

**ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ЗА ЕФЕКТА ОТ ХИМИОЛЪЧЕТЕРАПИЯТА ПРИ
РАК НА РЕКТУМА**

Енчев Е.¹, Димитров Е.¹, Минков Г.¹, Йовчев Й.¹, Гълъбова М.²

*1 – Клиника по хирургически болести, УМБАЛ“Проф. д-р Ст. Киркович“ – АД, гр. Стара
Загора, България*

*2 - Катедра „Обща и клинична патология, съдебна медицина, деонтология и
дерматовенерология“, МФ, ТрУ, гр. Стара Загора, България*

*Кореспонденция: д-р Емил Енчев – Клиника по хирургически болести, УМБАЛ“Проф. д-р Ст.
Киркович“ – АД, гр. Стара Загора; emo_19_89@abv.bg
0894845263; 0884099549*

Абстракт

Приблизително 60% от пациентите с рак на ректума, лекувани с неoadювантна химиолъчетерапия, постигат известна степен на патологичен отговор. Въпреки това, няма ефективен метод за предвиждане на това кои пациенти ще отговорят на неoadювантната терапия. Последните проучвания оценяват потенциала на генетичните биомаркери да прогнозира резултата при локално авансирал ректален аденокарцином, лекуван с неoadювантна химиолъчетерпия.

Направихме литературен обзор, използвайки PubMed, на тези статии, които специално се отнасят до способността на генетичния профил да предскаже отговора на неoadювантно лечение при ректален карцином. Въпреки че тъканното генно профилиране е довело до обещаващи данни, досега нито един от идентифицираните молекулни маркери при локално авансирал ректален карцином не е успешно валидиран като диагностичен или прогностичен инструмент, приложим към рутинната клинична практика.

Въведение

Препоръките за лечение на рака на ректума са под постоянна оценка. При локално авансирал ректален карцином (ЛАРК) стадий Т3, стадий Т4 или позитивни лимфни възли, предоперативната (неoadювантна) химиолъчетерапия (ХЛТ) значително подобрява локалния контрол и намалява токсичността в сравнение с постоперативната ХЛТ, но със сходни нива на преживяемост [3, 4]. Способността да се постигне патологично намаляване на стадия или пълен патологичен отговор (pCR), след неoadювантна ХЛТ е свързан с подобрена преживяемост, понижен локален рецидив и по-висока честота на сфинктер-съхраняващите операции [5]. Проспективната идентификация на пациентите, които имат по-голяма вероятност да реагират на предоперативна ХЛТ е важна за намаляването на терапевтичната морбидност и подобряването на преживяемостта и локалния контрол при ЛАРК. Последните проучвания оценяват потенциала на генетични биомаркери за предсказване на изхода при ЛАРК, третиран с неoadювантна ХЛТ [7, 8].

Материали и методи

Нашата цел беше да проучим текущата литература за най-често изследваните биомаркери за прогнозиране на резултата от неoadювантна ХЛТ при пациенти с ЛАРК. Използвахме PubMed за литературен обзор, използвайки следните ключови думи: "ректален рак", "отговор", "предсказване", "микроарей", "генна експресия", "ми-РНК" и "иРНК". Спряхме се на тези статии, които специално се отнасят до способността на генетичния профил да предскаже отговор на неoadювантна ХЛТ при ЛАРК (гени, микроРНК или дълга некодираща РНК). Статиите, в които е анализирано предсказването на отговор към ХЛТ в клетъчни линии на колоректален рак, не бяха включени.

Резултати

Първото проучване за прилагане на генетичен подпис за прогнозиране на отговор на неoadювантно лечение при рак на ректума е проведено през 2005 г [9]. То включва 30 пациенти от база данни, отнасяща се до Германската група за изследване на рака на ректума [22], които са получили предоперативна ХЛТ (50.4 Gy радиация, приложена в 28 фракции и непрекъснатата инфузия на 5FU). Те са претърпели операция 6 седмици след завършване на неoadювантната терапия. Отговорът на лечението е измерен въз основа на: туморно свиване (при сравнение с предоперативна ендолуменна ехография) и ремисия на тумора по скалата на Dworak (3-4 ст. се считат за non-респондери) [23]. Въз основа на намаляване размерите на туморите са идентифицирани 54 гени, експресирани по различен начин между респондери и non-респондери в туморни проби, екстрахирани преди неoadювантната терапия. Използвайки тези гени, са постигнати 83% прецизност при прогнозирането, както за респондерите, така и за non-респондерите, като по този начин доказват, че изследването на генетичната експресия чрез микроареи е полезно при предсказване намаляването размера на тумора, в отговор на предоперативна ХЛТ.

Проучване	Материал	Брой пациенти	ХЛТ режим	Отговор	Открити гени	Резултат
Ghadimi et al. 2005	тумор-тъканна биопсия	30	50.4Gy/28 фракции 5FU	Редукция на размера	54 гена SMC1, CLMN, CDC42BPA, FLNB	Прецизност при прогнозирането 83%
Kim et al. 2007	тумор-тъканна биопсия	31	50.4Gy/28 фракции 5FU + левковорин Капецитабин + иринотекан	Dworak regression grade	95 гена TYMS, RAD23B	Точност 87%, чувствителност 100%, специфичност 82%
Rimkus et al. 2008	тумор-тъканна биопсия	43	45Gy 5FU	Becker regression grade	42 гена CASP1, SLC35E1, CCNK, STAT2	Точност 81%, чувствителност 71%, специфичност 86%
Nishioka et al. 2011	тумор-тъканна биопсия	17	40Gy/20 фракции S1	Japanese Classification of Colorectal Carcinoma	17 гена MMP7, MMP9, MMP6, RRM1, MMP14	
Casado et al. 2011	тумор-тъканна биопсия Парафинови блокчета	25 94	50.4Gy/28 фракции 25 оксалиплатин + ралтитрексед	Dworak regression grade	24 гена 6 свръхекспресирани ALDH1A1, CDKN1, FOS	Non-респондери: точност 86%; чувствителност 87%; специфичност 82%
Palma et al. 2014	тумор-тъканна биопсия	26	50.4Gy/28 фракции Капецитабин/капецитабин + оксалиплатин	Mandard regression grade	257 гена: c-MYC, GNG4, POLA, RRM1	Точност 85%; чувствителност 60%; специфичност 100%
Grantt et al. 2014	тумор-тъканна биопсия	36	50.4Gy/30 фракции 5FU	American Joint Committee on Cancer	183 гена RAD50	Без отговор, чувствителност 33%; специфичност 100%

Kim et al. провеждат проучване през 2007 г., използвайки проби от 46 пациенти. [11]. Неoadювантното лечение включва лъчетерапия (50.4Gy в 28 фракции) и химиотерапия (5FU + левковорин, капецитабин или капецитабин + иринотекан). Пациентите претърпяват операция 6 седмици след завършване на лечението; туморният отговор е класифициран

според системата на Dworak за регресия на тумора. Идентифицирана е група от 95 гени. Чрез метода за кръстосана валидация (LOOCV) установяват, че тази група гени позволява да се предскаже туморният отговор с 84% прецизност, 64% чувствителност, 95% специфичност, 88% положителна прогнозна стойност и 87% отрицателна прогнозна стойност. Два от 95-те гени изпъкват: тимидилатсинтаза (TYMS), която е силно изразена при отговорилите тумори, и RAD23B (участва в репарацията на нуклеотидната ексцизия), която е повишена в нон-респондерите и преди това е асоциирана с резистентни пациенти на лечение с 5FU. Тези два гена могат да се използват за оценка на отговора при лечение с 5FU.

Rimkus et al. [12] също изследват туморни биопсии на пациенти в стадий T3. Използваният терапевтичен подход включва радиация (45Gy) и продължителна инфузия на 5FU. Операцията е извършена след 4-6-седмици. Анатомичният патологичен отговор е класифициран според степента на регресия по Бекер (респондери в стадий 1 и нон-респондери в стадии 2-3). Откриват 42 статистически значими гени, които са изразени по различен начин сред респондерите и нон-респондерите. Пет от тях (FREM1, M-RIP, SDHC, TDE1 и USP42) имат намалена експресия в групата на респондерите, докато останалите гени са свръхекспресирани и участват в апоптозата (CASP1), транспорта (SLC35E1), клетъчното сигнализиране (STAT2 и ETS2) и клетъчния цикъл (CCNK). Чувствителност 71%, специфичност 86%, положителна прогнозна стойност 71%, а отрицателната прогнозна стойност е 86%.

Nishioka и колеги [13] създават група от 20 пациенти (17 в опитна група и 3 в групата за валидиране), които са получили лъчетерапия (40Gy във фракции от 2Gy), асоциирани със S1, перорален химиотерапевтичен агент, чието действие е подобно на капецитабин, който понастоящем не е разрешен за употреба в Европа. Използват скалата за оценка на отговора на Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum, според която пациентите са разпределени в групи 0-1 като нон-респондери и в групи 2-3 като респондери. Идентифицират 17 гени, изразени по различен начин, между двете подгрупи пациенти (респондери срещу нон-респондери). От тях пет са металопроотеинази (MMP1, MMP7, MMP9, MMP14 и MMP16).

Granttet публикува проучване през 2014 г., в което използва високопроизводителни нуклеотидни микроареи за създаване на генетичен профил, свързан с резистентен на ХЛТ ректален рак. 33 пациента са включени в проучването [15]. От тези, които отговарят на клиничните критерии за неoadювантна ХЛТ, е взета биопсия. Режимът на лечение включва 50.4 Gy в 30 фракции с 5-флуороурацил. Оперативното лечение е извършено приблизително 8-10 седмици след завършване на ХЛТ. Отговорите са оценени според критериите на American Joint Committee on Cancer (AJCC), като с AJCC 0-2 са респондери, а AJCC 3 - нон-респондери. Те идентифицират уникален профил генна експресия, съставен от 812 гени, свързани с ректален рак, имащи слаб отговор на ХЛТ. Този профил позволява класификацията на нон-респондерите със 100% точност.

Предсказване на отговора въз основа на микроареи от генна експресия в периферната кръв.

Значението на имунния отговор при лъчечувствителността на паренхимните органи позволява на Palma et al. [8], да предложи хипотеза, че профилирането на експресията на генни микроареи от моноклеарни клетки в периферна кръв може да идентифицира пациентите с отговор на ХЛТ при ЛАРК. В проучването участват 35 пациенти. Периферните

кръвни проби са взети преди неoadювантното лечение. РНК е екстрахирана и пречистена, за да се получи яДНК и яРНК за хибридизация на микроареи. Използвана е количествена RT-PCR за потвърждаване на данните от експеримента с микроареи. Резултатите са корелирани с патологичния отговор, съгласно критериите на Mandard и UICC (пациенти с туморна регресия от 1-2 клас и даунстейджинг са определени като респондери, а пациенти с 3-5 степен без даунстейджинг като нон-респондери). Авторите извършват множествен t-тест, за да намерят онези гени, които се различават значително по експресията между респондерите (n = 11) и нон-респондерите (n = 16) към ХЛТ. Разнообразно експресирани гени са BC 035656.1, CIR, PRDM2, CAPG, FALZ, HLADPB2, NUPL2 и ZFP36. Измерването на нивото на генна експресия на FALZ (p = 0.029), определено чрез qRT-PCR показва статистически значими разлики между двете групи. Профилирането на генната експресия разкрива нови гени в периферните кръвни проби от мононуклеарни клетки, които биха могли да предскажат респондери и нон-респондери на ХЛТ при пациенти с ЛАРК. От значение за неoadювантното лечение на ректален карцином е медиацията на отговор на мононуклеарните клетки.

Предсказване на отговора чрез използване на микроареи от микро-РНК

МикроРНК (miRNAs), открити през 1993 г., представляват сравнително ново поле в бързо развиващия се свят на генетиката и регулирането на генетичната експресия. Тяхната функция може да бъде много подобна на функцията на онкогените, както и на тумор-супресорните гени. [25] Абсолютната експресия на miRNA участва в множество патологии и някои промени в нейното регулиране са свързани с колоректален рак. Освен това е установено, че ХЛТ при ЛАРК може да предизвика промени в експресията на miRNA в нормални тъканни проби, а те са свързани с положителен отговор на лечението [26].

Svoboda et al. изследват промените на избрани микроРНК в биопсии от ректален карцином на пациенти, лекувани с ХЛТ (50,4 Gy в 1,8 фракции едновременно с капецитабин) и корелацията с отговора [17]. Микробиопсии са взети от едни и същи ректални карциноми преди терапията и две седмици след започване на неoadювантната ХЛТ. Радикалната операция е извършена на 6-та седмица след завършване на неoadювантното лечение. Туморният отговор на терапията е оценен микроскопски по системата на Dworak за туморна регресия. След проучване на нормални биопсии от лигавицата, изследователите установяват, че микроРНК mi-R125b и mi-R137 показват значителна индукция и проявяват същите тенденции на експресия в повечето проби две седмици след началото на терапията, затова са избрани за последващ анализ в общия набор от проби. Чрез RT-PCR са определени относителните експресии на микроРНК. Пациентите с ранни тумори имат по-ниска индукция в сравнение с пациентите с рак в по-висок стадий. MiR125b се даун-регулира в няколко случая на рак и се смята, че действа като туморен супресор. В това проучване, туморите с най-високото ниво на регулиране на mi-R125b две седмици след започване на терапията не показват даунстейджинг (слаб отговор). Mi-R137 се регулира значително само в най-напредналия T-стадий. Следователно по-високо индуцираните нива на mi-R125b и mi-R137 са свързани с по-лош отговор на терапията.

Проучване	Материал	Брой пациенти	ХЛТ	Отговор	Микро-РНК	Резултат
Svoboda et al. 2008	Тумор-тъканна биопсия	35	50.4Gy 28 фракции капецитабин	Dworak regression grade	Вариабилност между пациентите miR125b, miR137 ъпрегулирани по време на лечението: слаб отговор	
Della Vittoria Scarpati et al. 2012	Тумор-тъканна биопсия	35	45Gy капецитабин + оксалиплатин	Mandard regression grade	57 miRNAs: 13 потвърдени с PCR miR-622, miR-630	Чувствителност 100% Специфичност 100%
Kherelseid et al. 2013	Парафинови блокчета	12	Не е посочена	Mandard regression grade	miR-10b, miR-143, miR-145, miR-21, miR-519c-3p	Точност 100%
Svoboda et al. 2012	Тумор-тъканна биопсия	20	45+5.4Gy капецитабин/5FU	Mandard regression grade	miR-215, miR-190b, miR-29b-2	Точност 90%
Hotchi et al. 2013	Тумор-тъканна биопсия	43	40Gy; 20 фракции; S1	RECIST	2 miRNAs miR-223	Чувствителност 100%; Специфичност 78%

Предсказване на отговора чрез SAGE (сериен анализ на генна експресия)

През 2011 г. Casado и колеги извършват сериен анализ на генетичната експресия, за да идентифицират генетичен профил, който би могъл да предвиди отговора към ХЛТ при ЛАРК [14]. В група от 25 пациенти прилагат три неoadювантни терапевтични режима, съставени от оксалиплатин и ралтитрексед (130 mg/m² и 3 mg/m², дни 1, 21 и 42) три цикъла, в комбинация с радиотерапия (50.4 Gy в 28 фракции). Отговорът е определен в хирургична проба, следвайки скалата, използвана от Dworak и колеги [23]. За разлика от представените досега изследвания, тук целта е да се намерят гени, предсказващи лош отговор. Идентифицирани са 24 гени, свързани с липсата на отговор. Въз основа на тези резултати и наличната литература, екипът избира 53 гени за последващо ретроспективно проучване при 94 пациенти с локално авансирал ректален рак, които са получили неoadювантно лечение (при четири различни режима на ХЛТ). Използвани са съхранявани проби в парафинови блокчета, и е извършен qRT-PCR според протокола TaqManLowDensityArray (TLDA). Това позволява да се идентифицира генетичен профил, съставен от 13 гени, които предсказват липсата на отговор с точност 85%, чувствителност 87% и специфичност 82%.

Изводи

Съвременните решения за онкологично лечение все повече зависят от клинични и лабораторни предиктивни и прогностични маркери. Докато прогностичните маркери обясняват вариабилността, независимо от лечението, нашето проучване имаше за цел да използва предиктивните маркери, за да обясни вариабилността на резултата в отговор на лечението. Използването на микроареи води до серия от обещаващи резултати чрез

профилиране на тъканно генно експресиране на различни злокачествени заболявания, включително рак. Интересно е, че генните подписи се използват успешно като прогностичен предиктор при пациенти с колоректален карцином [9, 28]. Въпреки че профилирането на генни микроареи от тъканите е довело до обещаващи данни при рак, досега нито един от идентифицираните подписи или молекулни маркери при ЛАРК не е успешно валидиран като диагностичен или прогностичен инструмент, приложим към рутинната клинична практика. Само два гена, MMP4 и FLNA, са докладвани в повече от една публикация [10, 11, 13] и само един от 257 гена, RRM1 (важен маркер за резистентност към химиотерапия при туморите на дебелото черво [29]), е идентифициран от Nishioka и колеги [13].

Значително отклонение се открива след анализиране на литературата. Малкият брой пациенти в проучванията е едно от тях. Изследваните проучвания са включвали между 12 и 94 пациенти. Дори ако е определена значима корелация между биомаркер и измерване на резултата, литературата не показва възпроизводимост. Преди да се установи клиничната употреба, е необходимо да се направят проспективни проучвания, включващи голям брой пациенти, за да се постигнат възпроизводими резултати. Освен това значителната вариабилност на ХЛТ курсове може да попречи на тълкуването на резултатите. Неоадювантната ХЛТ при ЛАРК обикновено се състои от 5FU и 45-50.4Gy. Чрез използването на алтернативни химиотерапевтични средства в изследванията резултатите са по-трудни за интерпретиране. Например, добавянето на оксалиплатин или иринотекан към 5FU за подгрупа от пациенти може да обърка изходните измервания чрез промяна на базовия отговор. Промениливостта в скоровата система за отчитане на отговора също е спорно отклонение между проучванията. Нашият обзор подчертава, че повишената експресия на с-Мус иРНК е важен маркер за отговора към ХЛТ при ЛАРК, като основен компонент на неопластичния фенотип при ректални тумори. Някои микро-РНКи функционират като онкогени, докато други могат да функционират като туморни супресори. Микро-РНК-те се считат за главни регулатори на важни биологични процеси, като клетъчен растеж, апоптоза и развитие на рак [32-35]. Профилите на експресията на микро-РНК показват, че са обещаващи биомаркери за класифициране или прогнозиране на ракови заболявания [35, 36]. Освен това микро-РНК-те участват в различни етапи на патогенезата на колоректалния рак чрез регулиране на експресията на онкогени и тумор-супресорни гени [37]. Също така участват в регулирането на радиоустойчивостта [38, 39]. Поради малкия си размер, микро-РНК-те са по-стабилни и устойчиви на екологични, физически и химически стрес, в сравнение с иРНК. Следователно, техният анализ като фиксирани с формалин парафин-вградени тъканни проби може да осигури по-точна репликация на това, което ще се изследва в пресни тъкани [19]. Анализът на фиксирани с формалин и парафин проби, може лесно да бъде прехвърлен в клиничната практика.

Заклучение

Текущата литература не дава достатъчна подкрепа на никой от изследваните биомаркери, за да позволи клиничното му приложение, и по този начин да се предскаже изхода от неоадювантната ХЛТ при ректален рак. В бъдещи клинични проучвания, оценяващи неоадювантната ХЛТ при ректален рак, биомаркерите трябва да бъдат оценени перспективно, за да се определи тяхната роля като предиктори на изхода. Гените, идентифицирани в мононуклеарните периферни кръвни клетки, биха могли да предложат нови прозрения в нарушаването на имунната система при ЛАРК [8] и трябва да бъдат допълнително проучени.

Използвана литература

1. H. Brenner, A. M. Bouvier, R. Foschi et al., "Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study," *International Journal of Cancer*, vol. 131, no. 7, pp. 1649–1658, 2012.
2. J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent et al., "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012," *European Journal of Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, 2013.
3. R. Sauer, H. Becker, W. Hohenberger et al., "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 17, pp. 1731–1740, 2004.
4. R. Sauer, T. Liersch, S. Merkel et al., "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 16, pp. 1926–1933, 2012.
5. W. H. Yoon, H. J. Kim, C. H. Kim, J. K. Joo, Y. J. Kim, and H. R. Kim, "Oncologic impact of pathologic response on clinical outcome after preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer," *Annals of Surgical Treatment and Research*, vol. 88, no. 1, pp. 15–20, 2015.
6. P. Palma, R. Conde-Muñoz, A. Rodriguez-Fernandez et al., "The value of metabolic imaging to predict tumour response after chemoradiation in locally advanced rectal cancer," *Radiation Oncology*, vol. 5, article 119, 2010.
7. P. Palma, C. Cano, R. Conde-Muino et al., "Expression profiling of rectal tumors defines response to neoadjuvant treatment related genes," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, Article ID e112189, 2014.
8. P. Palma, M. Cuadros, R. Conde-Muino et al., "Microarray profiling of mononuclear peripheral blood cells identifies novel candidate genes related to chemoradiation response in rectal cancer," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, Article ID e74034, 2013.
9. B. M. Ghadimi, M. Grade, M. J. Difilippantonio et al., "Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 9, pp. 1826–1838, 2005.
10. T. Watanabe, Y. Komuro, T. Kiyomatsu et al., "Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles," *Cancer Research*, vol. 66, no. 7, pp. 3370–3374, 2006.
11. I. J. Kim, S. B. Lim, H. C. Kang et al., "Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer," *Diseases of the Colon and Rectum*, vol. 50, no. 9, pp. 1342–1353, 2007.
12. C. Rimkus, J. Friederichs, A. L. Boulesteix et al., "Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 6, no. 1, pp. 53–61, 2008.
13. M. Nishioka, M. Shimada, N. Kurita et al., "Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemo radiotherapy in rectal cancer," *Cancer Genomics & Proteomics*, vol. 8, no. 2, pp. 87–92, 2011.
14. E. Casado, V. M. Garcia, J. J. Sanchez et al., "A combined strategy of SAGE and quantitative PCR provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemo radiotherapy response and outcome in rectal cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 12, pp. 4145–4154, 2011.
15. G. A. Gantt, Y. Chen, K. DeJulius, A. G. Mace, J. Barnholtz-Sloan, and M. F. Kalady, "Gene expression profile is associated with chemoradiation resistance in rectal cancer," *Colorectal Disease*, vol. 16, no. 1, pp. 57–66, 2014.
16. T. Watanabe, T. Kobunai, T. Akiyoshi, K. Matsuda, S. Ishihara, and K. Nozawa, "Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by using reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of four genes," *Diseases of the Colon and Rectum*, vol. 57, no. 1, pp. 23–31, 2014.
17. M. Svoboda, L. I. Holla, R. Seif et al., "Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer," *International Journal of Oncology*, vol. 33,

no.3, pp.541–547, 2008.

18. G. Della Vittoria Scarpati, F. Falchetta, C. Carlomagno et al., “A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer,” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 83, no.4, pp.1113–1119, 2012.

19. E. A. H. Kheirleiseid, N. Miller, K. H. Chang et al., “miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy,” *International Journal of Colorectal Disease*, vol.28, no.2, pp.247–260, 2013.

20. M. Svoboda, J. Sana, P. Fabian et al., “MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients,” *Radiation Oncology*, vol.7, article 195, 2012.

21. M. Hotchi, M. Shimada, N. Kurita et al., “microRNA expression is able to predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer,” *Molecular and Clinical Oncology*, vol. 1, no. 1, pp. 137–142, 2013.

22. R. Sauer, R. Fietkau, C. Wittekind et al., “Adjuvant versus neoadjuvant radio chemotherapy for locally advanced rectal cancer. A progress report of a phase-III randomized trial (protocol CAO/ARO/AIO-94),” *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft*, vol.177, no.4, pp.173–181, 2001.

23. O. Dworak, L. Keilholz, and A. Hoffmann, “Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy” *International Journal of Colorectal Disease*, vol. 12, no. 1, pp. 19–23, 1997.

24. A.-M. Mandard, F. Dalibard, J.C. Mandard et al., “Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations”, *Cancer*, vol.73, no.11, pp.2680–2686, 1994.

25. S. K. Shenouda and S. K. Alahari, “MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?”, *Cancer and Metastasis Reviews*, vol.28, no.3-4, pp.369–378, 2009.

26. U. Drebber, M. Lay, I. Wedemeyer et al., “Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy”, *International Journal of Oncology*, vol.39, no.2, pp.409–415, 2011.

27. R. Glynne-Jones and M. Kronfli, “Locally advanced rectal cancer: a comparison of management strategies”, *Drugs*, vol. 71, no. 9, pp. 1153–1177, 2011.

28. E. Bandrés, R. Malumbres, E. Cubedo et al., “A gene signature of 8 genes could identify the risk of recurrence and progression in Dukes’ B colon cancer patients,” *Oncology Reports*, vol. 17, no.5, pp.1089–1094, 2007.

29. M. A. van de Wiel, J. L. Costa, K. Smid et al., “Expression microarray analysis and oligo array comparative genomic hybridization of acquired gemcitabine resistance in mouse colon reveals selection for chromosomal aberrations”, *Cancer Research*, vol.65, no.22, pp.10208–10213, 2005.

30. L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engele et al., “Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs,” *Nature*, vol. 433, no. 7027, pp. 769–773, 2005.

31. R. I. Gregory and R. Shiekhattar, “MicroRNA biogenesis and cancer,” *Cancer Research*, vol. 65, no. 9, pp. 3509–3512, 2005.

32. V. Ambros, “The functions of animal microRNAs”, *Nature*, vol. 431, no.7006, pp.350–355, 2004.

33. G. A. Calin and C. M. Croce, “MicroRNA signatures in human cancers”, *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 857–866, 2006.

34. E. A. Miska, “How microRNAs control cell division, differentiation and death”, *Current Opinion in Genetics and Development*, vol.15, no.5, pp.563–568, 2005.

35. C. Jay, J. Nemunaitis, P. Chen, P. Fulgham, and A. W. Tong, “miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer”, *DNA and Cell Biology*, vol.26, no.5, pp.293–300, 2007.

36. S.L. Yu, H.Y. Chen, P.C. Yang and J. J. W. Chen, “Unique MicroRNA signature and clinical outcome of cancers”, *DNA and Cell Biology*, vol.26, no.5, pp.283–292, 2007.

37. O. Slaby, M. Svoboda, J. Michalek, and R. Vyzula, “MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application”, *Molecular Cancer*, vol.8, article 102, 2009.

38. K. M. Lee, E. J. Choi, and I. A. Kim, “MicroRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR associated signaling”, *Radiotherapy and Oncology*, vol.101, no.1, pp.171–176, 2011.

39. W. Y.Mansour, N. V. Bogdanova, U. Kasten-Pisula et al., “Aberrant overexpression of miR-421 downregulates ATM and leads to a pronounced DSB repair defect and clinical hypersensitivity in SKX squamous cell carcinoma,” *Radiotherapy and Oncology*, vol.106, no.1, pp.147–154, 2013.