol.* 2013;19(46):8502-8514.
7. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16365–85.
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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):209-249.
9. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683–91.
10. Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P, Raj JP. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Contemp Oncol.* 2018;22(3):141.
11. Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998–2001. *Cancer.* 2006;107(S5):1128–41.
12. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(2):385–98.
13. American Cancer Society. Colorectal Cancer Stages. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html> [Accessed 15th May 2021].
14. Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surg.* 2011;9(4):200–10.
15. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2020;158(2):291–302.
16. Cappell MS. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. *Med Clin North Am.* 2005;89(1):1–42.
17. Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2007;53(4):351–73.

18. Raje D, Mukhtar H, Oshowo A, Clark CI. What proportion of patients referred to secondary care with iron deficiency anemia have colon cancer? *Dis Colon Rectum*. 2007;50(8):1211–4.
19. Cappell MS, Friedel D. The role of sigmoidoscopy and colonoscopy in the diagnosis and management of lower gastrointestinal disorders: endoscopic findings, therapy, and complications. *Med Clin North Am*. 2002;86(6):1253–88.
20. Saito G, Sadahiro S, Kamata H, Miyakita H, Okada K, Tanaka A et al. Monitoring of serum carcinoembryonic antigen levels after curative resection of colon cancer: cutoff values determined according to preoperative levels enhance the diagnostic accuracy for recurrence. *Oncology*. 2017;92(5):276–82.
21. Nerad E, Lahaye MJ, Maas M, Nelemans P, Bakers F CH, Beets GL et al. Diagnostic accuracy of CT for local staging of colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Roentgenol*. 2016;207(5):984–95.
22. Kinkel K, Lu Y, Both M, Warren RS, Thoeni RF. Detection of hepatic metastases from cancers of the gastrointestinal tract by using noninvasive imaging methods (US, CT, MR imaging, PET): a meta-analysis. *Radiology*. 2002;224(3):748–56.
23. Martínez-Ares D, Martín-Granizo Barrenechea I, Souto-Ruzo J, Yanez Lopez J, Pallares Peral A, Vázquez-Iglesias JL. The value of abdominal ultrasound in the diagnosis of colon cancer. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2005;97(12):877–86.
24. Ribeiro MS, Wallace MB. Endoscopic treatment of early cancer of the colon. *Gastroenterol Hepatol*. 2015;11(7):445.
25. Bondevén P, Hagemann-Madsen RH, Laurberg S, Pedersen BG. Extent and completeness of mesorectal excision evaluated by postoperative magnetic resonance imaging. *Br J Surg*. 2013;100(10):1357–1367.
26. Cleary RK, Morris AM, Chang GJ, Halverson AL. Controversies in surgical oncology: does the minimally invasive approach for rectal cancer provide equivalent oncologic outcomes compared with the open approach? *Ann Surg Oncol*. 2018;25(12):3587–3595.
27. Du D, Su Z, Wang D, Liu W, Wei Z. Optimal interval to surgery after neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2018;17(1):13–24.
28. Lefevre JH, Mineur L, Kotti S, Rullier E, Rouanet P, Chaisemartin DC et al. Effect of interval (7 or 11 weeks) between neoadjuvant radiochemotherapy and surgery on complete pathologic response in rectal cancer: a multicenter, randomized, controlled trial (GRECCAR-6). *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3773–3780.
29. van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, Kranenbarg EMK, Beets GL, Figueiredo NL et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet*. 2018;391(10139):2537–2545.
30. McQuade R, Stojanovska V, Bornstein J, Nurgali K. Colorectal cancer chemotherapy: the evolution of treatment and new approaches. *Curr Med Chem*. 2017;24(15):1537–1557.
31. Carthew RW & Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–655.

32. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
33. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, & Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-98.
34. Dexheimer PJ & Cochella L. MicroRNAs: from mechanism to organism. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:409.
35. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, & Foti M. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *Int J of mol sciences*. 2019;20(24):6249.
36. Mattes J, Collison A & Foster PS. Emerging role of microRNAs in disease pathogenesis and strategies for therapeutic modulation. *Curr opin mol ther*. 2008;10(2):150-157.
37. Jeyaseelan K, Herath WB & Armugam A. MicroRNAs as therapeutic targets in human diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2007;11(8):1119-1129.
38. Cao DD, Li L, & Chan WY. MicroRNAs: key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(6):842.
39. Khan, AW. Nuclear functions of microRNAs relevant to the cardiovascular system. *Translational Research: microRNAs as Novel Therapeutics in Cancer*. 2020;230:151-163.
40. Romano G, Acunzo M & Nana-Sinkam P. microRNAs as Novel Therapeutics in Cancer. *Cancers*. 2021;13(7):1526.
41. Strimbu K & Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(6):463-466.
42. Piñol-Felis C, Fernández-Marcelo T, Viñas-Salas J & Valls-Bautista C. Telomeres and telomerase in the clinical management of colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:399-408.
43. Maghvan PV, Jeibouei S, Akbari ME, Niazi V, Karami F, Rezvani A et al. Personalized medicine in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2020;13(Suppl1): S18-S28.
44. Nikolouzakis TK, Vassilopoulou L, Fragkiadaki P, Mariolis Sapsakos T, Papadakis GZ, Spandidos DA et al. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients. *Oncology reports*. 2018;39(6):2455-2472.
45. García-Alfonso P, García-Carbonero R, García-Foncillas J, Pérez-Segura P, Salazar R, Vera R et al. Update of the recommendations for the determination of biomarkers in colorectal carcinoma: National Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clinical & Translational Oncology*. 2020;22(11): 1976-1991.
46. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*. 2020;9(2):276
47. Lan H, Lu H, Wang X & Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *BioMed research international*. 2015;2015:125094
48. Corté H, Manceau G, Blons H, & Laurent-Puig P. MicroRNA and colorectal cancer. *Digestive and liver disease*. 2012;44(3):195-200.
49. Mazeh H, Mizrahi I, Ilyayev N, Halle D, Brücher BL, Bilchik A et al. The diagnostic and prognostic role of microRNA in colorectal cancer-a comprehensive review. *Journal of cancer*. 2013;4(3):281-295.
50. Zhang N, Hu X, Du Y, Du J. The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2021;134:111099

51. Wu W K, Law PT, Lee CW, Cho CH, Fan D, Wu K et al. MicroRNA in colorectal cancer: from benchtop to bedside. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):247-253.
52. Zhu L & Fang J. The structure and clinical roles of MicroRNA in colorectal cancer. *Gastroenterology research and practice*. 2016;2016:1360348
53. Mohammadi A, Mansoori B, & Baradaran B. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:705-713.
54. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka, F, Mimori K, Uetake H et al. Over-and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International journal of oncology*. 2009;34(4):1069-1075.
55. Islam F, Gopalan V, Vider J, Lu CT & Lam AKY. MiR-142-5p act as an oncogenic microRNA in colorectal cancer: Clinicopathological and functional insights. *Experimental and molecular pathology*. 2018;104(1):98-107.
56. Wang S, Xiang J, Li Z, Lu S, Hu J, Gao X et al. A plasma microRNA panel for early detection of cancer. *International journal of cancer*. 2015;136(1):152-161.
57. Tokarz P & Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. *Acta Biochimica Polonica*. 2012;59(4):467-474.
58. Falzone L, Scola L, Zanghì A, Biondi A, Di Cataldo A, Libra M et al. Integrated analysis of colorectal colorectal cancer microRNA datasets: Identification of microRNAs associated with tumor development. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(5):1000–1014
59. Faber C, Kirchner T & Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Archiv*. 2009;454(4):359-367.
60. Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H & Mimori K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer. *Cancers*. 2017;9(9):124.
61. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013;62(9):1315-1326.
62. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58(10):1375-1381.
63. Xiao Z, Chen S, Feng S, Li Y, Zou J, Ling H et al. Function and mechanisms of microRNA-20a in colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2020;19(3):1605-1616.
64. Chiang Y, Song Y, Wang Z, Liu Z, Gao P, Liang J et al. microRNA-192,-194 and-215 are frequently downregulated in colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;3(3):560-566.
65. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J et al. Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer. *Biomarker insights*. 2006;2:113-121.
66. Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M et al. MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem cells*. 2011;29(11):1661-1671.
67. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2015;113(2):275-281.
68. Feng B, Dong TT, Wang LL, Zhou HM, Zhao HC, Dong F et al. Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PLOS ONE*. 2012;7(8): 10.1371

69. Yang X, Zeng Z, Hou Y, Yuan T, Gao C, Jia W et al. MicroRNA-92a as a potential biomarker in diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2014;9(2):e88745.
70. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK et al. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021;19(3):329–359.