

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ CELL FREE DNA (cfDNA) ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ ΚΑΙ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Κουκάκη Τ¹., Μπιζιώτα Ε¹., Ξενίδης Ν¹., Αμαραντίδης Κ¹., Μπολανάκη Ε²., Καραγιαννάκης Α²., Λιανίδου Ε³., Κακολύρης Σ¹., Μπαλγκουρανίδου Ι¹.

1.Πανεπιστημιακή Ογκολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Π.Γ.Ν.Αλεξανδρούπολης 2.Β' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Π.Γ.Ν.Αλεξανδρούπολης 3.Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Analysis of Circulating Tumor Cells lab, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών ΕΚΠΑ.

ABSTRACT

Εισαγωγή: Ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, αφού η πρόγνωση του παραμένει δυσμενής. Σκόπιμη κρίνεται η διερεύνηση νέων βιοδεικτών καρκίνου ικανών να παρέχουν πληροφορία για την πρόγνωση, την εκλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής καθώς και την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία.

Μέθοδοι: Τα δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 32 ασθενείς με εξαιρέσιμο καρκίνο παγκρέατος, 45 ασθενείς με προχωρημένη νόσο, πριν την έναρξη της επικουρικής θεραπείας και της πρώτης γραμμής θεραπείας, αντίστοιχα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου 25 υγιών αιμοδοτών.

Η απομόνωση του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA πραγματοποιήθηκε με ένα εμπορικά διαθέσιμο kit. Η ανίχνευση της μεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και η ποσοτικοποίηση του cfDNA πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της ειδικής στη μεθυλίωση PCR πραγματικού χρόνου και μέσω της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Alu-based real time PCR).

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση της μεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *RASSF1a*, *BRCA1*, *BRCA2* στο cell-free DNA ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο παγκρέατος. Επιπλέον στόχος της μελέτης είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του cell free DNA στο πλάσμα και η συσχέτιση της συγκέντρωσης του με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αποτελέσματα: Τα γονίδια *RASSF1a*, *BRCA1* και *BRCA2* ανιχνεύθηκαν μεθυλωμένα σε υψηλά ποσοστά, τόσο στους ασθενείς με πρώιμη όσο και στους ασθενείς με μεταστατική νόσο. Ακολούθησε ανάλυση επιβίωσης όπου και βρέθηκε ότι ασθενείς με πρώιμο καρκίνο παγκρέατος με μη μεθυλωμένα τα γονίδια *RASSF1a*, *BRCA1* και *BRCA2* έχουν μεγαλύτερο ελεύθερο υποτροπής διάστημα καθώς και μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) σε σχέση με εκείνους που έχουν μεθυλωμένα τα παραπάνω γονίδια ($p=0,023$, $p=0,001$ και $p=0,050$, αντίστοιχα). Επίσης, μεγαλύτερη ήταν και η ολική επιβίωση (OS) για τους ασθενείς με μη μεθυλωμένα τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ($p=0,001$ και $p=0,027$, αντίστοιχα), στην ομάδα των μεταστατικών ασθενών. Από την κλινική αξιολόγηση της συγκέντρωσης του cfDNA πλάσματος, προκύπτει ότι η ασθενείς με υψηλή συγκέντρωση cfDNA στο πλάσμα ($>=60\text{ng/mL}$) παρουσιάζουν μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS).

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα αυτά είναι προκαταρκτικά και αναμένεται να γίνουν συσχετίσεις και με άλλα γονίδια, με διαφορετικές παραμέτρους σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, αφού η πρόγνωση τους παραμένει δυσμενής.

Είναι η πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο.

Αποτελεί τον έβδομο σε συχνότητα καρκίνο, με αυξανόμενη τάση.

Η συχνότητα νέων διαγνωσμένων περιστατικών αυξάνεται με την ηλικία, και η πλειονότητα των περιστατικών διαγιγνώσκονται άνω της ηλικίας των 65.

Η αναλογία εμφάνισης σε άντρες και γυναίκες είναι περίπου η ίδια.

Σκόπιμη κρίνεται η διερεύνηση βιοδεικτών καρκίνου ικανών να παρέχουν πληροφορία για την πρόγνωση, την εκλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής καθώς και την ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ I

Τα γονίδια *RASSF1a*, *APC*, *BRCA1* και *BRCA2* ανιχνεύθηκαν μεθυλωμένα σε υψηλά ποσοστά, τόσο στους ασθενείς με πρώιμη όσο και στους ασθενείς με μεταστατική νόσο.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ CELL-FREE DNA Πρώιμος & Μεταστατικός καρκίνος Παγκρέατος		
	Adjuvant (%)	Metastatic (%)	Normal (%)
RASSF1A	27/32 (84.3)	30/45 (66.0)	0/25 (0.00)
BRCA1	23/32 (71.8)	32/45 (71.1)	0/25 (0.00)
BRCA2	25/32 (78.1)	31/45 (68.8)	0/25 (0.00)

Παρατηρήθηκε ότι η μέση συγκέντρωση του cfDNA (ng/μl) είναι υψηλότερη στην ομάδα των ασθενών με μεταστατική νόσο.

Μέση συγκέντρωση cfDNA (ng/μl)	
Ασθενείς με πρώιμο ca παγκρέατος	45.0
Ασθενείς με μεταστατικό ca παγκρέατος	73.0
Υγιείς (n=25)	28.0

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II

Ακολούθησε ανάλυση επιβίωσης όπου βρέθηκε ότι ασθενείς με πρώιμο καρκίνο παγκρέατος με μη μεθυλωμένα τα γονίδια *RASSF1a*, *BRCA1* και *BRCA2* έχουν μεγαλύτερο ελεύθερο υποτροπής διάστημα καθώς και μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) σε σχέση με εκείνους που έχουν μεθυλωμένα τα παραπάνω γονίδια ($p=0,023$, $p=0,001$ και $p=0,050$, αντίστοιχα). Εικόνες 1, 2, 3

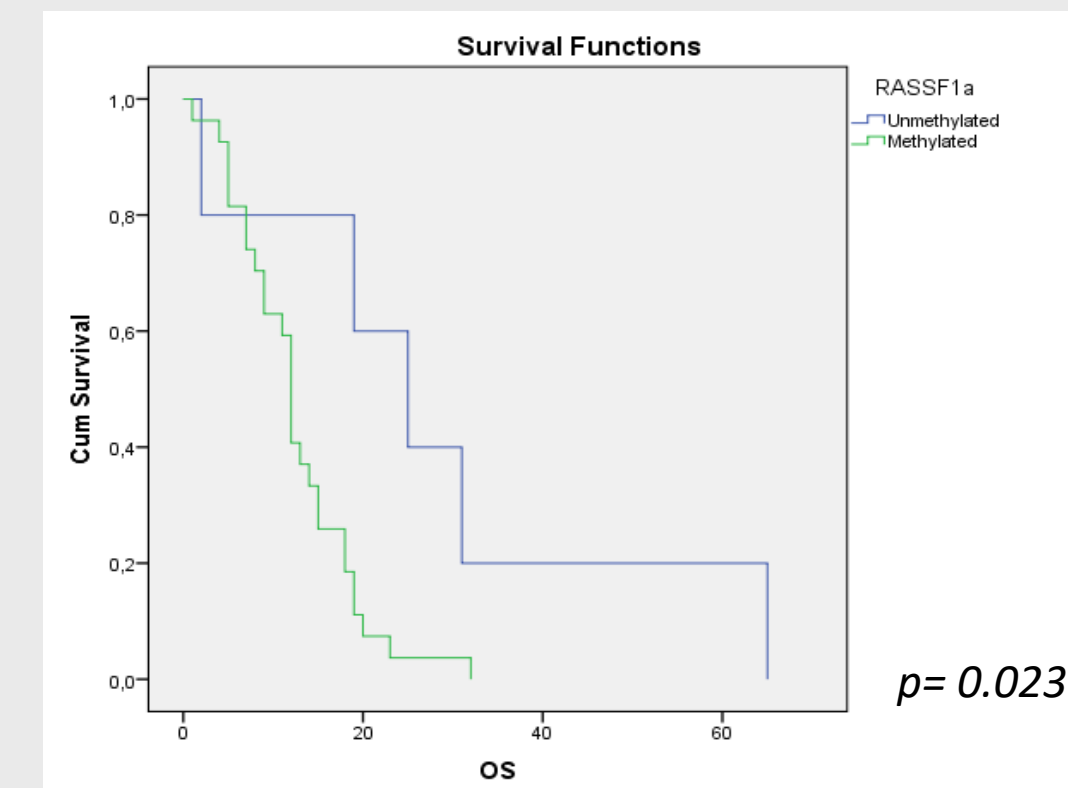
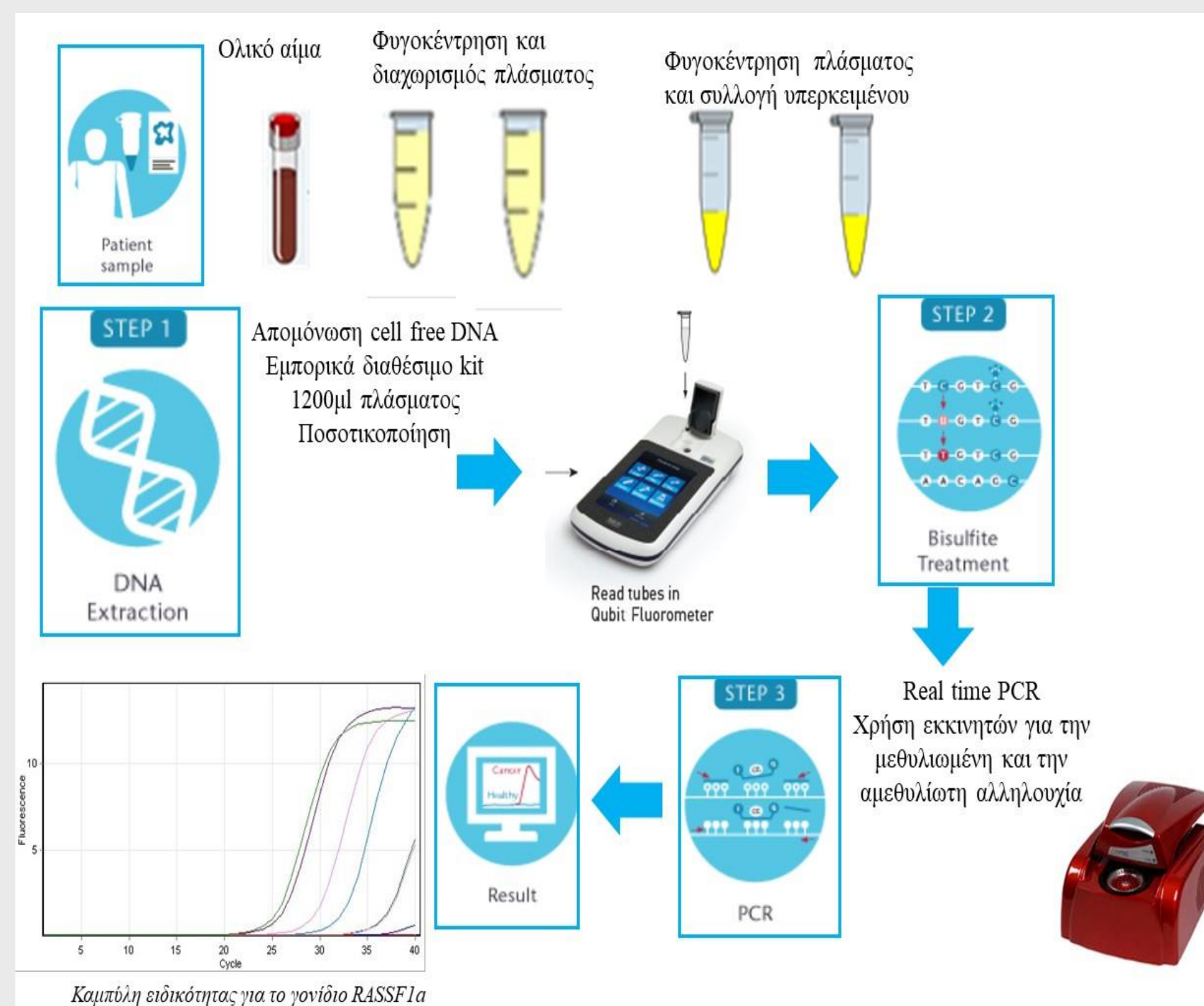
Επιπλέον και στην ομάδα των μεταστατικών ασθενών η ολική επιβίωση (OS) ήταν μεγαλύτερη για τους ασθενείς με μη μεθυλωμένα τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ($p=0,001$ και $p=0,027$, αντίστοιχα). Εικόνες 4,5

Από την κλινική αξιολόγηση της συγκέντρωσης του cfDNA πλάσματος ασθενών με πρώιμο καρκίνο του Παγκρέατος (n=32) προκύπτει ότι ασθενείς με υψηλή συγκέντρωση cfDNA στο πλάσμα ($>40\text{ng/μl}$) παρουσιάζουν μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην ομάδα των μεταστατικών ασθενών.

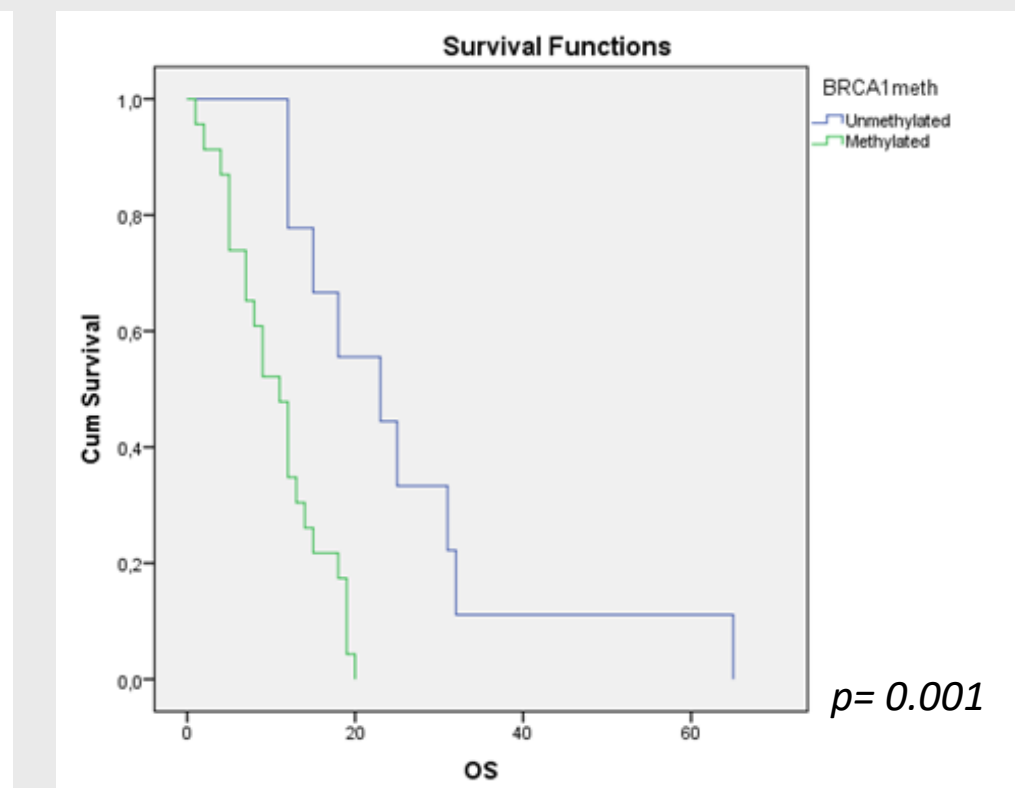
cfDNA			
Ασθενείς με πρώιμη νόσο (n=32)	OS		p=0,018 * p-value
	>6mo	<=6mo	
Συγκέντρωση cfDNA(ng/ml)	<40 ng/μl	>40 ng/μl	
	10	2	
	3	17	

cfDNA			
Ασθενείς με μεταστατική νόσο (n=45)	OS		p=0,021 * p-value
	>6mo	<=6mo	
Συγκέντρωση cfDNA(ng/ml)	<=60 ng/μl	>60 ng/μl	
	15	2	
	5	23	

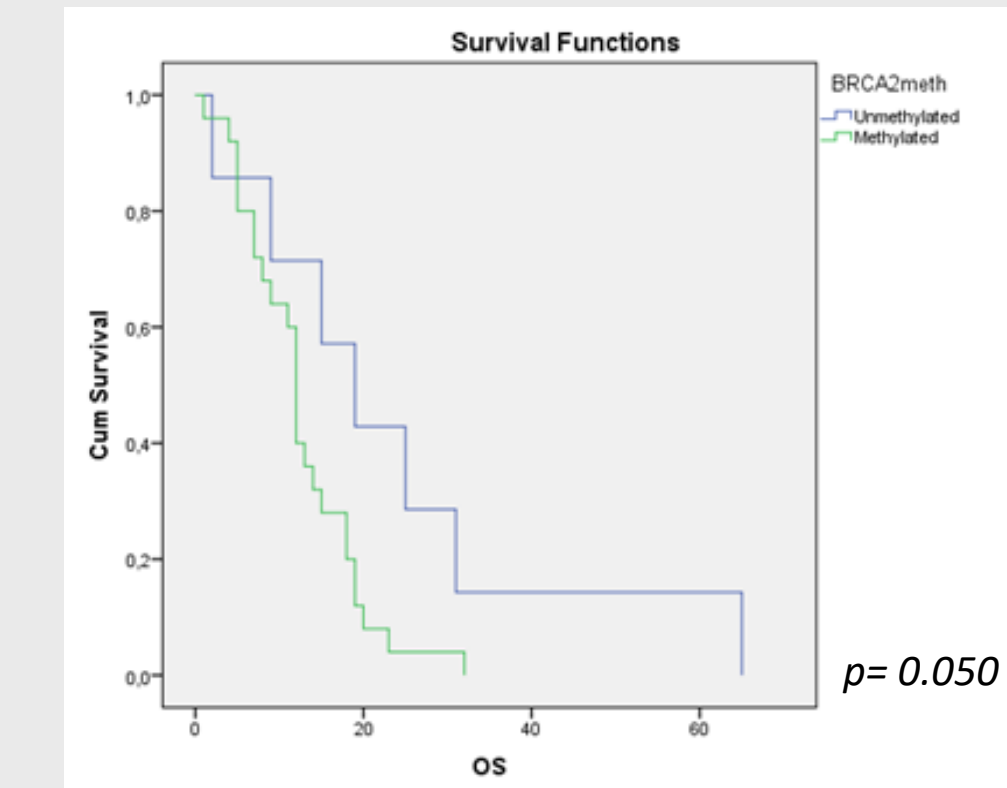
ΜΕΘΟΔΟΙ



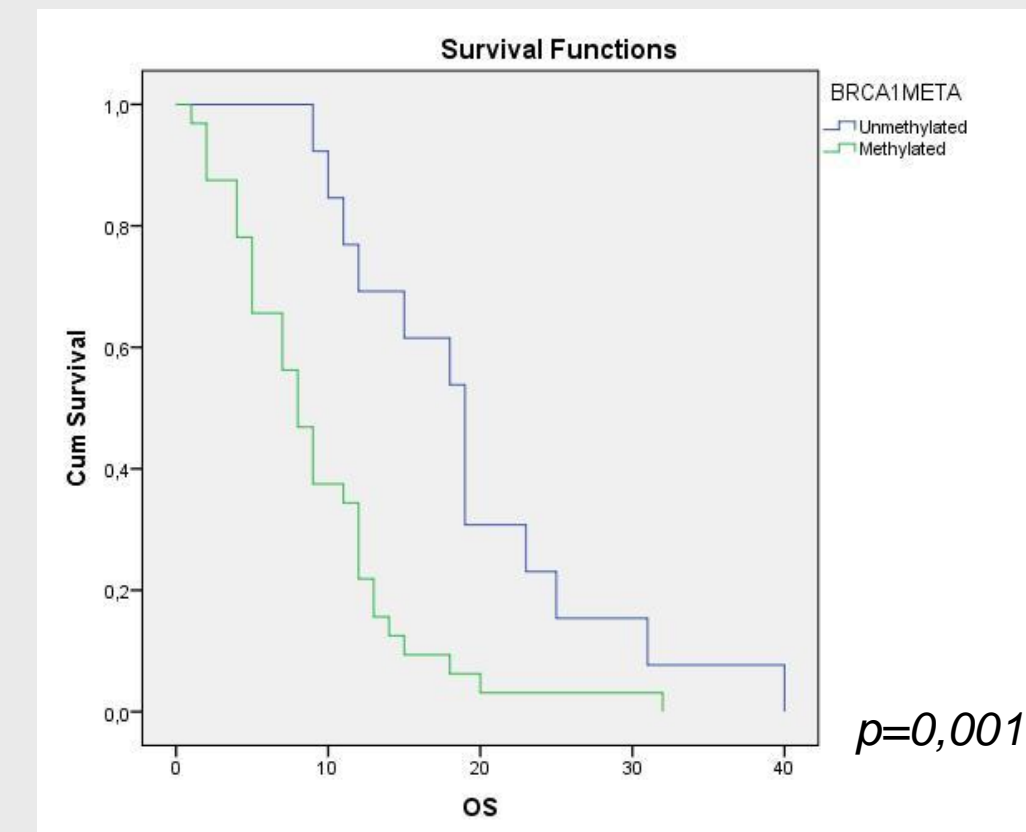
Εικόνα 1. Ολική επιβίωση και *Rassf1a* στην πρώιμη νόσο



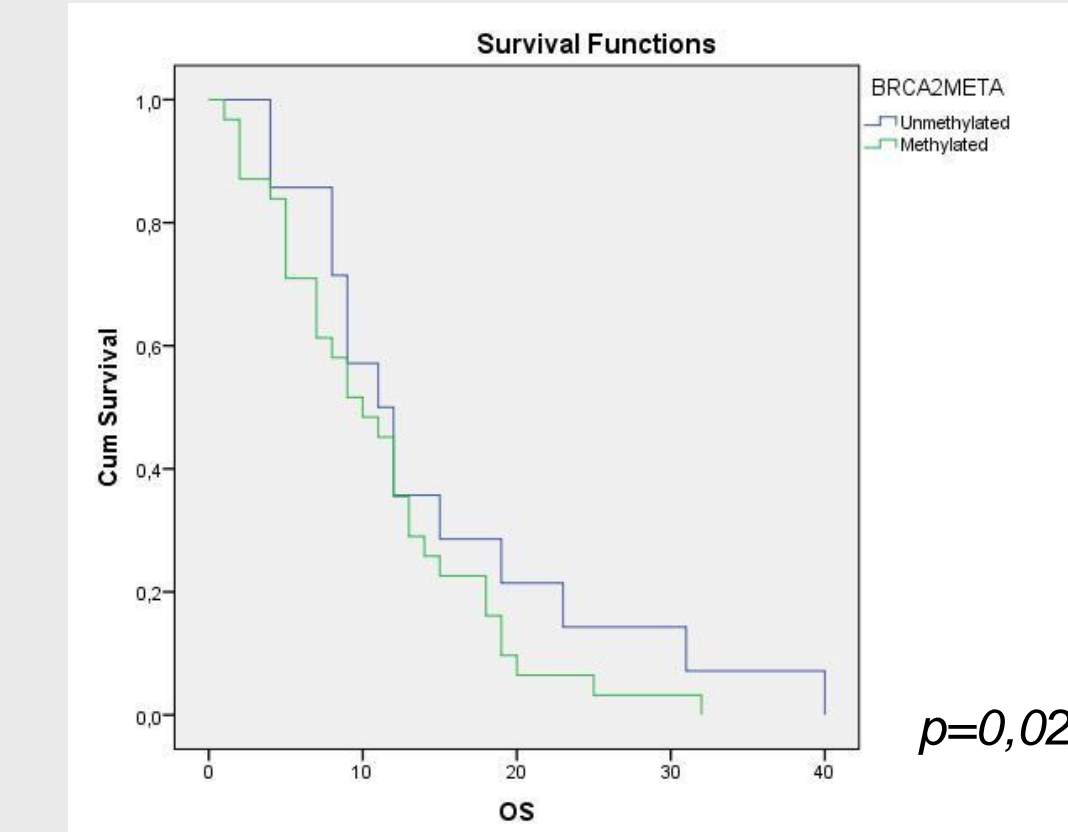
Εικόνα 2. Ολική επιβίωση και *BRCA1* στην πρώιμη νόσο



Εικόνα 3. Ολική επιβίωση και *BRCA2* στην πρώιμη νόσο



Εικόνα 4. Ολική επιβίωση και *BRCA1* στην μεταστατική νόσο



Εικόνα 5. Ολική επιβίωση και *BRCA2* στην μεταστατική νόσο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη του “κρυφού” επιγενετικού κώδικα και ιδιαίτερα της μεθυλίωσης του DNA, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο ερευνητικό πεδίο για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών πρόγνωσης της κλινικής έκβασης της νόσου

Τα γονίδια *RASSF1a*, *BRCA1*, *BRCA2* παρουσιάζουν σημαντικά επίπεδα μεθυλίωσης τόσο στην ομάδα των ασθενών με πρώιμη νόσο όσο και στην ομάδα των ασθενών με μεταστατική νόσο

Η μεθυλίωση των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* φαίνεται να αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης κυρίως στην ομάδα των μεταστατικών ασθενών

Η μελέτη της μεθυλίωσης των παραπάνω γονιδίων φαίνεται να αποτελεί ικανό προγνωστικό δείκτη επιβίωσης, ωστόσο η αξία του θα πρέπει να επικυρωθεί και να επιβεβαιωθεί σε ακόμα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα αυτά είναι προκαταρκτικά και αναμένεται να γίνουν συσχετίσεις και με άλλα γονίδια, με διαφορετικές παραμέτρους σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Zhou C, Porter N, Borges M, Gauthier C, Ferguson L, Huang B, Nanda N, He J, Laheru D, Hruban RH, Goggins M, Klein AP, Roberts NJ. Examination of ATM, BRCA1, and BRCA2 promoter methylation in patients with pancreatic cancer. *Pancreatol.* 2021 Aug;21(5):938-941.
- Brancaccio M, Natale F, Falco G, Angrisano T. Cell-Free DNA Methylation: The New Frontiers of Pancreatic Cancer Biomarkers' *Discovery. Genes (Basel).* 2019 Dec 23;11(1):14.