

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Bádon Emese Sarolta

**Betegség követés molekuláris markerekkel
vastagbél adenocarcinomában**

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Betegség követés molekuláris markerekkel vastagbél adenocarcinomában

Dr. Bádon Emese Sarolta

Témavezető: Prof. Dr. Méhes Gábor



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	7
3. A vastagbél carcinomák patológiai és biológiai vonatkozásai.....	9
3.1. Onkogenezis	9
3.1.1. Öröklött és szerzett genetikai eltérések.....	9
3.2.1. Klinikailag jelentős génelterések	11
3.2.1.1. A RAS géncslád	11
3.2.1.2. A BRAF gén	13
3.2.1.3. Az EGFR gén.....	13
3.2.1.4. A HER2 gén	14
3.2.1.5. A TP53 gén.....	14
3.3. A RAS/MAPK útvonal.....	15
3.4. A gén mutációk klinikai jelentősége.....	16
3.4.1. A mutációk szerepe a tumor diagnosztikában	16
3.4.2. Molekuláris osztályozás.....	18
3.4.2.1. Kromoszóma-instabilitási útvonal (CIN).....	18
3.4.2.2. CIMP Island Methylator fenotípus (CIMP) útvonal	18
3.4.2.3. Mikroszatellita instabilitási útvonal.....	19
3.5. Rizikó faktorok, klinikai megjelenés, diagnózis, stádium, prevenció	20
3.5.1. Rizikó faktorok.....	20
3.5.2. Klinikai megjelenés és prevenció.....	21
3.5.3. Szövetteni diagnózis és patológiai stádium klinikai jelentősége.....	22
3.6. Molekuláris vizsgálatok és klinikai döntés támogatás.....	22
3.6.1. Prognózis	22
3.6.2. Kezelési stratégiák.....	24
3.6.3. Kezelési válasz meghatározása, monitorozása.....	26
3.6.3.1. Szövet, rebiopszia.....	26
3.6.3.2. Liquid biopszia (LB).....	27
3.7. Metabolikus adaptáció és hypoxia.....	30
3.7.1. Tumor hypoxia.....	30
3.7.2. Adaptációs mechanizmusok.....	31
3.7.3. Karboanhidráz IX	32
3.7.4. CAIX a CRC-ban.....	33
4. Célkitűzések.....	34

5.	Anyagok és módszerek.....	35
5.1.	A minták kiválasztása és a vizsgálat felépítése.....	35
5.2.	A minták feldolgozása	35
5.2.1.	Tumor DNS kivonása FFPE szövetmintákból	35
5.2.2.	cfDNS kivonása perifériás vérmintákból	35
5.2.3.	Mutációs státusz meghatározás	36
5.2.3.1.	Sanger-szekvenálás.....	36
5.2.3.2.	Reverz hibridizáción alapuló vizsgálat (StripAssay).....	36
5.2.3.3.	Új generációs szekvenálás (NGS) FFPE szövetmintákból.....	36
5.2.3.4.	Új generációs szekvenálás (NGS) liquid biopsziából.....	37
5.3.	Immunhisztokémiai vizsgálatok	38
5.4.	Statisztikai elemzés és ábrák készítése	39
6.	Erdemények.....	40
6.1.	Vastagbél adenocarcinomás esetek molekuláris patológiai vizsgálata.....	40
6.2.	A <i>KRAS</i> státusz vizsgálata és dinamikája multiplex vastagbél adenocarcinómában – esetbemutató.....	43
6.2.1.	NGS-alapú mutációs profil meghatározás.....	45
6.2.2.	<i>KRAS</i> konfirmálási vizsgálatok	46
6.2.3.	<i>TP53</i> génelterések vizsgálata	48
6.3.	Tumor heterogenitás követése a <i>KRAS</i> gén esetében szövettani és liquid biopsziás mintákban	51
6.3.1.	<i>KRAS</i> státusz követése LB mintából (1. eset).....	53
6.3.2.	<i>KRAS</i> státusz követése LB mintából (2. eset).....	55
6.3.3.	<i>KRAS</i> státusz követése LB mintából (3. eset).....	58
6.4.	Hypoxia és adaptáció vizsgálata kezelt (NAT) és nem kezelt (UT) végbél adenocarcinómában.....	61
6.4.1.	A CAIX expressziós mintázat végbél adenocarcinómában	63
6.4.2.	A CAIX expresszió dinamikája neoadjuváns kezelésben részesült végbél (NAT) adenocarcinoma eseteiben (n=55).....	65
6.4.3.	A kezeletlen (UT) végbél adenocarcinoma CAIX expressziója (n = 34).....	67
6.4.4.	Tumor regressziós grádus és CAIX a NAT biopsziás és NAT műtéti mintákban (n = 55)	69
6.4.5.	<i>KRAS</i> státusz és CAIX expresszió a NAT és az UT esetekben	69
6.4.6.	A betegek túlélése és a CAIX expressziója NAT és UT mintákban	71
6.4.7.	Sejtproliferáció és CAIX expresszió.....	71
7.	Megbeszélés	74

7.1.	Multiplex <i>KRAS</i> eltérések jelentősége.....	74
7.2.	<i>KRAS</i> státusz követése LB módszerrel.....	77
7.3.	<i>KRAS</i> státusz és hypoxiás adaptáció összefüggése.....	80
8.	A tanulmány főbb megállapításai.....	83
9.	Összefoglalás.....	85
10.	Summary.....	87
11.	Publikációs lista (A Kenézy Élettudományi Könyvtár jóváhagyása által).....	100
12.	Tárgyszavak.....	104
13.	Köszönetnyilvánítás.....	105
14.	Függelék.....	106

1. Rövidítések jegyzéke

Adenomatous polyposis coli (APC)	Adenomatous polyposis coli
AKT Serine/Threonine Kinase (AKT)	AKT szerin/treonin kináz
Antigen Kiel 67 (Ki-67)	Kiel 67 antigén
APC membrane recruitment protein 1 (FAM123B)	APC membrán toborzó fehérje 1
A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (ARAF)	A-Raf proto-onkogén, szerin/treonin kináz
AT-Rich Interaction Domain 1A (ARID1A)	AT-Rich Interaction Domain 1A
Beta catenin (CTNNB1)	Beta catenin
Calcium folinate (FOL)	Kálcium-folinát
CAMP responsive element binding protein 1 (CREB)	CAMP-re reagáló elemkötő fehérje 1
Carboanhydrase (CA)	Karboanhidráz, szénsavanhidráz
Carboanhydrase IX (CAIX)	Karboanhidráz IX, szénsavanhidráz IX
Caudal type homeobox 2 (CDX2)	Caudal type homeobox 2
Cell free DNA (cfDNA)	Szabadon keringő DNS
Chromosomal instability (CIN)	Kromoszomális instabilitás
Circulating tumor DNA	Keringő tumor DNS
Circulating tumor cell (CTC)	Keringő tumor sejtek
c-Jun N-terminal kinases (JNK-k)	c-Jun N-terminális kinázok
Colorectal cancer (CRC)	Vastagbél tumor
Computertomography (CT)	Komputertomográfia
Consensus of molecular subtype (CMS)	Konzensus a molekuláris altípusról
CpG island methylator phenotype (CIMP)	CpG sziget metilátor fenotípus
C-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (CRAF)	C-Raf proto-onkogén, szerin/treonin kináz
Cyclin-dependent kinase (CDK)	Ciklin-függő kináz
Cytosine-phosphate-guanine (CpG)	Citozin-foszfó-guanin
Deoxyribonucleic acid (DNA)	Dexoxiribonukleinsav (DNS)
DNA mismatch repair (MMR)	DNS hibajavító gének,
Epidermal growth factor receptor (EGFR)	Epidermális növekedési faktor receptor
Epidermal Growth Factor (EGF)	Növekedési faktor
Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (ERBB2 (HER2))	Erb-B2 receptor tirozin kináz 2
Extracellular pH (pHe)	Extracelluláris pH
familial adenomatous polyposis (FAP)	Familiáris adenomatous polipózis
Fluorouracil (5-FU)	Fluorouracil
Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE)	Formalin fixált paraffinba ágyazott
Growth factor (GF)	Növekedési faktor
Growth factor receptor (GFR)	Növekedési faktor receptor
Guanosine diphosphate (GDP)	Guanozin-difoszfát
Guanosine-5'-triphosphate (GTP)	Guanozin-5'-trifoszfát
Harvey Rat sarcoma virus (HRAS)	Harvey Rat szarkóma vírus
Hematoxylin eosin (H&E)	Hematoxilin-eozin

Hepatocyte Growth Factor Receptor (MET)	Hepatocyte Growth Factor Receptor
Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)	Human epidermális növekedési faktor receptor 2
Hypoxia-inducible factor(HIF)	Hypoxia indukáló faktor
Immunohistochemistry (IHC)	Immunhisztokémia
Intracellular pH (pHi)	Intracelluláris pH
Kristen rat sarcoma virus oncogen homolog (KRAS)	Kristen rat sarcoma virus oncogen homolog
Loss of heterozygosity (LOH)	heterozigótaság elvesztése
Magnetic Resonance Imaging (MRI)	Mágneses magrezonancia képalkotás
Metastasis (M)	Metasztázis
Metastatic colorectal cancer (mCRC)	metasztatikus vastagbél tumor
Micro RNS (miRNS)	Mikro RNS
Microsatellite instability (MSI)	Mikroszatellita instabilitás
Microsatellite stable (MSS)	Mikroszatellita stabil
Mismatch repair gene (MMR)	DNS hibajavító gének
Mitogen Activated Protein (MAP)	Mitogén aktivált fehérje
Mitogen Activated Protein kinase kinase (MAPKK)	Mitogén aktivált protein kináz kináz
Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase (MAPKKK)	Mitogén aktivált protein kináz kináz kináz
Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)	Mitogén által aktivált protein kináz
Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)	Mitogén által aktivált protein kináz kináz
Monoclonal antibodies (MoAbs)	monoklonális antitestek
Mothers against decapentaplegic homolog 2 (SMAD2)	Mothers against decapentaplegic homolog 2
Mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4)	Mothers against decapentaplegic homolog 4
MutL homolog 1 (MLH1)	MutL homológ 1
MutS homolog 2 (MSH2)	MutS homológ 2
MutS homolog 6 (MSH6)	MutS homológ 6
MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (c-Myc)	MYC proto-onkogén, bHLH transzkripció faktor
Neoadjuvant treated (NAT)	Neoadjuvánsan kezelt
Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS)	Neuroblasztóma RAS vírus onkogén homológja
Neurotrophic tyrosine receptor kinase 1 (NTRK1)	Neurotrophic tyrosine receptor kinase 1
Next-generation sequencing (NGS)	Új generációs szekvenálás
non coding RNS (ncRNS)	Nem kódoló RNS
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit (kB)	Nukleáris faktor NF-kappa-B p105 alegység
O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT)	O-6-Metilguanin-DNS Metiltranszferáz
Partial response (PR)	Parciális remisszió
Peripheral blood (PB)	Periferiás vér
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)	Foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát-3-kináz alfa katalitikus alegység
Phosphoinositide 3-kinases (PI3K)	Foszfoinozítid 3-kinázok
PMS1 Homolog 2 (PMS2)	PMS1 homológ 2
Progressive disease (PD)	Progrediált betegség

Polymerase chain reaction (PCR)	Polimeráz láncreakció
Protein 15 (p15)	Protein 15
Protein 21 (p21)	Protein 21
Protein 27 (P27)	Protein 27
Protein 38 (p38)	Protein 38
Radiotherapy (RT)	Sugárterápia
Rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF)	Gyorsan felgyorsult fibrosarcoma
Rat sarcoma virus (RAS)	Rat sarcoma vírus
Receptor tyrosine kinases (RTK)	Tirozin kináz receptor
Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (HER2)	Receptor tirozin-protein kináz erbB-2
Rh polypeptide 1 (RhD)	Rh polipeptide
Ribonucleic acid (RNA)	Ribonukleinsav (RNS)
Sessil serrated adenoma (SSA/P)	Sessil fogazott adenoma
Sex Determining Region Y (SRY)	nemet meghatározó Y régió
Signal transducer and activator of transcription (STAT)	Jelátalakító és transzkripció aktivátor
Single nucleotid variant (SNV)	Egynukleotidos variáns
Son of sevenless (SOS1)	Son of sevenless
SRY-Box Transcription Factor 9 (SOX9)	SRY-Box transzkripció faktor 9
Stable disease (SD)	Stabil betegség
Tirosin kinase inhibitor (TKI)	Tirozin kináz inhibitor
TNM stadium (T - tumor, N - lymph node, M - metastasis)	TNM stádium (T - tumor, N - nyirokcsomó, M - metastázis)
Tumor (T)	Tumor
Tumor microenvironment (TME)	Tumor mikrokörnyezet
Tumor microenvironment (TME)	Tumor mikrokörnyezet
Tumor regression grade (TRG)	Tumor regressziós grádus
Tumor supressor gene 53 (TP53)	Tumor szupresszor gén
Tumor supressor protein 53 (p53)	Tumor szupresszor fehérje
Untreated (UT)	Kezeletlen
Variant allele ferquency (VAF)	Variáns allél frekvencia
V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; serine/threonine kinase (BRAF)	V-raf egér szarkóma vírus onkogén homológ B1; szerin/treonin kináz

2. Bevezetés

A vastagbél-daganat (colorectal cancer, CRC) gyűjtőfogalom a vastag- és/vagy a végbélet érintő tumoros elváltozásokat foglalja magában, melyet a mirigyhámsejtjeinek neoplasztikus átalakulása okoz. A CRC jelentős egészségügyi problémát jelent, mivel a világon a harmadik leggyakrabban diagnosztizált és a második leggyakoribb halálos kimenetelű megbetegedés [1]. A daganatos megbetegedésekkel összefüggő halálozások mintegy 9,4%-a 2020-ban CRC miatt következett be [2,3]. Tekintettel azonban az idősebb korosztályban azonosított esetek számának jelentős növekedésére, a becslések szerint a CRC globális előfordulása 2035-re több mint kétszeresére fog emelkedni [4]. Az esetek száma világszerte nő, kialakulásának kockázatát környezeti és genetikai tényezők egyaránt befolyásolják [3,5].

Azonban csak a közelmúltban vált lehetővé a humán tumorok kialakulásának és progressziójának hátterében álló molekuláris mechanizmusok azonosítása [6,7], annak ellenére, hogy az onkogenezist régóta többlépcsős folyamatnak tartják [8]. A CRC tumorok kiváló terepet biztosítanak a daganat kialakulásában szerepet játszó genetikai változások keresésére, követésére és tanulmányozására. A bőséges klinikai és szövettani adatok arra utalnak, hogy a legtöbb, ha nem is minden CRC, már meglévő alapvetően nem agresszív elváltozásból, adenomákból alakul ki. A fejlődés különböző stádiumaiban lévő daganatok, a nagyon kicsi adenomáktól a nagy metasztatikus carcinomákig nyerhetők a vizsgálathoz, ellentétben a legtöbb más gyakori humán tumor típusal [6]. Továbbá mind az örökletes, mind a környezeti tényezők hozzájárulnak a CRC daganatok kialakulásához, ami lehetővé teszi mind az öröklött, mind a szomatikus genetikai változások vizsgálatát is [3,7].

Az örökletes daganatos megbetegedésekben (pl. Lynch szindróma) szenvedő betegek azonosítása ma már általános gyakorlat a klinikai onkológiában. Számos olyan vizsgálat létezik, mely a tumorszövet molekuláris jellemzői vagy a rosszindulatú daganat egyéb biológiai paraméterei alapján segít kiválasztani a leghatékonyabb kezelést [9].

Az immunhisztokémia (IHC), azaz a szöveten belüli specifikus antigén vizsgálatát lehetővé tevő módszer kifejlesztése a XX. század közepére nyúlik vissza [10]. Ezáltal az ösztrogénreceptor expressziós szintjének klinikai meghatározására is sor került. Ez valóban történelmi előrelépés volt a személyre szabott onkológiában, mivel megváltoztatta a leggyakoribb onkológiai betegséggel, az emlőrákkal kapcsolatos kezelési lehetőségeket, mivel az endokrin terápiát egy laboratóriumi vizsgálathoz igazította [11].

A polimeráz láncreakció (PCR) kifejlesztése óriási áttörést hozott a klinikai diagnosztikában. A PCR-alapú technikák viszonylag egyszerű műszereket és infrastruktúrát igényelnek, kis mennyiségű mintát használnak fel és nagymértékben összeegyeztethetők a klinikai rutinnal [9].

Nagy újítást jelentett Sanger és munkatársai úttörő munkája a 70-es évek végén, amikor kidolgozták a DNS szekvenálására leggyakrabban használt módszert [12], melyet napjainkban is a molekuláris

diagnosztika arany standardjának tekintenek. Egyre nagyobb erőfeszítések történtek a technikai ismeretek kiszélesítésére ezen a területen, egészen a "második és harmadik generációs szekvenálási" módszerek kidolgozásáig [13,14]. Az újgenerációs szekvenálási (NGS) technológia a nukleinsav-szekvenálás standard koncepcióját forradalmasító technikák csoportja. Az NGS-technológia nagy sikere annak köszönhető, hogy nagyon kis mennyiségű nukleinsav felhasználásával több millió read szekvenálására képes és alkalmas komplex genomok gyors szekvenálására is, ami idő- és költségghatékony [15].

Napjainkban a daganatok molekuláris profilalkotása információt szolgáltat a diagnózisról, a prognózisról, a terápiás válasz előrejelzéséről, ami a klinikai döntéshozatalban elengedhetetlen. Az utóbbi években megnőtt az új generációs technikákat alkalmazó vizsgálatok száma világszerte, többek között intézetünkben is. Alkalmazásuk jelentős eredményekhez vezetett a mutációk, a genomi átrendeződések azonosításával és a terápiás válasz lehetséges értékelésével kapcsolatban. A humán malignus megbetegedésekben előforduló összes gén közül a *RAS*-variánsok gyakorisága a legmagasabb [3]. A személyre szabott orvoslás a genetikai, genomikai és klinikai biomarkerek fejlesztésének köszönhetően válik lehetővé. A *RAS* biológiájának megértésében elért legújabb eredmények új lehetőségeket teremtettek a *RAS* közvetlen vagy a kulcsfontosságú *RAS*-effektorok hatékonyabb célba juttatására. Bár ezek az új szerek és megközelítések már ígéretes eredményeket mutattak preklinikai és klinikai vizsgálatokban, de a *RAS* jelátvitel komplexitása és az adaptív visszacsatolás lehetősége továbbra is jelentős kihívást jelent. Ezért a célzott terápiák kifejlesztéséhez a tumoros megbetegedések *RAS* variánsoktól való tulajdonságainak részletes megértésére lesz szükség [16].

Az elmúlt évtizedben a daganatos megbetegedések diagnosztizálására és monitorozására szolgáló invazív technikák helyére a nem vagy a kevésbé invazív módszerek épültek be. Ilyenek a liquid biopsziák, melyek drasztikusan forradalmasították a klinikai onkológia területét, megkönnyítve ezáltal a folyamatos mintavételezést, a személyre szabott terápiás sémák kidolgozását és a terápiára adott rezisztencia szűrését [17–19].

Ez a folyamatos fejlődés lehetőséget nyújt a DNS és RNS molekulák változásainak olyan szintű precíziós vizsgálatára, úgy szöveti- mint liquid biopsziás szinten, mely kulcsfontosságú a célzott terápiák megválasztásában. Ezen vizsgálatok széles spektruma elérhető Intézetünk Molekuláris Daganatpatológiai laboratóriumában is.

3. A vastagbél carcinomák patológiai és biológiai vonatkozásai

3.1. Onkogenezis

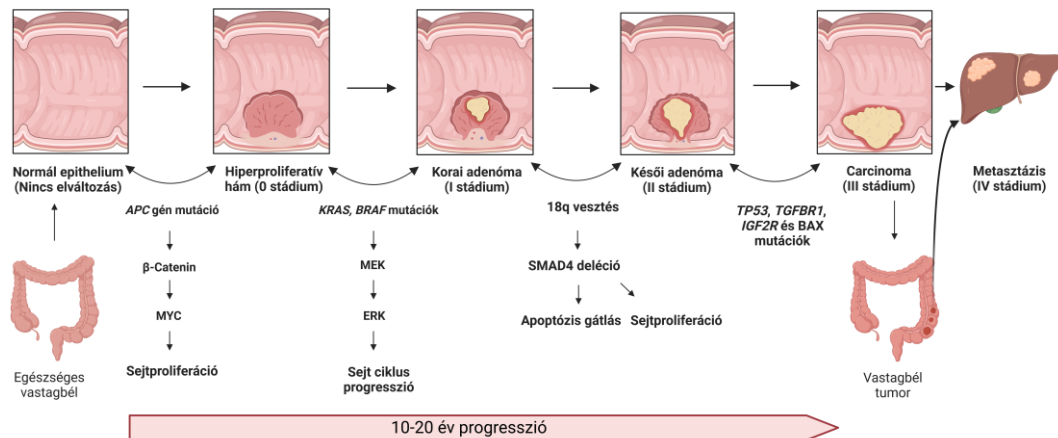
3.1.1. Öröklött és szerzett genetikai eltérések

Az örökletes CRC onkogenezisének tanulmányozása Dr. Aldred Warthin nevéhez fűződik, aki 128 évvel ezelőtt követte egy család kórtörténetét, melyben többszörösen tumoros halálesetek fordultak elő. Tanulmányaiban az érintett családfát vizsgálta, melyet G családnak nevezett el. Vizsgálatait 1895-ben kezdte el és 1913-ban publikálta első megfigyeléseit az *Archives of Internal Medicine* című folyóiratban, melyben dokumentálta a nőgyógyászati tumor különösen a méhnyálkahártya és gyomor-bélrendszeri tumorok közül is a gyomor- és CRC terjedési mintázatát [20,21]. 1971-ben Lynch és Krush újvizsgálták a G családot és arra a következtetésre jutottak, hogy az eredmények összhangban vannak az autoszomális domináns öröklődési mintázattal, de semmiképpen sem zárták ki a tumor kialakulásában szerepet játszó gének jelenlétét. Fearon és Vogelstein kimutatta, hogy egyes tumoros megbetegedésekben az adenomatosus polyposis coli (APC) gén mutálódik a karcinogén útvonal kezdeti lépéseként. [6,21].

A szomatikus változások egyik fontos lépése a CRC tumorok esetében a *RAS* génmutáció, mely Mariano Barbacid és Werner H. Kristen nevéhez fűződik, akik tanulmányaikban rávilágítottak arra, hogy a mutált *RAS* gének a betegségnek neoplasztikus tulajdonságokat kölcsönöznek [22,23]. Megfigyelték továbbá, hogy a CRC-k körülbelül 50%-ában, valamint az 1 cm-nél nagyobb adenomák hasonló százalékában *RAS* génmutáció van jelen. Ezzel szemben 1 cm-nél kisebb adenomák csupán 10%-nál mutattak ki *RAS* mutációt függetlenül attól, hogy az adenomák sporadikusan keletkeztek vagy öröklött hajlam volt a kialakulás hátterében. A *RAS* mutációval rendelkező adenomák nagyobb valószínűséggel fejlődhetnek tovább, mint a *RAS* génmutáció nélküliek. Ebből kifolyólag a *RAS* mutációk felelősek lehetnek egy kis méretű, de a daganatos sejtekből származó adenoma nagyobb és súlyosabb dysplasiát mutató adenomává való átalakulásáért, azáltal, hogy a mutációval rendelkező sejt klonális expanzióra hajlamos [6].

A malignus elfajulásának egyik módja az onkogéneket aktiváló és tumorszupresszor géneket inaktiváló genetikai és epigenetikai változások fokozatos felhalmozódása. A "klasszikus" vastagbél-daganat kialakulásának modelljében a daganatok túlnyomó többsége egy aberráns kriptával kezdődő polipból keletkezik, amely aztán korai adenomává fejlődik (<1 cm-es méret, tubuláris vagy tubulovillosus) [7]. Az adenóma előrehaladott adenomává fejlődik (>1 cm-es méret és/vagy villosus szövetten), mielőtt végül CRC-á alakul (1. Ábra) [7]. Ezt a folyamatot mutációk és epigenetikai változások felhalmozódása irányítja és körülbelül 10-15 év alatt alakul ki, de bizonyos esetekben (pl. Lynch-szindróma) hamarabb is kialakulhat [3,6]. Figyelemre méltó, hogy bár a hagyományos tubuláris adenomák szövettana meglehetősen hasonló, e polipok molekuláris biológiája heterogén, ami

magyarázatot adhat arra, hogy egyes adenómák miért fejlődnek CRC-á (a polipok kb. 10%-a), míg mások nem [3,7].



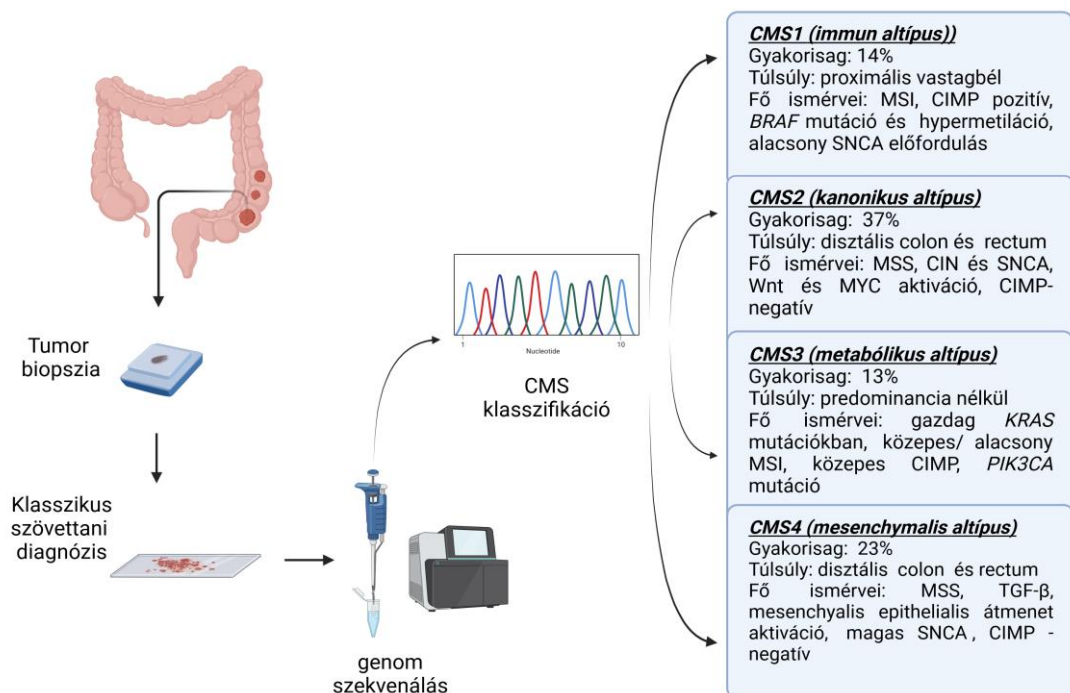
1. Ábra: A klasszikus vastagbél daganat kialakulásának modellje (saját forrás)

Továbbá a jobb colonfélben (coecum, a felszálló vastagbél és a haránt vastagbél) keletkező serrated polipok gyakran mikroszatellita instabil (MSI) fenotípussal rendelkeznek és az epigenetikai instabilitás egy olyan formáját hordozzák, amelyet CpG (citozin-foszfát-guanin)-sziget DNS-metiláció jellemez, amit CpG-sziget-metilátor fenotípusnak (CIMP) nevezünk. Ezzel szemben a bal colonfélben (leszálló vastagbél, szigmabél és végbél) keletkező polipok jellemzően mikroszatellita stabilak, gyakran hordoznak *KRAS* mutációkat és e polipok egy alcsoportja a CIMP attenuált formáját mutatja. A polipok és a belőlük kialakuló tumorok molekuláris különbségei miatt javasolták a CRC osztályozási rendszerét. A "Consensus Molecular Subtypes" (CMS) molekuláris altípusok olyan osztályozási rendszert jelentenek, amelyek a daganatok molekuláris jellemzői alapján történő kategorizálását teszik lehetővé. Ezek az altípusok segíthetnek az egyéni terápia megtervezésében és a betegség prognózisának meghatározásában. Az "arany standardnak" nevezett CMS osztályozás a CMS1 (immun altípus, 14%), CMS2 (kanonikus altípus, 37%), CMS3 (metabolikus altípus, 13%) és CMS4 (mesenchymális altípus, 23%) típusokból áll. A vegyes jellemzőkkel rendelkező heterogén mintákat vegyes vagy határozatlan csoportba (14%) sorolják [24–28]. A CMS altípusainak jellemzőit a 2. Ábra foglalja össze.

A CRC-ban a daganatok között jelentős heterogenitás figyelhető meg a specifikus mutációk tekintetében [29]. A CRC-ban leggyakrabban előforduló mutációk az *APC*, *CTNNB1*, *KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, *TGFBR2*, *TP53*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *SRY*, *SOX9*, *FAM123B* és *ERBB2*, amelyek a tumorigenezist a kulcsfontosságú jelátviteli útvonalakon keresztül, köztük a Wnt-β-catenin, az epidermális növekedési faktor (EGF), a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK), a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) és a TGF-β jelátviteli útvonalak működésének megzavarásával segítik elő. A CRC-t gyakran a Wnt jelátviteli útvonalat érintő változások indítják el, majd a kialakuló daganatos sejtek más jelátviteli útvonalak,

köztük a RAS-RAF-MAPK, a TGF- β és a PI3K-AKT útvonalak deregulációja következtében fejlődnek tovább [30].

A génmutációkon kívül epigenetikai változások is gyakran előfordulnak a praecancerosus laesiokban és a CRC-ban, és úgy tűnik, hogy a génmutációkkal együtt a premalignus állapot tumoros progressziójához vezetnek [31–33]. A DNS-metiláció a CpG-gazdag régiókat (CpG-szigeteket) érinti, amelyek gyakran a gének 5' régiójában találhatóak és a transzkripció faktorok kötődésére gyakorolt hatásokon és a kromatin szerkezetében bekövetkező változásokon keresztül transzkripció elnémulást eredményezhetnek [34]. A DNS-metilációban bekövetkező, a tumor kialakulásával összefüggő két alapvető változást foglalnak magukban: a gén promoternél lévő CpG-szigetek hipermetilációját, mely a tumorszupresszor gének elnémítását eredményezheti és a repetitív genetikai elemek hipometilációját, amely genom instabilitáshoz vagy onkogén aktivációhoz vezethet [7].



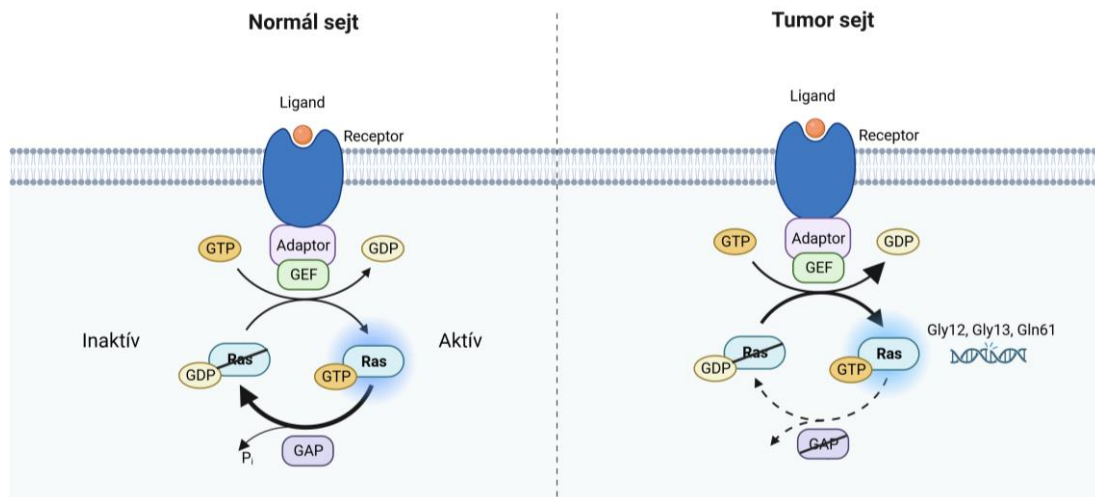
2. Ábra: CMS altípusok meghatározásának főbb lépései és jellemzői vastagbél-daganatban (saját forrás)

3.2.1. Klinikailag jelentős génelterések

3.2.1.1. A RAS géncslád

A leggyakrabban kimutatott onkogén elváltozások közé tartoznak a RAS család mutációi. A kis GTPázok RAS családjába négy egymással nagymértékben rokon tagból áll: KRAS 4A, KRAS 4B, HRAS és NRAS. A fehérjék a sejt citoszoljában termelődnek és a plazmamembrán belsején helyezkednek el [16]. A RAS gének GTPáz-ok egy csoportját kódolják, melyek szabályozzák a celluláris jelátvitelt. Kapcsolóként működnek az extracelluláris növekedési jelek átvitelében a sejtmag felé. Az aktiválódó RAS mutációk a

RAS fehérje aktivitását gátolják, ezáltal a GTPáz aktivitás csökken, a fehérje ellenállóvá válik a GTPáz általi GTP hidrolízissel szemben, ami szerkezetileg aktív GTP-kötött fehérjét és folyamatos növekedési stimulust eredményez onkogén aktivitással (3. Ábra). A RAS proto-onkogén mutációjával aktiválja onkogén potenciálját beindítva a tumorképződés folyamatát [8,23,35–39]. A RAS által szabályozott jelátviteli útvonalak olyan folyamatokat irányítanak, mint a sejtproliferáció, sejt differenciálódás, sejtadhézió, apoptózis. Ha ezekben mutáció következik be, akkor a sejteknek fokozódik az inváziós és metasztatizáló képessége [8,34].



3. Ábra: RAS aktiváció és inaktiváció folyamata normál sejten és az onkogenezisben (saját forrás)

A fenti ábrán a mutáns *KRAS* folyamatosan GTP-hez kötött aktív állapotban van (jobb oldal). A vad típusú *KRAS* ciklikusan változik az aktív GTP-hez kötött és az inaktív GDP-hez kötött állapot között (bal oldal) és nem osztódó sejtekben nagyrészt inaktív állapotban van jelen. Növekedési faktor stimuláció hatására a normál *KRAS*-t a RAS guanin nukleotid cserélő faktorok (RASGEF-ek) aktiválják, amelyek elősegítik a GTP kötődését a *KRAS*-hoz. A *KRAS*-GTP ezután a downstream effektorokhoz kapcsolódik. Ez a jelátviteli aktivitás a RAS GTPáz-aktiváló fehérjék (RASGAP-ok) hatására csökken, amelyek elősegítik a megkötött GTP GDP-vé történő hidrolízisét, így az inaktív *KRAS*-GDP képződését. A Gly12, Gly13 vagy Gln61 mutációja konstitutívan aktiválja a *KRAS*-t azáltal, hogy megakadályozza a van der Waals kölcsönhatások kialakulását a RAS és a RASGAP-ok között, illetve megzavarja a GTP hidrolíziséhez szükséges vízmolekula helyzetét. A GEF-ek és GAP-ek esetében a nyíl vastagsága jelzi a jelátvitel szintjét (3. Ábra) [40].

A RAS-család leggyakoribb mutációi a *KRAS* és *NRAS* géneket érintik. Ezek olyan pontmutációk, amelyekben egyetlen nukleotidot érintő eltérések láthatóak, melyek gyakran szomatikus eredetűek [8]. A *KRAS* a CRC leggyakrabban aktivált onkogénje. A 12. kromoszóma rövid karján, a 12.1. pozícióban található [22], mely 6 exonból áll. A *KRAS* mutációk az esetek körülbelül 30-50%-ában fordulnak elő,

különösen a 2. exon 12. (70-80%) és a 13. kodonjában (15-20%). Azonban előfordulhatnak a 3. exonban, az 59-61. kodonokban, valamint a 4. exonban, a 117. és 146. kodonokban is. A 2. exon 12. kodonjában leggyakrabban előforduló mutációk: a Gly12Asp, a Gly12Val és a Gly12Cys. A 3. exonban az érintett kodon a Gln61, míg a 4. exonban az Ala146 [8,36,41,42]. Jelenleg a *KRAS* mutációinak vizsgálata a metasztatikus CRC (mCRC) standard kezelésének része, lehetővé téve az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) elleni cetuximab és panitumumab antitestek alkalmazását, mivel a *KRAS* mutáció jelenléte előre jelzi ezekkel a szerekkel szembeni rezisztenciát [36].

A másik érintett gén az *NRAS*. Nevét a neuroblasztóma sejtekről kapta, melyekben eredetileg kimutatták. Az 1-es kromoszóma rövid karján a 13.2. pozícióban található. Az *NRAS* gének mutációi általában szomatikusak és nem öröklődnek [22]. A CRC-k körülbelül 3%-ban mutálódnak. Az *NRAS* aktiváló mutációi kölcsönösen kizárják a *BRAF* és *KRAS* mutációkat a CRC-ben és az anti-EGFR-antitestek hatástalanságát is előre jelzik [36].

3.2.1.2. A *BRAF* gén

A RAF-fehérjék a RAS utáni jelátvitelben közvetlenül elhelyezkedő szerin-treonin kinázok családjába tartoznak. A sejtek növekedéséhez és proliferációjához vezető RAF/MEK/MAPK szignáltranszdukciós útvonal aktiválásáért felelősek [43]. A 7. kromoszómán (7q34) található *BRAF* gén a *BRAF* fehérjét kódolja, ezáltal részt vesz a MAP kináz/ERK jelátviteli útvonalban [44]. Mutáns *BRAF* a sporadikus CRC-k 5-15%-ában fordul elő, gyakrabban a jobb colonfélét érinti, kevésbé a bal colonfélét (4%) és a végbelet (2%) [8,34]. A *BRAF* mutációk mintegy 90%-a a 15. exonban a T1799>A transzverzió szintjén fordul elő, ami glutaminsav-valin cserét eredményez (Val600Glu), mely a *BRAF* konstitutív aktiválásához vezet [8,36]. A Val600Glu a klinikai gyakorlatban leggyakrabban előforduló *BRAF* mutáció [45]. Rezisztenciát okoz az EGFR terápiával szemben és általában rosszabb prognózissal jár [46]. A *BRAF* és *RAS* mutációk a CRC-ben szinte mindig kizárják egymást. A *BRAF* mutáció a klasszikus adenoma-carcinoma útvonal helyett a serosus serrated útvonalon keresztül történő tumorfejlődésben mutatható ki [45,47–50]. Az agresszivitás szempontjából a *BRAF* mutáns daganatok körülbelül 60%-a rosszul és csak 36%-uk jól vagy mérsékelten differenciált. Hisztológiailag a mucinosus altípusban gyakrabban fordul elő a *BRAF* mutáció [8]. A legtöbb CRC-vel ellentétben a *BRAF* mutációval rendelkező daganatok gyakrabban adnak áttétet a hashártyába és ritkábban a tüdőbe és a májba [8].

3.2.1.3. Az *EGFR* gén

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) lokalizációja a 7p12. Membránhoz kötött receptor-tirozin-kináz, mely a receptor extracelluláris doménjén található és a monoklonális antitestek kulcsfontosságú célpontjává vált [8]. Aktiválja az intracelluláris szignáltranszdukciót a RAS/RAF/MAPK, STAT és PI3K/AKT útvonalakon keresztül, modulálva a sejtproliferációt, az adhéziót, az angiogenezist és a túlélést [51]. A CRC kialakulásának és progressziójának fontos összetevője. A *KRAS* mutációkat az

EGFR biológiai terápiájával szembeni rezisztencia prediktív jellemzőjének tekintik, ezért kulcsfontosságú a vizsgálatuk az onkológiai terápia megválasztásában [8].

Az EGFR funkciót célzó és gátló monoklonális antitesteket (MoAbs) általánosan alkalmazzák a CRC-k kezelésében. Az EGFR extracelluláris doménjét célozza meg a cetuximab és a panitumumab. Ezek a készítmények hatékonynak bizonyultak kemoterápiával kombinálva vagy önálló szerként is alkalmazva mCRC esetén [52]. Azonban az anti-EGFR a MoAb-kezeléssel szembeni rezisztencia gyakori [53]. A rezisztencia részben az EGFR intracelluláris jelátvitel onkogén aktiválásának tulajdonítható, beleértve a RAS/RAF/MAPK és PI3K/PTEN/AKT útvonalakat. A RAS/RAF/MAPK útvonalon a *KRAS* vagy *BRAF* mutációk a mCRC 35-45%-ban, illetve 4-15%-ban vannak jelen. A PI3K/PTEN/AKT útvonalon a *PIK3CA* mutációk és a PTEN expresszió elvesztése az CRC 10-18%-ában, illetve 19-42%-ában fordul elő. A *PIK3CA* mutációk a *KRAS* vagy *BRAF* mutációkkal együtt előfordulhatnak ugyanazon a daganaton belül, míg a *KRAS* és *BRAF* mutációi általában kizárják egymást [39].

3.2.1.4. A *HER2* gén

A *HER2* onkogén az EGFR-hez, HER1-hez, HER3-hoz és HER4-hez hasonló tirozin-kináz család tagja. A *HER2* a 17-es kromoszómán (7q12) található. Egy 185 kD méretű transzmembrán fehérjét kódol, amely ligandum kötés révén aktiválódik [34,54]. Aktiválása elindítja a jelátviteli útvonalakat, beleértve a MAPK-t és a PI3K/AKT-t, amelyek nélkülözhetetlenek a sejtek proliferációjához és differenciálódásához [55]. A fehérje a normál sejteken is megtalálható, viszont malignus folyamatokban, beleértve a CRC-t is, túlzottan expresszálódik [56]. A *HER2* amplifikáció gyakori genetikai változás mCRC-ben. A mCRC betegek körülbelül 5%-ánál fordul elő *HER2* génamplifikáció, génelterés vagy mindkettő [34,55,57,58]. Seo és mtsai. korrelációkat vizsgáltak a különböző klinikopatológiai változók és a *HER2* állapot között. Eredményeikben a *HER2* túlzott expressziója független volt a nemtől és a mikroszatellita állapottól, de korrelált az agresszív tumoros viselkedés jellemzőivel. Fokozott expressziója különösen a végbélben volt megfigyelhető [59]. A neoplasztikus sejtek a *HER2* szignáltranszdukciót egy alternatív útvonalként használják, mely immunitást biztosít számukra az anti-EGFR terápiákkal szemben. Ez a rezisztencia mechanizmus különösen a vad típusú RAS és *BRAF* tumorokban szerzett, amelyek egyébként érzékeny célpontjai lennének az anti-EGFR terápiának. A *HER2* egyre inkább terápiás célpontként jelenik meg, a trastuzumab-lapatinib és a trastuzumab-pertuzumab kombinációs terápiákban [58].

3.2.1.5. A *TP53* gén

A *TP53*-at a "genom kapuőrének" is nevezik [34]. Lokalizációja a 17p 13.1 pozícióban található. Mutációja számos malignus megbetegedésben kulcsfontosságú, köztük a CRC-ben is [60]. Fehérje terméke (tumor protein 53) felismeri a DNS sérülését, leállítja a sejtciklust, hogy lehetővé tegye a DNS javítását. Helyrehozhatatlan károsodás esetén elindíthatja a sejtek apoptózisának folyamatát [60–62].

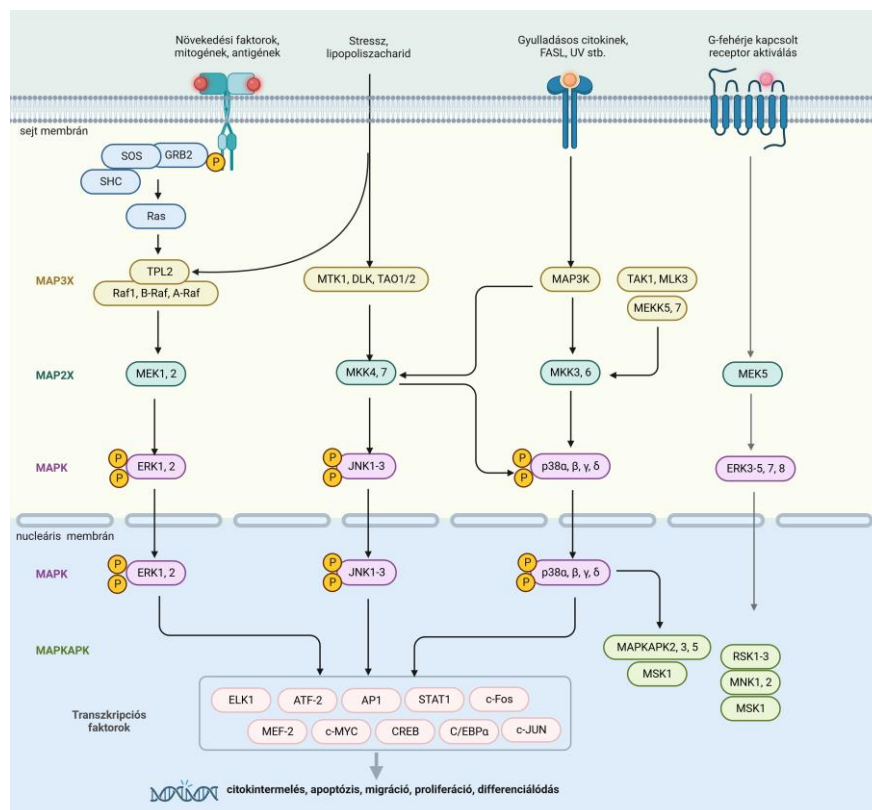
Az invazív CRC-k közel 50%-a hordoz *TP53* génmutációt, és gyakran fordul elő a végbélben vagy a disztális vastagbélben növekvő tumorokban [61]. Szerepe a CRC patogenezisében dichotómikus, magában foglalhatja a *TP53* gén "funkcióvesztését", mely az egyik allél inaktív mutációjából és a másik allél kromoszóma-instabilitás következtében bekövetkező elvesztéséből, vagy a DNS-kötő doménben lévő missense-típusú mutációk megszerzéséből ered, melyek a *TP53*-at proto-onkogénné alakítják át [62]. Az elmélet szerint ez az esemény az adenoma - carcinoma transzformációs útvonalban később következik be, mivel viszonylag alacsony arányban fordul elő a preacancerosus léziókban és nagyobb arányban az invazív esetekben [63]. Ez alól kivétel a vastagbélgyulladásal társuló carcinoma, ahol a *TP53* elvesztése a patogenezis korábbi lépése [64].

3.3. A RAS/MAPK útvonal

A RAS/MAPK útvonal egy összetett jelátviteli kaszkád, amely számos egyéb szignáltranszdukciós útvonallal és állandó keresztkapcsolódásokkal rendelkezik. Szerepük a sejtproliferációs, növekedési és túlélési folyamatokat fenntartó kulcsmolekulák szabályozásában van [42,65,66]. A MAPK jelátviteli kaszkád egy vagy több növekedési faktor (GF) és a hozzájuk tartozó specifikus növekedési faktor-receptorok (GFR) kölcsönhatásából áll. A GF-ok kötődnek és aktiválják a receptor-tirozinkináz (RTK) családba tartozó transzmembrán glikoproteineket, aktiválják a szignáltranszdukciós kaszkádot, amelyet a citoszolikus intermedierek keresztül történő jelátvitel, végül pedig az effektor gének transzkripció/transzláció szabályozása követ [67]. Ezeket elsősorban a növekedési faktor receptorok képviselik, amelyek aktiválásukat követően elősegítik a downstream szignáltranszdukciót. Ilyen például az epiteliális növekedési faktor (EGF), mely a nagy affinitású membránreceptorát az epidermális növekedési faktor receptort (EGFR) célozza meg [65]. A MAPK-útvonal foszforilációs kaszkádját aktiváló citoszolikus intermedierek első sorát a RAS GTPáz-ok szupercsaládja képviseli, amely több mint 150 kis G-fehérjét foglal magában, mint például a HRAS, KRAS, NRAS [16,68]. A RAS a kis G-fehérje család tagja, amely a GTP-hez kötött aktív és a GDP-hez kötött inaktív állapotok között ingadozik. A RAS a MAPK-útvonal kulcsfontosságú szabályozója [22]. Az EGFR aktiválódását követően a RAS GTPáz az EGFR-hez kapcsolódó nukleotidcsere-faktor Son of Sevenless 1 (SOS1) segítségével aktiválódik. A SOS1 határozza meg a GTP gyors átalakulását GDP-vé, ami a RAS-GTP, a RAS aktív formájának képződését korlátozza [69].

A RAF a RAS downstream effektorja, ezért függ az aktivált RAS-sal való kölcsönhatástól. A RAF-család számos változatot tartalmaz (pl. ARAF, BRAF, CRAF) [65], melyek szerin/treonin kinázokból állnak. A MEK (MAP kináz-ERK kináz) és az ERK1/2 (extracelluláris jelszabályozott kinázok) aktiválásával felelősek az útvonal progressziójáért. Az aktivációs kaszkád a következő sorrendben zajlik: MAPKKK (mitogén-aktivált protein kináz kinázok, amelyet a RAF és változatai képviselnek), majd a MAPKK (MEK1/2/3/4/5/6/7), végül a MAPK. Három fő klasszikus MAPK létezik különböző izoformákkal ERK-k

(ERK1 és ERK2 izoformákkal), JNK-k (c-Jun N-terminális kinázok, JNK1, JNK2 és JNK3 izoformákkal) és p38 MAPK-k (p38 α , p38 β , p38 γ és p38 δ izoformákkal) [65,66,70]. Mind a MEK, mind az ERK1/2 számos folyamatban vesz részt, például a sejtek túlélésében, proliferációjában és differenciálódásában, amelyek mindegyike a MEK, illetve az ERK1/2 foszforilált célpontjaitól függ. A sejtmagban az ERK1/2 képes aktiválni olyan transzkripciós faktorokat, mint a CREB (cAMP válaszelem-kötő fehérje), valamint a c-MYC (transzkripciós szabályozó Myc-like) és az NF- κ B (nukleáris faktor kappa B) (4. Ábra). Ez teszi az ERK1/2-t fontos daganatellenes terápiás célponttá [65,66,70].



4. Ábra: A vastagbél-daganatban szerepet játszó MAPK útvonalak (saját forrás)

3.4. A génmutációk klinikai jelentősége

3.4.1. A mutációk szerepe a tumor diagnosztikában

A legtöbb daganatos megbetegedést többszörös szomatikus mutációk jellemzik. Ezeket a mutációkat a tumor kialakulására gyakorolt hatásuk alapján driver vagy passenger mutációknak nevezzük [71]. A legtöbb tumor szekvenálási vizsgálatban a driver mutációkat helyezik előtérbe, az általuk biztosított növekedési előny miatt, ami pozitív szelekciót okoz a tumor fejlődése során [71,72]. A passenger mutációk eddig nem kerültek előtérbe, alapvetően azért, mert nem biztosítanak szelektív előnyt. A passenger mutációk azonban informatívak lehetnek, mivel különösen a passenger és driver mutációk száma lehetővé teszi, hogy információt nyerjünk mind a sejtvonalban bekövetkezett mitotikus sejtosztódások számáról, mind az egyes sejtosztódásoknál bekövetkezett mutációs rátáról [72]. A passenger mutációk felelősek egy új, izgalmas kutatási terület kialakulásáért. Abból a

feltételezésből kiindulva, hogy ezen passenger mutációk mintázata időben változatlan, ezek a mutációk reprezentatív képet adhatnak a tumor fejlődése során az aktív mutációs mechanizmusokról [73]. Így a driver- és passenger mutációs mintázat tükrözi azokat a DNS károsodási és javítási folyamatokat, amelyeken a daganatos sejtek idővel keresztülmennek [71].

Ilyen kulcsfontosságú driver mutáció a *KRAS* mutáció. Klinikai biomarkerként és potenciális terápiás célpontként való azonosítása vonzotta a tudományos célközösséget egy hatékony és pontos daganatellenes gyógyszer kifejlesztésére. [22,43,74]. A *RAS* mutációk azonosításának klinikai jelentősége, diagnosztikai és terápiás vonatkozásai vannak, mivel a CRC-ben az *NRAS/KRAS* mutáció jelenléte összefügg és előrejelzi az anti-EGFR terápiára adott válasz hiányát [75].

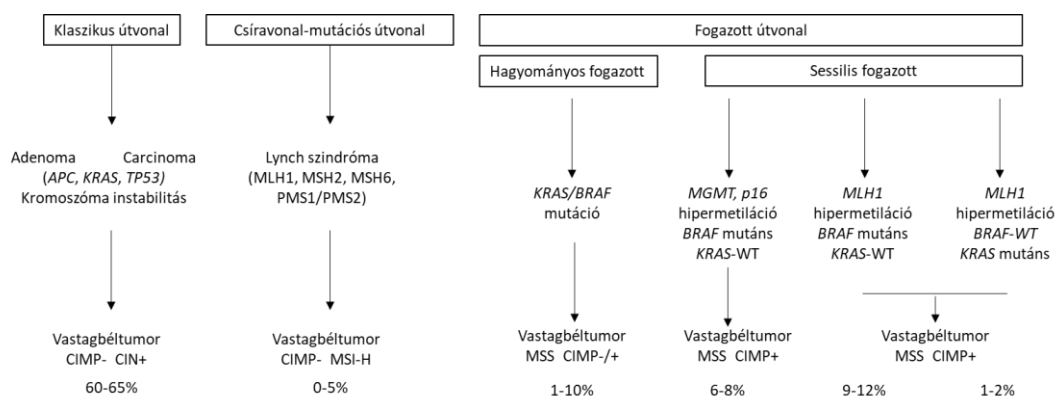
A *KRAS* a sporadikus mCRC-s betegek akár 50%-ában aktiválódik és az aktiválódások 95%-a a 2. exon 12/13-as kodonjában történik [76]. Fontos, hogy a *KRAS* 2–4. exon mutációi (amelyek a 12., 13., 161., 117. és 146. kodonokat érintik) nem reagálnak a cetuximab és a panitumumab terápiákra [77]. Egyes tanulmányokban a *KRAS* mutációk bevacizumabbal szembeni rezisztenciát is eredményezhetnek [78,79]. Az onkogének kiterjesztett *RAS* családjába az *NRAS* is részt vesz melynek a 2–4. exon mutációi a CRC-k 3–5%-ában fordulnak elő, és hasonlóan alacsonyabb választ eredményeznek az anti-EGFR terápiára [52,80].

A *BRAF* a Val600Glu variánsa a vastagbél adenocarcinomák közel 10%-ában fordul elő, mely kölcsönösen kizárja a *RAS* mutáció jelenlétét. Erős negatív prognosztikai marker, mely mind a citotoxikus, mind az anti-EGFR terápiával szemben rezisztenciát mutat [81,82].

Bár számos más biomarkert tanulmányoznak, mint például *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, *APC*, *SMAD4*, amelyek potenciálisan előre jelezhetik a terápiára adott választ mCRC-ben, jelenleg csak a *RAS* mutációk és a tumor elhelyezkedése (bal vs. jobb) olyan tényezők, amelyeket figyelembe kell venni a betegek anti-EGFR terápiára történő kiválasztásakor [83].

3.4.2. Molekuláris osztályozás

Az CRC-k három különböző mechanizmus, nevezetesen a kromoszóma-instabilitás (CIN), a CpG-sziget-metilátor fenotípus (CIMP) és a mikroszatellita-instabilitás (MSI) egyikéből vagy kombinációjából eredhetnek.



5. Ábra. A molekuláris osztályozásban szerepet játszó útvonalak genetikai és epigenetikai vonatkozásai (saját forrás)

3.4.2.1. Kromoszóma-instabilitási útvonal (CIN)

A genomiális instabilitás leggyakoribb formája a CIN. Aneuploidia vagy poliploidia jelenlétéről ismerhető fel. A kromoszómák számszerű változásainak vagy a kromoszómák többszörös szerkezeti aberrációinak jelenléteként definiálható. A vastagbél-daganatokban előforduló mutációk a genomi instabilitás két módjára vezethetők vissza: a CIN-re és a MSI-re [3]. A CIN a CRC-s esetek mintegy 70-85%-ában figyelhető meg [84–86]. A klasszikus adenoma – carcinoma modell szerint az *APC* mutációja CIN-on keresztül indítja el a tumoros átalakulást, mely különböző számbeli kromoszóma-aberrációkat, leggyakrabban a 18-as kromoszómát, szubkromoszómális aberrációkat és heterozigotizáció veszteséget foglal magában [9]. A CIN egyik jelentős jellemzője, hogy tumorsuppresszor gének delécióját okozza. A CIN-ben érintett kulcsfontosságú gének közé tartozik az *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PI3KCA* stb.[34,87]. Annak ellenére, hogy a CIN-ért felelős mechanizmusok meghatározása még nem világos, van némi bizonyíték arra, hogy a CIN a mögöttes októl függetlenül a klonális diverzitás növelésével elősegíti a tumoros folyamat progresszióját. Ez a megfigyelés releváns a CRC kialakulása szempontjából, mivel bár ritkán, de kromoszóma rendellenességeket észleltek vastagbél adenómákban, ami arra utal, hogy a CIN az adenoma – carcinoma szekvencia korai szakaszában keletkezhet [85]. A CIN-ből kiinduló CRC-k rosszabb kimenetelűek, mint a mikroszatellita instabilitással rendelkező daganatok [85].

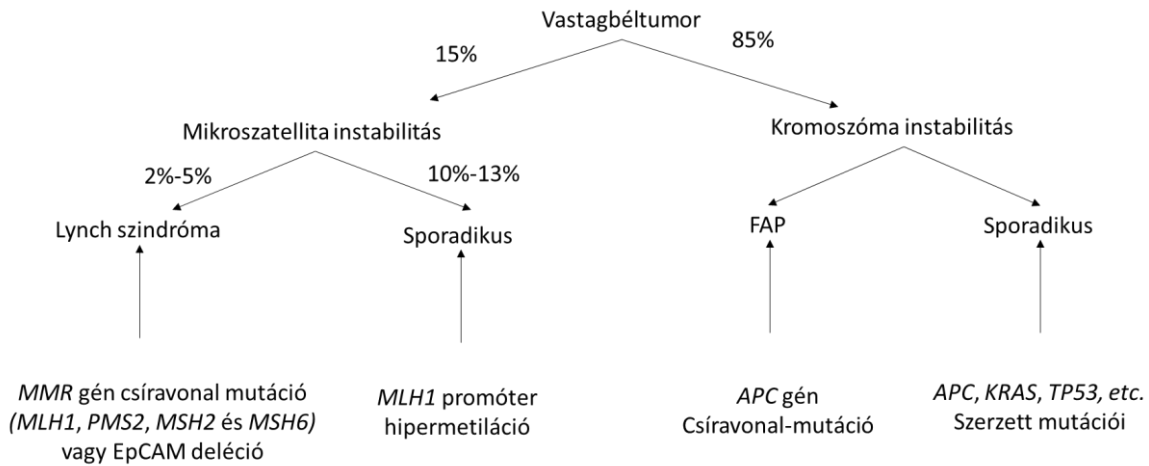
3.4.2.2. CIMP Island Methylator fenotípus (CIMP) útvonal

A CIMP egy olyan epigenetikai esemény, mely a megfigyelések szerint megelőzi a tumor kialakulását. A folyamat a metilációs szintek növekedésével jár a promóter régióban, ami a tumorsuppresszor gének elnémításához vezethet. Ezzel szemben a globális hipometilációt genomi instabilitással és kromoszóma aberrációkkal hozták összefüggésbe. CRC-ban az epigenetikai instabilitás

a CpG-szigetek hipermetilációjaként jelentkeznek, gyakran globális DNS hipometilációval együtt. CIMP-pozitív CRC-ban a tumorszupresszor gének promóter régiói gyakran hipermetiláltak, ami a gének funkcióvesztését eredményezi [88]. Továbbá CIMP-et hordozó CRC-k sajátos klinikai, patológiai és molekuláris profillal rendelkeznek. Összefüggést mutatnak a proximális tumor elhelyezkedésével, a női nemmel, a rossz differenciálódással, az MSI-vel, valamint a fokozott *BRAF*- és alacsony *TP53*-mutációs státusszal [89]. A CIMP-t ma már a sporadikus CRC egy különálló molekuláris altípusának tekintik, amely a CRC tumorigenezisében a serrated neoplasia útvonal kezdeti eseménye. A CIMP-et a DNS-metiltranszferázok (DNMT-k) közvetítik, amelyek elősegítik a tumorszupresszor gének promóterhez kapcsolódó CpG-gazdag régióinak hipermetilációját, melyeket a transzkripció inaktívál, ami a CRC kialakulásához és progressziójához vezet [90]. A DNS-metilációs profilok elemzése kimutatta, hogy a CRC-k nagyjából 20%-a CIMP kategóriába tartozik [24].

3.4.2.3. Mikroszatellita instabilitási útvonal

A mikroszatelliták rövid tandem ismétlődő DNS-szekvenciák, amelyek az emberi genomban mind a kódoló, mind a nem kódoló régiókban jelen vannak. Ismétlődő szerkezetük miatt a mikroszatelliták különösen hajlamosak a replikációs hibákra, amelyeket általában MMR rendszer javít [91]. Az MMR egy nagyon konzervált, számos fehérjét magában foglaló sejtfolyamat, amely a DNS-replikáció, a genetikai rekombináció, a kémiai vagy fizikai károsodás során keletkezett hibás bázisok azonosítását és későbbi javítását eredményezi. Az MMR-rendszerbe tartozó fehérjék közé tartoznak az MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3, PMS1 és Exo1 [92]. Ezek a fehérjék heterodimert alkotnak, amelyek a DNS-károsodást javítják. A normális DNS-replikáció során, amikor az MMR jól működik, a kis DNS-hibákat kezdetben az MSH2/MSH6 és MSH2/MSH3 heterodimerek észlelik és kötik meg [33]. Az MLH1/PMS2 heterodimerek ezt követően jelentkeznek a kivágáshoz és az új, javított szál újraszintéziséhez. A hiányos MMR azonban egy erős mutátor fenotípust eredményez, melyet MSI-nak nevezünk. Az MSI-t a CRC egyik fő carcinogenetikai útvonalaként ismerik, mely a LS molekuláris jellemzője. Általában az MMR-gének valamelyikének csíravonal-mutációjához kapcsolódik [20, 47]. Az MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 MMR-fehérjék IHC-vizsgálatával jelezni lehet a működő MMR-rendszert, megállapítva az MSI jelenlétét vagy hiányát. Figyelembe kell venni, hogy a PMS2 és az MSH6 MMR-fehérjék együttműködnek az MLH1-el, illetve az MSH2-vel és expressziójuk szorosan összefügg. Ezért az MSH2 expressziójának elvesztése gyakran társul az MSH6 expressziójának elvesztésével. Ez a mintázat erősen utal az MSH2 csíravonal-mutációjára [93]. Hasonlóképpen, az MLH1 expressziójának elvesztése gyakran társul a PMS2 expressziójának elvesztésével és ez a mintázat vagy az MLH1 csíravonal-mutációjából vagy az MLH1 gén promóterének szerzett szomatikus hipermetilációjából eredhet. Az MSH6 és a PMS2 csíravonal-mutációi általában az MSH6, illetve a PMS2 fehérje izolált expresszió vesztésével járnak együtt [85].



6. Ábra: A vastagbél-tumorkban előforduló mikroszatellita és kromoszóma instabilitás (saját forrás)

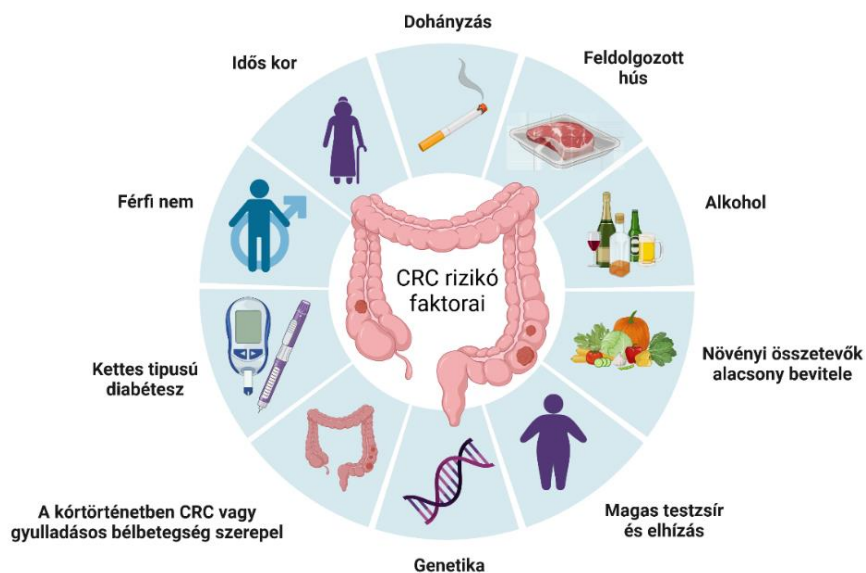
Míg a legtöbb CRC kromoszóma instabilitást mutat, a CRC-k körülbelül 15%-a hibás MMR eredményeként alakul ki (6. Ábra). A National Cancer Institute az MSI vizsgálatára egy diagnosztikai panelt ajánlott, amelyben két mononukleotid marker: a BAT25 és BAT26, valamint három dinukleotid marker: a D2S123, D5S346 és D17S250 szerepel [85,94]. Ezzel a panellel az MSI-H akkor definiálható, ha a tumorsejtekben lévő öt marker közül legalább kettő a normális sejtekhez képest instabilitást mutat. Eközben, ha csak egy marker esetén látható instabilitás a tumorsejtekben, a molekuláris fenotípust MSI-alacsony (MSI-L) kategóriába sorolják. Mikroszatellita stabil (MSS) státuszba sorolható, ha a tumorsejtek DNS-ben nincs instabil marker [94]. „Mikroszatellita magas” (MSI-H) ha markerek $\geq 30\%$ -ának instabilitása látható. A „mikroszatellita alacsony” (MSI-L) ha a markerek 10-29%-ában mutatkozik instabilitás és „mikroszatellita stabil” (MSS), ha az instabil markerek hiányoznak [33,85]. Az MMR-fehérjék vizsgálatának elengedhetetlen feltétele a formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) CRC-k szövettani mintájának IHC elemzése az MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 tekintetében [93].

3.5. Rizikó faktorok, klinikai megjelenés, diagnózis, stádium, prevenció

3.5.1. Rizikó faktorok

A CRC jelentős népegészségügyi problémát jelentenek. A férfiaknál a harmadik leggyakoribb, a nőknél pedig a második leggyakoribb malignus megbetegedés. 2020-ban Magyarországon volt a legmagasabb a CRC-s esetek összesített aránya világvizonylatban. Az összesített legmagasabb halálozási arány Szlovákiában volt [3,95]. Évente közel 1 millió halálesetet okoz, a szűrési technikák ellenére, amelyek csökkentették a betegségből eredő halálesetek számát. Az International Agency for Research on Cancer (IARC) becslése szerint a CRC globális terhe 2020 és 2040 között 56%-kal fog növekedni és évente több mint 3 millió új esetre fog nőni [2]. A betegség okozta halálesetek számának becsült növekedése még ennél is nagyobb 69%-os lesz és 2040-re világszerte mintegy 1,6 millió

halálesetet fog jelenteni. A növekedés nagy része várhatóan a fejlettebb országokban fog bekövetkezni [96]. Az esetek folyamatos növekedése és a CRC kialakulása összefügg a nem befolyásolható és a befolyásolható kockázati tényezőkkel. Nem befolyásolható tényezők a személyes kórtörténet (nem, életkor, adenomatosus polipok, gyulladós bélbetegség (IBD) anamnézise) és a családi anamnézis nem befolyásolható az egyének által (7. Ábra). Befolyásolható tényezők az egyéni szokásokkal vagy életmóddal kapcsolatosak, melyek megváltoztatásával a CRC kockázata jelentősen csökkenthető [3].



7. Ábra: A vastagbél tumor kialakulásában szerepet játszó rizikó faktorok (saját forrás)

3.5.2. Klinikai megjelenés és prevenció

A CRC korai stádiumban nem feltétlenül jár tünetekkel. A tüneteket okozó problémák általában a folyamat előrehaladása után kezdődnek. A leggyakoribb tünetek a hasi fájdalom, a székelési szokások megváltozása, a végbélvérzés vagy vérszegénység, de ezek a tünetek más gyomor-bélrendszeri betegségek esetén is gyakran előfordulnak, ezért a differenciáldiagnosztika kiemelkedően fontos.

A bélmozgások megváltozása a bal colonefált érinti gyakrabban, melyet a bél lumenének fokozatosan kialakuló szűkülete okoz, ami hasmenéssel, a széklet formájának megváltozásával és végül bélelzáródással társul. A vashiányos anaemiában szenvedő betegek körülbelül 10%-ánál fordul elő CRC, leggyakrabban a jobb colonefélbe, ezért a férfiak és a menopauzában lévő nők vashiánya sürgős kivizsgálást tesz szükségessé [97].

Megkülönböztetünk specifikus és nem specifikus tüneteket [98]. A specifikus tünetek csoportjába tartozik a hasi fájdalom, a széklet textúrájának megváltozása (ceruzaszéklet), a székelés gyakoriságának megváltozása, a vér megjelenése a székletben vagy végbélvérzés, tenesmus, anaemia. A nem specifikus tünetek közé tartozik a hasmenés, székrekedés, puffadás, fáradtság, étvágytalanság és az ok nélküli fogyás [97,99].

A rendszeres CRC szűrés kulcsfontosságú, különösen akkor, ha az előfordulás esélye nagyobb a családi kórtörténet miatt. A szűrővizsgálatok a tumor korai felismerésének egyetlen módja. Az általános lakosság körében a polipectomiával végzett vastagbélükrözés a CRC kockázatának csökkenésével és korai felismerése révén a túlélés javulásával jár. Az általános lakosság körében végzett National Polyp Study (USA) újraelemzése során a vastagbélükrözéssel végzett szűrővizsgálatok melyek polipectomiával társultak a 15 éves követés során 53%-kal csökkentette a CRC halálzásának kockázatát, valamint a CRC előfordulása legalább 66%-kal csökkent [100].

Számos hatékony szűrési mechanizmust fejlesztettek ki a CRC kimutatására. Ezek közé tartoznak a székletvizsgálat, a kettős kontrasztú báriumos beöntés, a virtuális és optikai vastagbélükrözés, a széklet DNS-vizsgálat. Ha a szűrővizsgálat pozitívnak bizonyul, a kezelés és a prognózis meghatározása érdekében stádiumbeosztást kell végezni, mivel a korai stádiumban lévő CRC felismerése lehetőséget nyújt a betegség okozta halálzás csökkentésére. Továbbá a korai CRC felismerése lehetővé teszi a kevésbé invazív kezelési módszerek alkalmazását is [101].

3.5.3. Szövettani diagnózis és patológiai stádium klinikai jelentősége

A CRC-ből származó szövettani minta vizsgálata a CRC-k diagnózisának arany standardja és a kezelés megkezdésének alapfeltétele. A stádiumbeosztás (tumor-nyirokcsomó-metasztázis: TNM) a szövettani minta feldolgozása alapján történik, melyben a T1-T4 a daganat bélalba való terjedésének mélységét, az N0-N2 a regionális nyirokcsomók érintettségét, az M0-M1 pedig a távoli áttétek hiányát vagy jelenlétét jelölik. A stádiumbeosztás (I-IV) azon alapul, hogy a daganat milyen mélységig terjed. A korai stádiumok a kisebb, felszíni hámot érintő daganatok, a későbbi stádiumok a nagyobb, a bélfal rétegeit mélyebben érintő, a regionális nyirokcsomókra és a test távoli területeire (pl. máj, tüdő, csont és agy) terjedő daganatokat jelölik [102]. A megfelelő kezelés kiválasztása a stádium meghatározásától függ, ennek értelmében korai stádiumban elsődlegesen a műtétet részesítik előnyben, míg a későbbi stádiumok esetén műtét előtti és utáni kezeléseket alkalmaznak.

3.6. Molekuláris vizsgálatok és klinikai döntéstámogatás

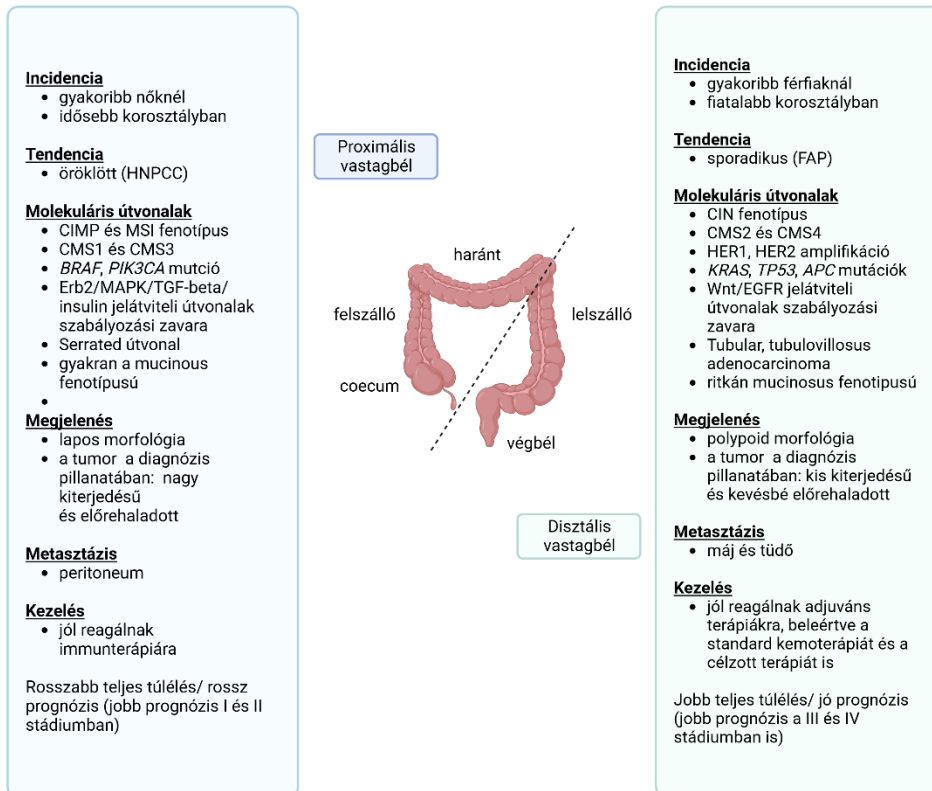
3.6.1. Prognózis

A daganatok különböző tulajdonságokkal rendelkeznek, és az onkológiai terápiákkal szemben eltérő érzékenységgel malignus sejtek mozaikjaiból épülnek fel. Mivel a tumor egy heterogén, dinamikusan változó célpont, az egyes betegcsoportokat, elváltozásokat és sejtpopulációkat különböző időpontokban különböző módon kell figyelemmel kísérni. A tumorheterogenitás jelentős kihívás elé állítja az orvosokat, annak érdekében, hogy a betegek megfelelő kezelésben részesüljenek a megfelelő időben. Ez nagy kihívást jelent a precíziós orvoslás céljainak megvalósításában is [103].

A túbiopsziából nyert mutációs profil nem ad egy teljes képet a tumorban előforduló összes mutáció jelenlétéről, következésképpen befolyásolja a kezelés pontosságát. Így a térbeli heterogenitás a kezeléssel szembeni rezisztencia alapja, különösen akkor, ha szelektív nyomást fejt ki például a késői stádiumú malignus megbetegedésekben alkalmazott gyógyszerekre. Ez nem csak a kemoterápia széles körű mutagén hatásának köszönhető, hanem a kemoterápia által kiváltott kompetitív hatásnak is, mely lehetővé teszi a kezelésre rezisztens szubklónok és a daganat újbóli kialakulását [104,105].

A genomi instabilitás megléte valószínűleg a genetikai heterogenitás jelentős oka is lehet. Valójában ennek pontos hatását alábecsülhetjük, mivel nem lehet minden egyes daganatsejt mutációs környezetét meghatározni. Mindazonáltal figyelembe kell venni, hogy a különböző instabilitási mechanizmusok különböző végkimenetelhez kapcsolódnak. Pontosabban, a mikroszatellita instabilitással járó CRC-k jobb klinikai prognózissal társulnak. Erre a tényre nincs határozott magyarázat. A mikroszatellita instabilitás olyan neoantigének kialakulásához vezethet, amelyek immun infiltrátumok kialakulását idézik elő [106].

Továbbá a CRC nem egyfajta betegség, hanem inkább két különböző betegségként viselkedik ugyanabban a szervben. A CRC viselkedését nagymértékben befolyásolja az anatómiai elhelyezkedése tehát beszélhetünk jobb és bal colonfelet érintő CRC-ről, ami viszont befolyásolja a tumor molekuláris és immunológiai jellemzőit. A jellegzetességek megismerése nagyon fontos e két különböző entitás szempontjából, mely a hatékony terápiák kiválasztásához és kifejlesztéséhez elengedhetetlen. A jobb és bal colonelel érintő CRC-k eltérő szövettani és molekuláris jellemzőkkel bírnak [107–110]. A jobb colonelelben kialakuló CRC-k általában mikroszatellita instabilak, míg a bal colonelelbe jelentkező CRC-ra kromoszóma instabilitás jellemző [110–112]. Makroszkóposan a jobb colonelel érintő tumorok lapos, a bélfalat megvastagító, míg a bal colonelelben a nyálkahártyából kiemelkedő, lumenbe boltosuló megjelenés figyelhető meg [107–111]. Így a jobb colonelel érintő CRC-t előrehaladottabb stádiumban észlelik, mint a bal colonelel érintő tumorokat. Bár a sebészi rezekció az elsődleges lehetőség, és az adjuváns terápiák hatékonyak tűnnek, a gyógyulás és a túlélés szempontjából még mindig szükség van sokkal hatékonyabb terápiákra a IV stádium szempontjából. Számos II. fázisú vizsgálat szerint a *KRAS* vad típusú bal colonelel érintő CRC-k számára előnyösek a célzott terápiák, beleértve az anti-EGFR vagy anti-VEGFR terápiákat, míg az MSI-high fenotípusú jobb colonelel érintő CRC-k jobban profitálnak az immunterápiákból [110]. A jobb és bal colonelel érintő tumorok jellemzőit az 8. Ábra foglalja össze.



8. Ábra: A jobb és bal colonekt érintő tumorkok jellegzetességei (saját forrás)

3.6.2. Kezelési stratégiák

A standard terápiákat, beleértve a sugárterápiát, a kemoterápiát, a célzott terápiát, a műtétet gyakran alkalmazzák a CRC-k kezelésében. A tumorsejtek azonban a kezelési szelektivitás nyomása alatt fejlődhetnek. Ezért a daganatos sejtek ellenálló képességét potenciálisan befolyásoló genetikai változások tisztázása kulcsfontosságú az onkoterápiás ismeretek fejlesztéséhez [17].

A CRC neoadjuváns kezelése egy olyan terápiás stratégia, melyet a műtét előtt alkalmaznak a daganat méretének csökkentése és a továbbterjedés megakadályozása céljából, annak érdekében, hogy a műtét könnyebben és hatékonyabban elvégezhető legyen. A neoadjuváns kezelés lehetőségeit az orvosok a beteg egyedi állapotának és a daganat jellemzőinek függvényében határozzák meg. Gyakran a sugárterápiát kemoterápiával kombinálják (kemoradioterápia) a hatékonyság növelése céljából.

A 5-fluorouracil (5-FU) és a capecitabine gyakran használt kemoterápiás szerek. Az 5-FU egy klasszikus kemoterápiás szer, amelyet gyakran kombinálnak más gyógyszerekkel, például oxaliplatinnal vagy irinotecannal. Az 5-FU és oxaliplatin kombinációja FOLFOX, az 5-FU és irinotecan kombinációja pedig FOLFIRI kezelésként ismert. A Capecitabine orálisan szedhető kemoterápiás gyógyszer, amely a szervezetben 5-FU-vá alakul át. Egyedül vagy más gyógyszerekkel kombinálva is alkalmazható [25,113].

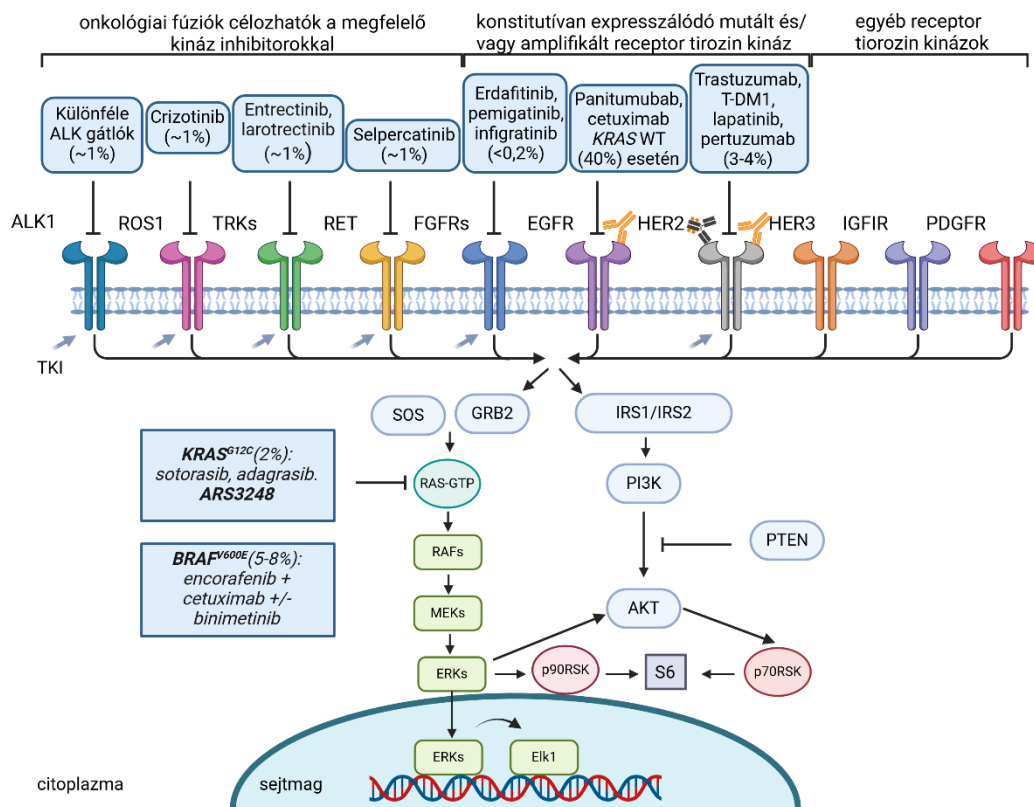
A cetuximab és panitumumab antitestek az EGFR-hez kötődnek és gátolják a tumor növekedését. Számos tanulmány megerősítette, hogy a *KRAS* mutációk jelenléte a 2. exonban az anti-EGFR

terápiákkal szembeni rezisztencia prediktív biomarkere. Jelenleg standard eljárás a tumorminták vizsgálata *KRAS* exon 2 mutációkra, mivel bizonyítottan költséghatékony eszköz az anti-EGFR terápiákkal szembeni rezisztencia előrejelzésére. A *KRAS* exon 2 vad típusú betegek, 65%-a rezisztens az EGFR monoklonális antitestekkel szemben, ami szükségessé teszi a rezisztenciáért felelős egyéb biomarkerek további keresését [83]. A bevacizumab egy humanizált anti-VEGF-A monoklonális antitest, melyet gyakran kombinálnak kemoterápiával *KRAS* mutáns mCRC kezelésében [113]. A CRC terápia változó, és a betegség stádiumától függ, melyet az 1. Táblázat foglal össze. A műtét a kevésbé előrehaladott CRC kezelésének részét képezi, és ezt követheti adjuváns, vagy előzheti meg neoadjuváns kemoterápia.

1. Táblázat: A vastagbél-daganat stádium szerinti kezelésének összefoglalása

Klinikai stádium	Patológiai stádium (TNM)
I. Stádium <u>Lokális kezelések:</u> csak műtéti rezekció	<ul style="list-style-type: none"> "in situ" carcinoma - a tumor a felszínes nyálkahártyát érinti
II. Stádium <u>Lokális kezelések:</u> <ul style="list-style-type: none"> a malignus tumor sebészi eltávolítása/parciális colectomia és lokális nyirokcsomó eltávolítás 	<ul style="list-style-type: none"> A daganat a vastagbél nyálkahártyáját áttöri (T1) és behatol az izomrétegbe (T2) nem terjed át a közeli nyirokcsomókba (N0) vagy távoli szervekbe (M0)
III. Stádium <u>Lokális, szisztémás és kombinált kezelések</u> <ul style="list-style-type: none"> műtét, majd adjuváns kemoterápia, beleértve a FOLFOX (5-FU, leukovorin (LV) és oxaliplatin) vagy CapeOx (capecitabin és oxaliplatin) kezelés egyes előrehaladott vastagbélrákok esetében neoadjuváns kemoterápia és sugárkezelés, aztán műtét 	<ul style="list-style-type: none"> A tumor a vastagbélből/végbélből áttérjed a regionális nyirokcsomókba (N1a-N2b) a vastagbél/végbél körüli zsírszövetben apró tumor depositumok vannak nem ad áttétet távoli szervekbe (M0).
IV. Stádium <u>Lokális, szisztémás és kombinált kezelések:</u> <ul style="list-style-type: none"> FOLFOIRI; FOLFIRI (5-FU, LV és irinotecan); FOLFOX; CAPIRI (capecitabin és irinotecan); CAPOX; 5-FU LV-vel; irinotecan; capecitabin és trifluridin plusz tipiracil (Lonsurf); immunterápia (Pembrolizumab (Keytruda) vagy Nivolumab (Opdivo); célzott terápiák; palliatív műtét/stentelés; rádiófrekvenciás abláció; radioembolizáció. 	<ul style="list-style-type: none"> a tumor áttétet ad a távoli nyirokcsomókba és a nyirok- és érrendszereken keresztül a test távoli szerveibe (M1a-M1c) a vastagbélrák leggyakrabban a májba és a tüdőbe ad áttétet

A metasztatikus CRC-ben (mCRC) szenvedő betegeknél a terápiás lehetőségek korlátozottabbak, és lényegében szisztémás terápiákat foglalnak magukban. A betegség ezen szakaszában elérhető kezelések ma már biológiai szerekkel végzett terápiát is tartalmaznak. Ezek közé tartoznak az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) elleni monoklonális antitestek, például a cetuximab és a panitumumab, valamint az antiangiogén szerek, például a bevacizumab és a ramucirumab, valamint a tirozin-kináz inhibitorok (TKI) melyeket a 9. ábra foglal össze.



9. Ábra: Releváns terápiás célpontok mCRC-ben. A fő onkogén tényezők, jelátviteli útvonalak és ezek hozzávetőleges prevalenciája mCRC-ben szenvedő betegeknél. Az **ARS3248** klinikai vizsgálat alatt van, nem engedélyezett. WT-vad típus (saját forrás).

3.6.3. Kezelési válasz meghatározása, monitorozása

3.6.3.1. Szövet, rebiopszia

A szöveti biopszia és rezekátum a legszélesebben használt módszer a tumordiagnosztikában és a biomarkerek kimutatásában. Emellett a tumor regressziós grádus (TRG) meghatározásában is fontos szerepet töltenek be. A tumor regressziós osztályozási rendszerek célja a citotoxikus kezelést követő regresszív változások meghatározása, melyek potenciális prognosztikai információkat szolgáltatnak [114]. A regressziós osztályozási rendszerek többnyire egyetlen, jól reprodukálható paraméterre hivatkoznak, mint például a terápia által kiváltott fibrózis mennyisége a reziduális tumorhoz viszonyítva, vagy a reziduális tumor becsült százalékos aránya a korábbi tumorhelyhez viszonyítva. Ilyen osztályozási rendszer a Mandard-féle beosztás mely öt fokozatú skálán értékeli a kezelésre adott válasz hatékonyságát, melyek a következők: TRG1 – a reziduális tumorsejtek teljes hiánya jellemzi (teljes regresszió), TRG2 – a kezelés következtében a fibrótikus szövetben elszórva daganatsejtek láthatóak, TRG3 – a reziduális daganatsejtek száma nagyobb, de még mindig a fibrózis dominál, TRG4 – a reziduális daganatsejtek túlnövik a fibrózist, TRG5 – nincs fibrózis, kiterjedt reziduális tumorsejtek dominálnak (regresszió teljes hiánya) [115].

A szövettani mintavételnek azonban számos korlátja van, mint például: invazív módszer; nem mindig kivitelezhető vagy megismételhető; egyetlen térbeli és időbeli pontra korlátozó információ

szolgáltat, ezért nem képes megragadni a komplex tumor heterogenitását, a tumor evolúciójának longitudinális nyomon követését.

A különböző tumorrégiók vegyes klón populációval rendelkezhetnek, mely gyógyszerselektív nyomás hatására heterogén metasztázisokhoz vezethet [116]. Ezek a metasztázisok genetikailag különbözhetnek az elsődleges daganatoktól és a klinikai monitorozásuk kihívást jelenthet [29,117]. Az elsődleges tumorok genetikai heterogenitását reprezentatív térbeli minták szekvenálásával lehet megragadni, de a daganat evolúciójáért és progressziójáért felelős genetikai elváltozások kimutatása továbbra is megoldatlan feladat [29]. A hisztopatológusok már régóta tisztában vannak a daganatos szöveteken belüli morfológiai eltérésekkel. Azonban a genetikai heterogenitást csak a közelmúltban ismerték fel a különböző tumor típusok közös jellemzőjeként, köszönhetően az új megközelítéseknek, köztük a „liquid biopszia” terén elért figyelemre méltó fejlődésnek [118].

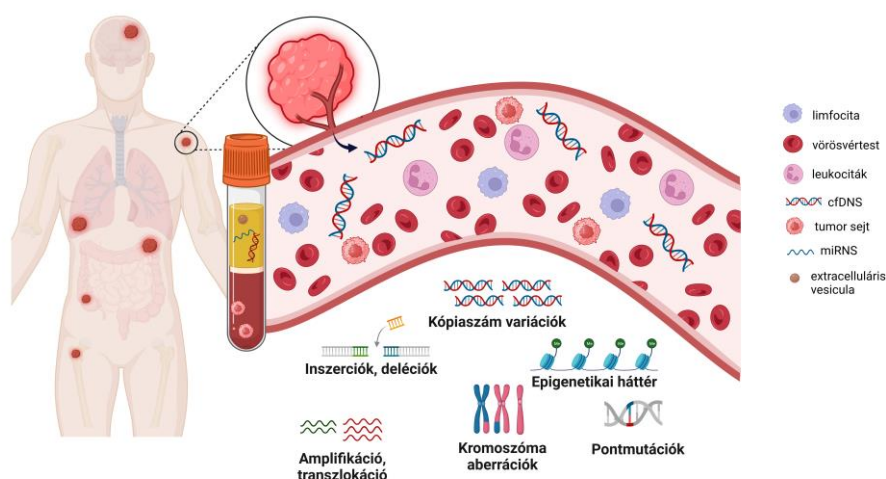
3.6.3.2. Liquid biopszia (LB)

A véralapú folyékony biopszia a véráramban keringő tumor eredetű vagy daganathoz kapcsolódó komponensek izolálásából és elemzéséből áll: keringő tumorsejtek (CTC), tumor eredetű keringő nukleinsavak, például sejtmintesen keringő tumor DNS (ctDNS), mikroRNS (miRNS) és nem kódoló RNS (ncRNS) [119].

A szabadon keringő DNS (cfDNS) felfedezése 1948-ig nyúlik vissza, amikor Mandel és Métais keringő DNS-t és RNS-t figyelt meg emberi plazmában [120]. Később Tan és mtsai. 1966-ban keringő cfDNS magas szintjét figyelték meg szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek vérében [121,122]. Leon és mtsai. 1977-ben kezdték el használni a cfDNS-t a tumor diagnosztikában, de sajnos az akkor rendelkezésre álló molekuláris biológiai technikai lehetőségek miatt nem jártak túl sok sikerrel [123]. A cfDNS szomatikus pontmutációit csak 1994-ben azonosították [124,125]. Az áttörés 1997-ben következett be, amikor Dennis Lo valós idejű PCR segítségével kimutatta az RhD-t és a magzati nemet az anyai plazmából [126].

A „cfDNS” kifejezés a vér nem sejtes komponensében található fragmentált DNS-re vonatkozik, mely apoptózis vagy necrosis útján kerül a véráramba és jellemzően kettős szálú körülbelül 150-200 bázispár hosszúságú fragmensekből áll. Egészséges egyének vérében lévő cfDNS a normális sejtek által kibocsátott csírsejt DNS-ből származik. Tumoros betegeknél a cfDNS egy része tumorsejtekből származik, ezt nevezik keringő tumor DNS-nek (ctDNS), mely tartalmazza a daganat tumorspecifikus változásait, például a mutálódott tumorszuppresszor gének vagy az onkogének jelenlétét [127–129]. A cfDNS molekulái gyorsan kiürülnek a keringésből, felezési ideje kb. 16 perc és 2,5 óra között van [130,131]. A cfDNS koncentrációja általában alacsony (100 ng/ml-en belül) normál körülmények között, de bizonyos élettani és kóros állapotokban értéke megnő, beleértve a testmozgást, a gyulladást, a cukorbetegséget és a tumoros elfajulást [132]. A cfDNS a perifériás vérben aktív (pl. citotoxikus sejtlízis) vagy passzív (pl. necrosis) sejtkárosodás következtében felszabaduló genomiális

DNS-töredékek frakciója, beleértve a tumorból származó DNS-t is. A cfDNS elemzésével kimutathatóak a tumorról kapcsolatos genetikai és epigenetikai változások (10. Ábra).

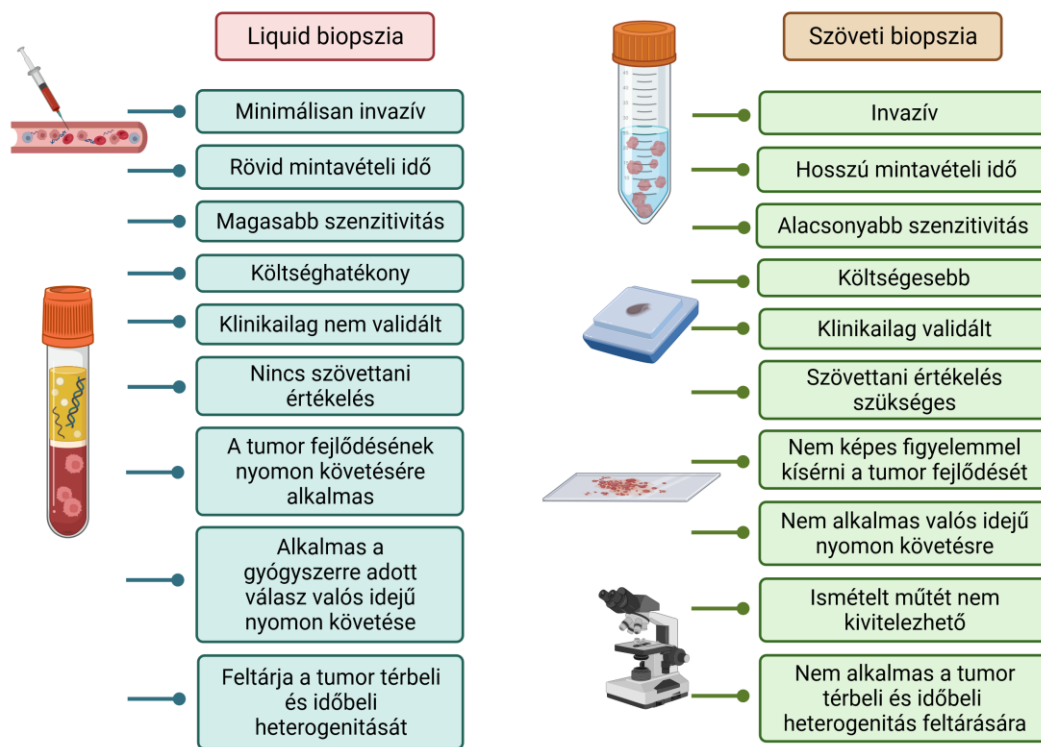


10. Ábra: A liquid biopszia diagnosztikus jelentősége (saját forrás)

Klinikai alkalmazása intenzíven fejlődik az onkológia területén, lehetőséget adva az adott tumortípusra specifikus molekuláris variánsok kimutatására a tumorfejlődés nagyon korai szakaszában [133]. Továbbá a tumorszövet mutációs profiljának meghatározása mellett, egyre nagyobb az érdeklődés az új helyettesítő markerek alkalmazása iránt metasztatikus tumoros betegek nyomon követése érdekében [133–135]. A jelenlegi nézet szerint a cfDNS a tumor DNS potenciális forrása a genetikai elemzéshez, amelyet egyszerű vérvétellel nyerhetünk, lehetővé téve ezáltal a fejlődő rosszindulatú folyamat valós idejű genetikai értékelését [119,134,136–138]. A genetikai progresszió, a terápiás rezisztencia hatással van a teljes túlélésre az áttétes daganatos betegeknél [133,138,139]. A genetikailag eltérő szubklónok szinkronban fejlődhetnek ugyanazon a tumoron belül, vagy a betegség progressziója során (időbeli heterogenitás) [105,119,138,140]. Az időbeli heterogenitással jelentkező új szubklónok szelekciója biológiailag befolyásolhatja a terápiára adott választ és a prognózist [118,119]. A tumor szöveti biopsziák DNS-elemzése mind a tumoron belüli, mind a tumorok közötti heterogenitást tükrözheti, ez utóbbi jellemzően metasztatikus folyamatokban fordul elő a progresszió jeleként. Míg a tumorból vett újbóli biopszia egyre kritikusabbá válik a követés során. A plazma cfDNS-t a tumorhoz kapcsolódó genetikai változások nyomon követésének egyszerű alternatív hozzáférési lehetőségeként tartják számon [17,119,138,140,141]. A cfDNS klinikai jelentőségét CRC-ban szenvedő betegeknél már vizsgálták és összefüggéseket állapítottak meg a szisztémás terápiára adott válasszal és a kezeléssel szembeni rezisztenciával kapcsolatban [84]. A legújabb irodalmi adatok szerint a cfDNS releváns prognosztikai és prediktív információkat szolgáltat a CRC progressziójának különböző fázisaiban, beleértve a korai diagnózist, a reziduális betegség kimutatását, a prediktív biomarkereket és a terápiás válasz hatékonyságát [134,137,139]. A cfDNS segítségével végzett mutációs profilalkotás

valós időben tükrözi a tumor fejlődés dinamikáját és a genetikai heterogenitást. Áttekintést nyújt az aktuális tumor tömegéről, új terápiás indikációkat is kínálva [142]. A rendszeres cfDNS mintavétel lehetővé teszi a molekuláris válasz követését, melyet az elsődleges tumor mintában azonosított jellegzetes mutáns allélok perifériás vérben vizsgálható mennyisége jellemez. A nyomon követés történhet egy vagy több domináns génvariáns, például a CRC-ban fő tumor biomarkerként szereplő specifikus *KRAS* variáns vizsgálatával. A terápiára adott választ azonban az egyes génváltozatok elvesztésén vagy újbóli megjelenésén túl bonyolítja az ugyanazon onkogénen belüli génváltozatok szubklonális váltakozása, ahogyan azt már a *KRAS* gén esetében is megállapították. Az irodalmi adatok szerint a *KRAS* mutáns CRC esetek akár 5-10%-ában szinkronban több *KRAS* variáns is kimutatható [35]. A különböző génváltozatok elvesztése, újbóli megjelenése, valamint váltakozása a daganat progressziója és a kezelés sikertelensége során igen egyéni mintázatot mutathat. Ezért a rendelkezésre álló primer és metasztatikus tumorminták, valamint a perifériás vér cfDNS összehasonlító elemzése együttesen segít megérteni a szubklonális progresszió általános jellemzőit és a ténylegesen alkalmazott kezeléssel való kölcsönhatásukat [136].

A daganatok molekuláris profilalkotásának elengedhetetlen feltétele az invazív biopsziás vagy műtéti rezezált tumorminták vizsgálata. Az invazív eljárások nehézségei közé tartozik a tumorminták beszerzése mind a minta mennyiségére, mind pedig a minőségére vonatkozóan. Sőt a biopsziás mintavétel a kezelés monitorizálása kapcsán szintén nagy kihívást jelent. Ezenkívül áttétképződés esetén, ahol a daganatok elterjedtek és folyamatosan fejlődnek mind térben és időben a kezelésre adott válasz hatékonyságának meghatározására a folyamat nyomon követése érdekében több biopsziára lehet szükség, mivel nehéz egységes képet kapni a tumorigenézis folyamatáról (11. Ábra). A hagyományos biopsziákhoz kapcsolódó kihívásokra tekintettel, napjainkban az onkológiai kutatások nagymértékben az analízisre helyezték át hangsúlyt, melynek kapcsán a teljes szöveti elemzés mellett a tumoros folyamat nyomon követése céljából a különböző liquid biopsziák elemzésére összpontosít [18].



11. Ábra: A liquid biopszia előnyei a hagyományos invazív sebészeti beavatkozásokkal szemben (saját forrás)

Az cfDNS-teszt számos előnnyel rendelkezik a hagyományos daganatszűrési eszközökkel szemben, így ideális megközelítés a malignus megbetegedések korai felismerésére. Elméletileg a kóros cfDNS jelenléte a vérben a tumor nagyon korai stádiumában, a hagyományos klinikai mérések küszöbe előtt azonosítható, kibővítve a korai beavatkozás időablakát. A cfDNS-alapú tesztek lehetővé teszik a többszörösen előforduló tumorok mutációs profiljának egyidejű kimutatását ezzel szemben a hagyományos szövettani módszer általában egy adott tumor típust vizsgál. A cfDNS-vizsgálat nem igényel mást, mint egy vérvételt, amely biztonságosabb, egyszerűbb és kevésbé invazív, mint a hagyományos szűrési módszerek. Végül, a cfDNS a teljes molekuláris és (epi)genetikai elváltozásokat magába foglalja, függetlenül a tumoron belüli heterogenitástól, elősegítve a precíziós kezelést és a korai felismerés utáni visszaesés monitorozását [131].

3.7. Metabolikus adaptáció és hypoxia

3.7.1. Tumor hypoxia

Számos szolid tumorban a növekedés során hypoxia alakul ki, melyet a nem megfelelő vérellátás, a tumorsejteknek a kapilláris rendszertől való növekvő távolsága okoz. A hypoxiás területeket alacsony oxigénkoncentráció, korlátozott tápanyagellátás és savas extracelluláris környezet jellemzi.

A szövetekben 2-9%-os O_2 -koncentráció a jellemző, ha az O_2 -koncentrációt $\leq 2\%$, akkor hypoxiásként, ha pedig $\leq 0,02\%$, akkor pedig súlyosan hypoxiásként definiálják [143]. Az O_2 diffúziós

távolsága a kapillárisoktól körülbelül 100-200 μm , az ennél távolabb elhelyezkedő tumorsejtek hypoxiássá válnak, mivel oxigén gradiensek alakulnak ki a tumorban [144,145]. A tumor pH-értéke az erekktől való távolság növekedésével szintén csökken, az érhálózattól mintegy 300 μm -re mért pH értéke 7,4-ről 6,0-ra csökkent [146]. A tumor sejtek intracelluláris pH-ját (pH_i) azonban a pH-szabályozó fehérjék hatására 7,0 és 7,4 között tartják számon [147]. A rossz perfúzió a kóros metabolitok eltávolítását is gátolja a tumorból, lehetővé téve az acidózis kialakulását a tumor mikrokörnyezetében (TME) [148]. A hypoxia alapvető sejtés és fiziológiai folyamatokban vesz részt, beleértve a sejtproliferációt, a nyugalmi állapotot és az apoptózist, a glükóz-anyagcserét, a pH-szabályozást és az angiogenezist, hozzájárulva a daganatos sejtek túléléséhez [149,150]. A hypoxia és az acidózis jelentős problémákat okoz a daganatok kezelésében, hozzájárulva a sugár- és kemoterápiával szembeni fokozott rezisztencia kialakulásához [148].

A CRC kezelésének hatékonysága olyan standard változóktól függ, mint a lokalizáció, a szövettani altípus, a prediktív genetikai háttér és a tumor stádiuma [151]. Az egyéni biológiai jellemzők azonban meghatározzák a funkcionális különbségeket, ami heterogén válaszokat eredményez a kemo- és sugárterápiára. A regionális tumor rezisztencia okai közé tartozik a nem megfelelő perfúzió és a kapcsolódó szöveti hypoxia [152,153].

3.7.2. Adaptációs mechanizmusok

A hypoxiás károsodást megkerülő adaptív mechanizmusok aktiválása a rossz prognózisú, agresszív malignus megbetegedések egyik jellemzője. Az adaptív folyamat részeként az anaerob anyagcserével rendelkező daganatos sejtekben az intracelluláris acidózis az extracelluláris pH (pH_e) rovasára kompenzálódik, ami funkcionális változásokat indukál hypoxiás mikrokörnyezetben, tovább elősegítve a rezisztenciát és a tumor progresszióját [149,152,154].

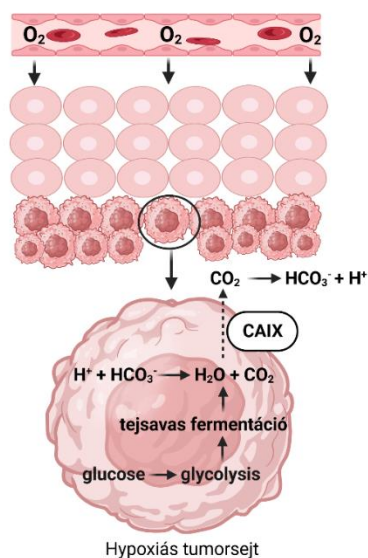
A tumorsejtek számos mechanizmust alkalmaznak a hypoxia alatti körülmények túlélésére, amelyek közül az egyik a hypoxia-indukáló faktor (HIF) útvonala [155,156]. Hypoxiás körülmények hatására a HIF stabilizálódásának következményeként fokozódik a dimer cink tartalmú glikoprotein, a karboanhidráz IX (CAIX) expressziója [157,158]. A CAIX a sejtmembránon helyezkedik el fontos szerepet játszik a sejtek pH-szabályozásának fenntartásában, ahol a glikolízis során keletkező széndioxidot bikarbonáttá és protonná hidrolizálja. A bikarbonátot különböző fehérjék (pl. anioncserélők) szállítják intracellulárisan, ezáltal kissé megemelve az pH_i -t, elősegítve a tumorsejtek proliferációját. A protonok viszont savas extracelluláris környezethez járulnak hozzá, ami az extracelluláris mátrix lebomlását okozza, ami kedvez az invázióknak, a migrációnak és az azt követő metasztázis képződésnek [158]. A hypoxia által indukált CAIX expresszió, a CAIX tumor specifikus expressziója és a pH-egyensúly fenntartásában betöltött fontos szerepe a CAIX-et a tumor hypoxia ígéretes endogén markerévé és az újonnan kifejlesztett inhibitorokkal történő onkológiai terápiák vonzó célpontjává teszi [151,158–160].

3.7.3. Karboanhidráz IX

A karboanhidrázok (CA-k) a cink-metalloenzim fehérjék családjába tartoznak, amelyek a sejtek pH-szabályozó rendszerének részeként katalizálják a szén-dioxid gyors és reverzibilis lebomlását bikarbonáttá és protonokká [161].

A CA-k legalább 16 különböző izoformáját izolálták emlősekből. Ezek a sejtek elhelyezkedése, aktivitása és szöveti lokalizációja tekintetében különböznek egymástól. A CAVI szekretálódik, CAI, -II, -III, -V, -VII és -XIII a mitokondriumban található, a CA IV, IX, XII, XIV és XV a sejtmembránon foglalnak helyet, melyek közül a CAIX és a CAXII fontos szerepet játszik a daganat progressziójában [157,162]. Egyes CA-król kimutatták, hogy a transzport "metabolonok" részeként működnek a HCO_3^- és H^+ transzporterek hatékonyságának növelése érdekében [163–165]. Ez hozzájárul a tumor sejtekben a lúgos pH_i és a TME-ben a savas pH_e fenntartásához, ami támogatja a tumor növekedését, invázióját, metasztázisát és a kemoterápiával és sugárterápiával szembeni rezisztenciát [117,158,166,167]. A lúgos pH_i ellenállást okoz az apoptotikus ingerekkel szemben, mivel a kaspáz aktiváció savas pH_i körülmények között következik be [168]. Emellett növeli mind a DNS-szintézist, mind a sejtproliferációt, lehetővé téve a tumor növekedését és progresszióját [147,169–171].

Az alacsony O_2 -szint következtében a hypoxiás tumoros sejteknek az energiatermelés érdekében tejsavas erjedésen kell átesniük, mely H^+ ionok termeléséhez vezet. Ha ezek a H^+ ionok felhalmozódnak a citoplazmában, a pH megváltozásához vezethetnek, ami káros lehet a sejtre nézve. A sejtben keletkező metabolikus savak reakcióba léphetnek a HCO_3^- -mal, ami H_2O és CO_2 keletkezéséhez vezet. A membrán permeáns CO_2 elősegíti a savak távozását a tumoros sejtekből. A CAIX megkönnyíti a CO_2 diffúzióját a sejtől azáltal, hogy katalizálja a CO_2 extracelluláris hidratációját, ami H^+ és HCO_3^- termeléséhez vezet. A CAIX ezért fenntartja a CO_2 meredekebb kiáramlási gradiensét, ami lúgosabb pH_i -hoz vezet, miközben az extracelluláris milió savasodását is okozza (12. Ábra).



12. Ábra: A CAIX hozzájárulása a glikolitikus protonok mozgásához a citoplazmából az extracelluláris környezetbe (saját forrás)

A CAIX jelentős szerepet játszik a hypoxiára adott adaptív válaszban, melyet a HIF-1 hangol össze mind a normál, mind a tumoros sejtekben. Sőt, a mikrokörnyezeti acidózishoz való hozzájárulása révén a CAIX részt vesz a tumor-stroma és a tumor-immunsejt interakciókban, felgyorsítja az extracelluláris mátrix degradációját, ezáltal elősegíti a sav-rezisztens sejtek invázióját és proliferációját [172–176]. A CAIX hypoxiás stressz miatti overexpressziója különböző tumorokban kedvezőtlen prognosztikai jellemzőként definiálható [177–184]. A CAIX-hez kapcsolódó változásokat olyan komplex mechanizmusoknak tekintik, amelyeket a klasszikus daganatellenes gyógyszerek és biológiai terápiák nem tudnak hatékonyan kihasználni [185,186].

3.7.4. CAIX a CRC-ban

Számos korábbi tanulmány rávilágít arra, hogy a CAIX hypoxia miatti overexpressziója prognosztikus jelentéssel bír [167,182,187]. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a CAIX gátlása olyan terápiás stratégia, amely beavatkozhat a malignus sejtek proliferációjába, migrációjába és inváziójába, míg az *in vivo* vizsgálatok azt mutatják, hogy az áttétes növekedés is korlátozható [186]. Bár a bizonyítékok arra utalnak, hogy e gátlás hatékonysága a daganatos sejtek pH-szabályozásának befolyásolásán keresztül valósul meg, a legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a CAIX számos más, a malignus sejtekben aktívnak ismert jelátviteli útvonallal és mechanizmussal is kölcsönhatásba léphet, amelyek közül sok befolyásolja a sugárzásra és kemoterápiára adott választ [188]. Ezek az útvonalak nem zárják ki egymást és a sugárzás iránti érzékenységet a pH-függő és független mechanizmusok közötti additív vagy szinergista kölcsönhatások határozhatják meg, ami arra utal, hogy a CAIX-nek számos fontos szerepe lehet a tumorsejtekben, amelyeket potenciálisan terápiásan ki lehetne használni [186].

4. Célkitűzések

- I. A MAPK útvonal mutációinak molekuláris vizsgálata vastag- és végbél carcinomás betegek esetében a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében.
- II. A *KRAS* mutációt hordozó vastag- és végbél carcinomás betegek követése és a mutációk változásának tanulmányozása a Debreceni Egyetem Patológia Intézetében elérhető szövettani és liquid biopsziás mintákból.

Prospektív vizsgálatunk célja, hogy egyes betegekben megvizsgáljuk az összes rendelkezésre álló primer és metasztatikus tumormintát illetve három különböző időpontból (műtét utáni/kezeletlen, bevacizumabbal kezelt második és negyedik ciklus előtt) származó cfDNS-t mintákat. Reverz hibridizációval (StripAssay), Sanger-szekvenálással és új generációs szekvenálással (NGS) is elemzett esetekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A szövettani mintákból nyert DNS mutációs státusz és az ugyanazon betegekből származó cfDNS eltérések közötti kapcsolat kimutatása.
 - A *KRAS* patogén variánsok dinamikájának nyomon követése a kombinált bevacizumab kezelés során.
 - A *KRAS* mutációval rendelkező metasztatikus vastagbél-daganatokban (mCRC) szenvedő betegek perifériás véréből (PB) származó cfDNS molekuláris eltérés mennyiben felelt meg a tumorszövetből származó eredménynek.
- III. A CAIX markerrel jellemzett tumor hypoxia vizsgálata végbél adenocarcinómában, retrospektív tanulmány keretében, melynek célja, hogy megvizsgáljuk:
 - A CAIX expresszió általános mintázatát végbél adenocarcinómában.
 - A CAIX expresszióját a kezeletlen biopsziás és a preoperatív neoadjuváns terápiát (NAT) követő műtéti mintákban végbél adenocarcinómában.
 - A CAIX expressziójának összefüggését a kezeletlen biopsziás és műtéti mintákban (UT-kontrollcsoport) a kezelt sebészeti mintákhoz képest (NAT).
 - A CAIX expressziójának korrelációját a patológiai és biológiai státusszal, beleértve a sejtproliferációt, a tumor regressziós grádust és a *KRAS* mutációs státuszt.
 - A CAIX hatását a betegek túlélésére.

5. Anyagok és módszerek

5.1. A minták kiválasztása és a vizsgálat felépítése

Tanulmányunkban a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Patológiai Intézetében 2015 és 2022 között diagnosztizált, archivált és molekuláris patológiai vizsgálattal igazolt *KRAS* mutáns vastagbél adenocarcinomás esetek szövettani és liquid biopsziás mintáit dolgoztunk fel. A vizsgálatot a legmagasabb etikai normáknak megfelelően végeztük, mely az országos etikai jóváhagyás hatálya alá tartozott (TUKEB referenciaszám: 60355-2/2016/EKU, 4648-6/2018/EÜIG és IV/8465-3/2021/EKU).

5.2. A minták feldolgozása

5.2.1. Tumor DNS kivonása FFPE szövetmintákból

Az FFPE tumorszövetet tartalmazó mintát abban az esetben dolgoztuk fel, ha két egymástól független patológus hematoxin és eozin (H&E) festett tárgylemezeken > 10%-os tumor százalékos arányt állapított meg. A genomi DNS kivonása QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történt. A DNS-koncentrációt Qubit dsDNA HS Assay Kit és Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük.

5.2.2. cfDNS kivonása perifériás vérmintákból

A perifériás vérmintákat (liquid biopszia) három meghatározott időpontban vettük: a kezelés előtt, a második ciklus előtt (a terápia megkezdése után 14-21 nappal) és a negyedik ciklus előtt (42-63 nap). A $10 \pm 0,1$ ml vérmintát EDTA alvadásgátolt vérvételi csövekbe (Becton Dickinson and Company, Sparks Glencoe, MD, USA) gyűjtöttük és 2 órán belül feldolgoztuk. Az izolálási folyamat két centrifugálási lépéssel kezdődött. Először a vérrel telt EDTA-s csöveket 10 percig 1300 g-n centrifugáltuk kb. 5 ml plazma nyerése céljából. A felülúszót új eppendorf csövekbe átpipettáztuk. Az összegyűjtött felülúszót másodszer is centrifugáltunk 16000 g-n 10 percig az esetlegesen megmaradt sejttörmelékek eltávolítása érdekében. A cfDNS-t $5,0 \pm 0,5$ ml perifériás vérplazmából a QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk, az elúció 40 μ l elúciós pufferrel történt. A DNS-koncentrációt a Qubit dsDNA HS Assay Kit és Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük. A cfDNS fragmens méretét és eloszlását Bioanalyzer 2100 készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) állapítottuk meg.

5.2.3. Mutációs státusz meghatározás

A célgének mutációs státuszának meghatározása három módszer segítségével valósult meg:

5.2.3.1. Sanger-szekvenálás

Sanger-szekvenáláshoz a *KRAS* gén 2. exonját PCR-rel amplifikáltuk 5'-GGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3' és 5'-CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC-3' primerek segítségével. A tisztított PCR termékeket a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit segítségével szekvenáltuk. Mintáinkat az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével elemeztük. A Sanger-szekvenálás során keletkezett electropherogramon a variáns allélfrekvenciát (VAF) a következő képlet szerint számoltuk ki: $\text{mA\% (mutáns allél aránya)} = \frac{\text{Hm}}{\text{Hm} + \text{Hwt}} \times 100$ [16].

5.2.3.2. Reverz hibridizáción alapuló vizsgálat (StripAssay)

A reverz hibridizációt *KRAS* XL, *NRAS* XL és *BRAF* 600/601 IVD StripAssay-vel végeztük a gyártó ajánlásának megfelelően (ViennaLab Diagnostics, Bécs, Ausztria). A vizsgálat a *KRAS* gén 29 klinikailag releváns mutációját, az *NRAS* gén 22 mutációját és a *BRAF* gén 9 patogén variánsát fedi le. A vizsgálat eredményének kiértékeléséhez a hibridizációs sávokat a reagensekhez mellékelt szabványosított elrendezéssel rendelkező referencia sablonhoz igazítottuk, melynek segítségével azonosítottuk a pozitív sávokat. A reverz hibridizációs vizsgálatok cut-off értéke 1% VAF felett van.

5.2.3.3. Új generációs szekvenálás (NGS) FFPE szövetmintákból

A genomialis DNS fragmentálása után NGS könyvtárakat hoztunk létre a TruSight Tumor 15 Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) segítségével. Ez a panel egy olyan célzott szekvenálási vizsgálat, mely egyidejűleg 15 génben található egy nukleotid-variánsokat (SNV-k), inszerciókat és deléciókat (indel) detektál, melyek a CRC-tumorokkal hozhatók összefüggésbe. A következő 15 gén szerepel a panelben: *AKT1*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *KIT*, *KRAS*, *KIT*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET*, *TP53*. A végleges könyvtár koncentrációját Qubit 4.0 fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg és hígítottuk 4nM végkoncentrációra. A szekvenáláshoz MiSeq Reagent kit-et (v3 2X300 ciklus) alkalmaztunk. A könyvtár denaturáció 0,2nM NaOH hozzáadásával történt. A végső betöltési koncentráció 8 pM könyvtár és 1% PhiX volt. A szekvenálást a MiSeq használati útmutatója szerint végeztük (Illumina, San Diego, CA, USA). Az adatokat a BaseSpace TruSight Tumor 15 segítségével elemeztük. Az alkalmazással (Illumina, San Diego, CA, USA) az SNV-k és az indelek jelenlétét vizsgáltuk. A szekvencia minőségét minden egyes minta esetében értékeltük. A kimutatási határértéket 2%-os variáns allélfrekvenciára állítottuk be. A megbízható variánsok kimutatásához > 250 leolvasás lefedettségre volt szükség.

5.2.3.4. Új generációs szekvenálás (NGS) liquid biopsziából

Az NGS-könyvtárakat az Archer® Reveal ctDNA™ 28 Kit (ArcherDX, Boulder, CO, USA) segítségével hoztuk létre. Ez a panel egy célzott szekvenálási vizsgálat, amely egyszerre detektálja és jellemzi az egynukleotid-variánsokat (SNV-k), inszerciókat és deléciókat (indeleket) 28 olyan génben, amelyek szolid tumorokhoz kapcsolódnak. A panel a következő 28 gént tartalmazza: *AKT1*, *ALK*, *AR*, *BRAF*, *CTNNB1*, *DDR2*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FGFR1*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MET*, *MTOR*, *NRAS*, *NTRK1*, *NTRK3*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET*, *ROS1*, *SMAD4* és *TP53*. A végleges könyvtárak koncentrációját KAPA library quantification kit (Roche, Basel, Svájc) segítségével határoztuk meg és 4 nM végső koncentrációra hígítottuk. A MiSeq rendszerrel (MiSeq Reagent kit v3 600-cycle) történő szekvenáláshoz a könyvtárat 0,2 nM NaOH hozzáadásával denaturáltuk és 40 pM-ra hígítottuk Illumina (San Diego, CA, USA) hibridizációs pufferével. A végső betöltési koncentráció 10 pM könyvtár és 1% PhiX volt. A szekvenálást a MiSeq használati útmutatója szerint végeztük. Az adatokat az Archer DX Analysis szoftver Local Virtual Machine alkalmazásával elemeztük az SNV-k és indelek jelenléte szempontjából. Minden egyes minta esetében értékeltük a szekvencia minőségét. Az illesztéshez a GRCh37 humán referencia genomot (az UCSC hg19 változatának megfelelő UCSC változatát) használtuk. A vizsgálat kimutatási határát 1%-os variáns allélfrekvenciában határoztuk meg. A megbízható variáns detektáláshoz > 250 leolvasás lefedettségre volt szükség.

5.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A standard szövet feldolgozáshoz a tumor mintákat elsődleges vastagbél-tükrözés során nyert biopsziás mintavételből és utólagos sebészi rezekció után kaptuk PBS pufferelt formaldehid oldatban (4%). Az FFPE beágyazást és a szövettani vizsgálatot a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében végeztük. A kiválasztott blokkokból 3 µm-es metszeteket készítettünk és IHC vizsgálatokat végeztünk.

Az automatizált IHC festés egyik részét a Bond Max festőautomatán végeztük. Az alkalmazott primer antitestek a következők voltak: anti-Ki-67, MIB-1 klón (Dako, Agilent Technologies és az anti-p53, Do-07 klón (Dako, Agilent Technologies) az anti-PMS2, EP51 klón (Dako, Agilent Technologies) anti-MLH1, G168-728 klón (Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Az IHC reakció detektálására a Leica Bond detection kit (kat.sz. DS9800) alkalmaztuk.

A további IHC reakciókat BenchMark Ultra automatán végeztük el. Az alkalmazott primer antitestek a következők voltak: Carbonic Anhydrase IX/CAIX, EP161 klónnal (Cell Marque/Sigma-Aldrich, CA, USA), anti-MSH2, G219-1129 klónnal (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) anti-MSH6, 44-es klónnal (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA). Az antigén-antitest kötődést az OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana) segítségével vizualizáltuk. A mintákat ezután hematoxin II –vel felülfestettük, majd víztelenítés után lefedtük.

A Ki-67 pozitív sejtek százalékos arányával a proliferációs indexet és a p53 intenzitást jelző Histo-score-t határoztuk meg az immunfestést követően mikroszkóp segítségével. A Histo-score magában foglalta a festődés intenzitását (osztályozva: 0, nincs festődés; 1, gyenge; 2, közepes; vagy 3, erős, a szomszédos ép nyálkahártya mediánját használva), valamint a pozitív sejtek százalékos arányát a kvantitatív értékelést követően. A Histo-score-t a következő képlet alapján határoztuk meg: $[1 \times (\% \text{ sejtek } 1+) + 2 \times (\% \text{ sejtek } 2+) + 3 \times (\% \text{ sejtek } 3+)]$. A lehetséges pontszámok tartománya 0-tól 300-ig terjed [16].

Az immunfestéseket fénymikroszkóppal két szövettani szakértő egymástól függetlenül értékelte. Ha egymásnak ellentmondó értékeket tapasztaltunk, a döntést személyes megbeszélést követően közös megegyezéssel hoztuk meg. A CAIX expresszióját a festődés mértékén alapuló vizuális osztályozási rendszerrel számszerűsítettük (pozitív tumorsejtek százalékos aránya: 0-100%). A kapott százalékos expressziós értékekből medián értéket számítottunk. A CAIX IHC és az expresszió meghatározása a medián értéktől függően a további elemzéshez CAIX alacsony és CAIX magas osztályozási rendszert hoztunk létre. Az CAIX alacsony csoportba a medián alatti CAIX értékkel rendelkező összes esetet soroltuk, beleértve a negatív festési eredményeket is, a CAIX magas csoportba pedig a mediánnal megegyező/feletti értékkel rendelkező eseteket soroltuk. A CAIX alacsony és CAIX magas kategóriákat külön értékeltük a NAT és UT csoportokon belül. Az összehasonlítás érdekében megvizsgáltuk a CAIX eloszlását és a CAIX alacsony és CAIX magas kategóriák általános jellemzőit mind a kezdeti biopsziás, mind a műtéti rezekciós mintákban.

Az IHC vizsgálataink során használt antitesteket az alábbi táblázat foglalja össze.

2. Táblázat: A vizsgálatban használt antitestek és a festés folyamata

Antitest			Festés menete				
Neve	Klón neve	Antitest gyártó, forgalmazó megnevezése	IHC Automata megnevezése:	Ag. Feltárás ideje, pH	Hígítás	Inkubációs idő	Előhívás
CAIX	EP16 1	Cell Marque/Labor-Test Kft Fejlesztő Kft.	BenchMark ultra típusú	56 perc, 100 °C, CC1, pH8,5	1:200	40 perc, 37 °C	DAB
Ki-67	MIB-1	Dako,an Agilent Technologies Company, Kromat Kft.	Bond-max típusú	30 perc, 100 °C, BERS2, pH9	1:200	30 perc, szobahő	DAB
MLH1	G168-728	Cell Marque/Labor-Test Kft Fejlesztő Kft.	Bond-max típusú	30 perc, 100 °C, BERS1, pH6	1:50	30 perc, 37 °C	DAB
MSH6	44	Biocare Medical/Frank Diagnosztika Kft.	BenchMark ultra típusú	48 perc, 100 °C, CC1, pH8,5	1:200	40 perc, 37 °C	DAB
MSH2	G219-1129	Cell Marque/Labor-Test Kft Fejlesztő Kft.	BenchMark ultra típusú	48 perc, 100 °C, CC1, pH8,5	1:400	40 perc, 37 °C	DAB
PMS2	EP51	Dako,an Agilent Technologies Company, Kromat Kft.	Bond-max típusú	30 perc, 100 °C, BERS2, pH9	1:200	30 perc, szobahő	DAB
p53	Do-07	Dako,an Agilent Technologies Company, Kromat Kft.	Bond-max típusú	30 perc, 100 °C, BERS1, pH6	1:700	30 perc, szobahő	DAB

5.4. Statisztikai elemzés és ábrák készítése

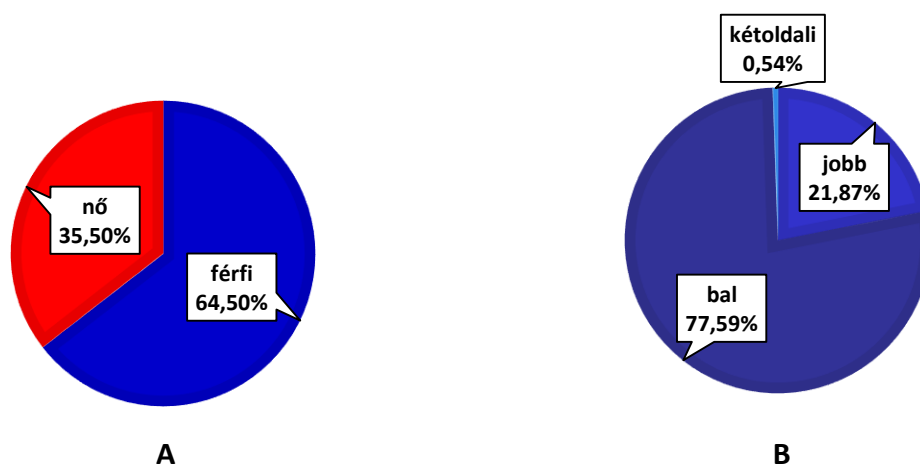
A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism 8 statisztikai szoftvert (Dotmatics, Boston, MA, USA) használtuk. Wilcoxon matched rank tesztet, Spearman korrelációs tesztet és Mann-Whithney U tesztet alkalmaztunk, valamint a VassarStats (<http://vassarstats.net>, hozzáférés: 2023. január 4.) online szoftvert a Fisher-féle egzakt próba alkalmazására, amely a fehérjék expressziója, a klinikai és a szövettani paraméterek közötti statisztikailag összefüggés értékelésére szolgált. Csak a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A irodalmi áttekintésben az ábrák készítésére a www.biorender.com online felületet alkalmaztam.

6. Erdemények

6.1. Vastagbél adenocarcinomás esetek molekuláris patológiai vizsgálata

A DE KK Patológiai Intézetében 2015 és 2022 között összesen 1339 CRC-s esetben történt a MAPK útvonalban meghatározó szerepet játszó célgének *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* molekuláris vizsgálat kérése. 1315 (98,2 %) esetben történt tényleges célgén meghatározás, mivel a maradék esetekben nem volt elegendő a tumorsejt arány vagy nem volt megfelelő a DNS koncentrációja a vizsgálat elvégzéséhez.

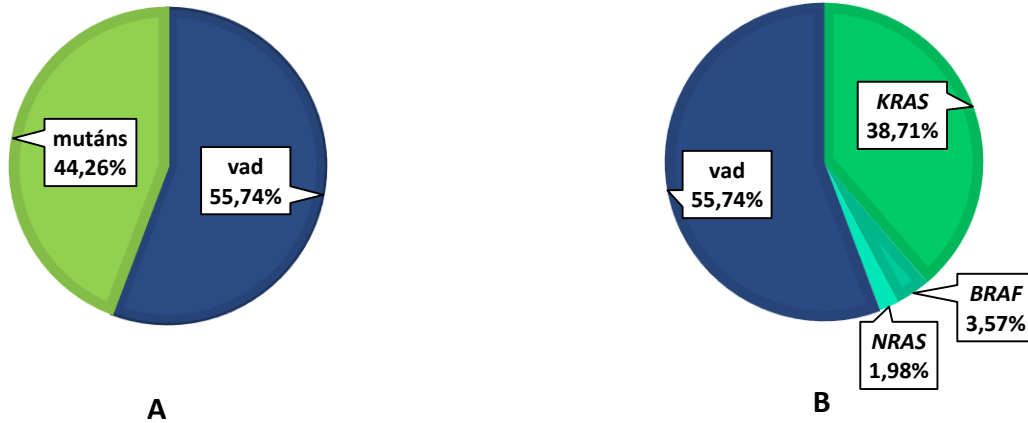
A vizsgált időintervallumban intézetünkben a férfiak (64,5%) több mint felét képezték a CRC-s beteganyagnak (13. Ábra).



13. Ábra: A vastagbél tumorok nemek közötti megoszlása (A) és az anatómiai lokalizáció gyakorisága (B) a DE KK Patológiai Intézetében (2015-2022, n=1315)

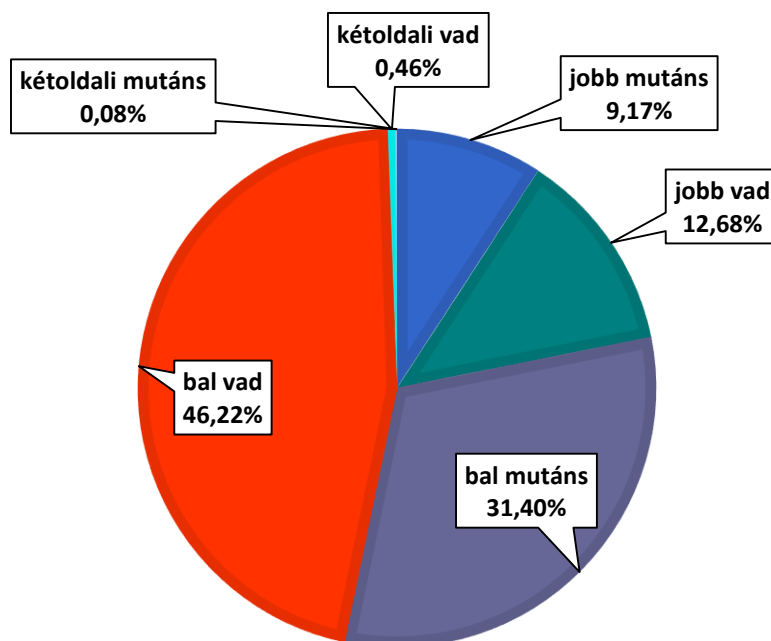
A CRC-k túlnyomó többsége a bal colonefél érintette (14. Ábra). A férfiak esetében jobb/bal colonefél = 12,97%/51,41%, míg a nők esetében jobb/bal colonefél = 8,9%/26,09% hasonló megoszlás volt igazolható. A jobb és bal colonefél érintő CRC-k a nemek tekintetében közel azonos előfordulást mutatott (nő/férfi=0,3%/0,23%).

A vizsgálataink során felmértük a MAPK jelátviteli útvonal általunk vizsgált mutáns és vad típusú CRC-s esetek számát, melynek során a vad típus az esetek több mint felében fordult elő (14. Ábra). Továbbá vizsgáltuk a MAPK aktivációs útvonalban szerepet játszó mutációk előfordulásának gyakoriságát, melynek következtében vad típus igazolódott az esetek több mint felében, ezt követte a mutáns *KRAS*, *BRAF* és legvégül az *NRAS*.



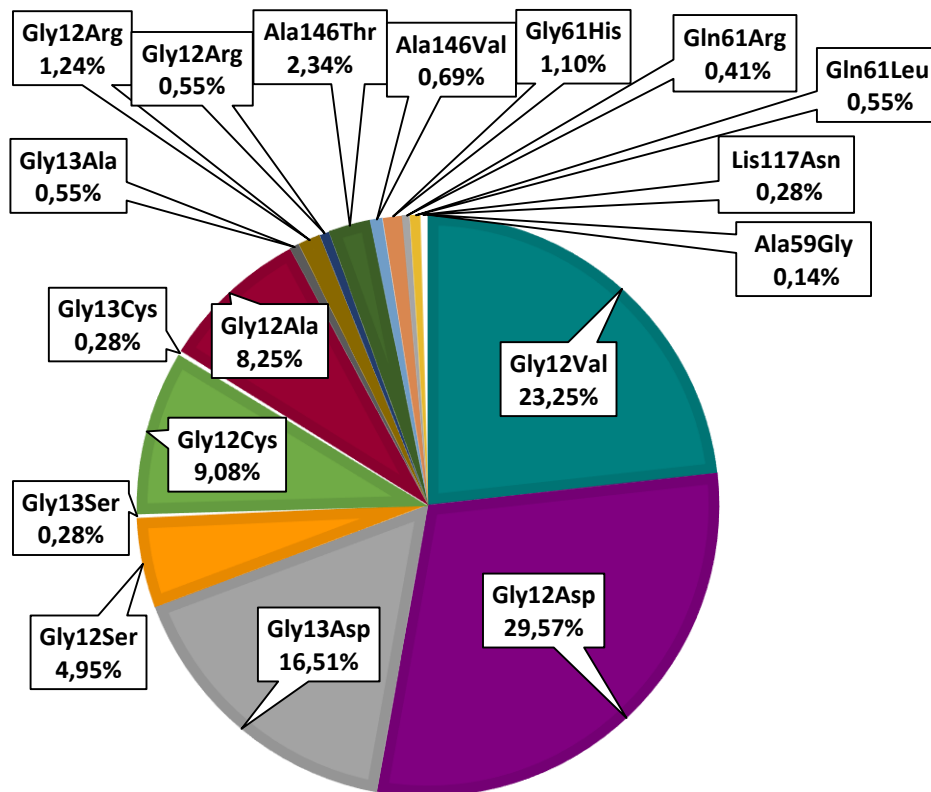
14. Ábra: A MAPK jelátviteli útvonal mutáns és vad típusú vastagbél-tumorok százalékos aránya (A) és a mutációk előfordulásának gyakorisága (B) a DE KK Patológiai Intézetében

A fentebb látott jobb és bal colonefélt érintő eloszlás kapcsán érdeklődésünk célpontjává vált a jobb és bal colonefél osztályozásán belül a genotípus gyakoriságának meghatározása. Eseteink közel felében a bal colonefélt érintő vad típus túlsúlya jellemzett, ezt követte a bal colonefél mutáns genotípusa (15. Ábra). A jobb colonefél kevésbé volt érintett.



15. Ábra. A vastagbél-tumorok lokalizációja és a KRAS gyakorisága a DE KK Patológiai Intézetében (n=1309)

A mutáns esetekben vizsgáltuk az egyes KRAS variánsok százalékos gyakoriságát. A leggyakrabban előforduló variáns a Gly12Asp (29,57%), melyet a Gly12Val (23,25%), a Gly13Asp (16,51%), a Gly12Cys (9,08%), a Gly12Ala (8,25%) és a Gly12Ser (4,95%) követett (16. Ábra). A jobb és bal colonefélt érintő CRC-ben előforduló KRAS variánsok közel azonos százalékban fordultak elő.



16. Ábra. KRAS variánsok megoszlása a DE KK Patológiai Intézetében (n=582)

Mindezek mellett a vizsgált időintervallumban a CRC-s esetek 40,91%-ban a MMR gének által kódolt fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata is megtörtént, melynek során 94,23%-ban MSS és 5,77%-ban MSI státusz igazolódott. Emellett a feldolgozott eseteinkben 14,05%-ban fordult elő mucinosus fenotípus.

6.2. A *KRAS* státusz vizsgálata és dinamikája multiplex vastagbél adenocarcinómában – esetbemutató

2015-től 2022-ig a DE KK Patológiai Intézetében 25 primer vastagbél adenocarcinomás esetben secunder metasztázis szekvenciális vizsgálatát végeztük. Ezekben az esetekben a *KRAS* státusz meghatározása, összehasonlítása volt a cél a primer és metasztatikus vastagbél adenocarcinómákban. Eseteink között szerepelt egy különleges négy egyidejűleg fennálló, különálló vastagbél daganatból álló, többszörös áttéteket okozó vastagbél tumor, melynek a klonális státuszát és genetikai variációját követtük nyomon négy évre visszamenőleg. Vizsgálatunk célja az egyes vastagbél adenocarcinoma gócek retrospektív azonosítása molekuláris genetikai módszerekkel, valamint a primer tumorok és a távoli áttétek közötti klonális kapcsolatok kimutatása. E célból új generációs szekvenálást alkalmaztunk, melyhez egy 15 génes szolid tumor génpanelt (Illumina MiSeq platform) használtunk. Az NGS eredményeinket reverz hibridizációs teszttel (StripAssay) és hagyományos Sanger-szekvenálással is megerősítettük.

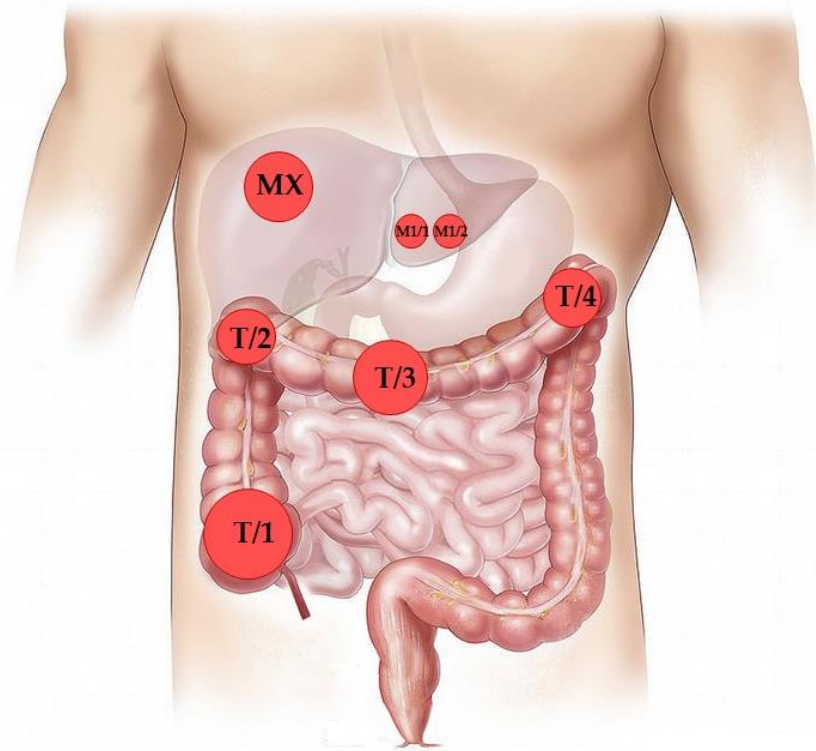
Egy 57 éves férfi esetében cachexia-t, laza székletet és vérzékenységet észleltek a DE KK Gasztroenterológiai Osztályán. Az ultrahang- és hasi CT-vizsgálat jelentős belfal megvastagodást, valamint a jobb colonszal (flexura hepatica) régiójában térfoglaló folyamatot írt le, mérsékelt paraaortikus nyirokcsomó megnagyobbodás és a máj VIII. szegmensében metasztázisnak megfelelő 3,2 cm-es elváltozás mellett. A preoperatív vastagbél tükrözés során nyert szövettan tubulovillosus adenomát igazolt, high grade dysplasiával. A tumor általi fenyegető bélelzáródás miatt subtotalis colectomiára került sor metasztatizációival. A CT leletben leírt a máj VI-VIII. szegmensében lévő metasztázis inoperábilisnak bizonyult, de a műtét során a máj III. szegmensében talált két kisebb metasztatikus gócek eltávolításra kerültek. A műtét előtt neoadjuváns terápia nem történt.

A műtéti minta részletes patológiai vizsgálata során igazolódott: 1) egy 9,5 cm-es mérsékelt differenciált adenocarcinoma a coecumból, már meglévő villosus polippal; 2) egy 4 cm-es, rosszul differenciált adenocarcinoma a májhajlatból, már meglévő villosus polippal; 3) egy 8 cm-es mérsékelt differenciált adenocarcinoma a colon transversumból, meglévő villosus polippal; 4) egy 5 cm-es rosszul differenciált adenocarcinoma a colon transversum régiójából, meglévő polip nélkül; és 5) két nekrotikus metasztatikus góc (0,8 és 1,3 cm) a máj III. szegmenséből, cribriform architektúrával (17. Ábra, 3. Táblázat). A szövettani mintázat általában mikroglanduláris volt, korlátozott tömegű mucinosus komponenssel. A patológiai stádium pT3 pN0 pM1 volt. Az IHC-vel meghatározott MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 hibajavító fehérjék expressziója megtartott volt.

A sebészeti minta molekuláris vizsgálata során *KRAS* mutációt azonosítottunk a primer tumorban (2. exon, 12. kodon, c.35G>T; p.Gly12Val). A posztoperatív restaginget követően további májmetasztázisok jelenlétét állapították meg és első vonalbeli kombinált kemo- és biológia terápia (Folfiri és Bevacizumab) mellett döntöttek. Közel egy évvel később a CT-vizsgálattal megállapított

regresszió lehetővé tette a májmetasztázis műtéti feltárását (M2). A beteg posztoperatív Xelox-terápiában részesült, de súlyos intolerancia alakult ki a terápiával szemben (hasmenés és kéz-láb szindróma), ezért a kezelést Folfoxra váltották. Hét hónap múlva a CT progressziót igazolt és újabb májmetasztázist távolítottak el, majd posztoperatív deGramount-terápiát alkalmaztak (M3). Kilenc hónappal később további három független májmetasztázist távolítottak el (M4). Ezután a mellkasi CT tüdőmetasztázisokat mutatott.

Az M3 mintából Sanger-szekvenálással meghatározott *KRAS* vad típusú státusz alapján másodvonalbeli Vectibix + Folfiri kezelést kezdtek, azonban további regressziót nem sikerült elérni. Az utolsó sebészeti beavatkozás a tüneteket okozó metasztatikus gerinctumor (M5) dekompesszív rezekciója volt, amelyet a harmadik vonalbeli Lonsurf-terápia követett.



17. Ábra: A proximális vastagbél egyes primer daganatainak és a májmetasztázisoknak a műtét időpontjában ismert anatómiai lokalizációja. Az MX a műtét előtti CT-vizsgálat során leírt, de később M2-ként (máj VIII. szegmens) eltávolított májmetasztázist jelöli.

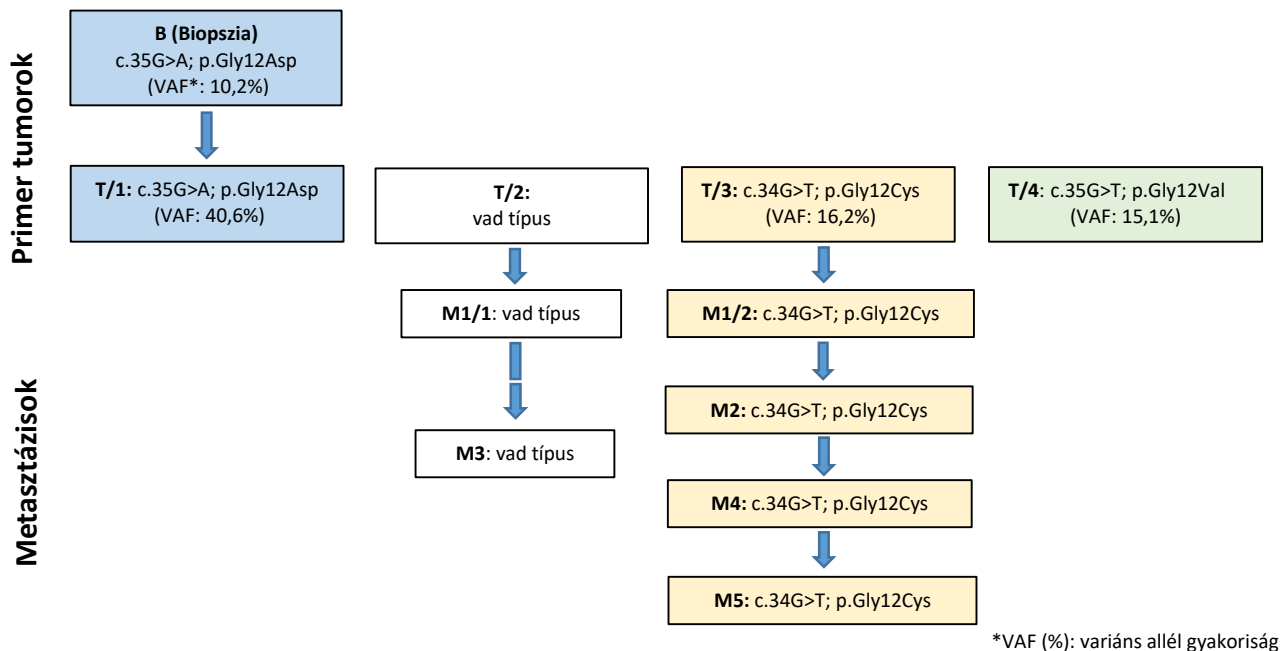
A 3. táblázatban időrendi sorrendben összefoglaltuk a sebészeti beavatkozásokat és a minta típusokat.

3. Táblázat: Esettanulmányunkban feldolgozott minták időrendi sorrendben.

Az első műtéti beavatkozástól eltelt idő (hónapokban)	Operáció típusa	Szövettan	Minta jelzése
2015. október	Vastagbél biopszia	Tubularis adenoma high- grade dysplasiával	B
2	Subtotalis colectomia és máj metastasectomia	Vastagbél adenocarcinoma (négy független helyről)	T/1 T/2 T/3 T/4
		Májmetasztázis	M1/1 M1/2
11	Májrezekció	Májmetasztázis	M2
18	Májrezekció	Májmetasztázis	M3
27	Májrezekció	Májmetasztázis	M4/1 M4/2 M4/3
36	Gerinc műtét és dekompreszió	Gerinc metasztázis	M5

6.2.1. NGS-alapú mutációs profil meghatározás

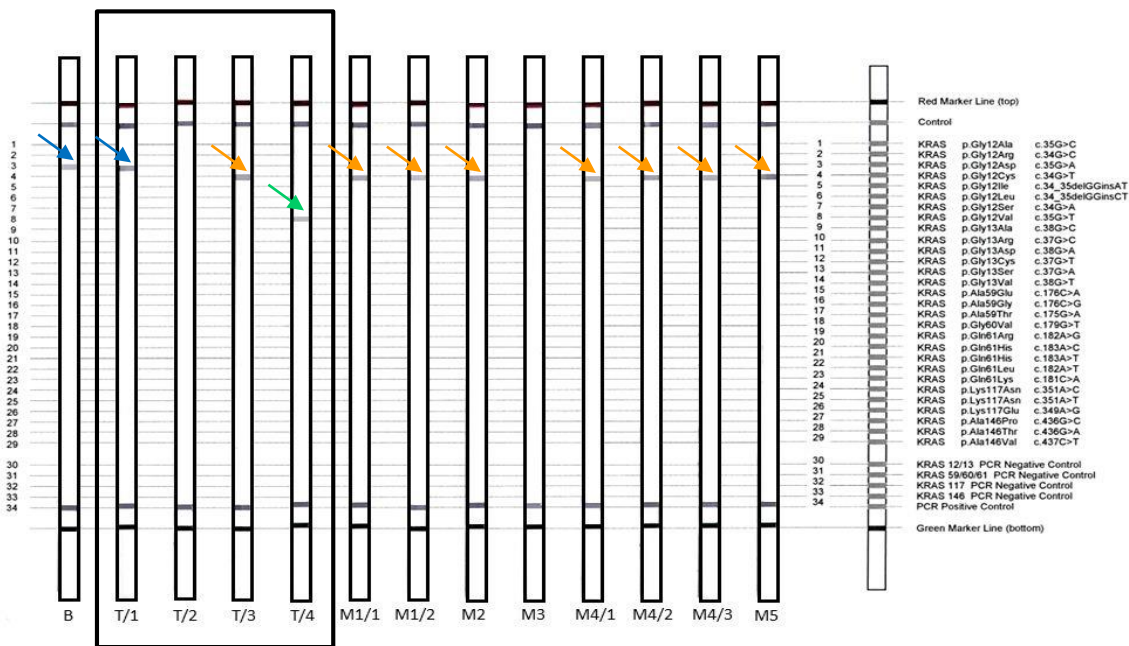
A 15 génből álló solid tumorpanel vizsgálata során a *KRAS* és a *TP53* génekben számos mutációt azonosítottunk, míg a többi gén (beleértve a *BRAF*, az *EGFR* és az *NRAS* géneket) nem volt érintett. A különböző mintákban a *KRAS* gént érintő eltéréseket a 4. táblázat foglalja össze. A preoperatív vastagbél-tükrözés során nyert biopsziában (B) a *KRAS* c.35G>A; p.Gly12Asp variánst (variáns allélfrekvencia-*VA*F: 10,2%) mutattuk ki, hasonlóan az első primer tumormintához (T/1) (*KRAS* c.35G>A; p.Gly12Asp, *VA*F: 40,6%). A második CRC mintában (T/2) vad típusú *KRAS*-t detektáltunk. A harmadik CRC mintában (T/3) a *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys variánst (*VA*F: 16,2%), a negyedik primer tumorban (T/4) pedig a *KRAS* c.35G>T; p.Gly12Val variánst (*VA*F: 15,1%) igazoltuk. A vastagbél műtét időpontjában eltávolított májmetasztázisok eltérő genotípust mutattak: az első tumorban (M1/1) vad típusú *KRAS*-t, a második tumorban (M1/2) pedig patogén *KRAS* változatot (c.34G>T; p.Gly12Cys, *VA*F: 19,1%) mutattunk ki. Ugyanezt a *KRAS* változatot igazoltuk (*VA*F: 6,4%) a 11 hónappal később rezekált második májmetasztázisban (M2). A harmadik időpontból származó májmetasztázisban (M3, 18 hónap) nem igazoltunk *KRAS* variánst. Az utolsó két időpontból származó metasztatikus mintákban (M4, 27 hónappal és M5, 36 hónappal az elsődleges műtét után) ismét a *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys variáns fordult elő, bár eltérő allélfrekvenciával (*VA*F: 2,0%, illetve 32,1%) (18. Ábra, 4. Táblázat).



18. Ábra. A *KRAS* Trusight Tumor 15 génpanelel vizsgálat eredményei az összes tumormintában. Három 12-es kodont érintő *KRAS* variánst (T/1 - kék, T/3 - sárga, T/4 - zöld) és egy vad típusú *KRAS*-t (T/2) azonosítottunk az elsődleges műtét időpontjában. A c.34G>T; p.Gly12Cys variáns, amely eredetileg csak a primer T/3-ban volt jelen, a betegség teljes lefolyása során nyomom követhető volt, kivéve az M3 mintában (soliter májmetasztázis az elsődleges műtét utáni 18. hónapban).

6.2.2. *KRAS* konfirmálási vizsgálatok

Az NGS-sel kapott *KRAS* eredmények összetettsége miatt két alternatív platformon végeztünk konfirmációt. A reverz hibridizáción alapuló StripAssay az összes, korábban NGS-sel kimutatott variánst azonosította, habár nem kvantifikálható (19. Ábra). A klasszikus bidirekcionális Sanger-szekvenálás megegyező eredményt adott az NGS vizsgálatokkal, kivéve alacsony VAF (<10%) esetén (20. Ábra, 4. Táblázat).

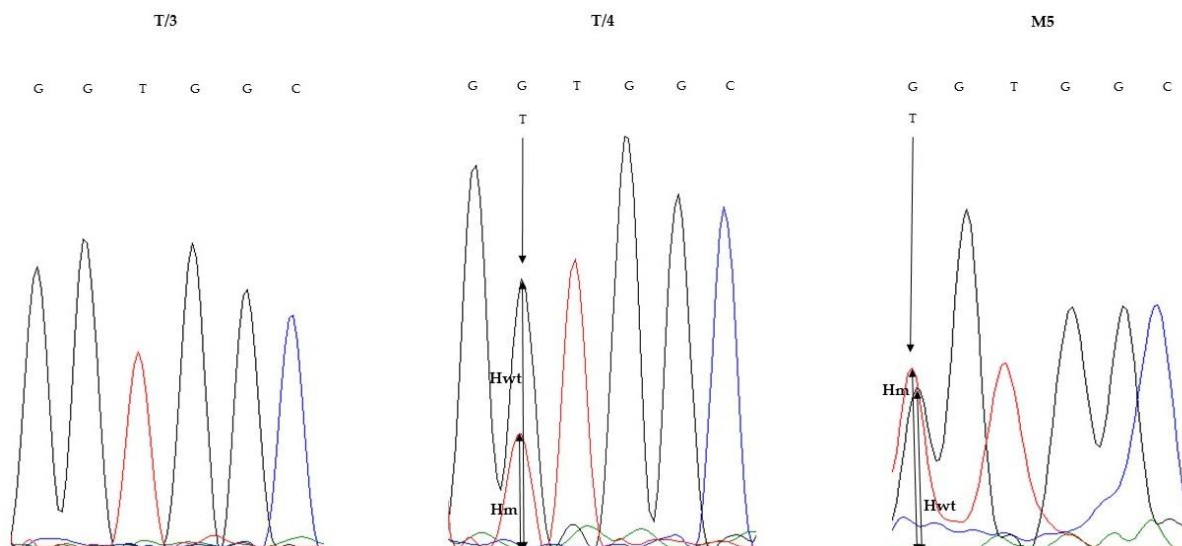


19. Ábra. A *KRAS* reverz-hibridizációs vizsgálat eredményei az összes tumormintában. Pozitív esetben hibridizációs sáv detektálható. Három 12-es kodont érintő *KRAS* variánst (T/1 - kék, T/3 - sárga, T/4 - zöld) és egy vad típusú *KRAS*-t (T/2) igazoltunk az elsődleges műtét időpontjában. A c.34G>T; p.Gly12Cys variáns, amely eredetileg csak a primer T/3-ban volt jelen, a betegség teljes lefolyása során nyomom követhető volt, kivéve az M3 mintában (soliter májmetasztázis az elsődleges műtét utáni 18. hónapban).

4. Táblázat: A TruSight Tumor 15 NGS panel, a StripAssay és a Sanger szekvenálás vizsgálatokkal kimutatott KRAS génvariánsok az elsődleges (T/1-4) és a metasztatikus daganatokban (M1-5).

Minták	Tumor sejtek %-os aránya	NGS	NGS VAF (%)	StripAssay	Sanger szekvenálás	Sanger VAF (%)
B	50	c.35G > A, p.Gly12Asp	10.2	c.35G > A, p.Gly12Asp	negatív ^b	0
T/1	30	c.35G > A; p.Gly12Asp	40.6	c.35G > A; p.Gly12Asp	c.35G>A; p.Gly12Asp	10
T/2	50	negatív ^a	0	negatív ^a	negatív ^a	0
T/3	30	c.34G > T; p.Gly12Cys	16.2	c.34G > T; p.Gly12Cys	negatív	0
T/4	30	c.35G > T; p.Gly12Val	15.1	c.35G > T; p.Gly12Val	c.35G > T; p.Gly12Val	26.86
M1/1	20	negatív ^a	0	c.34G > T; p.Gly12Cys ^b	negatív ^a	0
M1/2	30	c.34G > T; p.Gly12Cys	19.1	c.34G > T; p.Gly12Cys	c.34G > T; p.Gly12Cys	45.89
M2	20	c.34G > T; p.Gly12Cys	6.4	c.34G > T; p.Gly12Cys	negatív	0
M3	30	negatív ^a	0	negatív ^a	negatív ^a	0
M4/1	30	c.34G > T; p.Gly12Cys	<2	c.34G > T; p.Gly12Cys	negatív	0
M4/2	30	c.34G > T; p.Gly12Cys	<2	c.34G > T; p.Gly12Cys	c.34G > T; p.Gly12Cys	9.77
		c.35G > A; p.Gly12Asp	<2			
M4/2	30	c.35G > T; p.Gly12Val	<2	c.34G > T; p.Gly12Cys	c.34G > T; p.Gly12Cys	0
		c.34G > T; p.Gly12Cys	5.3			
M4/3	30	c.34G > T; p.Gly12Cys	5.3	c.34G > T; p.Gly12Cys	negatív	0
M5	50	c.34G > T; p.Gly12Cys	32.1	c.34G > T; p.Gly12Cys	c.34G > T; p.Gly12Cys	52

^aVariáns nagy érzékenységű (<1%) reverz hibridizációs vizsgálattal detektálva, ^bMutáció nem volt kimutatható a Sanger szekvenálás korlátozott érzékenysége miatt (<15%)



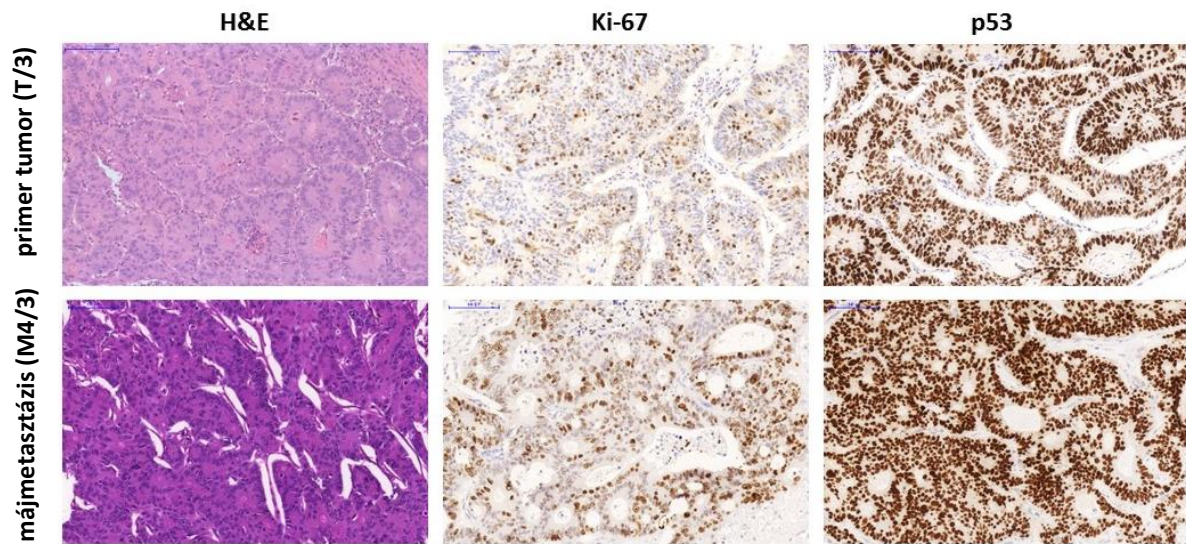
20. Ábra. A *KRAS* gén 12-es és 13-as kodonjainak Sanger szekvenálással készült electropherogramjai, melyek a 12-es kodonban különböző variánsokat mutatnak a T/3-as primer tumorban (vad típus, balra), a T/4-ben (c.35G>T; középen) és az M5-ös májmetasztázisban (c.34G > T; jobbra). Bár a T/3 Sanger-szekvenálással negatívnak bizonyult, NGS és StripAssay technológiák segítségével kimutatható volt. Az egyirányú nyilak a mutációk helyét, a kétirányú nyilak pedig a csúcsok magasságát mutatják. Hm = a mutáns allél csúcs magassága, Hwt = a vad típusú allél csúcs magassága.

6.2.3. *TP53* génelterések vizsgálata

Tizenhat *TP53* génvariánst detektáltunk a 13 elemzett mintában, melyek VAF-ja 2,9 és 72,8% között mozgott (5. Táblázat). A *TP53* gén c.820G>T; p.Val274Phe variánst a T/3 primer tumorban igazoltuk, mely az összes metasztatikus tumorban megjelent. Az M2 és M3 mintákban alacsony allélfrekvenciával fordultak elő (7,1 és 3,14% VAF). Az utolsó két metasztatikus mintában (M4 és M5) ez a variáns magas allélfrekvenciát (72,8 és 45,6% VAF) mutatott. A retrospektív elemzés során a p53 fehérje IHC vizsgálata is megtörtént az összes szövettani mintán, melyen különböző expressziós mintázatok igazolódtak. Az 5% VAF felett az IHC reakció mintázata megfelelt a mutáns fehérje jelölődésének (5. Táblázat). Kivéve a kezdeti biopsziás mintát (B) és a T/1 és T/4 primer tumorokat, minden minta magas H-score értéket mutatott, melyek mutáns fenotípusú reakcióra utalnak és a kapott NGS eredményekkel egybehangzóak voltak (21. Ábra).

5. Táblázat: TP53 NGS, p53 immunhisztokémiai és sejtproliferációs adatok ugyanabból a tumorszövet mintából. Összesen 16 TP53 varáns került kimutatásra 2% VAF érték felett. A klinikai szignifikancia megadása az OncoKB adatbázis alapján történt Tier beosztás szerint. 1: patogén, 2: valószínűleg patogén, 3: valószínűleg benignus, 4: benignus.

Minták	NGS	NGS VAF (%)	Mitosis index	p53 IHC (%)	p53 H-score	p53 értelmezése	Klinikai szignifikancia
							Tier szerint
B	c.417G>A; p.Lys139Asn	2.9	24	2	5	vad	1
	c.472C>T; p.Arg158Cys	3.8					1
	c.1009C>T; p.Arg337Cys	3.1					1
	c.464C>T; p.Thr155Ile	7.6					4
T/1	c. 455C>T, p.Pro152Leu	3.3	62	5	23	vad	1
	c.845G>A, p.Arg282Gln	3.9					1
T/2	c. 557C>G; p.His193Asp	35.6	71	60	155	mutáns	2
	c.586C>T; p. Arg196*	5.6					1
T/3	c.820G>T; p.Val274Phe	33.3	50	90	230	mutáns	2
T/4	c.743G>A; p.Arg248Gln	3.1	62	15	25	vad	1
M1/1	c.726C>A; p.Cys242*	10.8	57	70	150	mutáns	1
	c.769G>A; p.Gly266Arg	7.4					3
	c.328C>T; p.Arg110Cys	8.3					4
	c.747G>T; p.Arg249Ser	4.0					3
	c.820G>T, p.Val274Phe	23.1					2
M1/2	c.827C>T; p.Ala276Val	15.7	64	100	300	mutáns	4
	c. 917G>A; p.Arg306Gln	28.1					1
	c.820G>T; p.Val274Phe	6.1					2
M2	c.820G>T; p.Val274Phe	7.1	31	90	225	mutáns	2
M3	c.820G>T; p.Val274Phe	3.14	30	80	195	mutáns	2
M4/1	c.820G>T; p.Val274Phe	37.9	62	80	195	mutáns	2
M4/2	c.820G>T; p.Val274Phe	72.8	91	100	300	mutáns	2
M4/3	c.820G>T; p.Val274Phe	25.2	46	100	300	mutáns	2
M5	c.820G>T; p.Val274Phe	45.6	24	100	300	mutáns	2



21. Ábra. A kószövettani (H&E), a Ki-67 és a p53 IHC vizsgálat eredménye a T/3 elsődleges vastagbél adenocarcinoma mintából és az M4/3 májmetasztázis mintákból. Míg a tumor szövettani megjelenése (tubuláris-mirigyes mintázat minimális mucinosus differenciálódási góccokkal) nem változott jelentősen a követés során, a sejtproliferáció jelentős növekedését észleltük (20% vs. 40% Ki-67, középső panel). A T3 primer tumor pozitív p53 IHC státusza (általában erősen pozitív sejtmagok, H-score = 230) és az M4/3 metasztázis egyértelmű pozitivitása (erős, egységes nukleáris pozitívítás, H-score = 300) összhangban van az NGS eredményekkel. Mikroszkópos nagyítás: 20x.

6.3. Tumor heterogenitás követése a *KRAS* gén esetében szövettani és liquid biopsziás mintákban

A tumor heterogenitás a daganatok egyik legfontosabb jellemzője, amely jelentősen hozzájárul a betegség progressziójához és a terápia rezisztenciájához. Mint azt az előzőekben is bemutattuk a reziduális és recidív tumoros gócek genetikailag eltérő szubklónokat képviselhetnek, amelyek nem minden esetben kerülnek felismerésre, mivel az ismételt mintavétel általában korlátozott. A keringő szabad DNS (cfDNA) vizsgálata a perifériás vérplazmából (liquid biopszia, LB) egy hatékony eszköz a daganat genetikai eltéréseinek nyomon követésére.

További tanulmányunkban szintén a genetikai variabilitást vizsgáltuk, amelyet metasztatikus *KRAS* mutáns CRC-ban szenvedő betegeknél figyelhetünk meg. A mintákat 2020 szeptembere és 2022 augusztusa között gyűjtöttük primeren igazolódott esetekben, akik elsődleges mintavételen estek át. A DE KK Patológiai Intézetében működő molekuláris daganatpatológiai laborban összesen 211/490 (43,06%) vastagbél tumoros szövetmintát vizsgáltunk a megjelölt időpontban a *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* státuszának a meghatározására.

A vizsgált *KRAS* mutáns esetekből 12/211 (5,68%) alkalommal többszörös *KRAS* variáns igazolódott. Ezekben az esetekben a szövettani mintákat (primer tumor és metasztázis) StripAssay és Sanger-szekvenálással is vizsgáltuk, valamint NGS-t és StripAssays-t végeztünk az összes LB mintákból is.

A betegkövetés minden kritériuma három esetben teljesült (mintavétel kezelés előtt, a második ciklus előtt és a negyedik ciklus előtt), ahol lehetővé vált a prospektív perifériás vérmintavétel és cfDNA izolálás. A betegek a mutáns *KRAS* státusz miatt kombinált bevacizumab kemoterápiában részesültek.

A primer tumorminták *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* mutációs státuszát magas specificitású reverz hibridizációs technológiával (StripAssay) vizsgáltuk az 1-3. eset összes rendelkezésre álló szövetmintáján. A primer tumorban azonosított mutációkat Sanger-szekvenálással is megerősítettük. A molekuláris genetikai eredményeket az 6. Táblázat tartalmazza.

A Sanger-electropherogramok VAF-ját minden szövettani mintában meghatároztuk (cut-off > 5%). A *KRAS* patogén variánsok VAF tartománya 5-50% között mozgott (átlagosan 19,3%). A cfDNA koncentrációk 0,6 és 55,0 ng/μl között mozogtak (átlag 6,33 ng/μl), ami a DNS-tartalom nagyfokú változékonyságát jelzi.

6. Táblázat: Szövet és liquid biopsziás (LB) mintákból származó *KRAS* genotipizálás eredményei három CRC esetben.

Esetszám	Minta	Minta típusa ^a Magyarul legyen	<i>KRAS</i> genotípus (Sanger és StripAssay)	Sanger VAF%	Tumor sejt arány (%)	<i>KRAS</i> StripAssay genotípus (VAF%) ^b		
						LB1	LB2	LB3
1	R1-R5	vastagbél	c.35G>T; p.Gly12Val	25	30	c.34G>T; p.Gly12Cys (3)	c.34G>T; p.Gly12Cys (1.5)	negatív
			c.34G>T; p.Gly12Cys	10				
	M	nyirokcsomó metasztázis	c.35G>T; p.Gly12Val	5	30			
2 ^c	TB	végbél	c.38G>A; p.Gly13Asp	5	10	c.35G>T; p.Gly12Val (2)	c.35G>C; p.Gly12Ala (1.5)	c.35G>C; p.Gly12Ala (2)
						c.35G>A; Gly12Asp (2.5)		c.35G>A; Gly12Asp (2.5)
3	R	vastagbél	c.38G>A; p.Gly13Asp	30	30	c.38G>A; p.Gly13Asp (2.5)	c.34G>T; p.Gly12Cys (2)	c.34G>T; p.Gly12Cys (1.5)
	M1	nyirokcsomó metasztázis	c.34G>T; p.Gly12Cys	25	30		c.35G>A; p.Gly12Asp (2)	
	M2	hasnyálmirigy metasztázis	c.38G>A; p.Gly13Asp	15	20			

^a Primer tumor és a rendelkezésre álló metasztázis minták, minden betegnél metasztázis igazolódott CT vizsgálattal (R: reszekció, M: metasztázis, TB: szövetbiopszia)

^b Az NGS által meghatározott variáns allélgyakoriság (%)

^c A *KRAS* mutáció mellett *NRAS* variánst is kimutattunk a primer tumor biopsziás mintában (továbbá a plazma cfDNA MET és NTRK1 eltéréseket is tartalmazott, 6. Táblázat)

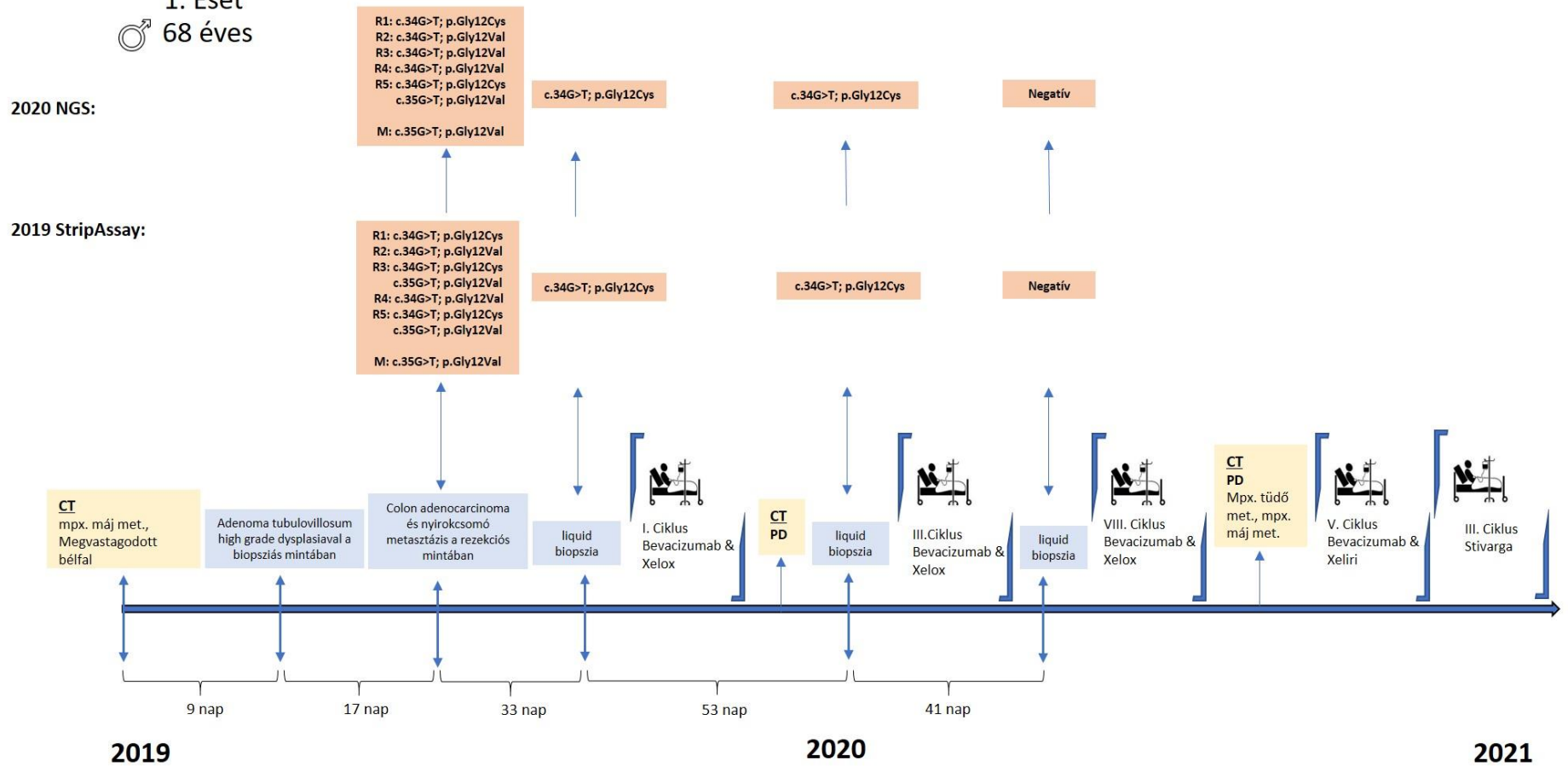
6.3.1. *KRAS* státusz követése LB mintából (1. eset)

66 éves férfi hasi fájdalom, étvágytalanság és haematochezia tüneteivel jelentkezett. A preoperatív vastagbéltükrözés a flexura hepatica magasságában tumortömeget igazolt, a szövettani kép tubulovillosus adenómát igazolt, high grade dysplasiával. A CT jelentős jobb oldali bélfal megvastagodást, a flexura hepatica régiójában tumor tömeget, valamint multiplex jobb oldali májmetasztázisokat, loco-regionális, mesenterialis és máj hilusi nyirokcsomó megnagyobbodást mutatott. Jobb oldali hemicolectomia után G2, pT3 pN1a adenocarcinoma igazolódott 1/15 pozitív nyirokcsomóval. A beteg bevacizumab és xelox terápiában részesült mutáns *KRAS* státusza miatt. A kezelést 33 nappal a műtét után kezdték el, az első LB mintavétel akkor történt.

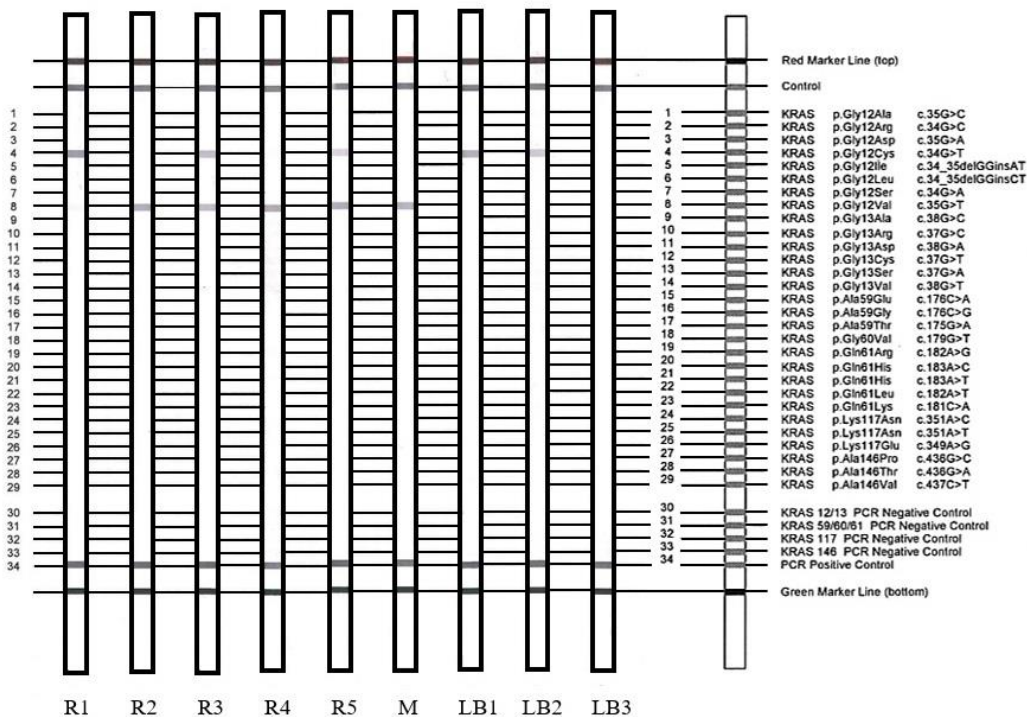
A primer tumor rezekciós mintáit (R1-R5), a metasztázisok (M) és a három cfDNS mutációs státuszát vizsgáltuk (22. és 23. Ábra). Az R3 és R5 mintákban két *KRAS* variánst mutattunk ki (c.34G>T; p.Gly12Cys és c.35G>T; p.Gly12Val). Az R1 mintában csak a c.34G>T; p.Gly12Cys mutációt azonosítottuk, míg az R2, R4 és M mintákban a másik genotípust (c.35G>T; p.Gly12Val) igazoltuk. Az első és a második plazmamintában (LB1, LB2) *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys aberrációt azonosítottunk, míg a harmadik plazma cfDNS (LB3) *KRAS* negatív lett.

A liquid biopsziából származó StripAssay-vel kapott eredményeinket NGS-sel konfirmáltuk. A 28 gén elemzésére alkalmas NGS panel alkalmazása során *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys mutációt azonosítottunk egyetlen patogén variánsként az LB1 és LB2 mintákban 3,0%-os és 1,5%-os VAF értékekkel, az LB3 minta szintén negatív lett.

1. Eset
♂ 68 éves



22. Ábra. A vizsgált 1. számú eset *KRAS* variánsainak időbeli változásai a kezelés hatására. A két kezdetben kimutatott *KRAS* variáns közül a cfDNS-ben egy jelent meg. R = műtéti minta, M = metasztázis, CT = komputertomográfia, PD = progrediált betegség.



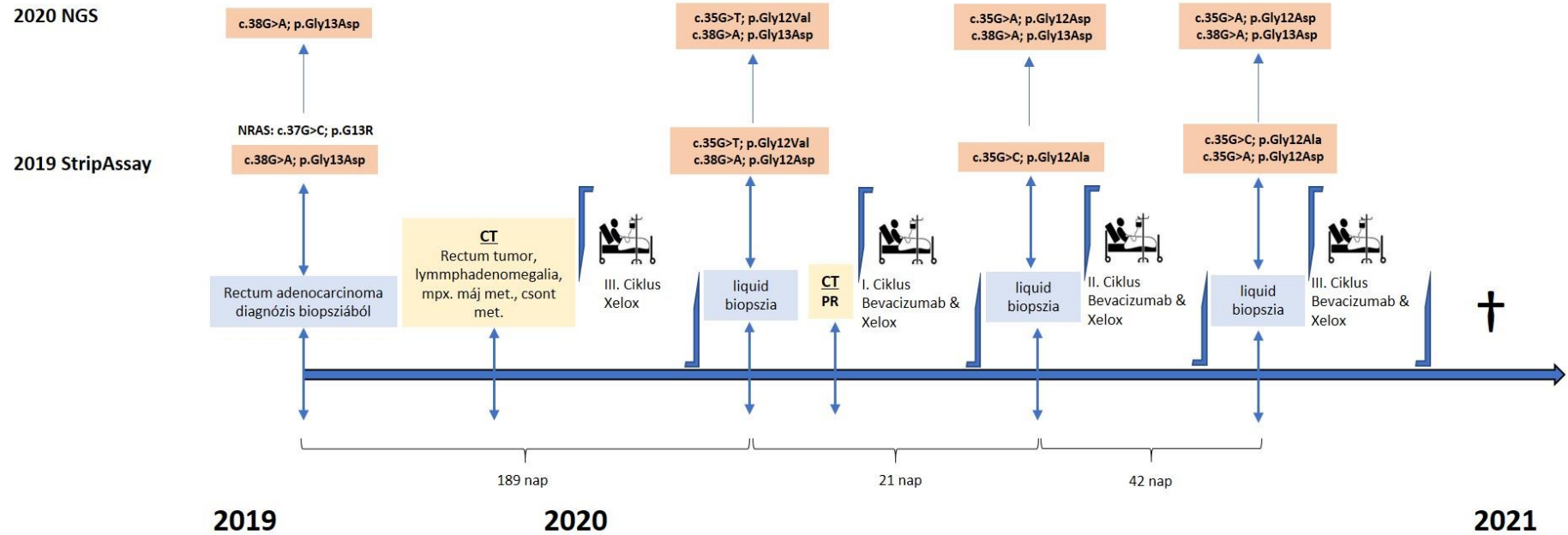
23. A *KRAS* reverz hibridizációs StripAssay (1. eset) eredményei. Az elsődleges műtét idején két *KRAS*-variánst azonosítottunk (R1-R5 a rezekciós anyagból származó szövetmintákat, az M egy nyirokcsomóból származó metasztázist jelent). A c.34G>T; p.Gly12Cys variánst a plazma cfDNS-ben a kezelés előtt (LB1) és a második ciklus előtt (LB2) azonosítottuk. A negyedik ciklus előtt a mutáns genotípus eltűnt a plazmából (LB3). R = rezekciós anyag, M = metasztázis, LB = liquid biopszia.

6.3.2. *KRAS* státusz követése LB mintából (2. eset)

Egy 70 éves férfi esetében végbéltükrözést végeztek, mivel a végbélnyílás közelében majdnem teljes szűkületet okozó daganatos elváltozás igazolódott. A CT és az MRI tumortömeget mutatott ki a végbél területén, regionális perirectális érintettséggel, nyirokcsomó megnagyobbodással és multiplex májmetasztázisokkal. A biopszia kórszövettani vizsgálata adenocarcinomát (G2) igazolt, ennek megfelelően a beteg első vonalbeli neoadjuváns radio-kemoterápiát kapott. A nyirokcsomó- és a májmetasztázisok nem voltak operálhatóak, így műtetre nem került sor. A bevacizumab xelox kezelés 189 nappal a diagnózis után kezdődött, az LB1 ekkor történt.

A primer tumor reverz hibridizációs és NGS vizsgálata során *KRAS* c.38G>A, p.Gly13Asp és *NRAS* c.37G>C, p.Gly13Arg patogén variánst mutattunk ki. Ezzel szemben az első vonalbeli neoadjuváns kezelést követő első plazmamintában (LB1) két új *KRAS* variáns igazolódott: c.35G>A; p.Gly12Asp és c.35G>T; p.Gly12Val. A második cfDNS-ben (LB2) csak a c.35G>C; p.Gly12Ala variáns jelent meg. A harmadik plazmamintában (LB3) a c.35G>C; p.Gly12Ala mellett a c.35G>A; p.Gly12Asp változat is megjelent, akárcsak az LB1 mintában. *NRAS* mutációt azonban egyik plazma cfDNS-ben sem találtunk (24. Ábra).

2. Eset
♂
70 éves



24. Ábra. A vizsgált 2. eset *KRAS* variánsainak időrendi változásai a kezelés hatására. Az elsődleges tumorban StripAssay és NGS vizsgálattal azonos *KRAS* variáns igazolódott. Emellett reverz hibridációval a *KRAS* eltérés mellett *NRAS* variáns is igazolódott. LB1-ben két új *KRAS* variáns igazolódott: c.35G>A; p.Gly12Asp és c.35G>T; p.Gly12Val. LB2-ben szintén egy új variáns jelent meg c.35G>C; p.Gly12Ala StripAssay vizsgálattal. LB3-ban c.35G>C; p.Gly12Ala mellett a c.35G>A; p.Gly12Asp változat is megjelent, akárcsak az LB1 mintában. CT = komputertomográfia, PR = parciális remisszió.

7. Táblázat: A 2. esetből származó elsődleges szöveti biopszia (TB) és a három kezelés utáni plazma cfDNS-minta (LB1-3) NGS-alapú mutációs profilja.

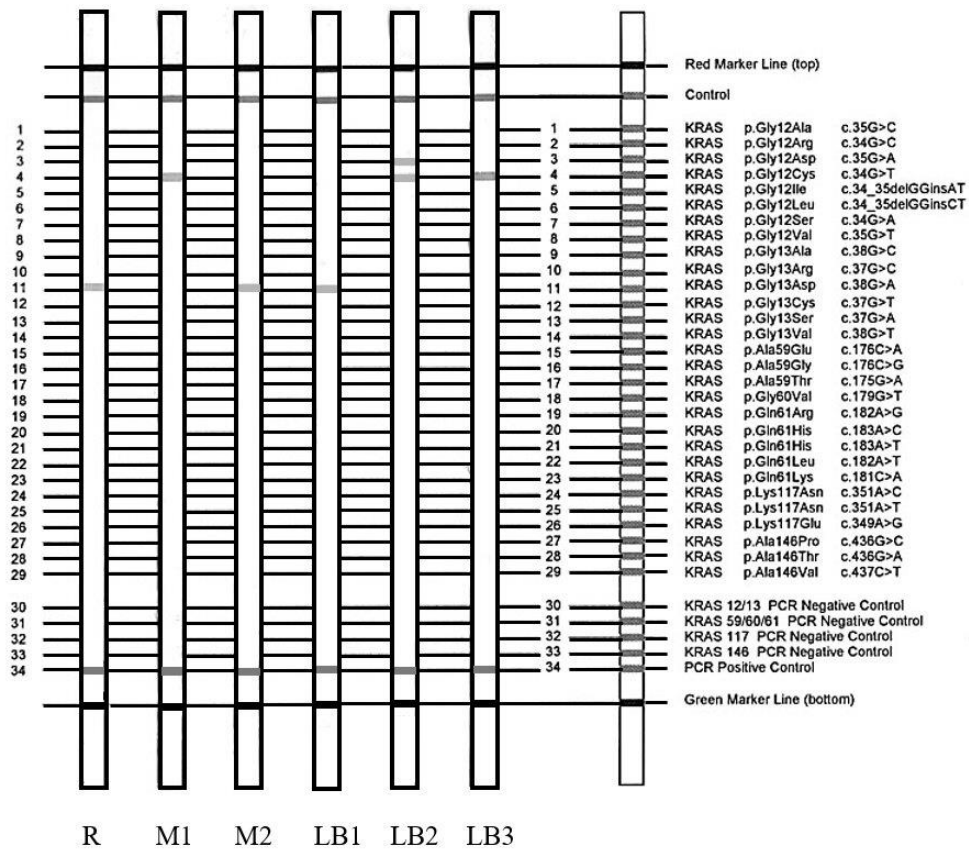
Érintett gén	Nukleotid csere	Aminosav csere	DNS minta eredete (VAF %)				Klinikai szignifikancia*
			TB	LB1	LB2	LB3	
KRAS	c.38G>A	p.Gly13Asp	6.7	0	0	0	1
	c.35G>T	p.Gly12Val	0	2.0	0	0	1
	c.35G>A	p.Gly12Asp	0	2.5	0	2.5	1
	c.35G>C	p.Gly12Ala	0	0	1.5	2.0	1
MET	c.2908C>T	p.Arg970Cys	48.0	45.0	49.0	49.0	2
NRAS	c.37G>C	p.Gly13Arg	24.3	0	0	0	1
NTRK1	c.1702C>T	p.His568Ter	53.0	46.0	52.0	54.0	3
	c.1730G>T	p.Gly577Val	49.0	47.0	54.0	42.0	3

*A klinikai szignifikancia megadása az OncoKB adatbázis alapján történt Tier beosztás szerint. 1 = patogén, 2 = valószínűleg patogén, 3 = valószínűleg benignus, 4 = benignus.

6.3.3. KRAS státusz követése LB mintából (3. eset)

Egy 77 éves férfi esetében 2015-ben vastagbélükröztést végeztek, melynek eredményeképpen a haránt vastagbélben kiterjedt daganatot találtak. A nyert biopsziás minta adenocarcinomát igazolt. Bal hemicolectomiát végeztek melynek során metasztatikus nyirokcsomó eltávolítás is történt. A kórszövetani vizsgálat G3, pT3 pN2b adenocarcinomát, míg a molekuláris vizsgálat mutáns KRAS státuszt igazolt. A műtétet követően a beteg első vonalbeli adjuváns kemoterápiában részesült (Folfox), távoli metasztázis és reziduális tumor nem volt igazolható képalkotó eljárással. 2020-ban, négy évvel és öt hónappal később hasi CT-vizsgálat solid elváltozást írt le a hasnyálmirigyben, amelyből mintát vettek. A kórszövettan és az immunfenotípus megerősítette a vastagbél adenocarcinomából származó metasztatikus jelleget. Bevacizumab és xelox terápia mellett döntöttek, amely előtt az első perifériás vérmintát (LB1) levettük. A korábbi esetekhez hasonlóan a cfDNS-vizsgálatot a terápiás séma második (LB2) és negyedik (LB3) ciklusa után is megismételtük.

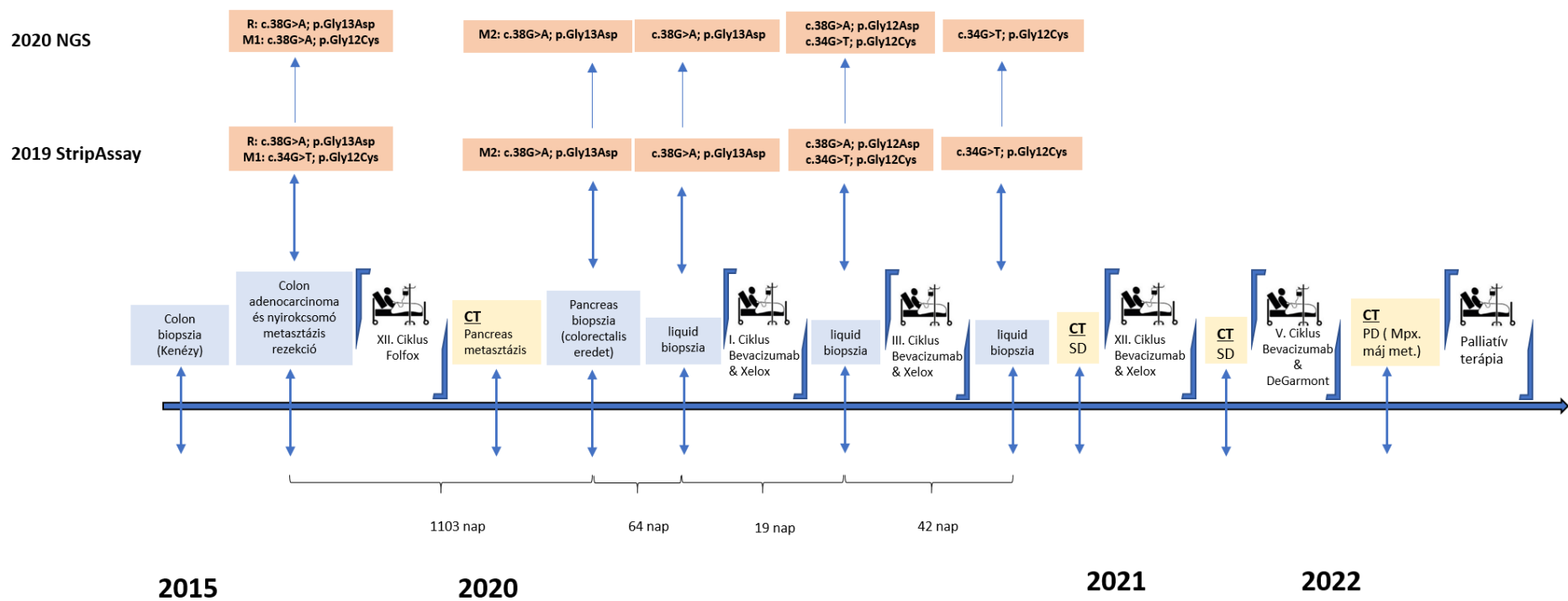
A primer tumor és a hasnyálmirigy metasztázis azonos c.38G>A; p.Gly13Asp KRAS variánst mutatott, míg az elsődleges műtét idejéből származó nyirokcsomó metasztázis c.34G>T; p.Gly12Cys patogén variánst tartalmazott. Az eredeti c.38G>A; p.Gly13Asp aberrációt csak az első LB plazma cfDNS-ében (LB1) azonosítottunk. A második plazmamintában (LB2) két új variáns, a c.34G>T; p.Gly12Cys (VAF: 2%) és a c.35G>A; p.Gly12Asp (VAF: 2%) variáns igazolódott. Ezen kívül a harmadik cfDNS-ben csak a c.34G>T; p.Gly12Cys (VAF: 1,5%) aberráció jelent meg. A vizsgált időpontokban (R, M1-2 és LB1-3) kapott molekuláris profilt a 26. Ábra, a betegkövetést a 27. Ábra mutatja be. .



26. Ábra. A 3. eset *KRAS* StripAssay eredménye a tumor rezekciós mintában (R), a nyirokcsomó áttétben a kezdeti műtét idejéből (M1), 53 hónappal később a hasnyálmirigy metasztázisból vett biopsziában (M2) és a plazma cfDNS-ben (LB1-3). R = rezekciós anyag, M = metasztázis, LB = liquid biopszia.

3. Eset

♂ 77 éves



27. Ábra. A vizsgált 3. eset KRAS variánsainak időrendi változásai a kezelés hatására. A primer tumorban, M2 és LB1 mintákban NGS-el és reverz hibridizációs módszerrel azonos KRAS variáns igazolódott. A primer tumor időpontjában eltávolított nyirokcsomó áttétben (M1) viszont eltérő KRAS variáns volt kimutatható, mely megjelent az LB2-3 mintákban. Emellett az LB2 mintában új KRAS variáns jelent meg. CT = komputertomográfia, SD = stabil betegség, PD = progresszív betegség.

6.4. Hypoxia és adaptáció vizsgálata kezelt (NAT) és nem kezelt (UT) végbél adenocarcinomában

Végbél adenocarcinomával diagnosztizált, preoperatív neoadjuváns kezelésben (NAT csoport) részesült betegből származó 55 kezelés előtti biopsziát és kezelés utáni sebészeti mintát dolgoztunk fel. Ezenkívül 34 biopsziát és műtéti mintát vontunk be kezeletlen végbél adenocarcinomás esetekből (UT csoport). A NAT-en átesett betegek az előírt protokollok alapján a következő kezelésekben részesültek: Capecitabin monoterápiás protokoll 2500 mg/m²; Mayo protokoll: 5-FU 425 mg/m² és kalcium-folinát (FOL) 20 mg/m² és 5-FU monoterápiás protokoll 500 mg/m². Minden beteg sugárterápiában részesült 50,4 Gy összdózis (1,8 Gy/nap, 5 nap/hét) kemoterápiával együtt, kivéve kettő esetet akik csak sugárterápiában részesültek.

A kiválasztási kritériumok közé tartozott, hogy az esetek TNM II. stádiumú besorolásba tartozzanak, mely a neoadjuváns kezelés előfeltétele, valamint mind a biopszia, mind a rezekciós minta reprezentatív tumorszövetet tartalmazzon a CAIX expresszió pontos elemzéséhez. Összehasonlítottuk az alapvető klinikai és szövettani paramétereket, beleértve a nemet, a tumor grádust és mélységet, az áttétek jelenlétét/hiányát, a mucinosus fenotípust, a *KRAS* státuszt, a neoadjuváns kezelés típusát és a tumor regressziós grádusát.

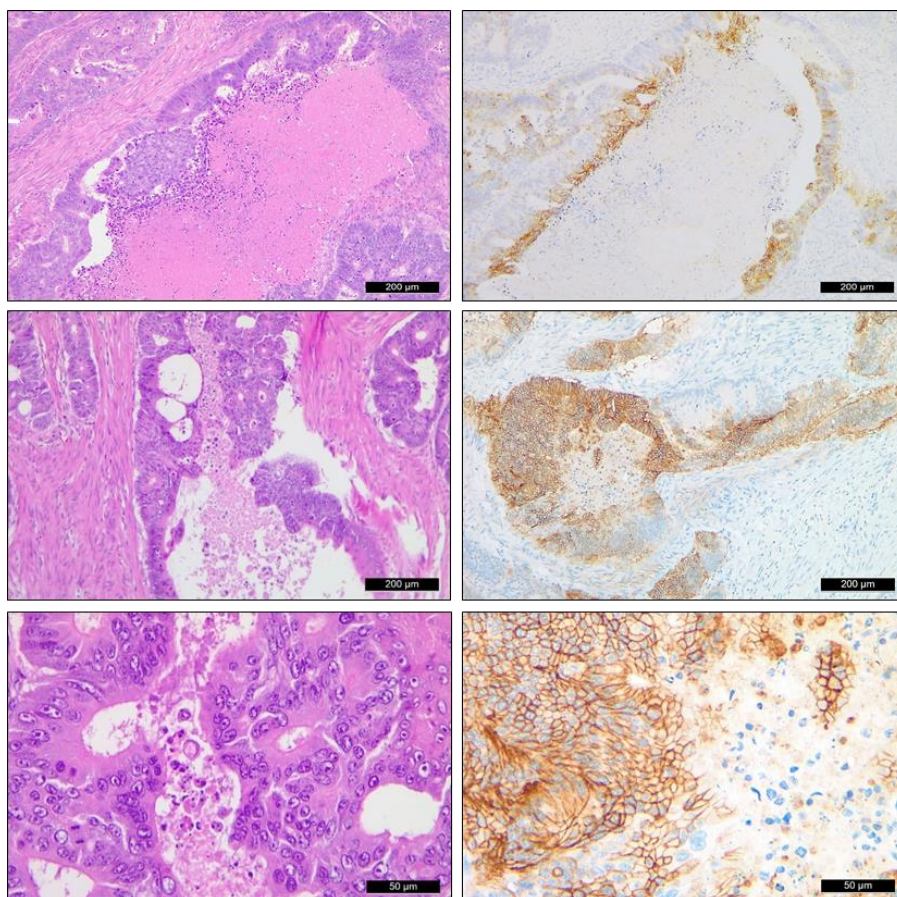
A vizsgálat csoport klinikopatológiai és biológiai jellemzőit az 8. Táblázat foglalja össze.

8. Táblázat. A vizsgálatban résztvevő neoadjuváns terápiával (NAT) kezelt végbél adenocarcinomás esetek és a kezeletlen kontrolllok (UT) klinikopatológiai és biológiai jellemzői.

Tulajdonságok	Kezelt esetek (NAT)		Nem kezelt esetek (UT)	
	Besorolás	N = 55	Besorolás	N = 34
Nem	Férfi	35	Férfi	23
	Nő	20	Nő	11
Életkor	Férfi (range)	68.6	Férfi	68.43 (51–84)
	Nő (range)	66.2	Nő	69 (52–83)
Szöveti grádus	G1	0	G1	1
	G2	36	G2	19
	G3	17	G3	13
	G4	2	G4	1
TNM stádium	T1	0	T1	3
	T2	29	T2	9
	T3	25	T3	19
	T4	1	T4	3
	Nx	0	Nx	2
	N0	33	N0	10
	N1	15	N1	14
	N2	7	N2	8
	Mx	51	Mx	0
	M0	0	M0	0
Mucinosus fenotípus	M1 (máj)	4	M1 (máj)	1
	jelen van	11	jelen van	6
KRAS státusz	hiányzik	44	hiányzik	28
	vad típus	25	vad típus	18
Neoadjuváns kezelés típusa	mutáns	30	mutáns	16
	Capecitabine & RT	32		
	5FU & FOL & RT	16		
	5FU & RT	5		
	RT	2		
Tumor regressziós grádus	R1	0		
	R2	14		
	R3	21		
	R4	14		
	R5	6		

6.4.1. A CAIX expressziós mintázat végbél adenocarcinomában

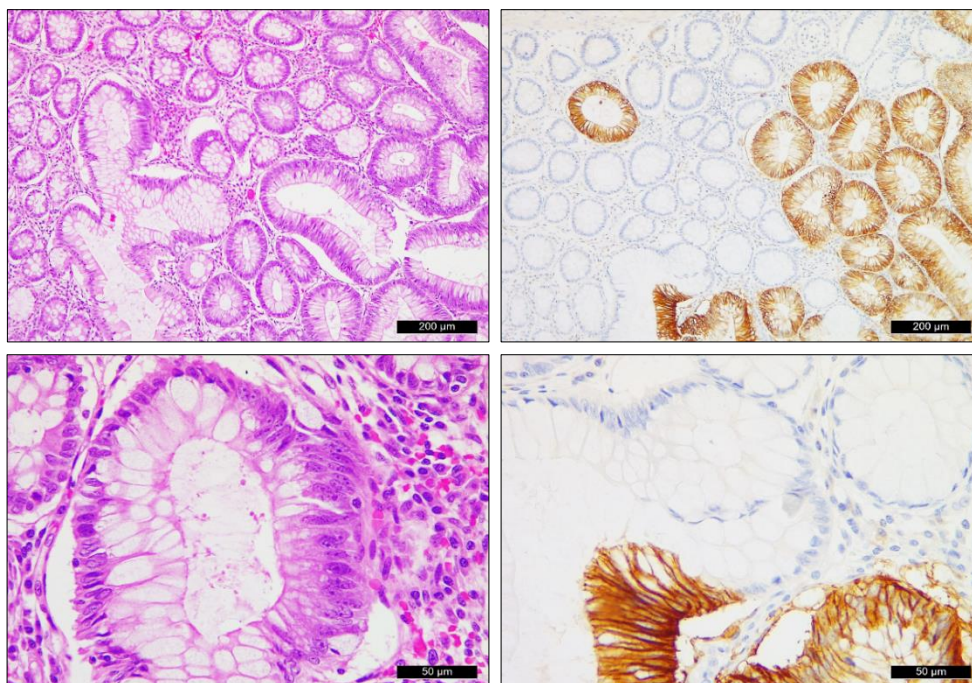
A CAIX kifejeződése nagyon változó formában és mennyiségben fordult elő az értékelt végbél adenocarcinomás mintákban. Általában a tumorsejtek szelektív festődése volt megfigyelhető, míg a normál/érintetlen végbél nyálkahártya negatívnak bizonyult a CAIX tekintetében. A daganatos területeken belül, jellegzetes és szelektív sejtmembrán festődést figyeltünk meg változó intenzitással. Ami az egyes esetek eloszlását illeti, a necrotikus területekkel való szoros összefüggést ismertünk fel, melynek során erős perinecrotikus tumorsejt jelölést láttunk. A necrosissal való összefüggést közelebbről is megvizsgáltuk a sebészeti rezekciós mintákon. A kiértékelt NAT 55 műtéti mintából 40 (72,72%) esetben fordult elő necrosis. A 40 esetből 24 esetben (60%) láttunk a perinecrotikus területek körül CAIX pozitivitást és 16 (40%) esetben nem azonosítottunk CAIX expressziót. A 34 UT rezekált mintákban 29 esetben (85,29%) tumorszöveti necrosist is azonosítottunk, melyek közül 26 (89,65%) mutatott CAIX pozitivitást a necrotikus terület körül, míg 3 (10,34%) minta a CAIX tekintetében negatívnak bizonyult (28. Ábra).



28. Ábra. A CAIX expressziós mintázat végbél adenocarcinomában. H&E festés (balra, 10×) és CAIX immunfestés (jobbra), mely szelektív sejtmembrán festődést mutat a necrotikus tumoros területben. A CAIX expresszió túlnyomórészt necrotikus tumor területekkel összefüggésben változó heterogenitással volt kimutatható (felül és középen, 10×).

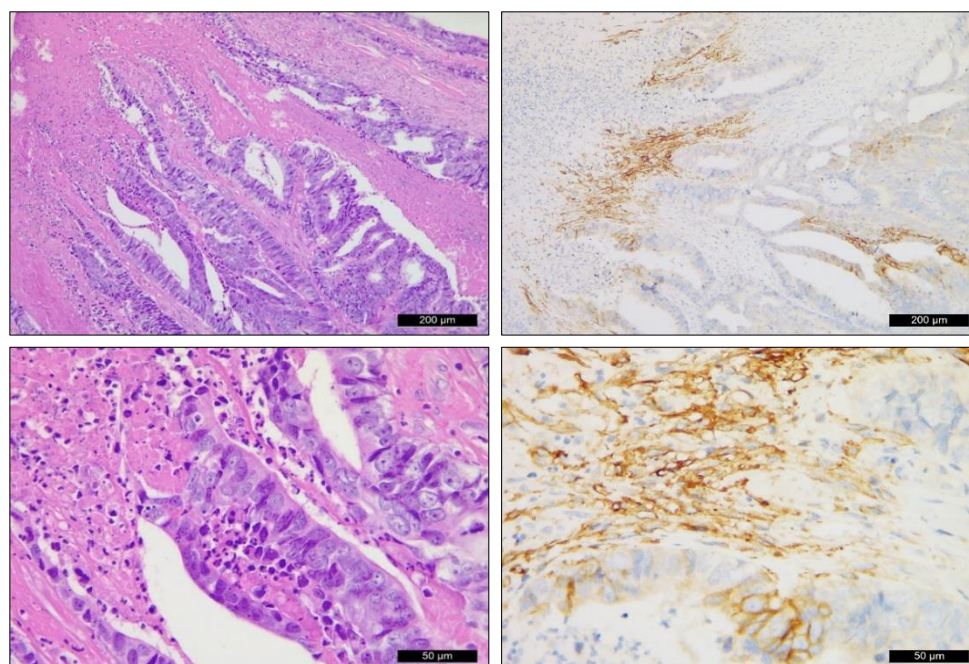
Érdekes módon a CAIX expresszió a súlyos dysplasiás területekben is gyakran előfordult, jól elkülönülve a normál hámtól vagy az alacsony fokú elváltozásoktól. Mérsékelt dysplastikus elváltozások esetében, a membrán jellegzetes CAIX expresszióval rendelkezett. A NAT műtéti minták

55 esetéből 5 (9,09%) esetben, míg az UT műtéti minták 34 esetéből szintén 5 (14,7%) esetben volt jelen a CAIX expresszió a dysplastikus területekben (29. Ábra).



29. Ábra. Szelektív CAIX expresszió a végbél adenocarcinoma melletti mérsékelt dysplasiás területekben (felső sor 10×, alsó sor 40×).

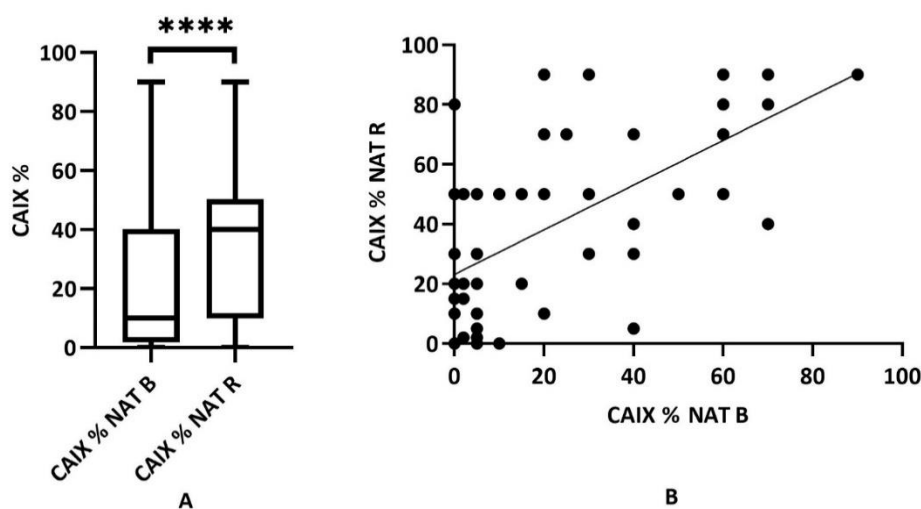
A mirigyhám eredetű neoplasztikus sejtcsoportok mellett, a CAIX expresszióját a tumoros neostromában is megfigyeltük. Fokozott CAIX expressziót láttunk a tumoron belül a neostromában a NAT műtéti minták 55 esetéből 24 (43,63%) esetben, míg 31 (56,37%) esetben a stroma CAIX-negatívnak mutatkozott. A 34 esetből álló UT csoportban a sebészeti minták közül csak 9 (26,47%) esetben láttunk CAIX pozitívást a stromát illetően (30. Ábra).



30. Ábra. CAIX expresszió a neostroma epithelialis és mesenchymalis sejtjeiben végbéltumor esetén (felső sor 10×, alsó sor 40×).

6.4.2. A CAIX expresszió dinamikája neoadjuváns kezelésben részesült végbél (NAT) adenocarcinoma eseteiben (n=55)

A CAIX expresszióját minden mintában a pozitív tumoros területek százalékos arányának a meghatározásával adtuk meg. A pozitivitás mértékét összehasonlítottuk a kezelés előtti és utáni mintákban. Statisztikai feldolgozás során a NAT biopsziás és a NAT műtéti mintáinak elemzésével a CAIX jelentős növekedését észleltük a kezelést követően (átlag $21,8 \pm 24,9$ SD vs. $39,4 \pm 29,4$ SD), ami statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (Wilcoxon matched rank teszt $p < 0,0001$). Továbbá pozitív korreláció (trend) igazolódott a biopszia és a műtéti minta között (Spearman korrelációs teszt $p < 0,0001$, rho: 0,5654) (31. A, B Ábra).



31. Ábra. A CAIX expressziójának eloszlása a NAT biopsziás (NAT B) és a NAT sebészi rezekciós mintákban (NAT R) (n = 55). (A) A CAIX tumorjelölés kumulatív eredménye (tartomány 0-90% mindkét csoport esetében, átlag $21,8 \pm 24,9$ SD vs. $39,4 \pm 29,4$ SD), ahol a CAIX jelölés szignifikánsan különbözik ($p < 0,0001$, ****: statisztikailag erősen szignifikáns); (B) a NAT tumoros csoport NAT B (kezelés előtti) és NAT R (kezelés utáni) mintái között meghatározott CAIX expresszió korrelációja ($p < 0,0001$, rho: 0,5654).

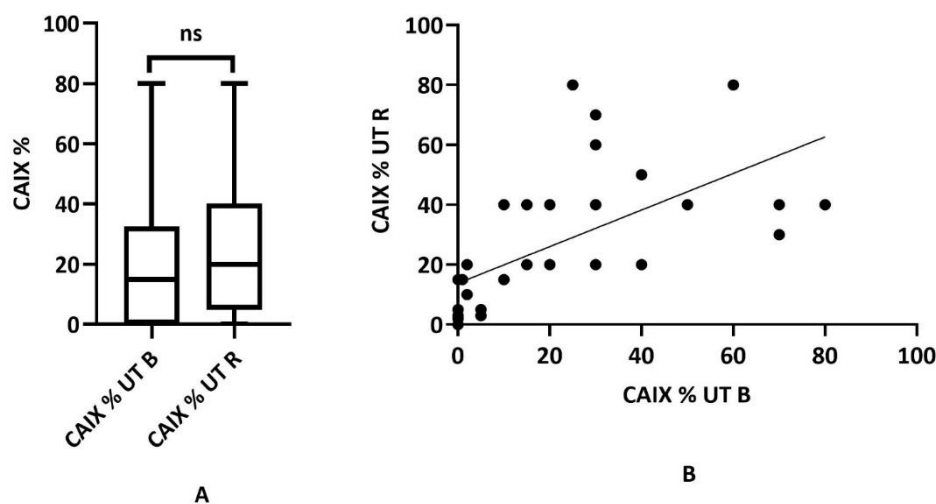
A további összehasonlítás érdekében az 55 NAT és 34 UT végbél daganat eseteinket pontosan felosztottuk a CAIX százalékos mediánja függvényében és CAIX alacsony és CAIX magas carcinomáknak minősítettük őket. Az elérhető klinikopatológiai adatokat is kiértékeltek a lehetséges különbségek bemutatására a CAIX expressziója függvényében. A legfontosabb összefüggést a CAIX expresszió mértéke és a tumor mutáns *KRAS* státusza között (biopsziás $p < 0,0151$; sebészeti minták $p < 0,0316$) találtunk, míg más klinikopatológiai paraméterekkel nem találtunk összefüggést. A kapott eredményeinket az 9. Táblázat mutatja be.

9. Táblázat. A CAIX expressziójának statisztikai megoszlása a NAT végbél adenocarcinoma klinikopatológiai paramétereit tekintetében.

Klinikopatológiai paraméterek a kezelt esetekben	CAIX expresszió a biopsziában		A CAIX expresszió a rezekátumban		Fisher teszt a biopsziában	Fisher teszt a rezekátumban
	CAIX alacsony	CAIX magas	CAIX alacsony	CAIX magas		
Összesen (n = 55)	27	28	26	29	<i>p</i> = 0.9999	
Nem						
Férfi (n = 35)	19	16	18	17	<i>p</i> = 0.4032	<i>p</i> = 0.7807
Nő (n = 20)	8	12	9	11		
Tumor grádus						
G2 (n = 36)	20	16	19	17	<i>p</i> = 0.4466	<i>p</i> = 0.5609
G3 (n = 17)	6	11	6	11		
G4 (n = 2)	1	1	1	1		
Nyirokcsomó						
pozitív (n = 16)	-	-	9	7	-	<i>p</i> = 0.5532
negatív (n = 39)	-	-	17	22		
Metasztázis						
jelen van (n = 11)	-	-	6	5	-	<i>p</i> = 0.9999
hiányzik (n = 44)	-	-	24	20		
Necrosis						
jelen van (n(B) = 2; n(R) = 24)	8	7	9	15	<i>p</i> = 0.4706	<i>p</i> = 0.1965
hiányzik (n(B) = 15; n(R) = 16)	0	2	10	6		
Stroma						
jelen van (n(B) = 4; n(R) = 24)	2	2	13	11	<i>p</i> = 0.9999	<i>p</i> = 0.4183
hiányzik (n(B) = 51; n(R) = 31)	25	26	13	19		
Tumort infiltráló lymphociták						
jelen van (n(R) = 24)	-	-	13	11	-	<i>p</i> = 0.7910
hiányzik (n(R) = 31)	-	-	18	13		
Mucinosus fenotípus						
jelen van (n = 11)	3	8	4	7	<i>p</i> = 0.1771	<i>p</i> = 0.5104
hiányzik (n = 44)	24	20	22	22		
Tumor regressziós grádus						
TRG2 (n = 14)	9	5	5	9	<i>p</i> = 0.0660	<i>p</i> = 0.0590
TRG3 (n = 21)	13	8	12	9		
TRG4 (n = 14)	4	10	4	10		
TRG5 (n = 6)	1	5	0	6		
KRAS státusz						
vad típus (n = 25)	17	8	16	9	<i>p</i> < 0.0151	<i>p</i> < 0.0316
mutáns (n = 30)	10	20	10	20		

6.4.3. A kezeletlen (UT) végbél adenocarcinoma CAIX expressziója (n = 34)

A kezeletlen végbél adenocarcinoma mintákat mint kontroll csoportot is a korábban bemutatott módon értékeltük. A CAIX expressziója nagyon változó volt, az értékek 0 és 80% között mozogtak. A NAT tumor csoporttal ellentétben az UT biopszia és az UT sebészeti minta statisztikai elemzése nem eredményezett statisztikailag szignifikáns különbséget a CAIX expresszió tekintetében (átlag $15,0 \pm 21,3$ SD vs. $20,0 \pm 23,2$, Wilcoxon matched rank test $p < 0,073$), de a biopsziás és a sebészeti minták közötti korreláció jól kimutatható volt (Spearman korrelációs teszt $p < 0,0001$, rho: 0,8077) (32. A, B Ábra).



32. Ábra. A CAIX expresszió eloszlása a kezeletlen biopsziás (UT B) és a hozzájuk tartozó sebészeti rezekciós mintákban (UT R) (n = 34). (A) A CAIX expresszió mértékének tartománya 0 - 80% között volt mindkét csoport esetében, de statisztikailag szignifikáns különbség nem állt fenn (átlag $15,0 \pm 21,3$ SD vs. $20 \pm 23,2$ SD, $p = 0,073$, ns: statisztikailag nem szignifikáns); (B) az UT B és UT R CAIX expresszió mértéke közötti korreláció ($p < 0,0001$, rho: 0,8077).

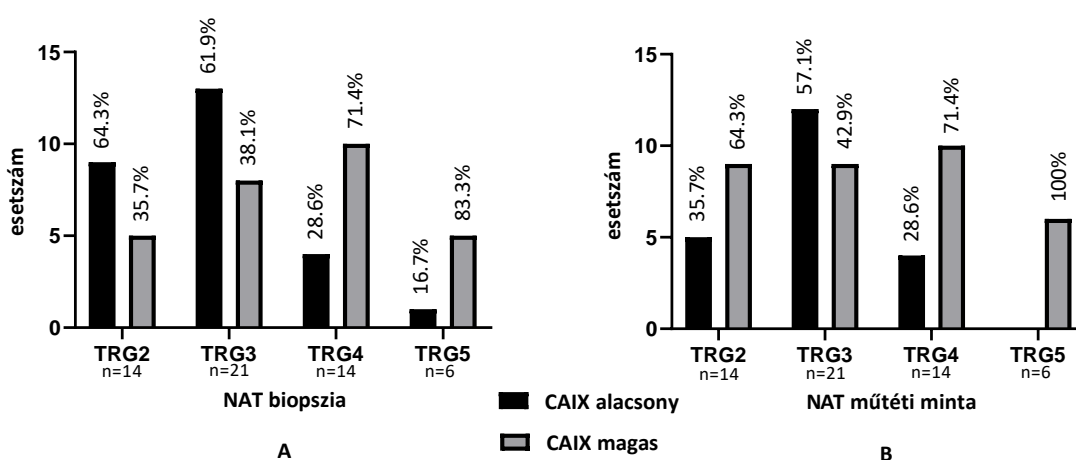
Az UT csoportban is a CAIX alacsony és CAIX magas medián szerinti osztályozást a kapcsolódó klinikopatológiai adatok elemzése követte. Hasonlóan a NAT carcinoma csoporthoz, statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a CAIX expresszió és a *KRAS* státusz között, de csak a biopsziás CAIX értékek tekintetében (biopsziás $p < 0,0454$; sebészeti minták $p < 0,0921$). Minden más értékelt paraméter független volt a CAIX státusztól (10. Táblázat).

10. Táblázat. A CAIX expresszió statisztikai megoszlása a kezeletlen (kontroll) végbél adenocarcinomás minták klinikopatológiai paramétereit tekintetében.

Klinikopatológiai paraméterek a nem kezelt esetekben	A CAIX expresszió a biopsziában		A CAIX expresszió a rezekátumban		Fisher teszt a biopsziában	Fisher teszt a rezekátumban
	CAIX alacsony	CAIX magas	CAIX alacsony	CAIX magas		
Összesen (n = 34)	15	19	14	20	$p = 0.9999$	
Nem						
Férfi (n = 23)	12	11	12	11	$p = 0.4768$	$p = 0.2714$
Nő (n = 11)	4	7	3	8		
Tumor grádus						
G1 (n(B) = 1, n(R) = 1)	0	1	0	1		
G2 (n(B) = 28, n(R) = 19)	14	14	9	10	$p = 0.3547$	$p = 0.9068$
G3 (n(B) = 5, n(R) = 13)	1	4	5	8		
G4 (n = 1 R)	-	-	0	1		
Nyirokcsomó						
pozitív (n = 17)	-	-	6	11		
negatív (n = 17)	-	-	8	9	-	$p = 0.7283$
Metasztázis						
jelen van (n = 5)	-	-	1	4		
hiányzik (n = 29)	-	-	13	16	-	$p = 0.3786$
Necrosis						
jelen van (n(B) = 2; n(R) = 26)	0	2	9	17	$p = 0.4667$	$p = 0.5320$
hiányzik (n(B) = 4; n(R) = 3)	2	2	0	3		
Stroma						
jelen van (n(B) = 0; n(R) = 9)	-	-	3	6		
hiányzik (n(B) = 34; n(R) = 25)	14	20	8	17	-	$p = 0.9999$
Tumort infiltráló lymphociták						
jelen van (n(R) = 19)	-	-	5	9		
hiányzik (n(R) = 15)	-	-	10	10	-	$p = 0.4953$
Mucinosus fenotípus						
jelen van (n = 6)	2	4	1	5	$p = 0.6722$	$p = 0.3636$
hiányzik (n = 28)	13	15	13	15		
KRAS státusz						
vad típus (n = 18)	11	7	10	8	$p < 0.0454$	$p = 0.0921$
mutáns (n = 16)	4	12	4	12		

6.4.4. Tumor regressziós grádus és a CAIX a NAT biopsziás és NAT műtéti mintákban (n = 55)

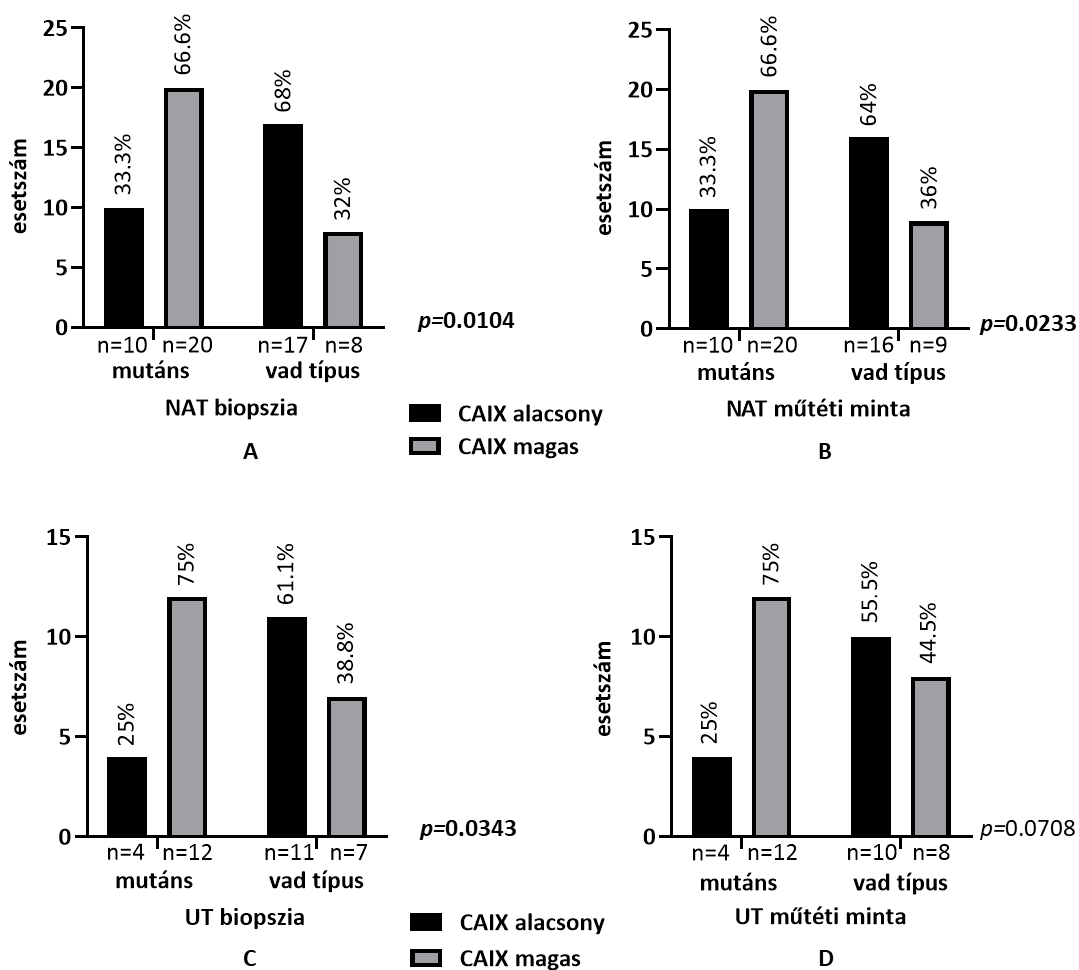
A neoadjuváns kezelés hatásának vizsgálatára a terápiát követően nyert NAT műtéti mintákban a WHO ajánlásai szerint meghatároztuk a tumor regressziós grádust (TRG) Mandard-féle regressziós beosztás szerint. Az így kapott TRG-t összehasonlítottuk a kezelés utáni minta CAIX expressziójával, de a kezelés előtti biopsziás minták CAIX expressziójával is a lehetséges prediktív jellemzők érdekében. A kezelés előtti biopsziák értékelésénél a TRG2-3 esetek többsége a CAIX alacsony (64,3 és 61,9%), és fordítva, a TRG4-5 esetek többsége a CAIX magas fenotípushoz (71,4 és 83,3%) társult. Ezzel szemben a CAIX expresszió a NAT-ot követően az esetek többségében általában megnövekedettnek bizonyult, CAIX magas fenotípust mutattak (71,4% és 100,0%) (33. A, B Ábra).



33. Ábra. A kezelés utáni NAT sebészeti rezekciós mintákban meghatározott tumor regressziós grádus (TRG) és a CAIX expressziója a kezelés előtti NAT biopsziás (A) és a kezelés utáni NAT sebészeti mintákban (B). A válasz elmaradása (TRG4-5) túlnyomórészt a CAIX magas fenotípushoz társul.

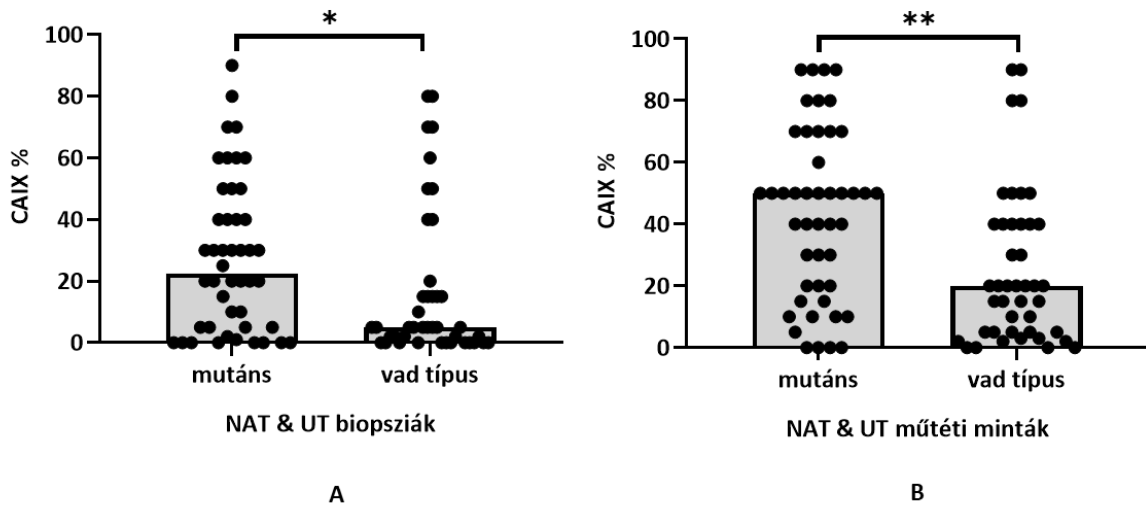
6.4.5. KRAS státusz és CAIX expresszió a NAT és az UT esetekben

Meghatároztuk a *KRAS* mutációs profilt a tanulmányba bevont összes végbél adenocarcinoma mintákban, ami lehetővé tette a CAIX expressziós adatokkal való összehasonlítását. A *KRAS* mutáns és vad típusú tumor csoportok összehasonlítása jelentős különbségeket igazolt, mivel a *KRAS* mutáns minták esetében a CAIX kifejeződése sokkal magasabbnak bizonyult. A CAIX expresszió és a *KRAS* státusz korrelációja statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a NAT biopsziákban, a sebészeti mintákban és az UT biopsziákban, de az UT sebészeti rezekciós mintákban nem, a Fisher egzakt teszt szerint ($p < 0,05$) (34. A-D Ábra).



34. Ábra. A *KRAS* státusz és a CAIX expresszió közötti korreláció a NAT biopsziáiban és a kezelés utáni sebészeti mintákban (A, B), valamint az UT (n = 34) végbél adenocarcinoma biopsziáiban és a kezeletlen sebészeti mintáiban (C, D).

Mivel a *KRAS* mutáns végbél adenocarcinomák szignifikánsan nagyobb arányban képviseltették magukat a CAIX magas csoportban, mind a NAT, mind az UT minták esetében, kombinált elemzést is végeztünk a *KRAS* státuszhoz kapcsolódó pontos CAIX értékek felhasználásával az egységes végbéldaganat kohorszban (n = 89, mutáns n = 46, vad típusú n = 43). A várakozásoknak megfelelően a CAIX expressziós értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a *KRAS* mutáns esetekben (kezdeti biopsziák: vad típusú átlag $16,28 \pm 24,34$ SD vs. mutáns átlag $27,67 \pm 24,6$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,0138$; NAT és UT sebészeti minták: vad típusú átlag $25,51 \pm 25,10$ SD vs. mutáns átlag $43,15 \pm 27,62$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,002$) (35. A, B Ábra).



35. Ábra. A *KRAS* státusz és CAIX expresszió a kombinált NAT és UT végbél adenocarcinoma mintákban (n = 89). A CAIX értékek eloszlása a *KRAS* mutáns és vad típusú tumorok biopsziás mintáiban (A) és sebészi rezekciós mintákban (B) A mutáns *KRAS* tumorok szignifikánsan magasabb összesített CAIX expressziós értékkel rendelkeznek (* p = 0,0138; ** p = 0,002).

6.4.6. A betegek túlélése és a CAIX expressziója NAT és UT mintákban

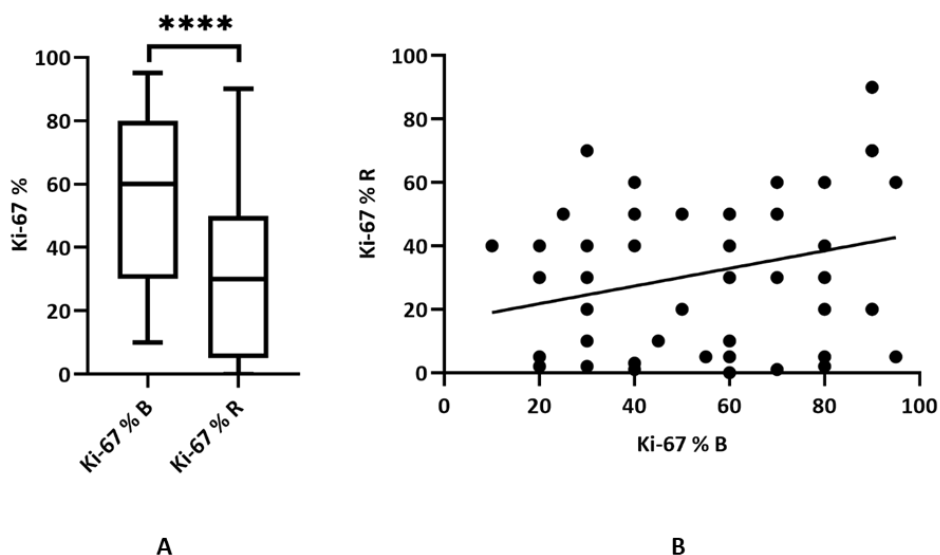
Ezután a CAIX expressziójának összefüggését vizsgáltuk a NAT biopsziás és műtési mintákban a teljes túlélés (OS) és a progressziómentes túlélés (PFS) tekintetében. A statisztikai elemzés (Kaplan-Meier-görbék) szerint a CAIX magas és CAIX alacsony kategóriák között nem volt mérhető szignifikáns különbség az OS vagy a PFS tekintetében (OS biopsziás minták p = 0,9769 vs. sebészeti minták p = 0,6585; PFS biopsziás minták p = 0,2129 vs. sebészeti minták p = 0,7382). Hasonlóképpen, az UT biopsziás és műtési minták értékelése sem eredményezett szignifikáns korrelációt az OS és PFS, valamint a CAIX alacsony és CAIX magas expressziós csoportok között (OS biopsziák p = 0,1620 vs. műtési minták p = 0,7940; PFS biopsziák p = 0,4830 vs. műtési minták p = 0,1380).

6.4.7. Sejtproliferáció és CAIX expresszió

Kutatásunk során a CAIX expressziójának vizsgálata mellett kitértünk a proliferációs aktivitás expressziós mintázatának a megfigyelésére is az UT és NAT csoportokban. Az UT csoportban (n = 34) a kezeletlen biopsziák és műtési minták esetében a proliferációs aktivitás expressziójának értékei szoros összefüggést mutattak (kezeletlen biopszia átlag $55,8 \pm 16,54$ SD vs. kezeletlen műtési minta átlag $57,79 \pm 19,97$ SD), statisztikailag szignifikáns különbség nem volt igazolható (Wilcoxon matched rank test p < 0,1671). Továbbá pozitív korreláció (trend) igazolódott a kezeletlen biopszia és a műtési minta között (Spearman korrelációs teszt p < 0,0001, rho: 0,9371).

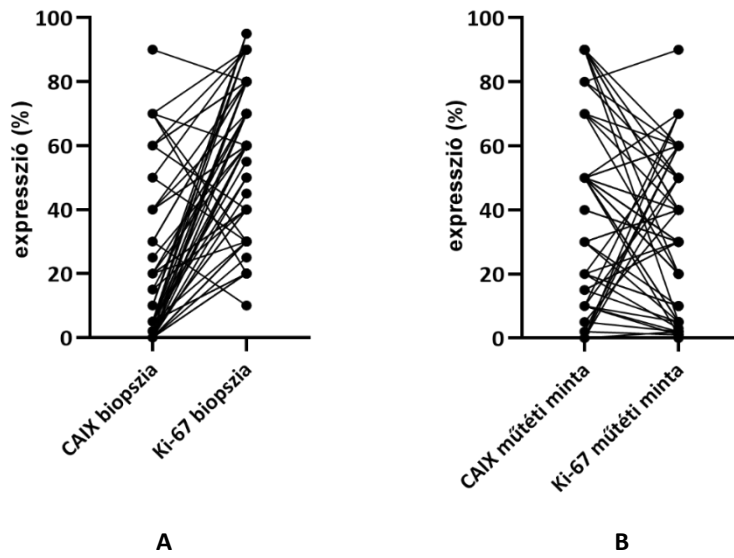
Ezzel ellentétben a kezeletlen biopsziák és a kezelt műtési minták esetében a kezdeti proliferációs aktivitás jelentősen csökkent a kezelés hatására. Statisztikailag szignifikáns különbség igazolódott a Ki-67 expresszió tekintetében (kezeletlen biopszia átlag $56,82 \pm 24,29$ SD vs. kezelt műtési minta átlag $32,04 \pm 23,62$ SD, Wilcoxon matched rank test p < 0,0001), de a kezeletlen biopsziás és a kezelt

sebészeti minták közötti enyhe korrelációt láttunk (Spearman korrelációs teszt $p < 0,404$ rho: 0,2772) (36. A, B Ábra).



36. Ábra: A Ki-67 expressziójának eloszlása a NAT biopsziákban (NAT B) és a NAT sebészi rezekciós mintákban (NAT R) (n = 55). (A) A Ki-67 tumorjelölés kumulatív eredménye (tartomány 0-95% mindkét csoport esetében, átlag $56,82 \pm 24,29$ SD vs. $32,04 \pm 23,62$ SD), ahol a Ki-67 jelölés szignifikánsan különbözik ($p < 0,0001$, ****: statisztikailag erősen szignifikáns); (B) a NAT tumoros csoport NAT B és NAT R mintái között meghatározott Ki-67 expresszió korrelációja ($p < 0,404$, rho: 0,2772).

Ezenfelül a CAIX és a Ki-67 végbéltumoron belüli expressziós mintázatának vizsgálata során megfigyeltük, hogy az esetek többségében a kezelt esetekben a magasabb Ki-67 expressziós értékekhez alacsonyabb CAIX expressziós érték tartozott, míg a kezelt esetek többségében magasabb CAIX expressziós értékekhez alacsonyabb Ki-67 expressziós aktivitás társult. A Ki-67 expressziós értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a biopsziás mintákban a CAIX expressziós mintázathoz képest (kezdeti biopsziák: CAIX átlag $21,78 \pm 24,97$ SD vs. Ki-67 átlag $56,82 \pm 24,29$ SD ; Mann-Whitney teszt $p < 0,0001$; NAT sebészeti minták: CAIX átlag $39,44 \pm 29,47$ SD vs. Ki-67 átlag $32,04 \pm 23,62$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,2630$) (37. A, B Ábra).



37. Ábra: A Ki-67 és CAIX expressziója a NAT B és a NAT R mintákban (n = 55). A Ki-67 és CAIX tumorjelölés kumulatív eredménye (tartomány 0-95% mindkét csoport esetében). (A) A biopsziás minták esetében a CAIX átlag $21,78 \pm 24,97$ SD vs. Ki-67 átlag $56,82 \pm 24,29$ SD; Mann-Whitney teszt $p < 0,0001$; (B) NAT sebészeti minták: CAIX átlag $39,44 \pm 29,47$ SD vs. Ki-67 átlag $32,04 \pm 23,62$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,2630$.

7. Megbeszélés

7.1. Multiplex *KRAS* eltérések jelentősége

A CRC carcinogenezise heterogén folyamat, mely számos alternatív sejtes jelátviteli mechanizmust foglal magában. A leggyakoribb klasszikus útvonal az adenoma-carcinoma útvonalat követi, melyet az *APC*, *KRAS*, *NRAS* és *TP53* gének patogén variánsai jellemzik [48,189]. Ezen kívül a CRC a serrated-metilált útvonalon keresztül is kialakulhat, amely a *KRAS/BRAF* mutációk, a CpG-sziget-metiláció és az *MGMT* és *MLH1* metilációs státusza alapján hagyományos és sessilis serrated mechanizmusokra osztható tovább [190]. A mismatch repair protein komplex csírvonalbeli mutációival járó CRC-t (Lynch-szindróma) külön csoportnak tekintik. A jelenlegi szövettani gyakorlat szerint a mismatch repair (MMR) hiány kizárását immunhisztokémiai panel alkalmazása teszi lehetővé [94]. Emellett a releváns génszakaszok DNS-szekvenálása lehetővé teszi a molekuláris alcsoport becslést kategorizálását, mivel a komplex genomikai vizsgálatok (beleértve a metilációs profilalkotást is) még nem állnak rendelkezésre a klinikai rutinban [191]. A CRC-k molekuláris vizsgálata magába foglalja a *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* aktiváló mutációinak kizárását, ami az anti-EGFR-terápia alkalmazásának kötelező előfeltétele [192–195]. A jelenlegi diagnosztikai eljárás szerint a releváns génszekvenciák meghatározásához reprezentatív tumorminta elemzése szükséges. A patogén génvariánsok egyediek és jellegzetesek és a változó mértékű heterogenitás ellenére a főbb variánsok stabilak maradnak a terjedés során. Általában az áttétek mutációs profilja az elsődleges daganatokra épül, amelyekből származnak [196,197]. A klonális genetikai háttér, melyet tovább befolyásolnak a szelekciós mechanizmusok pl. a disszemináció vagy a kezelés, alapvetően meghatározza a túlélést és az alkalmazott célzott terápiával szembeni rezisztenciát [29,198–200].

A többszörös tumoros gócok jellemzően örökletes daganatos szindrómákhoz társulnak, és kimutatásuk csírvonalbeli génmutációkkal hozható összefüggésbe, például a familiáris adenomatosis polipózis vagy az örökletes nem-polipózisos CRC esetében [189,201,202]. A többszörös tumoros gócok azonban egyre gyakoribbak a nem örökletes, sporadikus betegségekben, megjelenésük számos kockázati tényezőhöz társul, beleértve a férfi nemet és az előrehaladott életkort [201,202]. A CRC-ben kialakuló, a progresszív daganatos átalakulást elősegítő folyamatokat gyakran kísérik dysplasiás adenómák vagy a tumort megelőző felszíni elváltozások más formái, amelyek vastagbélükrözés vagy sebészi mintavételezés során alul diagnosztizálhatók [101,203]. Ezenkívül a fel nem fedezett szinkron és metakron tumoros gócok akár egy betegségként is értelmezhetők (lokális szóródás, ill. recidíva), ha részletes elemzésük pato-biológiai módszerekkel elmarad.

Munkáink során a vastag- és végbéltumorok molekuláris, ezen belül elsősorban a *KRAS* gén eltéréseinek vizsgálata kapcsán tapasztalt jelenségeket elemeztük. Elsőként megállapíthatjuk, hogy a DE KK Patológia Molekuláris Laboratóriumában megvizsgált esetek molekuláris profilja lényeges statisztikai eltérést nem mutat a hazai és nemzetközi szakirodalomban található eredményektől. Az

ilyen módon reprezentatívnak tekinthető kohorsz eseteit célkitűzéseinknek megfelelően speciális szempontok szerint elemeztük. Számos esetből néhány olyan betegre fókuszáltunk, akiknél többszörös daganatból, ill. több időpontból származó mintából volt lehetőség a *KRAS* és egyéb gének státuszának összehasonlító elemzésére és az összefüggések feltárására.

Első esettanulmányunkban megvizsgáltuk az összes rendelkezésre álló szöveti és molekuláris jellemzőt, hogy meghatározzuk az egy betegben négy egyidejűleg előforduló elsődleges vastagbél-daganat és nyolc távoli áttét biológiai természetét és megállapítsuk a klonális kapcsolatot közöttük. A szövettani megjelenés, a megőrzött MMR fehérje IHC-profil és a *KRAS/TP53* szekvenálási eredmények alapján, a daganatos gócot a jobb colonfélt érintő anatómiailag elkülönült dysplasiás adenomatous polipjaiból egymástól függetlenül kialakult hagyományos adenocarcinómák sorozataként értelmeztük. Az *APC* génre sajnos nem terjedt ki az alkalmazott génpanel, de az anamnézis és a klinikopatológiai kép nem támasztotta alá a familiáris adenomatous polyposis (FAP) etiológiáját.

A molekuláris leletek összehasonlítása egyértelműen kimutatta a négy primer tumor független jellegét, melyek négy különböző *KRAS* genotípust mutattak, köztük három, egymással nem összefüggő patogén *KRAS* variánst (Gly12Asp, Gly12Cys, Gly12Val) és egy vad típusú *KRAS* konfigurációt. Az egyes *KRAS* variánsok lehetővé tették az áttétes daganatok nyomon követését a betegség különböző időpontjaiból. Érdekes módon a négy különböző genotípusú primer adenocarcinoma közül csupán az egyik (T3) mutatott egyezést a metasztatikus folyamatban észleltekkel, így ezt az összes szinkron (M1/1 és M1/2) és a későbbi követés során előforduló metasztázis (M2-M5) forrásaként határoztuk meg. Az egyetlen visszatérően megjelenő *KRAS* mutáció (c.34G>T, p.Gly12Cys) a betegség lefolyása során megbízható útmutatásként szolgált a terápia kiválasztásában. Ez az állandó variáns csupán az M1/1 és M3 metasztázisokban nem volt kimutatható, ami nem feltétlenül jelenti az adott allél hiányát. Feltételezzük, hogy a minőségi változók, beleértve a szövetek összetételét, a fixálást stb., zavarhatják a DNS-alapú vizsgálatokat, amint azt bármely alkalmazott genetikai platform használata során is megállapítottak. Ez esetben sem lehet a technikai problémát kizárni.

A *KRAS* eltérés mellett az NGS génpanel a *TP53* gén különböző változatait is azonosította változatos kombinációkban, ami szintén igazolja az egyes tumoros gócok klonális függetlenségét. Alacsony gyakoriságú (<10%) *TP53* variánsokat mutattunk ki minden primer mintában, míg domináns *TP53* variánst csak a T2 és T3 mintákban voltak megfigyelhetők. A T3-ban kimutatott *TP53* variáns (c.820G > T, p.Val274Phe) volt azonban az egyetlen, amely az összes későbbi mintán keresztül követhető volt. A *KRAS* adatokkal összhangban a T3 primer tumort a szisztémás disszemináció egyértelmű és kizárólagos forrásaként határoztuk meg. Érdekes módon a vad típusú *KRAS* eredmény által jellemzett M1/1 és M3 májmetasztázis is mutatta az állandó *TP53* variánst, eleinte meglehetősen magas később alacsony allélfrekvenciával (VAF 23,1% ill. 3,14%), de viszonylag magas szövettani p53 H-score-al.

Általánosságban elmondható, hogy a p53 IHC összhangban volt a *TP53* szekvenálási adatokkal, változó, de kiemelkedő H-score-t adva a T2 és T3 primer, valamint az összes metasztatikus tumorban.

A diagnosztikus vastagbéltükrözés során nyert biopszia és a műtéti anyag összehasonlítása szintén érdekes megfigyeléseket eredményezett a vizsgált esetben. A preoperatív biopsziában (a dysplasia szövettanilag súlyos formája) a sebészi rezekciós minta T1 primer tumorában kimutatott *KRAS* variánssal megegyező *KRAS* variánst (c.35G>A, p.Gly12Asp) mutattunk ki. A klinikai feljegyzések szerint a vastagbéltükrözést a teljes vastagbélben végezték, míg a biopsziás mintavétel csak a proximalis végen (coecum) elhelyezkedő legnagyobb elváltozásból történt, ami az általunk T1 elnevezésű daganatnak felelt meg, így a mintavétel összhangban van a *KRAS* szekvenálási adatokkal. Összesen azonban hat különböző, alacsony szintű *TP53* variánst (VAF 2,9% és 7,6% között) mutattunk ki a biopsziában és a T1-ben is, amelyek nem mutattak átfedést. Más követéses mintákhoz hasonlóan az NGS által kimutatott alacsony gyakoriságú *TP53* variánsok sporadikusnak és egyedinek tűnnek, elsősorban a dysplasia jelenlétét támogatják és a jelek szerint nincs jelentős hatásuk a tumor progressziójára.

Az NGS módszer nagy előnye a tumor progressziójával és a terápia rezisztenciájával összefüggő több génváltozat párhuzamos kimutatása [204]. Eseteinkben egy egyszerű, 15 génből álló panelt használtunk, amely a CRC kezelése szempontjából releváns diagnosztikai célpontokat fed le. Ez a panel megfizethető és hatékony a klinikai igények teljesítéséhez, bár a genom teljes komplexitását messze nem tükrözi. A reverz hibridizáción alapuló StripAssay ezzel szemben gyorsan és rendkívül érzékenyen, de egyesével azonosítja a soliter gének releváns hotspot-mutációit. A jelenleg általunk is használt *KRAS* StripAssay vizsgálat 29 specifikus *KRAS* variánst fed le, 1% alatti VAF érzékenységgel. Végül megemlítenénk, hogy a soliter kis régiók Sanger-szekvenálását korábban a molekuláris géndiagnosztika "arany standardjának" tekintették. Még mindig alkalmazható a jól megőrzött, terjedelmes, solid tumormintákból származó DNS-eredmények konfirmálására, ugyanakkor az alacsony frekvenciájú (10% alatti VAF) variánsok kimutatására vonatkozó korlátok egyértelműek.

Összefoglalva, e szokatlan, többszörös vastagbél tumor és a kapcsolódó áttétek célzott szekvencia elemzése értékes betekintést nyújtott az elsődleges daganatok klonális kapcsolatába és a négy éven át kezelt áttétes folyamat genetikai progressziójába. A molekuláris eredményeket úgy értelmezhetjük, hogy az egyidőben fennálló négy független primer tumor közül csak az egyik igényelt ténylegesen szisztémás kezelést távoli áttétek miatt. Eredményeink tovább hangsúlyozzák az áttétes elváltozások külön értékelésének szükségességét a betegség nyomon követése és a terápia optimalizálása érdekében.

7.2. KRAS státusz követése LB módszerrel

A tumor szubklónok megjelenése és térbeli újraeloszlása a progresszív daganatokban folyamatos és idővel biológiailag/genetikailag különböző tumor régiók, góccok kialakulásához vezet. Ezenkívül a kemo-radioterápia potenciálisan kiváltja a rezisztens klónok szelekcióját, új mutációk és egyéb génátrendeződések generálódását indukálja, amelyek hozzájárulnak a tumorsejtek túléléséhez. Következésképpen egyetlen, kezdeti tumorminta elemzése valószínűleg nem jósolja meg, hogy mi történik később a másodlagos elváltozásokban és általában csak az adott tumoros terület pillanatnyi állapotát tükrözi [17,138]. A rezisztens/reziduális tumorok és az újonnan kialakult áttétek genetikai monitorozása tehát nagy klinikai jelentőséggel bír. Bár a progresszió észlelésekor ismételt tumorminta vétele mérlegelendő, ezt számos tényező nehezíti. A nemrégiben elérhetővé vált liquid biopszia megközelítése lehetővé teszi a rosszindulatú daganatsejtekből felszabaduló és a vérplazmába kerülő szabad DNS töredékek (cfDNS) elemzését. Ennek a megközelítésnek az egyik legnagyobb előnye a genetikai anyaghoz való egyszerű és folyamatos hozzáférés. A tumor DNS vizsgálatokkal ellentétben azonban a cfDNS genotipizálása egy összetett genetikai képet tükröz, amely a plazmába kijutott összes genetikai szubklónokat képviseli, nagyjából függetlenül azok tényleges anatómiai lokalizációjától. Nem meglepő, hogy a mutációs státusz ily módon történő nyomon követése a kimutatott génváltozatok által feltárja a daganatra jellemző szubklónok sokféleségét és néha váratlan variabilitását. Érdekes kérdés, hogy párhuzamosan több génvariáns fennállása esetén ezek honnan erednek és egymással milyen klonális kapcsolatot mutatnak. A gyakorlatunkban visszatérően szerepeltek olyan daganatok, melyeket egyidejűleg egynél több *KRAS* variáns jellemezett. A *KRAS* mutáns CRC kohorsz 5,68%-ában fedeztünk fel variánsdiverzitást, ami megfelel a nemzetközi szakirodalomban leírtaknak. Vizsgálatunk középpontjában vastagbél adenocarcinoma mintákban azonosított több *KRAS* variáns valós dinamikája állt. Ennek megértéséhez a daganatos DNS-en túl cfDNS vizsgálatokat is végeztünk. Bár a részletes profilalkotáshoz rendelkezésre álló betegek száma erősen korlátozott volt, rendkívül érdekes megfigyeléseket tettünk.

Az 1. betegnél a vizsgált primer tumorban intratumorális heterogenitás mutatkozott szubklonális evolúcióval. Az öt különálló primer tumor szövetmintában (R1-R5) két patogén *KRAS* variáns váltakozott és csak két mintában fordult elő mindkettő (R3 és R5). Érdekes módon az egyetlen sebészileg eltávolított nyirokcsomó metasztázis csak az egyik (a c.35G>T; p.Gly12Val) variánst mutatta, mely különbözött a plazma cfDNS-ben kimutatott egyetlen variánstól (c.34G>T; p.Gly12Cys) a kombinált terápia megkezdése előtt és után. A primer tumor és a szomszédos nyirokcsomó metasztázis radikális eltávolítása után a liquid biopsziák természetesen már csak a maradék tumortömeg patogén változatait reprezentálják. Az LB1-ben és később az LB2-ben kimutatott *KRAS* variánsok a rezezált primer tumor két (R1 és R3) területén kerültek kimutatásra. Ez arra utal, hogy a műtéten túljutott tumoros maradvány az R1/R3 szövetrészekhez hasonlíthatók biológiailag. A harmadik cfDNS minta (LB3) variáns mentes maradt, ami tulajdonítható a kezelésre adott válasznak, ugyanakkor az LB-val

kapcsolatban szintén előforduló átmeneti mintavételi hiba sem zárható ki. Az efféle genetikai diverzitás a daganat lefolyása, progressziója során ismert, de egyelőre nem gyakran kutatott jelenség. Raimondi és munkatársai tizenegy RAS mutáns metasztatikus CRC esetet vizsgáltak és csak 6 esetben (55%) mutattak ki azonos variánsokat a plazmában, míg a többi esetben vad típust találtak (5 eset, 45%). Klinikai jelentőséggel bír, hogy a betegség progressziójának idején a plazmában RAS mutációra negatívan tesztelt betegek EGFR-gátlóval történő kezelésre alkalmasnak minősülnek [104].

A 2. számú betegnél a vizsgálathoz rendelkezésre álló egyetlen tumoros szövetmintában egyetlen *KRAS*, valamint *NRAS*, *MET* és *NTRK1* gének további variánsai fordultak elő. A neoadjuváns radio-kemoterápia, majd a bevacizumab kombinált terápia után vett LB-k három további *KRAS* variánst mutattak, azonban egyetlen *NRAS* variánst sem tükröztek, ami a tumorelles terápia hatására kialakuló genotípus váltásra, tumor heterogenitásra utal. A *MET* és *NTRK1* mutációkat ugyanakkor valamennyi cfDNS mintán keresztül azonosítottuk, azonos, magas gyakoriságú VAF-al, ami egyéni, csírvonalbeli eltérésre utal. Az eset fontos jellemzője, hogy az elsődleges végbél carcinoma inoperábilis volt, eközben a beteg többszörös májmetasztázisokat kapott. Hipotézisünk szerint az alapító klón különböző *KRAS* variánsokkal rendelkező szubklónokban fejlődött ki. A primer tumorból vett minta a genetika szempontjából korlátozott értékkel bír és az aktuálisan eltalált tumor részlet csak az egyik *KRAS* variánst hordozta. A tumor DNS-ből meghatározott viszonylag alacsony VAF (6,7%) szintén szubklonális változás mellett szól. Feltételezzük tehát, hogy ugyanazon primer és metasztatikus tumorok különböző területei egymástól függetlenül fejlődhetnek más patogén variánsok megjelenésével, amelyek esetleg az alkalmazott genotoxikus terápia hatására is szelektálódhattak. A gén variánsok dinamikus változása még mindig meglepő, de nem elszigetelt eredmény. Példaként Sclafani F. és mtsai. ide illő tanulmánya említhető meg melyben a lokálisan előrehaladott végbéltumorokban szenvedő betegeknél a tumorszövet és a plazma minták között a *KRAS* státuszt összehasonlítva az esetek 26,8%-ában eltérő plazma eredményeket találtak, melyeket később kiterjesztett szövetmintavétellel is igazolni tudtak [205]. Saját esetünkben a plazma cfDNS elemzésekkel a progresszió komplex jellegére is következtethettünk.

A 3. betegnél a műtéti úton eltávolított primer vastagbél tumort és nyirokcsomó metasztázisokat, valamint a késői távoli metasztázisokat (hasnyálmirigy) lehetett összehasonlítani, majd LB cfDNS vizsgálatot végeztünk. Míg a primer tumor (R), a hasnyálmirigy metasztázis (M2) és a bevacizumabot megelőzően a plazmából származó cfDNS (LB1) ugyanazt a *KRAS* mutációt mutatta, a kezdeti diagnózis idejéből származó nyirokcsomó metasztázis (M1) és a későbbi időpontokból származó követéses cfDNS-ek (LB2 és LB3) ettől eltérő *KRAS* variánst mutattak, valamint megjelent egy további, harmadik *KRAS* variáns is az LB2 cfDNS mintában. Az egyik variánsról a másikra való átváltás elfogadható a terápia után visszatérő metasztatikus tumorban, különösen a plazma cfDNS-ből származó egyező eredmények esetén, ahogyan azt az előző példában is láttuk. Az eltérő egymás utáni plazma eredmények visszatérése az eredeti variánshoz (némi eltéréssel) azonban váratlan és nehezen magyarázható

fejlemény, mely csak az egymás mellett létező szubklónok rendkívüli időbeli dinamikájával, a tumorsejtek aktivitásával, pusztulásával, a cfDNS vérplazmába való kikerülésével illetve stabilitásával magyarázható.

A részletesen kivizsgált és bemutatott három esetben a daganatos betegség lefolyása során új *KRAS* variánsok jelenhetnek meg és/vagy tűnhetnek el a vérből kimutatott genotípus alapján. Az 1. esetben a primer tumorból több mintát is szekvenáltunk, ami mélyebb betekintést engedett a szubklonális környezetbe. A 2. és 3. esetben a terápia előtt csak egy tumormintát vizsgáltunk, amely egyetlen *KRAS* variánst tartalmazott, majd a betegség során további variánsokat észleltünk. Eseteinkben a lefolyás során 2, 3 ill. 4 patogénként ismert *KRAS* variánst mutattunk ki a különböző mintákban egyéb eltérések mellett. A genetikai profilt erősen befolyásolhatja a tumor heterogenitása, progresszivitása és a terápiára adott válasz. A vérben észlelt negatív eredmény természetesen itt sem mérvadó, de a pozitív eredmény az adott variáns létezését és ezáltal a szubklónok sokaságát jelzi.

A mCRC-k esetében a tanulmányok gyakran a cfDNS-analízis választását támogatják diagnosztikai és monitorozási célokra [206], viszont a genetikai variabilitás kérdéséről sokkal kevesebb adat áll rendelkezésre. Furiki és munkatársai 22 beteg primer tumorainak, áttétes májtumorainak és liquid biopsziáinak gyűjtésével vizsgálták a mCRC-ben újonnan megjelenő mutáns géneket [140]. Arra a következtetésre jutottak, hogy a májmetasztázisokban részben olyan új mutációk vannak jelen, amelyek a primer tumorokban nem voltak azonosíthatóak. A liquid biopszia segítségével azonosították az összes mutáció jelenlétét az áttétes májtumorokban, függetlenül attól, hogy ezek a mutációk nem voltak kimutathatók az elsődleges tumorokban. Míg a primer és metasztázisok közötti egyezés aránya általában magas, a metasztázisokban az új eltérések megjelenésének a valószínűsége a becslések szerint 10% körüli [140,207,208]. Már egy limitált kiterjedésű génpanel alkalmazása is rávilágít arra, hogy az egyes biopsziák gyakran nem képesek azonosítani a daganatra jellemző összes klinikailag releváns prediktív jellemző jelenlétét. A cfDNS részletes szekvenálása az esetek 78%-ában további egyidejű rezisztencia mechanizmusok érintettségére utalt [209]. A cfDNS, amennyiben reprezentatív, összetett módon tükrözi a későbbi terápia tervezésében figyelembe vehető klinikailag releváns elváltozásokat. Klasszikus példaként az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztencia kialakulásának nyomon követése különösen hatékonyan bizonyult liquid biopsziával [19,209,210]. Hasonlóképpen, a műtétet és az első vonalbeli kezelést követő *KRAS* mutáns státusz LB-alapú megközelítése az anti-EGFR terápia alkalmazása mellett érvelhet [211]. Ezen túlmenően a közeljövőben a *KRAS* státusz pontos nyomon követésének követelményével a specifikus patogén *KRAS* változatokra irányuló biológiai terápiák bevezetésével számolhatunk. Összefoglalva, az LB-t klinikailag kifejezetten hasznos kiegészítőnek tekinthetjük a szöveti biopszia mellett, mely továbbra is gold standard a szolid tumorok diagnosztizálásában és prediktív vizsgálatában. Az LB másfajta információt eredményez, többek között betekintést nyújt a genetikailag heterogén agresszív folyamat dinamikájába. A perifériás vérbe kibocsátott cfDNS segítségével a tumor minden kompartmentjéhez

hozzáférhetünk, függetlenül azok térbeli és időbeli eloszlásától. Bár a tumorból származó cfDNS számos aspektusa még nem tisztázott, a technológia növekvő klinikai jelenlétével párhuzamosan egyre szélesebb körben elérhetővé válik. A bemutatott példák egy olyan korszak kezdetét mutatják, ahol az egyre hosszabb túlélésű szolid tumorok, így például az mCRC-k is, genetikai és funkcionális jellemzőit rendszeresen tudjuk követni a válasz megítélése és a kezelés optimalizálása érdekében.

A genomiális rendellenességek jelentősége és evolúciója a CRC kialakulásában és progressziójában egyaránt ahhoz a felismeréshez vezetett, hogy ideális esetben szükség van az elsődleges tumor(ok) és a metasztázisok sorozatos genotipizálására, ha valóban el akarjuk érni a személyre szabott ellátást. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre a ctDNA biomarkerként való alkalmazására a gyógyító céllal végzett rezekciót követő korai betegségek és minimális reziduális betegségek követésére, a relapszusok korábbi azonosítására, a kezelésre adott válasz értékelésére és a kialakulóban lévő gyógyszer rezisztencia mechanizmusok felderítésére [137].

7.3. KRAS státusz és hypoxiás adaptáció összefüggése

A rosszindulatú daganatok progressziója során a genomikai tényezőkön túl lokális változók, így a mikro környezet összetétele és a túlélést támogató jellege is fontos szerepet kapnak. Tanulmányunk ezért a környezeti adaptációs képességek és egyes genetikai eltérések összefüggéseire is irányulnak. A disszertációban részletezett vizsgálatunk a hypoxiás stresszhez kapcsolódó CAIX expresszió mértékére és dinamikájára összpontosít végbél adenocarcinómában, melyet IHC módszerrel határoztunk meg. Neoadjuvánsan kezelt és nem kezelt kontroll esetek diagnosztikus biopsziás és sebészi rezekciós mintáit hasonlítottuk össze a CAIX expressziójának tekintetében. A CAIX expresszió a várakozásoknak megfelelően a tumoros sejtek változó frakciójára korlátozódott, igen specifikus sejtmembrán-lokalizációban. A CAIX kiterjedése heterogén és egyéni volt, a tumorsejtekben 0-90% közötti széles skálán mozgott. A CAIX jellemzően a tumor necrotikus gócainak közelében mutatkozott, de necrosist nem mutató nagyobb, solid területek is gyakran megfigyelhetőek voltak. Ezenkívül mérsékelt dysplasiás területek is megkülönböztethetőek voltak a környező, ép mirigyhámhoz képest a fokozott CAIX expresszió tekintetében. Mindezek alapján a CAIX expresszió valójában tumorspecifikus jelenségnek bizonyult és megjelenése, a szakirodalomban olvasható megállapításokkal megegyezően, a vizsgált végbéltumoros mintákban is a sublethalis-lethalis hypoxiás daganatos területeket reprezentálta.

A CAIX jelölés intratumorális összetettsége miatt a vizsgált kohorszt CAIX alacsony és CAIX magas kategóriákba soroltuk a további elemzéshez. Vizsgálatunkban a CAIX expresszió nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a legtöbb hagyományos klinikai patológiai paraméterrel. Hasonló eredményeket publikáltak Korkeila és mtsai. akik 166 végbéldaganatos mintában vizsgálták a CAIX expresszióját. Kutatásukban a CAIX expressziós mintázata független volt a kiválasztott paraméterektől, például a daganat méretétől, nyirokcsomó státuszától vagy grádusától [167].

Kovacova és Hodorova szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a CAIX expresszió nem állt szignifikáns összefüggésben a nemmel, a tumor grádusával, a nyirokcsomó státusszal vagy a metasztázis jelenlétével/hiányával [187]. Tupa és mtsai. szintén nem észleltek szignifikáns különbséget a CAIX expresszió és a klinikai és morfológiai jellemzők között [212].

Jelenlegi elemzésünkben a CAIX expresszió dinamikájának összehasonlítására törekedtünk, bevonva a kezelés előtti, a kezelés utáni és a kezeletlen kontroll végbél adenocarcinomás mintákat. Feltételeztük, hogy a kemo-radioterápiához kapcsolódó stressz és perfúzió hiány hypoxiás károsodással és adaptív mechanizmusok indukciójával jár. Fontos megfigyelésként a CAIX szignifikáns növekedése volt kimutatható a neoadjuváns kemo-radioterápiát követően a műtéti rezekciós mintákban (NAT), míg ez nem volt nyilvánvaló a kezeletlen (UT) tumormintákban. A fellelhető egyetlen hasonló témájú közleményben Guedj és mtsai. arról számoltak be, hogy a CAIX expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelés előtti biopsziás mintákban [213]. Az általunk vizsgált mintákban a kemo-radioterápia helyi hatásai a standard szövettani vizsgálatok alapján egyértelműen láthatóak voltak, beleértve a tömeges szövetkárosodást követő szöveti remodellinget és a tumor necrozist. A maradék daganatos területek csökkent sejtproliferációs aktivitással (a Ki-67 jelölési index alapján meghatározva) rendelkeztek, ami a közvetlen citotoxikus hatással és a megfelelő szöveti perfúzió hiányával összefüggő regresszív jellegzetesség. Más szövettani változásokkal összhangban a CAIX expresszió fokozódása a hypoxia által vezérelt alkalmazkodásra utalhat, mely potenciálisan hozzájárul a korlátozott kezelési válaszhoz vezető rezisztencia mechanizmusokhoz.

Az agresszív daganatos viselkedés és a kezeléssel szembeni rezisztencia a driver mutációk megjelenésével jár együtt. Ebben a kohorszban értékelni tudtuk a CAIX expresszió és a *KRAS* mutációs státusz kapcsolatát, melyek között korreláció igazolódott. A *KRAS* mutáns végbél adenocarcinómák kezdetben és a neoadjuváns terápiát követően is szignifikánsan magasabb CAIX értékekkel rendelkeztek. Ez a megfigyelés független volt a kezelési státusztól. A mutáns *KRAS* által aktivált MAPK-út vonal szoros kölcsönhatásra utal a végbéltumoros sejtek anyagcseréjével és oxigénigényével kapcsolatban. Tanulmányunk elsőként hívja fel a figyelmet a CAIX és a mutáns *KRAS* kölcsönhatására végbél adenocarcinómában. Ezt a mechanizmust támasztja alá Swayampakula és mtsai. in vitro tanulmánya, akik a CAIX általi pH-szabályozást vizsgálták *KRAS* mutáns hasnyálmirigy ductus adenocarcinoma sejtekben [179]. A hypoxiára válaszul a *KRAS* mutáns hasnyálmirigy ductus adenocarcinoma sejtekben CAIX overexpresszió volt megfigyelhető a HIF1 α és HIF2 α stabilizációján keresztül, ami az intracelluláris pH és a glikolízis fenntartása érdekében kifejtett adaptív válaszként értelmezhető. Ezek az eredmények saját munkánkkal egybehangzóan azt sugallják, hogy a CAIX függő rezisztencia hátterében a *KRAS* mutáción keresztül kialakuló tumorsejt aktiváció áll.

A neoadjuváns terápia sikerének/hatásának széles körben használt szöveti jelzője a TRG, mely a kezelés utáni sebészeti mintákban vizsgálható [115,214]. A CAIX expresszió elemzése bemutatta, hogy a jelentős tumor regresszió hiánya (TRG 4-5) mind a kezelés előtti biopsziákban, mind a kezelés utáni

végbéltumoros mintákban meghatározott CAIX magas fenotípushoz társult. A CAIX-et expresszáló daganatos sejtek potenciálisan fokozott rezisztenciáját jelzi és a CAIX expresszió mértékének hasznosságát sugallja a kezelés utáni tumorok jellemzésére [215–217].

E sajátos összefüggések ellenére a CAIX valódi prognosztikai szerepe továbbra is kissé ellentmondásos. Vizsgálatunk nem tudta egyértelműen kimutatni a hosszú távú túlélési különbségeket a CAIX alacsony és a CAIX magas betegségcsoportok között, igaz, ebben jelentős akadályt jelentettek az alacsony esetszám és a CAIX pontosabb mennyiségi meghatározásának korlátai.

Korábbi közlemények eredményei szintén ellentmondásosak a CAIX prediktív jelentőségét illetően, ami elsősorban a cél meghatározás és a minta kohorszok összetettségével függhet össze. A fokozott CAIX expressziót rosszabb betegség specifikus túléléssel társították [152], azonban a negatív vagy gyenge CAIX expressziót mutató végbéltumoros esetekben szignifikánsan hosszabb volt a betegségmentes túlélés [187]. Kujik és mtsai. áttekintő tanulmányukban megállapították, hogy a magas CAIX expressziót mutató vastagbél carcinomás esetekben rövidebb a betegség- és progressziómentes túlélés [182]. Ezzel szemben 539 vastagbéltumoros esetben vizsgált CAIX expresszió elemzése nem eredményezett szignifikáns korrelációt a főbb klinikai paraméterek és a túlélés között [161]. Debucquoy és mtsai. eredményeik alapján szintén azt állítják, hogy a CAIX-nek nincs prognosztikai jelentősége [215]. Érdekes eredmény, hogy az irritábilis bél szindrómához társuló vastagbél carcinomában a CAIX overexpressziója volt látható a sporadikus vastagbéltumorokhoz képest, ami arra utal, hogy a CAIX által jelzett adaptációs mechanizmus a korai, daganat megelőző állapotokkal, illetőleg a daganat etiológiájával is összefügghet [216].

Az eltérések a populáció összetételének, a szövettani altípusoknak, az antitesteknek és kimutatási módszereknek, a különböző statisztikai elemzéseknek egyaránt köszönhetőek. A standardizálás ezen a téren is alapvető hiányosság az eredmények összehasonlítása tekintetében. Saját vizsgálatunk esetszáma is viszonylag alacsony, melyet azonban a kiértékelés során az általános paramétereken felül teljesebb körű analízis és dinamikus szemlélet hivatott kompenzálni. Meglátásunk szerint a CAIX viszonya a *KRAS* státuszhoz és a neoadjuváns kezelés sikeréhez klinikailag is releváns, de alig ismert összefüggés, ezért további tanulmányok folytatása e területen mindenképpen indokolt.

8. A tanulmány főbb megállapításai

- A vastagbélben megjelenő többszörös primer tumorok metasztatizáló képességei eltérnek. Vizsgált esetünkben egy tumorgóc szolgált az összes áttét forrásaként, hangsúlyozva az elsődleges tumor molekuláris biológiai jellemzőinek fontosságát.
- Az egy betegben előforduló multiplex primer vastagbél-daganatok és távoli áttétek vizsgálata során minden primer és áttétes gócot célszerű külön értékelni, mivel az egyes gócok egyedi genetikai profillal rendelkeznek. Az eltérő gócokat külön entitásnak lehet tekinteni és a gócok heterogenitásának megfelelően különálló kezelési lehetőséget kellene mérlegelni.
- Egyes szöveti biopsziák nem informatívak, vagy nem képesek azonosítani a klinikailag releváns genetikai változásokat, a rebiopszia viszont körülményes, nem is mindig kivitelezhető invazív mintavevő módszer. Ezért a liquid biopszia nyújtotta diagnosztikus lehetőség előnyös és egyre gyakrabban reális alternatíva.
- A liquid biopszia, vagyis a perifériás vérben található cfDNA elemzése, lehetővé teszi a daganatos betegség folyamatos genetikai monitorozását és a különböző prediktív génvariánsok azonosítását.
- A liquid biopszia különösen a metasztatikus CRC-k esetén nélkülözhetetlen az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztencia és különböző gyógyszerrezisztencia mechanizmusainak azonosításában, az időbeli heterogenitás nyomon követésében, ezáltal a személyre szabott terápia kiválasztásában
- A *KRAS* mutáns szubklónok megjelenése és eltűnése a vastagbél daganat lefolyása során a vártnál gyakrabban dinamikus eltéréseket mutat.
- Kezeletlen és neoadjuváns kezelésben részesült végbél tumorban a hypoxiás stressz hatására a CAIX kiemelkedően specifikus sejtmembrán-lokalizációt mutatott és heterogén formában volt jelen a tumoros sejtekben.
- A kezelés utáni szövetmintákban szignifikáns CAIX expresszió emelkedést tapasztaltunk, míg a nem kezelt mintákban eltérés nem volt jellemző.
- A terápia hatékonyságának vizsgálata során a kezelés előtti biopsziák értékelésénél a TRG2-3 esetek többsége a CAIX alacsony és fordítva, a TRG4-5 esetek többsége a CAIX magas fenotípushoz társult, ami a kezelés sikertelenségének fokozott lehetőségét jelezheti a kezdetben CAIX magas tumorok esetében. Ezzel szemben a CAIX expresszió a terápiát követően általában megnövekedettnek bizonyult, mely alapján korlátozott/a kezelésre nem reagáló (TRG4-5) tumorok CAIX magas fenotípust mutattak.
- A *KRAS* mutáció jelenléte magas CAIX expresszióval társult mind a kezelés előtt, mind a kezelés után. A CAIX által jelzett adaptációs mechanizmus valószínűleg kiemelt szerepet játszik a *KRAS* mutáns végbéltumoros sejtek anyagcseréjének és rezisztenciájának szabályozásában.

- A kezelés előtti mintákban a magas sejtproliferációs értékekhez alacsonyabb CAIX expresszió tartozott, míg a kezelés utáni mintákban a terápia által kiváltott hypoxiás stressz hatására a proliferációs aktivitás jelentős mértékben csökkent, a CAIX expressziója az eseteink túlnyomó többségében fokozódott.
- A CAIX potenciálisan hasznos lehet a kezelés utáni tumorok jellemzésére, de prediktív szerepe továbbra is vitatott marad CRC-ben.

9. Összefoglalás

Tanulmányunk első részében multiplex primer vastagbél-daganatot és távoli áttéteit vizsgáltunk egy azon esetben, hangsúlyozva annak szükségességét, hogy az áttétes elváltozásokat célszerű külön értékelni a hatékony kezelési döntés meghozatalában. A daganatok eltérő genetikai profilt mutattak, különböző *KRAS* és *TP53* variánsokkal, ami rávilágít egymástól független eredetükre. Figyelemre méltó, hogy egyetlen primer tumor (T3) szolgált az összes metasztázis forrásaként, hangsúlyozva az elsődleges tumor jellemzőinek nyomon követésének fontosságát. A tanulmány célzott génpanelt alkalmaz a genetikai elemzéshez, amely hatékonyan azonosítja a kulcsfontosságú mutációkat, köztük a *KRAS*-t és a *TP53*-at. Az eredmények kiemelik a molekuláris vizsgálatok értékét a terápiás döntések irányításában, különösen a többszörös primer tumorra rendelkező esetekben. Összességében kutatásunk ezen része kritikus betekintést nyújt a vastagbél-tumor genetikai heterogenitásába és rávilágít az egyes daganatok molekuláris profilján alapuló személyre szabott kezelési stratégiák szükségességére.

További vizsgálataink a progresszív vastagbél-daganat esetében a tumor genetikai változatosságára és a terápiás választ befolyásoló tényezőkre irányultak. A kutatás azt mutatta, hogy a CRC-ben az egyes tumor régiók eltérő mutációs profilokkal rendelkezhetnek és a terápiára adott választ alapvetően befolyásolhatja a genetikai heterogenitás. A liquid biopszia, vagyis a perifériás vérben található cfDNA elemzése, lehetővé teszi a folyamatos genetikai monitorozást és a különböző *KRAS* variánsok azonosítását. A tanulmány kiemeli, hogy az egyes biopsziák gyakran nem képesek azonosítani a klinikailag releváns genetikai változásokat, így a cfDNA elemzése kiegészítő és fontos lehet a terápia tervezésében. A kutatás azt is hangsúlyozza, hogy a tumor heterogenitása és fejlődése kulcsfontosságú tényező a genetikai profil alakulásában. Emellett a cfDNA elemzése segíthet az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztencia és a gyógyszerrezisztencia mechanizmusainak azonosításában. Tanulmány kiemeli a liquid biopszia potenciálját, mint kiegészítő eszközt a tumorok genetikai monitorozásában és a terápia személyre szabásában, különösen a metasztatikus vastagbél-tumor esetén.

Végül a szöveti hypoxia függő CAIX dinamikus expresszióját is vizsgáltuk végbél adenocarcinómában, különös tekintettel a patobiológiai változókra és a kezelés hatására. A CAIX jellegzetes és specifikus sejtmembrán-lokalizációt mutatott és változó arányban volt jelen a tumorsejtekben. A neoadjuváns kezelés utáni szövetmintákban szignifikáns CAIX emelkedést tapasztaltunk, míg a kezelésben nem részesült esetekben nem. A CAIX kifejeződése nem mutatott statisztikai korrelációt a hagyományos klinikai paraméterekkel. Ugyanakkor a mutáns *KRAS* jelenléte magas CAIX szinttel társult mind a kezelés előtt és után, ill. annak hiányában is. Következtetésünk szerint az aktiváló *KRAS* mutációk lényeges szerepet játszhatnak a végbél-tumorsejtek anyagcseréjének és rezisztenciájának szabályozásában. Az alacsony tumor regresszióval rendelkező betegek esetében a CAIX magas kifejeződése a kezelés utáni szövetmintákban is megfigyelhető volt. A CAIX potenciálisan

hasznos lehet a preoperatív kezelést túlélő tumorrészek jellemzésére, de prognosztikai szerepe továbbra is vitatott marad.

10. Summary

One major aim of our studies was to examine multiple primary colorectal tumors and distant metastases, emphasizing the need to evaluate metastatic lesions separately for treatment decisions. In a case study the synchronous tumors exhibited diverse genetic profiles, with different *KRAS* and *TP53* variants, highlighting their independent origins. Notably, one primary tumor (T3) served as the source for all metastases, emphasizing the importance of tracking primary tumor characteristics. The study employed a targeted gene panel for genetic analysis, which efficiently identified key mutations, including *KRAS* and *TP53*. The clinical significance of *TP53* IHC and sequencing for accurate characterization was stated. Overall, this research offers critical insights into the genetic heterogeneity of colorectal cancer and highlights the need for personalized treatment strategies based on the molecular profile of each tumor. In this study, the genetic diversity of progressive colorectal cancer (CRC) and factors influencing therapeutic response were examined.

The next part of the research demonstrated that within CRC, individual tumor regions can have distinct mutation profiles, moreover, therapeutic responses may fundamentally affect genetic heterogeneity. Liquid biopsy, or the analysis of cfDNA found in peripheral blood, allows for continuous genetic monitoring and identifies various *KRAS* variants among patients. Our study highlighted that individual biopsies often fail to identify clinically relevant genetic changes, making cfDNA analysis a supplementary and important tool in treatment planning. The research also emphasized that tumor heterogeneity and evolution are key factors in shaping the genetic profile. Furthermore, cfDNA analysis effectively identifies secondary resistance to anti-EGFR therapy and drug resistance mechanisms. The study underscores the potential of liquid biopsy as a supplementary tool in the genetic monitoring of tumors and personalizing therapy, particularly in diseases like metastatic CRC.

Finally, we investigated the dynamic expression of hypoxia-dependent CAIX in rectal adenocarcinoma, with a particular focus on hypoxic stress and its effect on treatment response. CAIX exhibited highly specific membrane localization and varied in its presence among cancer cells. Significant increases in CAIX were observed in tissue samples after treatment compared to untreated samples. The expression of CAIX did not show statistical correlations with traditional clinical parameters. However, the presence of activating *KRAS* mutations was associated with high CAIX levels both before and after treatment. Consequently, CAIX likely plays a role in regulating the metabolism and resistance of rectal cancer cells. Among patients with low tumor regression, high CAIX expression was observed in post-treatment tissue samples. CAIX has the potential to be useful in characterizing post-treatment tumors, but its prognostic role remains a subject of further studies. This summary highlights the role of CAIX and its relationship with hypoxic stress and treatment effects in rectal adenocarcinoma, providing valuable insights into treatment efficacy and prognosis.

Irodalomjegyzék

1. Cancer Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 29 June 2023).
2. Cancer Today Available online: <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed on 29 June 2023).
3. Hossain, M.S.; Karuniawati, H.; Jairoun, A.A.; Urbi, Z.; Ooi, D.J.; John, A.; Lim, Y.C.; Kibria, K.M.K.; Mohiuddin, A.K.M.; Ming, L.C.; et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* **2022**, *14*, 1732, doi:10.3390/cancers14071732.
4. Treatment of Colorectal Cancer in Older Patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) Consensus Recommendations 2013 - ScienceDirect Available online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419314115?via%3Dihub> (accessed on 29 June 2023).
5. Edwards, B.K.; Ward, E.; Kohler, B.A.; Ehemann, C.; Zauber, A.G.; Anderson, R.N.; Jemal, A.; Schymura, M.J.; Lansdorp-Vogelaar, I.; Seeff, L.C.; et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2006, Featuring Colorectal Trends and Impact of Interventions (Risk Factors, Screening, and Treatment) to Reduce Future Rates. *Cancer* **2010**, *116*, 544–573, doi:10.1002/cncr.24760.
6. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61*, 759–767, doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I.
7. Kuipers, E.J.; Grady, W.M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T.; Sung, J.J.; Boelens, P.G.; van de Velde, C.J.H.; Watanabe, T. COLORECTAL CANCER. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15065, doi:10.1038/nrdp.2015.65.
8. Afrăsânie, V.-A.; Marinca, M.V.; Alexa-Stratulat, T.; Gafton, B.; Păduraru, M.; Adavidoaiei, A.M.; Miron, L.; Rusu, C. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and Microsatellite Instability in Metastatic Colorectal Cancer – Practical Implications for the Clinician. *Radiol Oncol* **2019**, *53*, 265–274, doi:10.2478/raon-2019-0033.
9. Sokolenko, A.P.; Imyanitov, E.N. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2018**, *5*.
10. Coons, A.H.; Kaplan, M.H. LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS. *J Exp Med* **1950**, *91*, 1–13.
11. Coombes, R.C.; Berger, U.; McClelland, R.; Trott, P.; Powles, T.; Wilson, P.; Gazet, J.-C.; Ford, H. PREDICTION OF ENDOCRINE RESPONSE IN BREAST CANCER BY IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF OESTROGEN RECEPTOR IN FINE-NEEDLE ASPIRATES. *The Lancet* **1987**, *330*, 701–703, doi:10.1016/S0140-6736(87)91071-3.
12. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, *74*, 5463–5467, doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
13. Meyerson, M.; Gabriel, S.; Getz, G. Advances in Understanding Cancer Genomes through Second-Generation Sequencing. *Nat Rev Genet* **2010**, *11*, 685–696, doi:10.1038/nrg2841.
14. Schadt, E.E.; Turner, S.; Kasarskis, A. A Window into Third-Generation Sequencing. *Human Molecular Genetics* **2010**, *19*, R227–R240, doi:10.1093/hmg/ddq416.
15. De Cario, R.; Kura, A.; Suraci, S.; Magi, A.; Volta, A.; Marcucci, R.; Gori, A.M.; Pepe, G.; Giusti, B.; Sticchi, E. Sanger Validation of High-Throughput Sequencing in Genetic Diagnosis: Still the Best Practice? *Frontiers in Genetics* **2020**, *11*.
16. Murdande, S.S. Role of Rat Sarcoma Virus Mutations in Cancer and Potential Target for Cancer Therapy. *Future Sci OA* **6**, FSO455, doi:10.2144/foa-2019-0045.
17. Osumi, H.; Shinozaki, E.; Yamaguchi, K. Circulating Tumor DNA as a Novel Biomarker Optimizing Chemotherapy for Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12061566.
18. Lone, S.N.; Nisar, S.; Masoodi, T.; Singh, M.; Rizwan, A.; Hashem, S.; El-Rifai, W.; Bedognetti, D.; Batra, S.K.; Haris, M.; et al. Liquid Biopsy: A Step Closer to Transform Diagnosis, Prognosis and Future of Cancer Treatments. *Molecular Cancer* **2022**, *21*, 79, doi:10.1186/s12943-022-01543-7.
19. Cao, H.; Liu, X.; Chen, Y.; Yang, P.; Huang, T.; Song, L.; Xu, R. Circulating Tumor DNA Is Capable of Monitoring the Therapeutic Response and Resistance in Advanced Colorectal Cancer Patients

- Undergoing Combined Target and Chemotherapy. *Front Oncol* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.00466.
20. Warthin, A.S. Classicin Oncology: Heredity with Reference to Carcinoma as Shown by the Study of the Cases Examined in the Pathological Laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **1985**, *35*, 348–359, doi:10.3322/canjclin.35.6.348.
 21. Schluskel, A.T.; Ronald A. Gagliano, J.; Seto-Donlon, S.; Eggerding, F.; Donlon, T.; Berenberg, J.; Lynch, H.T. The Evolution of Colorectal Cancer Genetics—Part 1: From Discovery to Practice. *Journal of Gastrointestinal Oncology* **2014**, *5*, 326, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2014.069.
 22. Rajasekharan, S.; Raman, T. Ras and Ras Mutations in Cancer. *Open Life Sciences* **2013**, *8*, 609–624, doi:10.2478/s11535-013-0158-5.
 23. Cox, A.D.; Der, C.J. Ras History. *Small GTPases* **2010**, *1*, 2–27, doi:10.4161/sgtp.1.1.12178.
 24. Rejali, L.; Seifollahi Asl, R.; Sanjabi, F.; Fatemi, N.; Asadzadeh Aghdaei, H.; Saeedi Niasar, M.; Ketabi Moghadam, P.; Nazemalhosseini Mojarad, E.; Mini, E.; Nobili, S. Principles of Molecular Utility for CMS Classification in Colorectal Cancer Management. *Cancers* **2023**, *15*, 2746, doi:10.3390/cancers15102746.
 25. Stintzing, S.; Wirapati, P.; Lenz, H.-J.; Neureiter, D.; Fischer von Weikersthal, L.; Decker, T.; Kiani, A.; Kaiser, F.; Al-Batran, S.; Heintges, T.; et al. Consensus Molecular Subgroups (CMS) of Colorectal Cancer (CRC) and First-Line Efficacy of FOLFIRI plus Cetuximab or Bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) Trial. *Annals of Oncology* **2019**, *30*, 1796–1803, doi:10.1093/annonc/mdz387.
 26. Valenzuela, G.; Canepa, J.; Simonetti, C.; Solo de Zaldívar, L.; Marcelain, K.; González-Montero, J. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer in Clinical Practice: A Translational Approach. *World J Clin Oncol* **2021**, *12*, 1000–1008, doi:10.5306/wjco.v12.i11.1000.
 27. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reyniès, A.; Schlicker, A.; Soneson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat Med* **2015**, *21*, 1350–1356, doi:10.1038/nm.3967.
 28. Inamura, K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers* **2018**, *10*, 26, doi:10.3390/cancers10010026.
 29. Blank, A.; Roberts, D.E.; Dawson, H.; Zlobec, I.; Lugli, A. Tumor Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree? *Front Med (Lausanne)* **2018**, *5*, doi:10.3389/fmed.2018.00234.
 30. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Med Sci (Basel)* **2018**, *6*, 31, doi:10.3390/medsci6020031.
 31. Migheli, F.; Migliore, L. Epigenetics of Colorectal Cancer. *Clinical Genetics* **2012**, *81*, 312–318, doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01829.x.
 32. Jung, G.; Hernández-Illán, E.; Moreira, L.; Balaguer, F.; Goel, A. Epigenetics of Colorectal Cancer: Biomarker and Therapeutic Potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**, *17*, 111–130, doi:10.1038/s41575-019-0230-y.
 33. Armaghany, T.; Wilson, J.D.; Chu, Q.; Mills, G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* **2012**, *5*, 19–27.
 34. Kasi, A.; Handa, S.; Bhatti, S.; Umar, S.; Bansal, A.; Sun, W. Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep* **2020**, *16*, 97–106, doi:10.1007/s11888-020-00458-z.
 35. Ucar, G.; Ergun, Y.; Aktürk Esen, S.; Acikgoz, Y.; Dirikoc, M.; Esen, İ.; Bal, Ö.; Uncu, D. Prognostic and Predictive Value of KRAS Mutation Number in Metastatic Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)* **2020**, *99*, e22407, doi:10.1097/MD.00000000000022407.
 36. Lipsyc, M.; Yaeger, R. Impact of Somatic Mutations on Patterns of Metastasis in Colorectal Cancer. *J Gastrointest Oncol* **2015**, *6*, 645–649, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.045.
 37. Grolleman, J.E.; Díaz-Gay, M.; Franch-Expósito, S.; Castellví-Bel, S.; de Voer, R.M. Somatic Mutational Signatures in Polyposis and Colorectal Cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **2019**, *69*, 62–72, doi:10.1016/j.mam.2019.05.002.
 38. Bhullar, D.S.; Barriuso, J.; Mullaitha, S.; Saunders, M.P.; O'Dwyer, S.T.; Aziz, O. Biomarker Concordance between Primary Colorectal Cancer and Its Metastases. *EBioMedicine* **2019**, *40*, 363–374, doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.050.

39. Mao, C.; Wu, X.-Y.; Yang, Z.-Y.; Threapleton, D.E.; Yuan, J.-Q.; Yu, Y.-Y.; Tang, J.-L. Concordant Analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA Mutations, and PTEN Expression between Primary Colorectal Cancer and Matched Metastases. *Sci Rep* **2015**, *5*, 8065, doi:10.1038/srep08065.
40. Zeitouni, D.; Pylayeva-Gupta, Y.; Der, C.J.; Bryant, K.L. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers (Basel)* **2016**, *8*, 45, doi:10.3390/cancers8040045.
41. Pappou, E.P.; Ahuja, N. The Role of Oncogenes in Gastrointestinal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* **2010**, S2–S15.
42. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences* **2018**, *6*, 31, doi:10.3390/medsci6020031.
43. Roberts, P.J.; Der, C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 3291–3310, doi:10.1038/sj.onc.1210422.
44. Hussain, M.R.M.; Baig, M.; Mohamoud, H.S.A.; Ulhaq, Z.; Hoessli, D.C.; Khogeer, G.S.; Al-Sayed, R.R.; Al-Aama, J.Y. BRAF Gene: From Human Cancers to Developmental Syndromes. *Saudi J Biol Sci* **2015**, *22*, 359–373, doi:10.1016/j.sjbs.2014.10.002.
45. Sakamoto, N.; Feng, Y.; Stolfi, C.; Kurosu, Y.; Green, M.; Lin, J.; Green, M.E.; Sentani, K.; Yasui, W.; McMahon, M.; et al. BRAFV600E Cooperates with CDX2 Inactivation to Promote Serrated Colorectal Tumorigenesis. *eLife* **6**, e20331, doi:10.7554/eLife.20331.
46. Safaee Ardekani, G.; Jafarnejad, S.M.; Tan, L.; Saeedi, A.; Li, G. The Prognostic Value of BRAF Mutation in Colorectal Cancer and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2012**, *7*, e47054, doi:10.1371/journal.pone.0047054.
47. De Palma, F.D.E.; D'Argenio, V.; Pol, J.; Kroemer, G.; Maiuri, M.C.; Salvatore, F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 1017, doi:10.3390/cancers11071017.
48. Nakanishi, Y.; Diaz-Meco, M.T.; Moscat, J. Serrated Colorectal Cancer: The Road Less Travelled? *Trends in Cancer* **2019**, *5*, 742–754, doi:10.1016/j.trecan.2019.09.004.
49. Murcia, O.; Juárez, M.; Hernández-Illán, E.; Egoavil, C.; Giner-Calabuig, M.; Rodríguez-Soler, M.; Jover, R. Serrated Colorectal Cancer: Molecular Classification, Prognosis, and Response to Chemotherapy. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 3516–3530, doi:10.3748/wjg.v22.i13.3516.
50. Mohammadi, M.; Kristensen, M.H.; Nielsen, H.J.; Bonde, J.H.; Holck, S. Qualities of Sessile Serrated Adenoma/Polyp/Lesion and Its Borderline Variant in the Context of Synchronous Colorectal Carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* **2012**, *65*, 924–927, doi:10.1136/jclinpath-2012-200803.
51. Pabla, B.; Bissonnette, M.; Konda, V.J. Colon Cancer and the Epidermal Growth Factor Receptor: Current Treatment Paradigms, the Importance of Diet, and the Role of Chemoprevention. *World J Clin Oncol* **2015**, *6*, 133–141, doi:10.5306/wjco.v6.i5.133.
52. Sorich, M.J.; Wiese, M.D.; Rowland, A.; Kichenadasse, G.; McKinnon, R.A.; Karapetis, C.S. Extended RAS Mutations and Anti-EGFR Monoclonal Antibody Survival Benefit in Metastatic Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Ann Oncol* **2015**, *26*, 13–21, doi:10.1093/annonc/mdu378.
53. Muhammad, S.; Jiang, Z.; Liu, Z.; Kaur, K.; Wang, X. The Role of EGFR Monoclonal Antibodies (MoABs) Cetuximab/Panitumab, and BRAF Inhibitors in BRAF Mutated Colorectal Cancer. *J Gastrointest Oncol* **2013**, *4*, 72–81, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.044.
54. Iqbal, N.; Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int* **2014**, *2014*, 852748, doi:10.1155/2014/852748.
55. Ivanova, M.; Venetis, K.; Guerini-Rocco, E.; Bottiglieri, L.; Mastropasqua, M.G.; Garrone, O.; Fusco, N.; Ghidini, M. HER2 in Metastatic Colorectal Cancer: Pathology, Somatic Alterations, and Perspectives for Novel Therapeutic Schemes. *Life (Basel)* **2022**, *12*, 1403, doi:10.3390/life12091403.
56. Schuell, B.; Gruenberger, T.; Scheithauer, W.; Zielinski, C.; Wrba, F. HER 2/Neu Protein Expression in Colorectal Cancer. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 123, doi:10.1186/1471-2407-6-123.
57. Siena, S.; Sartore-Bianchi, A.; Marsoni, S.; Hurwitz, H.I.; McCall, S.J.; Penault-Llorca, F.; Srock, S.; Bardelli, A.; Trusolino, L. Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Oncogene in Colorectal Cancer. *Ann Oncol* **2018**, *29*, 1108–1119, doi:10.1093/annonc/mdy100.

58. Suwaidan, A.A.; Lau, D.K.; Chau, I. HER2 Targeted Therapy in Colorectal Cancer: New Horizons. *Cancer Treatment Reviews* **2022**, *105*, 102363, doi:10.1016/j.ctrv.2022.102363.
59. Seo, A.N.; Kwak, Y.; Kim, D.-W.; Kang, S.-B.; Choe, G.; Kim, W.H.; Lee, H.S. HER2 Status in Colorectal Cancer: Its Clinical Significance and the Relationship between HER2 Gene Amplification and Expression. *PLoS One* **2014**, *9*, e98528, doi:10.1371/journal.pone.0098528.
60. Liebl, M.C.; Hofmann, T.G. The Role of P53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 2125, doi:10.3390/cancers13092125.
61. Iacopetta, B. TP53 Mutation in Colorectal Cancer. *Human Mutation* **2003**, *21*, 271–276, doi:10.1002/humu.10175.
62. Nakayama, M.; Oshima, M. Mutant P53 in Colon Cancer. *J Mol Cell Biol* **2018**, *11*, 267–276, doi:10.1093/jmcb/mjy075.
63. Nikolaev, S.I.; Sotiriou, S.K.; Pateras, I.S.; Santoni, F.; Sougioultzis, S.; Edgren, H.; Almusa, H.; Robyr, D.; Guipponi, M.; Saarela, J.; et al. A Single-Nucleotide Substitution Mutator Phenotype Revealed by Exome Sequencing of Human Colon Adenomas. *Cancer Research* **2012**, *72*, 6279–6289, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3869.
64. Schwitalla, S.; Ziegler, P.K.; Horst, D.; Becker, V.; Kerle, I.; Begus-Nahrman, Y.; Lechel, A.; Rudolph, K.L.; Langer, R.; Slotta-Huspenina, J.; et al. Loss of P53 in Enterocytes Generates an Inflammatory Microenvironment Enabling Invasion and Lymph Node Metastasis of Carcinogen-Induced Colorectal Tumors. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 93–106, doi:10.1016/j.ccr.2012.11.014.
65. Koveitypour, Z.; Panahi, F.; Vakilian, M.; Peymani, M.; Seyed Forootan, F.; Nasr Esfahani, M.H.; Ghaedi, K. Signaling Pathways Involved in Colorectal Cancer Progression. *Cell & Bioscience* **2019**, *9*, 97, doi:10.1186/s13578-019-0361-4.
66. Fang, J.Y.; Richardson, B.C. The MAPK Signalling Pathways and Colorectal Cancer. *Lancet Oncol* **2005**, *6*, 322–327, doi:10.1016/S1470-2045(05)70168-6.
67. Cargnello, M.; Roux, P.P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **2011**, *75*, 50–83, doi:10.1128/MMBR.00031-10.
68. Johnson, D.S.; Chen, Y.H. Ras Family of Small GTPases In Immunity And Inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **2012**, *12*, 458–463, doi:10.1016/j.coph.2012.02.003.
69. Vo, U.; Vajpai, N.; Flavell, L.; Bobby, R.; Breeze, A.L.; Embrey, K.J.; Golovanov, A.P. Monitoring Ras Interactions with the Nucleotide Exchange Factor Son of Sevenless (Sos) Using Site-Specific NMR Reporter Signals and Intrinsic Fluorescence. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 1703–1718, doi:10.1074/jbc.M115.691238.
70. Braicu, C.; Buse, M.; Busuioc, C.; Drula, R.; Gulei, D.; Raduly, L.; Rusu, A.; Irimie, A.; Atanasov, A.G.; Slaby, O.; et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1618, doi:10.3390/cancers11101618.
71. Stratton, M.R.; Campbell, P.J.; Futreal, P.A. The Cancer Genome. *Nature* **2009**, *458*, 719–724, doi:10.1038/nature07943.
72. Stratton, M.R. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. *Science* **2011**, *331*, 1553–1558, doi:10.1126/science.1204040.
73. Alexandrov, L.B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D.C.; Aparicio, S.A.J.R.; Behjati, S.; Biankin, A.V.; Bignell, G.R.; Bolli, N.; Borg, A.; Børresen-Dale, A.-L.; et al. Signatures of Mutational Processes in Human Cancer. *Nature* **2013**, *500*, 415–421, doi:10.1038/nature12477.
74. Maffeis, V.; Nicolè, L.; Cappellesso, R. RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, doi:10.3389/fonc.2019.01255.
75. Hendricks, A.; Rosenstiel, P.; Hinz, S.; Burmeister, G.; Röcken, C.; Boersch, K.; Schafmayer, C.; Becker, T.; Franke, A.; Forster, M. Rapid Response of Stage IV Colorectal Cancer with APC/TP53/KRAS Mutations to FOLFIRI and Bevacizumab Combination Chemotherapy: A Case Report of Use of Liquid Biopsy. *BMC Medical Genetics* **2020**, *21*, 3, doi:10.1186/s12881-019-0941-5.
76. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* **2012**, *487*, 330–337, doi:10.1038/nature11252.
77. Loupakis, F.; Ruzzo, A.; Cremolini, C.; Vincenzi, B.; Salvatore, L.; Santini, D.; Masi, G.; Stasi, I.; Canestrari, E.; Rulli, E.; et al. KRAS Codon 61, 146 and BRAF Mutations Predict Resistance to

- Cetuximab plus Irinotecan in KRAS Codon 12 and 13 Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Br J Cancer* **2009**, *101*, 715–721, doi:10.1038/sj.bjc.6605177.
78. Hurwitz, H.I.; Tebbutt, N.C.; Kabbinavar, F.; Giantonio, B.J.; Guan, Z.-Z.; Mitchell, L.; Waterkamp, D.; Taberero, J. Efficacy and Safety of Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer: Pooled Analysis from Seven Randomized Controlled Trials. *Oncologist* **2013**, *18*, 1004–1012, doi:10.1634/theoncologist.2013-0107.
 79. Zhou, M.; Yu, P.; Qu, J.; Chen, Y.; Zhou, Y.; Fu, L.; Zhang, J. Efficacy of Bevacizumab in the First-Line Treatment of Patients with RAS Mutations Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* **2016**, *40*, 361–369, doi:10.1159/000452551.
 80. Peeters, M.; Oliner, K.S.; Price, T.J.; Cervantes, A.; Sobrero, A.F.; Ducreux, M.; Hotko, Y.; André, T.; Chan, E.; Lordick, F.; et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 5469–5479, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0526.
 81. Maughan, T.S.; Adams, R.A.; Smith, C.G.; Meade, A.M.; Seymour, M.T.; Wilson, R.H.; Idziaszczyk, S.; Harris, R.; Fisher, D.; Kenny, S.L.; et al. Addition of Cetuximab to Oxaliplatin-Based First-Line Combination Chemotherapy for Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Results of the Randomised Phase 3 MRC COIN Trial. *Lancet* **2011**, *377*, 2103–2114, doi:10.1016/S0140-6736(11)60613-2.
 82. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954, doi:10.1038/nature00766.
 83. Tran, N.H.; Cavalcante, L.L.; Lubner, S.J.; Mulkerin, D.L.; LoConte, N.K.; Clipson, L.; Matkowskyj, K.A.; Deming, D.A. Precision Medicine in Colorectal Cancer: The Molecular Profile Alters Treatment Strategies. *Ther Adv Med Oncol* **2015**, *7*, 252–262, doi:10.1177/1758834015591952.
 84. Tariq, K.; Ghias, K. Colorectal Cancer Carcinogenesis: A Review of Mechanisms. *Cancer Biol Med* **2016**, *13*, 120–135, doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103.
 85. Grady, W.M.; Markowitz, S.D. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Dig Dis Sci* **2015**, *60*, 762–772, doi:10.1007/s10620-014-3444-4.
 86. Chan, D.K.H.; Buczacki, S.J.A. Tumour Heterogeneity and Evolutionary Dynamics in Colorectal Cancer. *Oncogenesis* **2021**, *10*, 1–9, doi:10.1038/s41389-021-00342-x.
 87. Al-Joufi, F.A.; Setia, A.; Salem-Bekhit, M.M.; Sahu, R.K.; Alqahtani, F.Y.; Widyowati, R.; Aleanizy, F.S. Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer with an Emphasis on Recent Advances in Biomarkers, as Well as Nanotechnology-Based Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 169, doi:10.3390/nano12010169.
 88. Mojarad, E.N.; Kuppen, P.J.; Aghdaei, H.A.; Zali, M.R. The CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* **2013**, *6*, 120–128.
 89. Ogino, S.; Goel, A. Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *J Mol Diagn* **2008**, *10*, 13–27, doi:10.2353/jmoldx.2008.070082.
 90. Zhang, X.; Zhang, W.; Cao, P. Advances in CpG Island Methylator Phenotype Colorectal Cancer Therapies. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*.
 91. Vilar, E.; Gruber, S.B. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer—the Stable Evidence. *Nat Rev Clin Oncol* **2010**, *7*, 153–162, doi:10.1038/nrclinonc.2009.237.
 92. Pećina-Šlaus, N.; Kafka, A.; Salamon, I.; Bukovac, A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2020**, *7*.
 93. Bateman, A.C. DNA Mismatch Repair Proteins: Scientific Update and Practical Guide. *Journal of Clinical Pathology* **2021**, *74*, 264–268, doi:10.1136/jclinpath-2020-207281.
 94. Zeinalian, M.; Hashemzadeh-Chaleshtori, M.; Salehi, R.; Emami, M.H. Clinical Aspects of Microsatellite Instability Testing in Colorectal Cancer. *Adv Biomed Res* **2018**, *7*, 28, doi:10.4103/abr.abr_185_16.
 95. Colorectal Cancer Statistics. *WCRF International*.
 96. Colorectal Cancer Awareness Month 2022 – IARC Available online: <https://www.iarc.who.int/featured-news/colorectal-cancer-awareness-month-2022/> (accessed on 8 April 2023).

97. Holtedahl, K.; Borgquist, L.; Donker, G.A.; Buntinx, F.; Weller, D.; Campbell, C.; Månsson, J.; Hammersley, V.; Braaten, T.; Parajuli, R. Symptoms and Signs of Colorectal Cancer, with Differences between Proximal and Distal Colon Cancer: A Prospective Cohort Study of Diagnostic Accuracy in Primary Care. *BMC Family Practice* **2021**, *22*, 148, doi:10.1186/s12875-021-01452-6.
98. Ballinger, A.B.; Anggiansah, C. Colorectal Cancer. *BMJ* **2007**, *335*, 715–718, doi:10.1136/bmj.39321.527384.BE.
99. Rasmussen, S.; Larsen, P.V.; Søndergaard, J.; Elnegaard, S.; Svendsen, R.P.; Jarbøl, D.E. Specific and Non-Specific Symptoms of Colorectal Cancer and Contact to General Practice. *Family Practice* **2015**, *32*, 387–394, doi:10.1093/fampra/cmz032.
100. Bretthauer, M.; Kalager, M. Colonoscopy as a Triage Screening Test. *N Engl J Med* **2012**, *366*, 759–760, doi:10.1056/NEJMe1114639.
101. Hall, J.F. Management of Malignant Adenomas. *Clin Colon Rectal Surg* **2015**, *28*, 215–219, doi:10.1055/s-0035-1564434.
102. Massachusetts, M.S., PharmD, BCOP Associate Professor of Pharmacy Practice Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences Worcester Colorectal Cancer Screening Guidelines Update Available online: <https://www.uspharmacist.com/article/colorectal-cancer-screening-guidelines-update> (accessed on 2 July 2023).
103. Ramón y Cajal, S.; Sesé, M.; Capdevila, C.; Aasen, T.; De Mattos-Arruda, L.; Diaz-Cano, S.J.; Hernández-Losa, J.; Castellví, J. Clinical Implications of Intratumor Heterogeneity: Challenges and Opportunities. *J Mol Med (Berl)* **2020**, *98*, 161–177, doi:10.1007/s00109-020-01874-2.
104. Raimondi, C.; Nicolazzo, C.; Belardinilli, F.; Loreni, F.; Gradilone, A.; Mahdavian, Y.; Gelibter, A.; Giannini, G.; Cortesi, E.; Gazzaniga, P. Transient Disappearance of RAS Mutant Clones in Plasma: A Counterintuitive Clinical Use of EGFR Inhibitors in RAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11010042.
105. Molinari, C.; Marisi, G.; Passardi, A.; Matteucci, L.; De Maio, G.; Ulivi, P. Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19123733.
106. Barranha, R.; Costa, J.L.; Carneiro, F.; Machado, J.C. Genetic Heterogeneity in Colorectal Cancer and Its Clinical Implications. *Acta Médica Portuguesa* **2015**, *28*, 370–375, doi:10.20344/amp.5398.
107. Young, S.; Golzarian, J. Primary Tumor Location in Colorectal Cancer: Comparison of Right- and Left-Sided Colorectal Cancer Characteristics for the Interventional Radiologist. *Cardiovasc Intervent Radiol* **2018**, *41*, 1819–1825, doi:10.1007/s00270-018-2014-0.
108. Luisetto, M.; Ahmadabadi, B.N.; Nili-Ahmadabadi, H.; Rafa, A.Y.; Hamid, G.A.; Mashori, G.R.; Cabianca, L.; Latyshev, O.Y. Comparison of Risk Factors and Molecular Analysis of Right-Sided Colon and Left Sided Colon Cancer. *ACRCI* **2019**, *2*, 1–27.
109. Lee, M.S.; Menter, D.G.; Kopetz, S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **2017**, *15*, 411–419, doi:10.6004/jnccn.2017.0038.
110. Baran, B.; Mert Ozupek, N.; Yerli Tetik, N.; Acar, E.; Bekcioglu, O.; Baskin, Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res* **2018**, *11*, 264–273, doi:10.14740/gr1062w.
111. Missiaglia, E.; Jacobs, B.; D’Ario, G.; Di Narzo, A.F.; Sonesson, C.; Budinska, E.; Popovici, V.; Vecchione, L.; Gerster, S.; Yan, P.; et al. Distal and Proximal Colon Cancers Differ in Terms of Molecular, Pathological, and Clinical Features. *Ann Oncol* **2014**, *25*, 1995–2001, doi:10.1093/annonc/mdu275.
112. Katsaounou, K.; Nicolaou, E.; Vogazianos, P.; Brown, C.; Stavrou, M.; Teloni, S.; Hatzis, P.; Agapiou, A.; Fragkou, E.; Tsiaoussis, G.; et al. Colon Cancer: From Epidemiology to Prevention. *Metabolites* **2022**, *12*, 499, doi:10.3390/metabo12060499.
113. Ciardiello, F.; Ciardiello, D.; Martini, G.; Napolitano, S.; Tabernero, J.; Cervantes, A. Clinical Management of Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Precision Medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2022**, *72*, 372–401, doi:10.3322/caac.21728.
114. Song, C.; Chung, J.-H.; Kang, S.-B.; Kim, D.-W.; Oh, H.-K.; Lee, H.S.; Kim, J.W.; Lee, K.-W.; Kim, J.H.; Kim, J.-S. Impact of Tumor Regression Grade as a Major Prognostic Factor in Locally Advanced

- Rectal Cancer after Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Proposal for a Modified Staging System. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 319, doi:10.3390/cancers10090319.
115. Kim, S.H.; Chang, H.J.; Kim, D.Y.; Park, J.W.; Baek, J.Y.; Kim, S.Y.; Park, S.C.; Oh, J.H.; Yu, A.; Nam, B.-H. What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy? *Cancer Res Treat* **2016**, *48*, 998–1009, doi:10.4143/crt.2015.254.
 116. Parsons, B.L. Multiclonal Tumor Origin: Evidence and Implications. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2018**, *777*, 1–18, doi:10.1016/j.mrrev.2018.05.001.
 117. Gillies, R.J.; Verduzco, D.; Gatenby, R.A. Evolutionary Dynamics of Carcinogenesis and Why Targeted Therapy Does Not Work. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 487–493, doi:10.1038/nrc3298.
 118. Venesio, T.; Siravegna, G.; Bardelli, A.; Sapino, A. Liquid Biopsies for Monitoring Temporal Genomic Heterogeneity in Breast and Colon Cancers. *Pathobiology* **2018**, *85*, 146–154, doi:10.1159/000473882.
 119. Russano, M.; Napolitano, A.; Ribelli, G.; Iuliani, M.; Simonetti, S.; Citarella, F.; Pantano, F.; Dell’Aquila, E.; Anesi, C.; Silvestris, N.; et al. Liquid Biopsy and Tumor Heterogeneity in Metastatic Solid Tumors: The Potentiality of Blood Samples. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2020**, *39*, 95, doi:10.1186/s13046-020-01601-2.
 120. Yang, M.; Forbes, M.E.; Bitting, R.L.; O’Neill, S.S.; Chou, P.-C.; Topaloglu, U.; Miller, L.D.; Hawkins, G.A.; Grant, S.C.; DeYoung, B.R.; et al. Incorporating Blood-Based Liquid Biopsy Information into Cancer Staging: Time for a TNMB System? *Ann Oncol* **2018**, *29*, 311–323, doi:10.1093/annonc/mdx766.
 121. Volik, S.; Alcaide, M.; Morin, R.D.; Collins, C. Cell-Free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Molecular Cancer Research* **2016**, *14*, 898–908, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0044.
 122. Tan, E.M.; Schur, P.H.; Carr, R.I.; Kunkel, H.G. Deoxybonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Invest* **1966**, *45*, 1732–1740, doi:10.1172/JCI105479.
 123. Leon, S.A.; Shapiro, B.; Sklaroff, D.M.; Yaros, M.J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res* **1977**, *37*, 646–650.
 124. Vasioukhin, V.; Anker, P.; Maurice, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Stroun, M. Point Mutations of the N-Ras Gene in the Blood Plasma DNA of Patients with Myelodysplastic Syndrome or Acute Myelogenous Leukaemia. *Br J Haematol* **1994**, *86*, 774–779, doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x.
 125. Sorenson, G.D.; Pribish, D.M.; Valone, F.H.; Memoli, V.A.; Bzik, D.J.; Yao, S.L. Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1994**, *3*, 67–71.
 126. Lo, Y.M.D.; Corbetta, N.; Chamberlain, P.F.; Rai, V.; Sargent, I.L.; Redman, C.W.; Wainscoat, J.S. Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum. *The Lancet* **1997**, *350*, 485–487, doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
 127. Fujiwara, K.; Fujimoto, N.; Tabata, M.; Nishii, K.; Matsuo, K.; Hotta, K.; Kozuki, T.; Aoe, M.; Kiura, K.; Ueoka, H.; et al. Identification of Epigenetic Aberrant Promoter Methylation in Serum DNA Is Useful for Early Detection of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 1219–1225.
 128. Wang, J.-Y.; Hsieh, J.-S.; Chang, M.-Y.; Huang, T.-J.; Chen, F.-M.; Cheng, T.-L.; Alexandersen, K.; Huang, Y.-S.; Tzou, W.-S.; Lin, S.-R. Molecular Detection of APC, K- Ras, and P53 Mutations in the Serum of Colorectal Cancer Patients as Circulating Biomarkers. *World J Surg* **2004**, *28*, 721–726, doi:10.1007/s00268-004-7366-8.
 129. Shaw, J.A.; Smith, B.M.; Walsh, T.; Johnson, S.; Primrose, L.; Slade, M.J.; Walker, R.A.; Coombes, R.C. Microsatellite Alterations Plasma DNA of Primary Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **2000**, *6*, 1119–1124.
 130. Corcoran, R.B.; Chabner, B.A. Application of Cell-Free DNA Analysis to Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine* **2018**, *379*, 1754–1765, doi:10.1056/NEJMra1706174.
 131. Gao, Q.; Zeng, Q.; Wang, Z.; Li, C.; Xu, Y.; Cui, P.; Zhu, X.; Lu, H.; Wang, G.; Cai, S.; et al. Circulating Cell-Free DNA for Cancer Early Detection. *Innovation (Camb)* **2022**, *3*, 100259, doi:10.1016/j.xinn.2022.100259.

132. Telekes, A.; Horváth, A. The Role of Cell-Free DNA in Cancer Treatment Decision Making. *Cancers* **2022**, *14*, 6115, doi:10.3390/cancers14246115.
133. Nagy, B. Cell-Free Nucleic Acids. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20225645.
134. Méhes, G. Liquid Biopsy for Predictive Mutational Profiling of Solid Cancer: The Pathologist's Perspective. *J. Biotechnol.* **2019**, *297*, 66–70, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.04.002.
135. Ding, Y.; Li, W.; Wang, K.; Xu, C.; Hao, M.; Ding, L. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/6843180.
136. Messaoudi, S.E.; Mouliere, F.; Manoir, S.D.; Bascoul-Mollevi, C.; Gillet, B.; Nouaille, M.; Fiess, C.; Crapez, E.; Bibeau, F.; Theillet, C.; et al. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 3067–3077, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0297.
137. Khakoo, S.; Georgiou, A.; Gerlinger, M.; Cunningham, D.; Starling, N. Circulating Tumour DNA, a Promising Biomarker for the Management of Colorectal Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2018**, *122*, 72–82, doi:10.1016/j.critrevonc.2017.12.002.
138. Ramón y Cajal, S.; Sesé, M.; Capdevila, C.; Aasen, T.; De Mattos-Arruda, L.; Diaz-Cano, S.J.; Hernández-Losa, J.; Castellví, J. Clinical Implications of Intratumor Heterogeneity: Challenges and Opportunities. *J Mol Med (Berl)* **2020**, *98*, 161–177, doi:10.1007/s00109-020-01874-2.
139. Parikh, A.R.; Corcoran, R.B. Monitoring Resistance through Liquid Biopsy. *Ann Oncol* **2018**, *29*, 8–11, doi:10.1093/annonc/mdx650.
140. Furuki, H.; Yamada, T.; Takahashi, G.; Iwai, T.; Koizumi, M.; Shinji, S.; Yokoyama, Y.; Takeda, K.; Taniai, N.; Uchida, E. Evaluation of Liquid Biopsies for Detection of Emerging Mutated Genes in Metastatic Colorectal Cancer. *Eur J Surg Oncol* **2018**, *44*, 975–982, doi:10.1016/j.ejso.2018.01.224.
141. Corcoran, R.B.; Chabner, B.A. Application of Cell-Free DNA Analysis to Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine* **2018**.
142. Ding, Y.; Li, W.; Wang, K.; Xu, C.; Hao, M.; Ding, L. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer Available online: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/6843180/> (accessed on 3 August 2020).
143. Bertout, J.A.; Patel, S.A.; Simon, M.C. The Impact of O₂ Availability on Human Cancer. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 967–975, doi:10.1038/nrc2540.
144. Secomb, T.W.; Dewhirst, M.W.; Pries, A.R. Structural Adaptation of Normal and Tumour Vascular Networks. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2012**, *110*, 63–69, doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00815.x.
145. Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in Tumors: Pathogenesis-Related Classification, Characterization of Hypoxia Subtypes, and Associated Biological and Clinical Implications. *Adv Exp Med Biol* **2014**, *812*, 19–24, doi:10.1007/978-1-4939-0620-8_3.
146. Gatenby, R.A.; Smallbone, K.; Maini, P.K.; Rose, F.; Averill, J.; Nagle, R.B.; Worrall, L.; Gillies, R.J. Cellular Adaptations to Hypoxia and Acidosis during Somatic Evolution of Breast Cancer. *Br J Cancer* **2007**, *97*, 646–653, doi:10.1038/sj.bjc.6603922.
147. Webb, B.A.; Chimenti, M.; Jacobson, M.P.; Barber, D.L. Dysregulated pH: A Perfect Storm for Cancer Progression. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 671–677, doi:10.1038/nrc3110.
148. Vaupel, P. Tumor Microenvironmental Physiology and Its Implications for Radiation Oncology. *Semin Radiat Oncol* **2004**, *14*, 198–206, doi:10.1016/j.semradonc.2004.04.008.
149. Span, P.N.; Bussink, J. Biology of Hypoxia. *Semin Nucl Med* **2015**, *45*, 101–109, doi:10.1053/j.semnuclmed.2014.10.002.
150. Gillies, R.J.; Gatenby, R.A. Hypoxia and Adaptive Landscapes in the Evolution of Carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **2007**, *26*, 311–317, doi:10.1007/s10555-007-9065-z.
151. Dayde, D.; Tanaka, I.; Jain, R.; Tai, M.C.; Taguchi, A. Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, E573, doi:10.3390/ijms18030573.
152. Korkeila, E.A.; Sundström, J.; Pyrhönen, S.; Syrjänen, K. Carbonic Anhydrase IX, Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Ezrin and Glucose Transporter-1 as Predictors of Disease Outcome in Rectal Cancer: Multivariate Cox Survival Models Following Data Reduction by Principal Component Analysis of the Clinicopathological Predictors. *Anticancer Res* **2011**, *31*, 4529–4535.

153. Vitoratou, D.-I.; Tolia, M.; Liakos, P.; Tsoukalas, N.; Giaginis, C.; Nikolaou, M.; Nikolaou, G.; Rigas, G.; Psarianos, K.; Lioupis, A.; et al. Clinical Value of Significance of Hypoxia Inducible Factor-1 α , Glucose Transporter-1 and Carbonic Anhydrase IX in Rectal Cancer after Preoperative Chemoradiotherapy. *J BUON* **2019**, *24*, 456–463.
154. Saka, B.; Ekinci, O.; Dursun, A.; Akyurek, N. Clinicopathologic and Prognostic Significance of Immunohistochemical Expression of HIF-1 α , CXCR4 and CA9 in Colorectal Carcinoma. *Pathology - Research and Practice* **2017**, *213*, 783–792, doi:10.1016/j.prp.2017.04.001.
155. Wouters, B.G.; Koritzinsky, M. Hypoxia Signalling through mTOR and the Unfolded Protein Response in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 851–864, doi:10.1038/nrc2501.
156. Denko, N.C. Hypoxia, HIF1 and Glucose Metabolism in the Solid Tumour. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 705–713, doi:10.1038/nrc2468.
157. Neri, D.; Supuran, C.T. Interfering with pH Regulation in Tumours as a Therapeutic Strategy. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 767–777, doi:10.1038/nrd3554.
158. Pastorek, J.; Pastorekova, S. Hypoxia-Induced Carbonic Anhydrase IX as a Target for Cancer Therapy: From Biology to Clinical Use. *Semin Cancer Biol* **2015**, *31*, 52–64, doi:10.1016/j.semcancer.2014.08.002.
159. Dubois, L.J.; Niemans, R.; van Kuijk, S.J.A.; Panth, K.M.; Parvathaneni, N.-K.; Peeters, S.G.J.A.; Zegers, C.M.L.; Rekers, N.H.; van Gisbergen, M.W.; Biemans, R.; et al. New Ways to Image and Target Tumour Hypoxia and Its Molecular Responses. *Radiother Oncol* **2015**, *116*, 352–357, doi:10.1016/j.radonc.2015.08.022.
160. Ward, C.; Meehan, J.; Gray, M.; Kunkler, I.H.; Langdon, S.P.; Argyle, D.J. Carbonic Anhydrase IX (CAIX), Cancer, and Radiation Responsiveness. *Metabolites* **2018**, *8*, E13, doi:10.3390/metabo8010013.
161. Viikilä, P.; Kivelä, A.J.; Mustonen, H.; Koskensalo, S.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Haglund, C. Carbonic Anhydrase Enzymes II, VII, IX and XII in Colorectal Carcinomas. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 8168–8177, doi:10.3748/wjg.v22.i36.8168.
162. Supuran, C.T. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 168–181, doi:10.1038/nrd2467.
163. Becker, H.M.; Klier, M.; Schüler, C.; McKenna, R.; Deitmer, J.W. Intramolecular Proton Shuttle Supports Not Only Catalytic but Also Noncatalytic Function of Carbonic Anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 3071–3076, doi:10.1073/pnas.1014293108.
164. Deitmer, J.W.; Becker, H.M. Transport Metabolons with Carbonic Anhydrases. *Front Physiol* **2013**, *4*, 291, doi:10.3389/fphys.2013.00291.
165. Klier, M.; Andes, F.T.; Deitmer, J.W.; Becker, H.M. Intracellular and Extracellular Carbonic Anhydrases Cooperate Non-Enzymatically to Enhance Activity of Monocarboxylate Transporters. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 2765–2775, doi:10.1074/jbc.M113.537043.
166. Parks, S.K.; Chiche, J.; Pouysségur, J. Disrupting Proton Dynamics and Energy Metabolism for Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 611–623, doi:10.1038/nrc3579.
167. Korkeila, E.; Talvinen, K.; Jaakkola, P.M.; Minn, H.; Syrjänen, K.; Sundström, J.; Pyrhönen, S. Expression of Carbonic Anhydrase IX Suggests Poor Outcome in Rectal Cancer. *Br J Cancer* **2009**, *100*, 874–880, doi:10.1038/sj.bjc.6604949.
168. Matsuyama, S.; Llopis, J.; Deveraux, Q.L.; T sien, R.Y.; Reed, J.C. Changes in Intramitochondrial and Cytosolic pH: Early Events That Modulate Caspase Activation during Apoptosis. *Nat Cell Biol* **2000**, *2*, 318–325, doi:10.1038/35014006.
169. Schreiber, R. Ca²⁺ Signaling, Intracellular pH and Cell Volume in Cell Proliferation. *J Membr Biol* **2005**, *205*, 129–137, doi:10.1007/s00232-005-0778-z.
170. Ward, C.; Langdon, S.P.; Mullen, P.; Harris, A.L.; Harrison, D.J.; Supuran, C.T.; Kunkler, I.H. New Strategies for Targeting the Hypoxic Tumour Microenvironment in Breast Cancer. *Cancer Treat Rev* **2013**, *39*, 171–179, doi:10.1016/j.ctrv.2012.08.004.
171. Lee, C.H.; Cragoe, E.J.; Edwards, A.M. Control of Hepatocyte DNA Synthesis by Intracellular pH and Its Role in the Action of Tumor Promoters. *J Cell Physiol* **2003**, *195*, 61–69, doi:10.1002/jcp.10225.

172. Aldera, A.P.; Govender, D. Carbonic Anhydrase IX: A Regulator of pH and Participant in Carcinogenesis. *Journal of Clinical Pathology* **2021**, *74*, 350–354, doi:10.1136/jclinpath-2020-207073.
173. Becker, H.M. Carbonic Anhydrase IX and Acid Transport in Cancer. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 157–167, doi:10.1038/s41416-019-0642-z.
174. Matolay, O.; Lívía, B.; Gyurkovics, A.; Francz, M.; Gabriella, V.; Rejtő, L.; Illés, Á.; Bedekovics, J.; Méhes, G. Quantitative Analysis of Carbonic Anhydrase IX Uncovers Hypoxia-Related Functional Differences in Classical Hodgkin Lymphoma Subtypes. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 3463, doi:10.3390/ijms20143463.
175. Lin, C.; Ng, H.L.H.; Pan, W.; Chen, H.; Zhang, G.; Bian, Z.; Lu, A.; Yang, Z. Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 26936–26952, doi:10.3390/ijms161125995.
176. Shin, H.-J.; Rho, S.B.; Jung, D.C.; Han, I.-O.; Oh, E.-S.; Kim, J.-Y. Carbonic Anhydrase IX (CA9) Modulates Tumor-Associated Cell Migration and Invasion. *J Cell Sci* **2011**, *124*, 1077–1087, doi:10.1242/jcs.072207.
177. Huang, B.-R.; Liu, Y.-S.; Lai, S.-W.; Lin, H.-J.; Shen, C.-K.; Yang, L.-Y.; Lu, D.-Y. CAIX Regulates GBM Motility and TAM Adhesion and Polarization through EGFR/STAT3 under Hypoxic Conditions. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, E5838, doi:10.3390/ijms21165838.
178. Stewart, D.J.; Nunez, M.I.; Behrens, C.; Liu, D.; Lin, Y.H.; Lee, J.J.; Roth, J.; Heymach, J.; Swisher, S.G.; Hong, W.K.; et al. Membrane Carbonic Anhydrase IX Expression and Relapse Risk in Resected Stage I-II Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **2014**, *9*, 675–684, doi:10.1097/JTO.000000000000148.
179. McDonald, P.C.; Chafe, S.C.; Brown, W.S.; Saberi, S.; Swayampakula, M.; Venkateswaran, G.; Nemirovsky, O.; Gillespie, J.A.; Karasinska, J.M.; Kalloger, S.E.; et al. Regulation of pH by Carbonic Anhydrase 9 Mediates Survival of Pancreatic Cancer Cells With Activated KRAS in Response to Hypoxia. *Gastroenterology* **2019**, *157*, 823–837, doi:10.1053/j.gastro.2019.05.004.
180. McDonald, P.C.; Swayampakula, M.; Dedhar, S. Coordinated Regulation of Metabolic Transporters and Migration/Invasion by Carbonic Anhydrase IX. *Metabolites* **2018**, *8*, E20, doi:10.3390/metabo8010020.
181. Andreucci, E.; Peppicelli, S.; Carta, F.; Brisotto, G.; Biscontin, E.; Ruzzolini, J.; Bianchini, F.; Biagioni, A.; Supuran, C.T.; Calorini, L. Carbonic Anhydrase IX Inhibition Affects Viability of Cancer Cells Adapted to Extracellular Acidosis. *J Mol Med (Berl)* **2017**, *95*, 1341–1353, doi:10.1007/s00109-017-1590-9.
182. van Kuijk, S.J.A.; Yaromina, A.; Houben, R.; Niemans, R.; Lambin, P.; Dubois, L.J. Prognostic Significance of Carbonic Anhydrase IX Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, doi:10.3389/fonc.2016.00069.
183. Juhász, P.; Hasulyó, D.; Bedekovics, J.; Beke, L.; Kacsala, N.; Török, M.; Méhes, G. Carbonic Anhydrase IX (CAIX) Expressing Hypoxic Micro-Environment Hampers CD8+ Immune Cell Infiltrate in Breast Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **2019**, *10.1097/PAI.0000000000001082*, doi:10.1097/PAI.0000000000001082.
184. Méhes, G.; Matolay, O.; Beke, L.; Czenke, M.; Jóna, Á.; Miltényi, Z.; Illés, Á.; Bedekovics, J. Hypoxia-Related Carbonic Anhydrase IX Expression Is Associated with Unfavourable Response to First-Line Therapy in Classical Hodgkin's Lymphoma. *Histopathology* **2019**, *74*, 699–708, doi:10.1111/his.13808.
185. Neri, D.; Supuran, C.T. Interfering with pH Regulation in Tumours as a Therapeutic Strategy. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 767–777, doi:10.1038/nrd3554.
186. Ward, C.; Meehan, J.; Gray, M.; Kunkler, I.H.; Langdon, S.P.; Argyle, D.J. Carbonic Anhydrase IX (CAIX), Cancer, and Radiation Responsiveness. *Metabolites* **2018**, *8*, doi:10.3390/metabo8010013.
187. Kováčová, Z.; Hodorová, I. Carbonic Anhydrase IX and Survivin in Colorectal Adenocarcinoma Cells: Slovakian Population Study. *Biology* **2021**, *10*, 872, doi:10.3390/biology10090872.
188. Tafreshi, N.K.; Lloyd, M.C.; Bui, M.M.; Gillies, R.J.; Morse, D.L. Chapter 13: Carbonic Anhydrase IX as an Imaging and Therapeutic Target for Tumors and Metastases. *Subcell Biochem* **2014**, *75*, 221–254, doi:10.1007/978-94-007-7359-2_12.

189. Nguyen, H.T.; Duong, H.-Q. The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy (Review). *Oncology Letters* **2018**, *16*, 9–18, doi:10.3892/ol.2018.8679.
190. Heinen, C.D. Mismatch Repair Defects and Lynch Syndrome: The Role of the Basic Scientist in the Battle against Cancer. *DNA Repair (Amst)* **2016**, *38*, 127–134, doi:10.1016/j.dnarep.2015.11.025.
191. Del Vecchio, F.; Mastroiaco, V.; Di Marco, A.; Compagnoni, C.; Capece, D.; Zazzeroni, F.; Capalbo, C.; Alesse, E.; Tessitore, A. Next-Generation Sequencing: Recent Applications to the Analysis of Colorectal Cancer. *J Transl Med* **2017**, *15*, doi:10.1186/s12967-017-1353-y.
192. D’Haene, N.; Fontanges, Q.; De Nève, N.; Blanchard, O.; Melendez, B.; Delos, M.; Dehou, M.-F.; Maris, C.; Nagy, N.; Rousseau, E.; et al. Clinical Application of Targeted Next-Generation Sequencing for Colorectal Cancer Patients: A Multicentric Belgian Experience. *Oncotarget* **2018**, *9*, 20761–20768, doi:10.18632/oncotarget.25099.
193. Margonis, G.A.; Kim, Y.; Spolverato, G.; Ejaz, A.; Gupta, R.; Cosgrove, D.; Anders, R.; Karagkounis, G.; Choti, M.A.; Pawlik, T.M. Association Between Specific Mutations in KRAS Codon 12 and Colorectal Liver Metastasis. *JAMA Surg* **2015**, *150*, 722–729, doi:10.1001/jamasurg.2015.0313.
194. Rowland, A.; Dias, M.M.; Wiese, M.D.; Kichenadasse, G.; McKinnon, R.A.; Karapetis, C.S.; Sorich, M.J. Meta-Analysis Comparing the Efficacy of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Therapy between KRAS G13D and Other KRAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer Tumours. *Eur. J. Cancer* **2016**, *55*, 122–130, doi:10.1016/j.ejca.2015.11.025.
195. Abdelnaby, A.Y.; Moussa, G.I.; Abdou, S.M.; Abdul Baki, E.A.; Salem, M.L.; Sharnobi, G.E.; Gharib, F.; Farghal, E.E.; Watany, M.; Soliman, S.M.; et al. Genetic Variations of Selected Genes Using Target Deep Sequencing in Colorectal Cancer Patients. *J Cancer Sci Ther* **2017**, *9*, doi:10.4172/1948-5956.1000492.
196. Seyfried, T.N.; Huysentruyt, L.C. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog* **2013**, *18*, 43–73.
197. Vermaat, J.S.; Nijman, I.J.; Koudijs, M.J.; Gerritse, F.L.; Scherer, S.J.; Mokry, M.; Roessingh, W.M.; Lansu, N.; Bruijn, E. de; Hillegersberg, R. van; et al. Primary Colorectal Cancers and Their Subsequent Hepatic Metastases Are Genetically Different: Implications for Selection of Patients for Targeted Treatment. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 688–699, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1965.
198. Lee, S.Y.; Haq, F.; Kim, D.; Jun, C.; Jo, H.-J.; Ahn, S.-M.; Lee, W.-S. Comparative Genomic Analysis of Primary and Synchronous Metastatic Colorectal Cancers. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90459, doi:10.1371/journal.pone.0090459.
199. Kogita, A.; Yoshioka, Y.; Sakai, K.; Togashi, Y.; Sogabe, S.; Nakai, T.; Okuno, K.; Nishio, K. Inter- and Intra-Tumor Profiling of Multi-Regional Colon Cancer and Metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *458*, 52–56, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.064.
200. Dócs, O.; Fazakas, F.; Horváth, N.L.; Tóth, L.; András, C.; Horváth, Z.; Méhes, G. Changes of KRAS Exon 2 Codon 12/13 Mutation Status in Recurrent Colorectal Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **2015**, *21*, 399–404, doi:10.1007/s12253-014-9834-2.
201. Lam, A.K.-Y.; Chan, S.S.-Y.; Leung, M. Synchronous Colorectal Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Implications. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 6815–6820, doi:10.3748/wjg.v20.i22.6815.
202. Pajares, J.A.; Perea, J. Multiple Primary Colorectal Cancer: Individual or Familial Predisposition? *World J Gastrointest Oncol* **2015**, *7*, 434–444, doi:10.4251/wjgo.v7.i12.434.
203. Wilkins, T.; McMechan, D.; Talukder, A.; Herline, A. Colorectal Cancer Screening and Surveillance in Individuals at Increased Risk. *AFP* **2018**, *97*, 111–116.
204. Jancik, S.; Drabek, J.; Berkovcova, J.; Xu, Y.Z.; Stankova, M.; Klein, J.; Kolek, V.; Skarda, J.; Tichy, T.; Grygarkova, I.; et al. A Comparison of Direct Sequencing, Pyrosequencing, High Resolution Melting Analysis, TheraScreen DxS, and the K-Ras StripAssay for Detecting KRAS Mutations in Non Small Cell Lung Carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* **2012**, *31*, 79, doi:10.1186/1756-9966-31-79.
205. Sclafani, F.; Chau, I.; Cunningham, D.; Hahne, J.C.; Vlachogiannis, G.; Eltahir, Z.; Lampis, A.; Braconi, C.; Kalaitzaki, E.; De Castro, D.G.; et al. KRAS and BRAF Mutations in Circulating Tumour DNA from Locally Advanced Rectal Cancer. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 1445, doi:10.1038/s41598-018-19212-5.

206. Thomsen, C.B.; Hansen, T.F.; Andersen, R.F.; Lindebjerg, J.; Jensen, L.H.; Jakobsen, A. Monitoring the Effect of First Line Treatment in RAS/RAF Mutated Metastatic Colorectal Cancer by Serial Analysis of Tumor Specific DNA in Plasma. *J Exp Clin Cancer Res* **2018**, *37*, doi:10.1186/s13046-018-0723-5.
207. Vakiani, E.; Janakiraman, M.; Shen, R.; Sinha, R.; Zeng, Z.; Shia, J.; Cercek, A.; Kemeny, N.; D'Angelica, M.; Viale, A.; et al. Comparative Genomic Analysis of Primary Versus Metastatic Colorectal Carcinomas. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 2956–2962, doi:10.1200/JCO.2011.38.2994.
208. Kim, T.-M.; Jung, S.-H.; An, C.H.; Lee, S.H.; Baek, I.-P.; Kim, M.S.; Park, S.-W.; Rhee, J.-K.; Lee, S.-H.; Chung, Y.-J. Subclonal Genomic Architectures of Primary and Metastatic Colorectal Cancer Based on Intratumoral Genetic Heterogeneity. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4461–4472, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2413.
209. Parikh, A.R.; Leshchiner, I.; Elagina, L.; Goyal, L.; Levovitz, C.; Siravegna, G.; Livitz, D.; Rhrissorakrai, K.; Martin, E.E.; Van Seventer, E.E.; et al. Liquid versus Tissue Biopsy for Detecting Acquired Resistance and Tumor Heterogeneity in Gastrointestinal Cancers. *Nature Medicine* **2019**, *25*, 1415–1421, doi:10.1038/s41591-019-0561-9.
210. Trojan, J.; Klein-Scory, S.; Koch, C.; Schmiegel, W.; Baraniskin, A. Clinical Application of Liquid Biopsy in Targeted Therapy of Metastatic Colorectal Cancer Available online: <https://www.hindawi.com/journals/crionm/2017/6139634/> (accessed on 18 August 2020).
211. Pereira, J.; Alves, F.; Ferreira, F.; Matos, L.V. de; Massena, A.; Martins, A.; J, P.; F, A.; F, F.; L, V. de M.; et al. Liquid Biopsies in Progressing Metastatic Colorectal Cancer- Application and Their Therapeutic Implications According to the RAS Status. *Cureus Journal of Medical Science* **2020**, *12*, doi:10.7759/cureus.7035.
212. Tupá, V.; Drahošová, S.; Grendár, M.; Adamkov, M. Expression and Association of Carbonic Anhydrase IX and Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. *Pathology - Research and Practice* **2019**, *215*, 705–711, doi:10.1016/j.prp.2019.01.012.
213. Guedj, N.; Bretagnol, F.; Rautou, P.-E.; Deschamps, L.; Cazals-Hatem, D.; Bedossa, P.; Panis, Y.; Couvelard, A. Predictors of Tumor Response after Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Adenocarcinomas. *Hum Pathol* **2011**, *42*, 1702–1709, doi:10.1016/j.humpath.2011.01.015.
214. Thies, S.; Langer, R. Tumor Regression Grading of Gastrointestinal Carcinomas after Neoadjuvant Treatment. *Front Oncol* **2013**, *3*, 262, doi:10.3389/fonc.2013.00262.
215. Debucquoy, A.; Goethals, L.; Libbrecht, L.; Perneel, C.; Geboes, K.; Ectors, N.; McBride, W.H.; Haustermans, K. Molecular and Clinico-Pathological Markers in Rectal Cancer: A Tissue Micro-Array Study. *Int J Colorectal Dis* **2009**, *24*, 129–138, doi:10.1007/s00384-008-0608-8.
216. Nakada, N.; Mikami, T.; Horie, K.; Nagashio, R.; Sakurai, Y.; Sanoyama, I.; Yoshida, T.; Sada, M.; Kobayashi, K.; Sato, Y.; et al. Expression of CA2 and CA9 Carbonic Anhydrases in Ulcerative Colitis and Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Pathol Int* **2020**, *70*, 523–532, doi:10.1111/pin.12949.
217. Fokas, E.; Ströbel, P.; Fietkau, R.; Ghadimi, M.; Liersch, T.; Grabenbauer, G.G.; Hartmann, A.; Kaufmann, M.; Sauer, R.; Graeven, U.; et al. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2017**, *109*, djx095, doi:10.1093/jnci/djx095.

11. Publikációs lista (A Kenézy Élettudományi Könyvtár jóváhagyása által)



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/426/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bádon Emese Sarolta

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bádon, E. S.**, Beke, L., Mokánszki, A., András, C., Méhes, G.: Carbonic Anhydrase IX Expression and Treatment Response Measured in Rectal Adenocarcinoma Following Neoadjuvant Chemo-Radiotherapy.
Int. J. Mol. Sci. 24 (3), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032581>
IF: 5.6 (2022)
2. **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., András, C., Méhes, G.: Clonal diversity in KRAS mutant colorectal adenocarcinoma under treatment: Monitoring of cfDNA using reverse hybridization and DNA sequencing platforms.
Mol. Cell. Probes. 67, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101891>
IF: 3.3 (2022)
3. **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., András, C., Damjanovich, L., Méhes, G.: Quadruplicate Synchronous Adenocarcinoma of the Colon With Distant Metastases-Long-Term Molecular Follow-Up by KRAS and TP53 Mutational Profiling.
Diagnostics (Basel). 10 (6), 1-13, 2020.
IF: 3.706

További közlemények

4. Matolay, O., **Bádon, E. S.**, Balázs, L., Juhász, P., Csonka, T., Méhes, G.: A szénsavánhidráz IX szerepe a malignus daganatok progressziójában - lehetséges terápiás célpont?
Magy Onkol. 65 (2), 157-166, 2021.
5. Mokánszki, A., **Bádon, E. S.**, Mónus, A., Tóth, L., Bittner, N., Méhes, G.: Cell-free DNA From Pleural Effusion Samples: is It Right for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma?
Pathol. Oncol. Res. 27, 1-7, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2021.613071>
IF: 2.874





6. Mokánszki, A., Chang Chien, Y. C., Mótyán, J. A., Juhász, P., **Bádon, E. S.**, Madar, L., Szegedi, I., Kiss, C., Méhes, G.: Novel RB1 and MET Gene Mutations in a Case with Bilateral Retinoblastoma Followed by Multiple Metastatic Osteosarcoma.
Diagnostics. 11 (1), 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11010028>
IF: 3.992
7. Molnár, C., **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., Beke, L., Győry, F., Nagy, E. V., Méhes, G.: High Genetic Diversity and No Evidence of Clonal Relation in Synchronous Thyroid Carcinomas Associated with Hashimoto's Thyroiditis: a Next-Generation Sequencing Analysis.
Diagnostics. 10 (1), 1-11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10010048>
IF: 3.706

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,178

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,606**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.09.15.





Registry number: DEENK/426/2023.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Emese Sarolta Bádon
Doctoral School: Doctoral School of Clinical Medicine

List of publications related to the dissertation

1. **Bádon, E. S.**, Beke, L., Mokánszki, A., András, C., Méhes, G.: Carbonic Anhydrase IX Expression and Treatment Response Measured in Rectal Adenocarcinoma Following Neoadjuvant Chemo-Radiotherapy.
Int. J. Mol. Sci. 24 (3), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032581>
IF: 5.6 (2022)
2. **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., András, C., Méhes, G.: Clonal diversity in KRAS mutant colorectal adenocarcinoma under treatment: Monitoring of cfDNA using reverse hybridization and DNA sequencing platforms.
Mol. Cell. Probes. 67, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101891>
IF: 3.3 (2022)
3. **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., András, C., Damjanovich, L., Méhes, G.: Quadruplicate Synchronous Adenocarcinoma of the Colon With Distant Metastases-Long-Term Molecular Follow-Up by KRAS and TP53 Mutational Profiling.
Diagnostics (Basel). 10 (6), 1-13, 2020.
IF: 3.706

List of other publications

4. Matolay, O., **Bádon, E. S.**, Balázs, L., Juhász, P., Csonka, T., Méhes, G.: A szénsavhidráz IX szerepe a malignus daganatok progressziójában - lehetséges terápiás célpont?
Magy Onkol. 65 (2), 157-166, 2021.
5. Mokánszki, A., **Bádon, E. S.**, Mónus, A., Tóth, L., Bittner, N., Méhes, G.: Cell-free DNA From Pleural Effusion Samples: is It Right for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma?
Pathol. Oncol. Res. 27, 1-7, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2021.613071>
IF: 2.874





6. Mokánszki, A., Chang Chien, Y. C., Mótyán, J. A., Juhász, P., **Bádon, E. S.**, Madar, L., Szegedi, I., Kiss, C., Méhes, G.: Novel RB1 and MET Gene Mutations in a Case with Bilateral Retinoblastoma Followed by Multiple Metastatic Osteosarcoma.
Diagnostics. 11 (1), 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11010028>
IF: 3.992
7. Molnár, C., **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., Beke, L., Győry, F., Nagy, E. V., Méhes, G.: High Genetic Diversity and No Evidence of Clonal Relation in Synchronous Thyroid Carcinomas Associated with Hashimoto's Thyroiditis: a Next-Generation Sequencing Analysis.
Diagnostics. 10 (1), 1-11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10010048>
IF: 3.706

Total IF of journals (all publications): 23,178

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 12,606

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

15 September, 2023



12. Tárgyszavak

Vastagbél tumor, végbél tumor, többszörös primer vastagbél daganat, multiplex metsztázisok, MAPK útvonal, *KRAS* mutáció, liquid biopszia, cfDNA, genetikai heterogenitás, személyre szabott terápia, hypoxiás stressz és adaptáció, karboanhidráz IX, proliferációs index.

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek Prof. Dr. Méhes Gábornak a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított doktori tanulmányaim sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm segítőkész támogatását, a türelmét, a belém fektetett bizalmát, emberségét, valamint a szaktudását, amellyel rávezetett a tudományos orvosi gondolkodás menetére, mely számomra példaértékű útravaló, mind az életben, mind pedig az orvosi szakmában.

Köszönöm továbbá Dr. Mokánszki Attilának és Mónus Anikónak, hogy mély betekintést nyerhettem szaktudásuk által a molekuláris daganatpatológia diagnosztikai hátterébe úgy elméleti, mint gyakorlati szinten egyaránt, valamint a molekuláris labor minden egyes dolgozójának a folyamatos segítségért és támogatásért.

Köszönöm Dr. András Csillának a minták gyűjtésében nyújtott segítségéért és munkám támogatásáért.

Köszönettel tartozom Beke Líviának a feltétel nélküli állandó segítségéért az immunhisztokémiai festések kivitelezésében.

Köszönettel tartozom a Patológia Intézet minden egyes dolgozójának akik közvetlenül vagy közvetve valamilyen módon segítették munkám

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném kifejezni hálámat szerető és támogató családomnak és minden kedves barátomnak a folyamatos bátorításukért, támogatásukért és toleranciájukért a doktori tanulmányaim során.

Kutatásunkat az alábbi pályázatok támogatták: ÚNKP-20-3-II-DE-502, ÚNKP-21-3-II-DE-277 AZ INNOVÁCIÓS ÉS TECHNOLÓGIAI MINISZTERIUM ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁGI PROGRAMJA A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAP (OM) FORRÁSÁBÓL.

14. Függelék

A tézis az alábbi publikációkra épül: