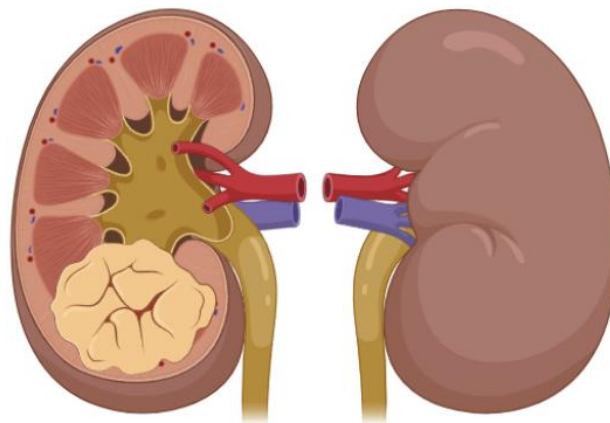


**“Μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα PITX1 σε ασθενείς
με καρκίνο του νεφρού.”**

**“Study of transcriptional factor PITX1 in kidney cancer
patients.”**



Ονοματεπώνυμο: Αζούριστον Ουρανία του Νικολάου

Επιβλέπουσα: κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Συνεπιβλέπων: κ. Αντώνιος Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος: κ. Ελένη Θώδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Κοτταρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2025

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, του Τμήματος Ιατρικής (ΤΙ), της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, προς μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων απόκτησης του Πτυχίου Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Επιτροπή:

- ❖ **Μαρία Σαμαρά :** Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- ❖ **Αντώνιος Γιακουντής:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- ❖ **Θώδου Ελένη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Περίληψη</i>	σελ. 5
<i>Abstract</i>	σελ. 6
<i>1. Εισαγωγή</i>	σελ. 7
<i>1.1 Νεφρός</i>	σελ. 7
<i>1.1.1 Ανατομία</i>	σελ. 7
<i>1.1.2 Ιστολογία</i>	σελ. 9
<i>1.1.3 Φυσιολογία</i>	σελ. 14
<i>1.2 Καρκίνος του Νεφρού</i>	σελ. 16
<i>1.2.1 Επιδημιολογία</i>	σελ. 16
<i>1.2.2 Παράγοντες Κινδύνου</i>	σελ. 17
<i>1.2.3 Ιστολογική Ταξινόμηση</i>	σελ. 19
<i>1.2.4 Σταδιοποίηση -Πρόγνωση</i>	σελ. 25
<i>1.2.5 Θεραπεία</i>	σελ. 30
<i>1.3 PITX1</i>	σελ. 32
<i>1.3.1 PITX1: Θέση και Πρωτεΐνη</i>	σελ. 32
<i>1.3.2 Αναπτυξιακός Ρόλος PITX1</i>	σελ. 33
<i>1.3.3 Συμμετοχή στον Καρκίνο</i>	σελ. 34
<i>2. Σκοπός</i>	σελ. 40
<i>3. Υλικά και Μέθοδοι</i>	σελ. 40
<i>3.1 Υλικό της Μελέτης</i>	σελ. 40
<i>3.2 Απομόνωση ολικού RNA</i>	σελ. 40
<i>3.3 Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός RNA</i>	σελ. 42
<i>3.3.1 Φωτομέτρηση RNA</i>	σελ. 42
<i>3.3.2 Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης</i>	σελ. 4
<i>3.3.3 Ηλεκτροφόρηση RNA</i>	σελ. 43
<i>3.4 Κατασκευή cDNA</i>	σελ. 43
<i>3.5 PCR Ελέγχου</i>	σελ. 45
<i>3.6 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative real time PCR, q-rtPCR)</i>	σελ. 46
<i>3.7 Στατιστική Ανάλυση</i>	σελ. 47

4. Αποτελέσματα.....σελ.	47
5. Συμπεράσματα και Συζήτηση.....σελ.	53
6. Βιβλιογραφία.....σελ.	55
7. Ευχαριστίες.....σελ.	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί την 12η σε συχνότητα κακοήθεια παγκοσμίως, με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται στην Ευρώπη. Παρουσιάζει μικρή διαφοροποίηση στα δύο φύλα και συγκαταλέγεται 9ος σε συχνότητα στα άρρενα και 14ος σε συχνότητα στα θήλεα άτομα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), περίπου το 45% των ατόμων που έχουν διαγνωστεί με τη νόσο θα καταλήξουν από αυτή.

Η πρωτεΐνη *PITX1* αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PITX1*, στο χρωμόσωμα 5 στον άνθρωπο. Κατατάσσεται στην οικογένεια *Pitx*, τα μέλη της οποίας ανήκουν στα homeobox γονίδια και κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες με ειδικευση αλληλουχίας (sequence-specific transcription factors/ SSTFs). Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, ρυθμίζοντας γονίδια-στόχους που βρίσκονται καθοδικά αυτών. Το *PITX1* γονίδιο έχει ογκοκατασταλτική δράση. Ωστόσο, σε πρόσφατες μελέτες φαίνεται να εμπλέκεται σε οδούς που αποδεδειγμένα προάγουν την κυτταρική επιβίωση και την πρόοδο της νόσου σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε την έκφραση του *PITX1* γονιδίου, σε επίπεδο mRNA, σε καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό 44 ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνο. Για το σκοπό αυτό έγινε απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης και ακολούθησε ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q-rtPCR) και σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των *PITX1* mRNA μορίων σε συνάρτηση με το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού προγράμματος IBM SPSS v29. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν 4.73 φορές περισσότερη έκφραση του *PITX1* στον καρκινικό ιστό έναντι του φυσιολογικού, και τα independent samples t-test έδωσαν P-value = 0.0008 για την διαφορικότητα της έκφρασης μεταξύ *PITX1* και *GAPDH*. Παράλληλα, έγινε συσχέτιση με τις κλινικοϊστολογικές παραμέτρους των ασθενών που μελετήσαμε, η οποία δεν έδειξε κάποια σχέση ανάμεσα στην έκφραση του *PITX1* και την ηλικία, το φύλο ή τον τύπο των κυττάρων του όγκου (διαυγοκυτταρικό και μη διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα).

ABSTRACT

Kidney cancer is the 12th most common malignancy in the world, with the highest rates occurring in Europe. It shows little variation in both sexes and ranks 9th in frequency in males and 14th in frequency in females. According to the World Health Organization (WHO), about 45% of people diagnosed with the disease will die from it.

The *PITX1* protein is a transcription factor encoded by the *PITX1* gene, on chromosome 5 in humans. It is classified under the *Pitx* family category, whose members belong to the homeobox genes and encode sequence-specific transcription factors/ SSTFs. They recognize specific DNA sequences and consequently regulate downstream target genes. *PITX1* gene has been proven to act as a tumor suppressor. However, in recent studies it appears to be involved in pathways proven to promote cell survival and disease progression in various types of cancer.

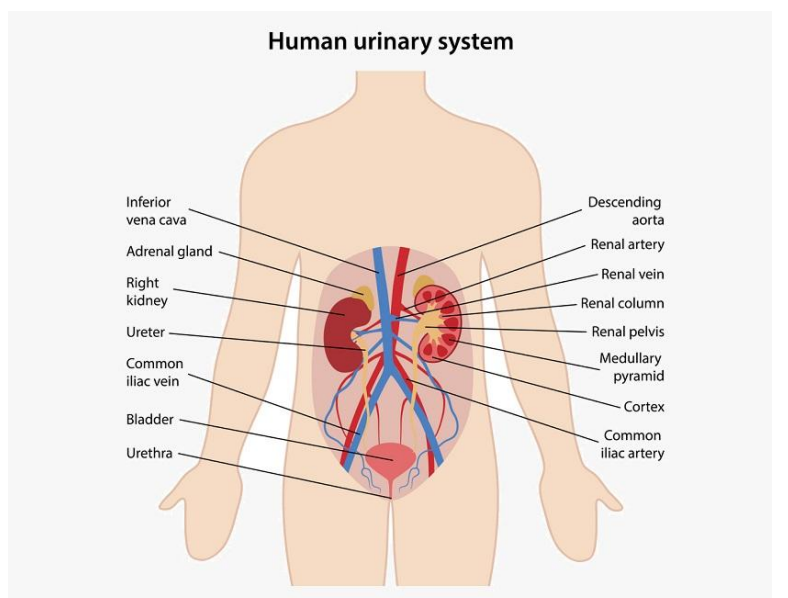
In this thesis we studied the expression of *PITX1* gene, at the mRNA level, in cancerous and adjacent normal tissue of 44 patients with renal cell cancer. To this end, total RNA isolation and cDNA synthesis with the aid of reverse transcriptase were performed, followed by real-time quantitative polymerase chain reaction (q-rtPCR) and relative quantification of *PITX1* mRNA expression levels in relation to the *GAPDH* reference gene. Statistical analysis was performed through the IBM SPSS v29 program software. Our results showed *PITX1* expression to be 4.73 times upregulated in cancer tissue than normal, and independent samples t test gave us a P-value = 0.0008 for the differential expression between *PITX1* and *GAPDH*. At the same time, there was a correlation analysis with the clinical histological parameters of the patients we studied, which did not show any relation between *PITX1* expression and age, sex or tumour cell type (clear cell and non-clear cell carcinoma).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΝΕΦΡΟΣ

1.1.1 Ανατομία

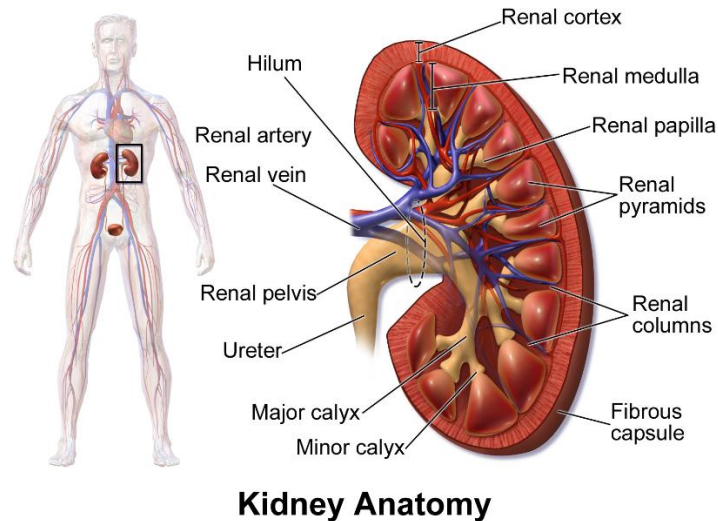
Το ουροποιητικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τη διήθηση και την απομάκρυνση υγρών, και άλλων ουσιών από το αίμα μέσω της παραγωγής και απέκκρισης των ούρων. Αποτελείται από τους νεφρούς, τη νεφρική πύελο, τους νεφρικούς κάλυκες, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα. Ολόκληρο το σύστημα θεωρείται εξωπεριτοναϊκό, καθώς βρίσκεται έξω από την μεμβράνη του περιτόναιου που επενδύει την κοιλιακή κοιλότητα. Οι νεφροί, οι νεφρικοί κάλυκες, οι ουρητήρες και η νεφρική πύελος τοποθετούνται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, δηλαδή στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, πίσω από τον υμένα του περιτόναιου, ενώ οι ουρητήρες φθάνουν μέχρι την ουροδόχο κύστη που εντοπίζεται υποπεριτοναϊκά, δηλαδή κάτω από το περιτόναιο. Η ουρήθρα τοποθετείται στα έξω γεννητικά όργανα. Οι δύο νεφροί, μήκους 10 έως 13 εκατοστών, βρίσκονται εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, στο επίπεδο του ομφαλού, ενώ η αιμάτωσή τους εκτελείται από την νεφρική αρτηρία και τη νεφρική φλέβα. Ο νεφρός, μέσω της διήθησης του πλάσματος, αποβάλλει τα ανεπιθύμητα συστατικά από το σώμα με τη μορφή των ούρων. Τα ούρα συλλέγονται αρχικά στη νεφρική πύελο – που βρίσκεται στην έσω επιφάνεια κάθε νεφρού- κι από εκεί περνάνε στον εκάστοτε ουρητήρα προκειμένου να οδηγηθούν στην ουροδόχο κύστη. Η ουροδόχος κύστη συσπάται περιστασιακά, στέλνοντας τα ούρα στην ουρήθρα, απ' όπου και αποβάλλονται από το σώμα. Η ουρήθρα παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό, με το μέγεθος και την πορεία της να είναι χαρακτηριστικά για κάθε φύλο. Τα όργανα καθοδικά των νεφρών χαρακτηρίζονται ως αποχετευτική μοίρα, καθώς ο ρόλος τους είναι αποκλειστικά η απομάκρυνση των ούρων από το σώμα. Η παραγωγή των ούρων λαμβάνει χώρα στους νεφρούς.¹



Εικόνα 1. Το ουροποιητικό σύστημα στον άνθρωπο²

Οι δύο νεφροί έχουν σχήμα φασολιού και ζυγίζουν περίπου 115-170 γραμμάρια έκαστος. Ο αριστερός νεφρός είναι μεγαλύτερος του δεξιού και βρίσκεται υψηλότερα, καθώς ο δεξιός νεφρός πιέζεται από το ήπαρ. Το παρέγχυμα του νεφρού σε διατομή αποκαλύπτει δύο περιοχές

με διαφορετικές αποχρώσεις, εσωτερικά απαντά ο σκουρόχρωμος μυελός και εξωτερικά απαντά ο ανοιχτόχρωμος φλοιός.³ Ο μυελός αποτελείται από νεφρικούς λοβούς που έχουν πυραμοειδή διάταξη. Οι κορυφές των μυελικών πυραμίδων καλούνται νεφρικές θηλές και προβάλλουν στον νεφρικό κάλυκα. Οι νεφρικοί κάλυκες συνεχονται σε μεγαλύτερους (συνήθως 2-3 ανά νεφρό), οι οποίοι με τη σειρά τους σχηματίζουν τη νεφρική πύελο, απ' όπου ξεκινά ο ουρητήρας. Οι πυραμίδες χωρίζονται μεταξύ τους από προεκτάσεις του νεφρικού φλοιού, τις νεφρικές στήλες. Οι νεφρικές στήλες εξυπηρετούν την αιμάτωση και τη θρέψη των νεφρών.^{4,5}



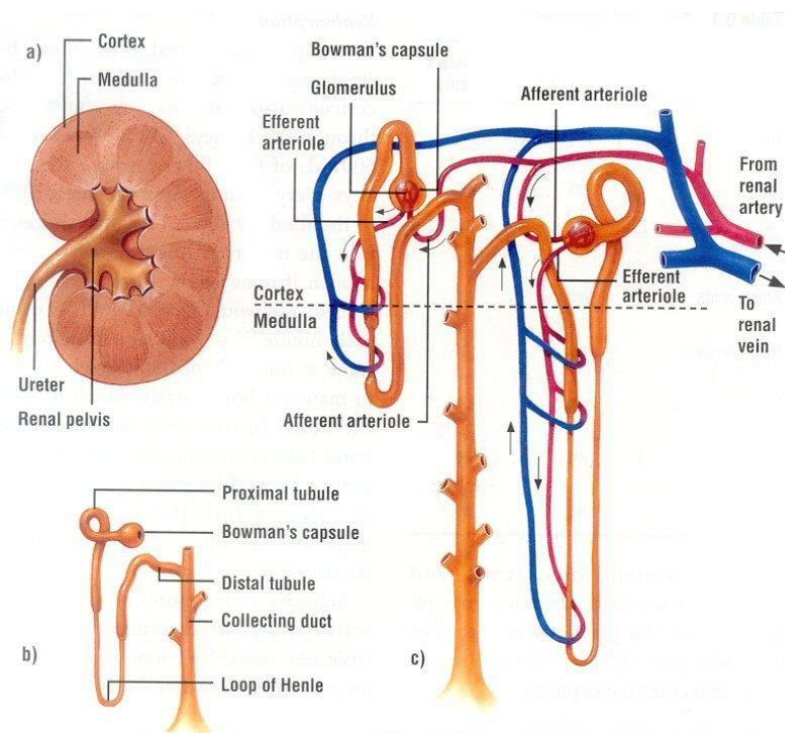
Εικόνα 2. Νεφρός σε διατομή⁶

Οι λειτουργικές μονάδες του νεφρού είναι οι νεφρώνες. Κάθε νεφρός αποτελείται από περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Οι νεφρώνες σχηματίζονται κατά την εμβρυογένεση. Κάθε νεφρώνας διαθέτει το νεφρικό σωματίο- που αποτελείται από το σπείραμα και την κάψα του Bowman- κι ένα εσπειραμένο σωληνάριο που καταλήγει στη νεφρική πύελο. Ο νεφρώνας χωρίζεται στο αγγειακό και το σωληναριακό τμήμα με βάση τις λειτουργίες του. Στο αγγειακό τμήμα του νεφρώνα, το οποίο αποτελείται από το σπείραμα- ένα σύμπλεγμα τριχοειδών αγγείων που επικάθονται στα μεσαγγειακά κύτταρα- πραγματοποιείται η διήθηση του εισερχόμενου αίματος μέσω του προσαγωγού αρτηριδίου, το οποίο αποτελεί διακλάδωση της νεφρικής αρτηρίας. Το προσαγωγό αρτηρίδιο διαιρείται σε τριχοειδή που δημιουργούν ένα αναστομωτικό δίκτυο. Τα σπειραματικά τριχοειδή αγγεία συνεχονται και σχηματίζουν τα απαγωγά αρτηρίδια, που απομακρύνουν το μη διηθημένο αίμα.^{1,3}

Τα απαγωγά αρτηρίδια διακλαδίζονται σε περισωληναριακά τριχοειδή, τα οποία υποβοηθούν στην ανταλλαγή ουσιών μεταξύ του σωληναριακού τμήματος του νεφρώνα και του κυκλοφορικού συστήματος. Αυτά σχηματίζουν φλεβίδια που εκβάλλουν στην νεφρική φλέβα. Το υγρό που προκύπτει μετά τη διήθηση, περνά από το σπείραμα στο σωληναριακό τμήμα και ξεκινά με την κάψα του Bowman, ένα επιθηλιακό έλυτρο που περιβάλλει το σπείραμα και συγκεντρώνει το διήθημα.^{1,3}

Στη συνέχεια ακολουθεί το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, ένα έντονα περιελιγμένο τμήμα του σωληναρίου με έντονα λαχνωτή επιφάνεια που αυξάνει το εμβαδόν του και στη συνέχεια γίνεται πιο ευθύ και αποτελεί το κατιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Το παχύτερο τμήμα της αγκύλης του Henle επιστρέφει στον φλοιό, διαπλέκεται με τα αρτηρίδια και δημιουργεί την παρασπειραματική συσκευή, μία δομή με πρωταγωνιστικό ρόλο στη ρύθμιση της νεφρικής λειτουργίας, καθώς ελέγχει τη ροή του αίματος στους νεφρώνες και τον ρυθμό διήθησης.

Κοντά στο αγγειώδες σπείραμα, το νεφρικό σωληνάριο δημιουργεί ένα δεύτερο εσπειραμένο σωληνάριο, το άπω, το οποίο βρίσκεται στον φλοιό και εκβάλλει στο αθροιστικό σωληνάριο μέσω ενός βραχέος εμβόλιμου σωληναρίου. Το αθροιστικό σωληνάριο συλλέγει το διήθημα που πλέον έχει σχηματίσει τα ούρα και το αδειάζει στη νεφρική πύελο.^{1,3}

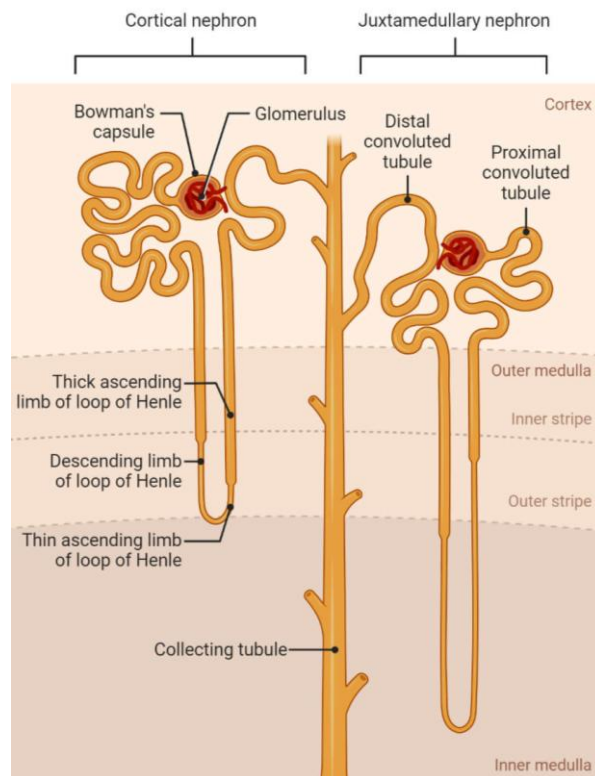


Εικόνα 3. Ανατομία του νεφρού. (Α) Σχηματική αναπαράσταση των νεφρών και των συνδέσεών τους με το αγγειακό σύστημα: η νεφρική αρτηρία που προέρχεται από την αορτή με κόκκινο χρώμα και η νεφρική φλέβα που πηγαίνει στην κοίλη φλέβα με μπλε χρώμα. (Β) ο νεφρός αποτελείται από έναν φλοιό που περιέχει σπειράματα, εγγύς και Άπω εσπειραμένα σωληνοειδή τμήματα του νεφρώνα και ένα μυελό που περιέχει το ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου, την αγκύλη του Henle και μέρος του συστήματος συλλογής. (Γ) αναπαράσταση των διαφόρων τμημάτων του νεφρώνα⁷

1.1.2 Ιστολογία

Ο νεφρός διακρίνεται μακροσκοπικά σε δύο τμήματα: τον φλοιό εξωτερικά και τον μυελό εσωτερικά. Το σπείραμα και το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο εντοπίζονται στο φλοιό, ενώ η αγκύλη του Henle, που ακολουθεί, διεισδύει στον μυελό και επιστρέφει στη συνέχεια στον φλοιό, όπου συνδέεται με το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, το οποίο καταλήγει στα αθροιστικά σωληνάρια.

Με βάση το μήκος της αγκύλης του Henle και τη θέση τους στο παρέγχυμα οι νεφρώνες διακρίνονται σε φλοιώδους και μυελικής μοίρας. Οι νεφρώνες φλοιώδους μοίρας απαντούν κοντά στην φλοιώδη επιφάνεια και οι αγκύλες του Henle είναι βραχείες και μόλις εισέρχονται στην εξωτερική στιβάδα της μυελώδους μοίρας. Οι νεφρώνες της μυελικής μοίρας απαντούν σε μεγαλύτερο βάθος, κοντά στην συμβολή φλοιού και μυελού και οι αγκύλες του Henle έχουν μεγάλο μήκος και εκτείνονται βαθιά μέσα στη μυελώδη μοίρα.¹¹



Εικόνα 4. Οι δύο τύποι νεφρώνων: φλοιώδεις (αριστερά) και παραμυελικοί (δεξιά)⁸

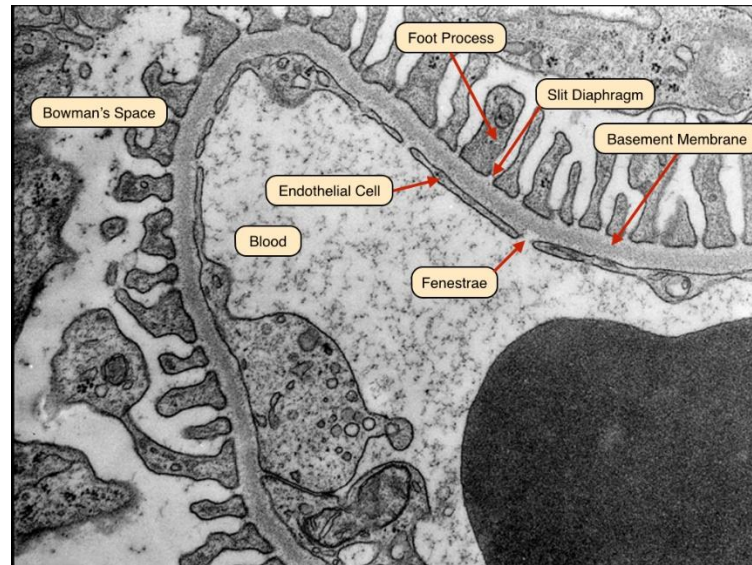
1.1.2.1 Σπείραμα

Το σπείραμα σχηματίζεται από διαπλεκόμενα τριχοειδή αγγεία που περιβάλλονται από την κάψα του Bowman. Τα σπειραματικά τριχοειδή πλαισιώνονται από το προσαγωγό και τα απαγωγό αρτηρίδιο, τα οποία ρυθμίζουν την πίεση εντός του σπειράματος και μπορούν να φιλτράρουν μεγάλους όγκους αίματος. Η κάψα του Bowman αποτελείται από το περίσπλαγχνο πέταλο, το οποίο περιβάλλει τα σπειραματικά τριχοειδή αγγεία και το περίτονο πέταλο, που καλύπτει όλη την κάψα εκτός από τον αγγειακό πόλο. Στο χώρο μεταξύ του περίσπλαγχνου και του περιτόνου πετάλου εισέρχεται το πρωτογενές διήθημα.¹¹

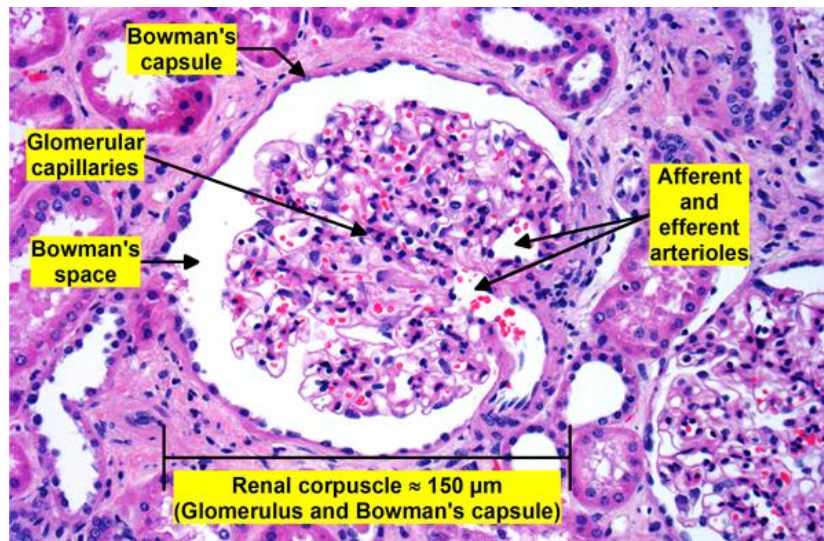
Ο φραγμός της σπειραματικής διήθησης επιτυγχάνεται με τη δράση τριών βασικών δομών:

- Ενδοθήλιο των τριχοειδών του σπειράματος: επενδύει εσωτερικά τα τριχοειδή του σπειράματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν έχουν διαφράγματα στις συνδέσεις μεταξύ τους και για το λόγο αυτό δημιουργούνται μικροί πόροι με διάμετρο 70 έως 100 nm που επιτρέπουν τη διέλευση του πλάσματος, αλλά όχι των κυττάρων του αίματος. Η πλευρά των κυττάρων που βλέπει προς τον αυλό είναι αρνητικά φορτισμένη.¹¹
- Βασική μεμβράνη σπειράματος (GBM): αποτελεί τη μεσαία και πιο σημαντική μεμβράνη του φραγμού διήθησης. Βρίσκεται μεταξύ του ενδοθηλίου των τριχοειδών και των ποδοκυττάρων και αποτελείται από εξωκυττάρια πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των πρωτεογλυκανών, της λαμινίνης, της φιμπρονεκτίνης και του κολλαγόνου τύπου IV. Είναι ένα παχύ στρώμα που προσδίδει επιλεκτικότητα στο φιλτράρισμα, καθώς εμποδίζει την διέλευση μεγαλομοριακών ουσιών και εμφανίζει και εκλεκτικότητα φορτίου. Συμβάλλει στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των σπειραματικών τριχοειδών.¹¹

- Ποδοκύτταρα/ Σχισμοειδή διαφράγματα των ποδοκυττάρων: λεπτή μεμβράνη που αποτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα που αποτελούν το εξωτερικό «τμήμα» του φραγμού, επιτρέποντας τη διέλευση μόνο σε πολύ μικρά μόρια. Τα ποδοκύτταρα είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα κύτταρα που φέρουν χαρακτηριστικές προεκβολές λόγω εξειδικευμένων πρωτεϊνών, όπως είναι η νεφρίνη, η συναπτοποδίνη, η ποδοσίνη και άλλα μόρια. Οι προεκβολές των γειτονικών ποδοκυττάρων αλληλομπλέκονται και δημιουργούνται ανάμεσά τους ελικοειδείς σχισμές, οι οποίες συνδέονται μέσω της διαφραγματικής σχισμής και επιτρέπουν τη συνεχή ροή του διηθήματος από τα τριχοειδή προς τον χώρο ανάμεσα στα πέταλα της κάψας του Bowman.¹¹



Εικόνα 5. Φραγμός σπειραματικής διήθησης. Αποτελείται από τρεις δομές: το ενδοθήλιο των τριχοειδών του σπειράματος (endothelial cell) που χαρακτηρίζεται από πόρους (fenestrae), τη βασική μεμβράνη του σπειράματος (Basement membrane) και τα σχισμοειδή διαφράγματα (slit diaphragm) των ποδοκυττάρων.⁹



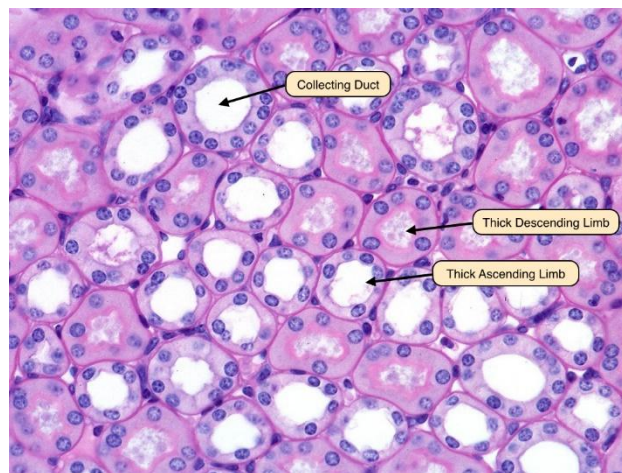
Εικόνα 6. Μικροσκοπική εικόνα νεφρικού σωματίου (renal corpuscle) με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (HE). Απεικονίζονται η κάψα του Bowman (Bowman's capsule), ο ενδιάμεσος χώρος (Bowman's space), τα προσαγωγά και απαγωγά αρτηρίδια (afferent and efferent arterioles) και τα σπειραματικά τριχοειδή (glomerular capillaries)¹⁰

1.1.2.2. Εγγύς Εσπειραμένο Σωληνάριο

Η κάψα του Bowman καταλήγει στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, το οποίο επενδύεται από απλό κυβικό επιθήλιο. Στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο επαναρροφάται το μεγαλύτερο ποσοστό διηθημένου ύδατος, γλυκόζης και ηλεκτρολυτών. Η επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων προς τον αυλό φέρει ψηκτροειδή παρυφή, δηλαδή μικρολάχνες, που αυξάνουν σημαντικά την επιφάνεια επαφής με το σπειραματικό υπερδιήθημα, επιτρέποντας την επαναρρόφηση. Τα κύτταρα φέρουν επίσης πολυάριθμα μιτοχόνδρια που καλύπτουν τις ενεργειακές ανάγκες της αντλίας Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης που ευθύνεται για τη διακυτταρική μεταφορά ποσοστού της τάξης 60 έως 80% του υπερδιηθήματος. Επιπρόσθετα υπάρχουν και πολλά λυσοσώματα που εξυπηρετούν την επαναρρόφηση πολυπεπτιδίων.¹¹

1.1.2.3. Αγκύλη του Henle

Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο γίνεται στη συνέχεια πιο ευθύ και συνιστά την αγκύλη του Henle, που εισέρχεται στο μυελό και αποτελείται επιπλέον από το λεπτό κατίον, το λεπτό ανιόν και το παχύ ανιόν τμήμα. Το σωληνάριο γίνεται πιο λεπτό και τα κύτταρά του μικρότερα και με λιγότερα μιτοχόνδρια και μικρολάχνες. Το λεπτό κατίον, όπως και το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο είναι πολύ διαπερατό στο νερό, καθώς περιέχουν μεγάλη ποσότητα ακουαπορινών. Στη συνέχεια το σωληνάριο ανεβαίνει προς τα επάνω και επιστρέφει στον φλοιό. Το λεπτό ανιόν τμήμα είναι αδιαπέραστο στο νερό. Σταδιακά τα κύτταρα αυξάνονται πάλι σε μέγεθος και σε περιεκτικότητα μιτοχονδρίων και μικρολαχνών (παχύ ανιόν τμήμα), ώστε να συμμετάσχουν στην ενεργή μεταφορά του νατρίου και την αραίωση των ούρων.¹¹

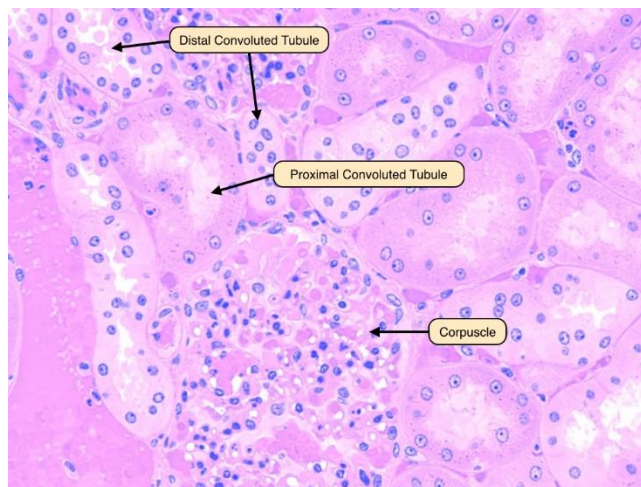


Εικόνα 7. Μικροσκοπική απεικόνιση της αγκύλης του Henle (αποτελείται από το Thick Descending Limb και το Thick Ascending Limb) και Σωληνάρια συλλογής (Collecting Duct)⁹

1.1.2.4. Παρασπειραματική συσκευή και Άπω Εσπειραμένο Σωληνάριο

Η παρασπειραματική συσκευή είναι μία δομή που ρυθμίζει τη σπειραματική διήθηση. Η περιοχή αυτή βρίσκεται κοντά στον αγγειακό πόλο του σπειράματος. Περιλαμβάνει την πυκνή κηλίδα, το εξωσπειραματικό μεσάγγειο, το τελικό τμήμα του προσαγωγού αρτηριδίου και το αρχικό τμήμα του απαγωγού αρτηριδίου. Τα κοκκώδη κύτταρα του προσαγωγού αρτηριδίου του σπειράματος συνδέονται με μεσαγγειακά, λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα παρασπειραματικά κύτταρα εκκρίνουν ρενίνη ως απάντηση στη μείωση του όγκου του πλάσματος ή της συγκέντρωσης των κατιόντων νατρίου. Τα κύτταρα του άπω εσπειραμένου

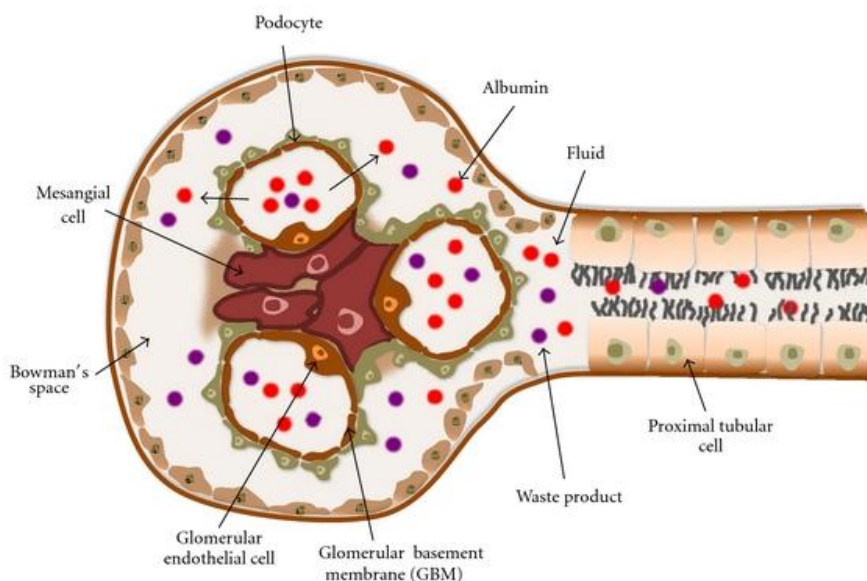
σωληναρίου είναι διαφοροποιημένα κύτταρα που περιέχουν πολυάριθμα μιτοχόνδρια λόγω αυξημένων ενεργειακών αναγκών. Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο εντοπίζεται στον φλοιό και επενδύεται από απλό κυβικό επιθήλιο.



Εικόνα 8 Στο μικροσκόπιο: Εγγύς Εσπειραμένο Σωληνάριο (Proximal Convoluted Tubule), Άπω Εσπειραμένο Σωληνάριο (Distal Convoluted Tubule) και Νεφρικό Σωμάτιο (Corpuscle)⁹

1.1.2.5. Αθροιστικά σωληνάρια και πόροι

Στα αθροιστικά σωληνάρια συγκεντρώνονται και συμπυκνώνονται τα ούρα και προωθούνται στις θηλές, στους νεφρικούς κάλυκες και στη νεφρική πύελο, ώστε να καταλήξουν στον ουρητήρα. Τα σωληνάρια επενδύονται από απλό κυβικό επιθήλιο και διακρίνονται δύο τύποι κυττάρων: τα σκουρόχρωμα ή εμβόλιμα κύτταρα, τα οποία ρυθμίζουν την έκκριση των κατιόντων υδρογόνου και των διττανθρακικών ιόντων, καθώς και τα κύτταρα των αθροιστικών σωληναρίων, τα οποία είναι πιο αραιοχρωματικά, φέρουν κροσσούς και διαθέτουν διαύλους νερού για την επαναρρόφησή του.¹¹



Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση του νεφρώνα. Το σπείραμα (glomerulus) αποτελείται από μεσαγγειακά κύτταρα (mesangial cell) και το ενδοθήλιο των τριχοειδών του σπειράματος (glomerular endothelial cell), τη βασική μεμβράνη (GBM) και τα ποδοκύτταρα (podocytes). Το υγρό που περιέχει αλβουμίνη και απόβλητα διηθείται μέσω του σπειράματος, εισέρχεται

1.1.3 Φυσιολογία

Το ουροποιητικό σύστημα διατελεί πρωταγωνιστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανθρώπινου σώματος, καθώς ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις πολλών συστατικών του πλάσματος και απομακρύνει άχρηστα παραπροϊόντα του μεταβολισμού. Οι νεφροί αποτελούν το κύριο όργανο που εκτελεί την εκκαθάριση του πλάσματος, μέσω της διήθησης, διατηρώντας τα θρεπτικά συστατικά και αποβάλλοντας τα άχρηστα παραπροϊόντα μέσω των ούρων. Σε γενικές γραμμές, οι νεφροί διατηρούν τον όγκο, την ωσμωμοριακότητα και την οξεοβασική ισορροπία των σωματικών υγρών, μέσω της ρύθμισης του ισοζυγίου του νερού και του NaCl, αλλά και της απομάκρυνσης οξέων και βάσεων με τα ούρα.¹

Πιο συγκεκριμένα, οι νεφροί είναι υπεύθυνοι για:

- Διατήρηση του ισοζυγίου του νερού.
- Διατήρηση της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών, μέσω της ρύθμισης της ποσότητας και της συγκέντρωσης των ιόντων του εξωκυττάριου υγρού, συμπεριλαμβανομένων των Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , HCO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} και του Mg^{2+} .
- Διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας μέσω της ρύθμισης της αποβολής με τα ούρα ιόντων H^+ και HCO_3^- .
- Ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, που εξασφαλίζει την παραγωγή του ενζύμου ρενίνης από την παρασπειραματική συσκευή, το οποίο μετατρέπει το αγγειοτενσινογόνο σε αγγειοτενσίνη I, εκκινώντας το σύστημα και εξασφαλίζοντας τη συστολή των αγγείων και την κατακράτηση κατιόντων νατρίου και νερού.
- Ρύθμιση της ερυθροποίησης, μέσω της παραγωγής της ερυθροποιητίνης, μίας γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης η οποία εξασφαλίζει την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών.
- Ρύθμιση της βιταμίνης D, μέσω της μετατροπής της στην πιο δραστική της μορφή, την καλσιτριόλη, η οποία διατηρεί το ισοζύγιο φωσφόρου- ασβεστίου στον οργανισμό και διασφαλίζει την ομοιόσταση των οστών.
- Απέκκριση εξωγενών χημικών ουσιών και φαρμάκων (τοξίνες, φάρμακα, μη θρεπτικές ουσίες κλπ.) μέσω διήθησης και απέκκρισής τους.¹

Οι νεφροί επιτυγχάνουν τη ρύθμιση της ομοιόστασης εξασφαλίζοντας τρεις βασικές διεργασίες:

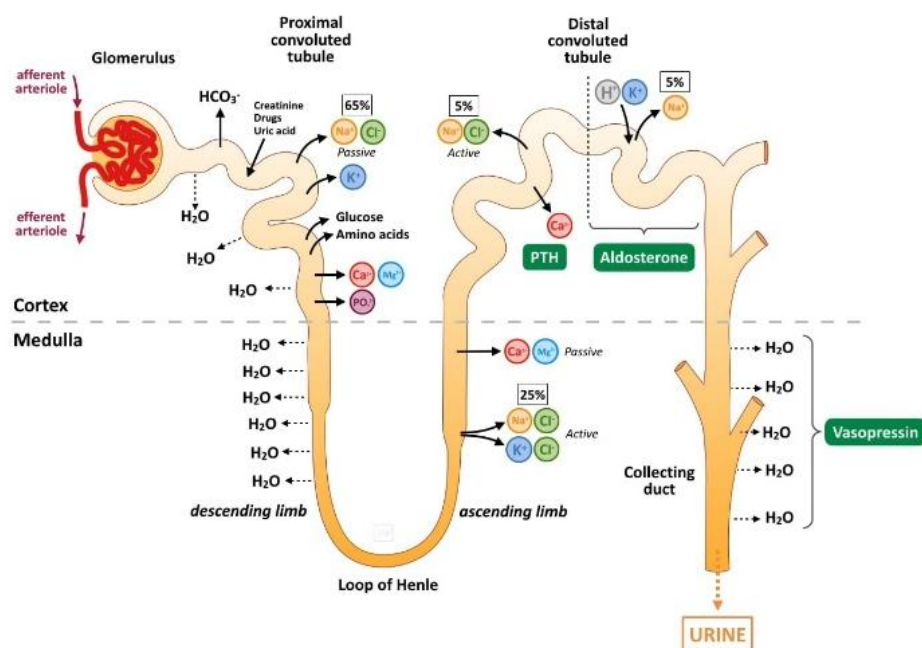
- Σπειραματική διήθηση του πλάσματος: Το πλάσμα διηθείται από τα τριχοειδή του σπειράματος (περίπου 20% του πλάσματος που εισέρχεται στα σπειραματικά

τριχοειδή) και περνά στην κάψα του Bowman. Περίπου 125 ml διηθήματος σχηματίζονται από τα σπειράματα των δύο νεφρών ανά λεπτό και περιέχουν άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού, περίσσεια αλάτων και νερό για το σχηματισμό των ούρων. Ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης εξαρτάται από την πίεση και την επιφάνεια της διήθησης, καθώς και τη διαπερατότητα στο νερό.¹

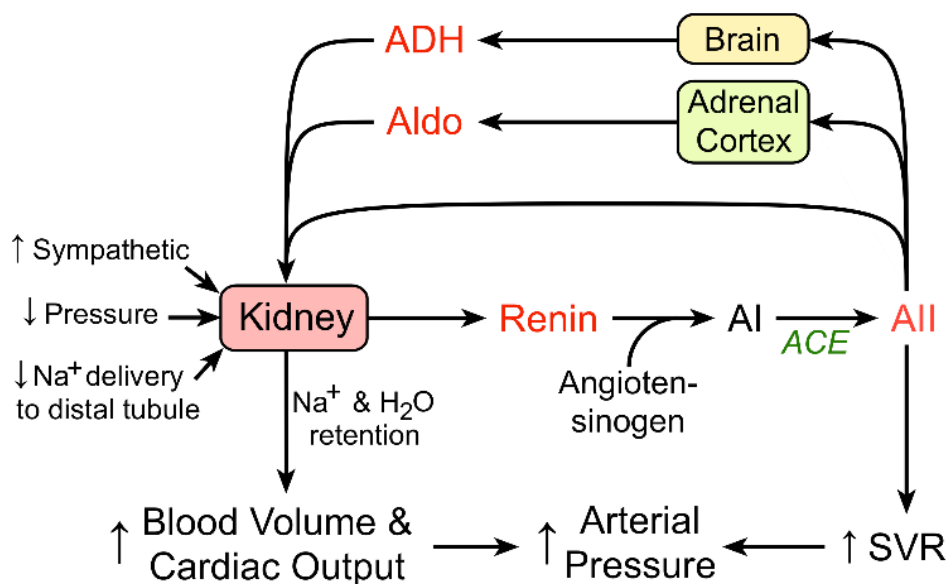
- **Σωληναριακή επαναρρόφηση:** Τα νεφρικά σωληνάκια, εξασφαλίζουν την επιστροφή των χρήσιμων για το σώμα θρεπτικών στοιχείων στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των περισωληναριακών τριχοειδών, τα οποία λαμβάνουν τα θρεπτικά από τον αυλό των σωληναρίων και τα επιστρέφουν στην καρδιά μέσω του φλεβικού συστήματος. Ημερησίως διηθούνται περίπου 180 λίτρα πλάσματος, εκ των οποίων επαναρροφούνται τα 178.5. Το υπόλοιπο 1.5 λίτρο είναι αυτό που θα σχηματίζει τα ούρα. Η επαναρρόφηση των ουσιών επιτυγχάνεται με απλή διάχυση, υποβοηθούμενη (κλίση συγκέντρωσης) ή ενεργητική μεταφορά (πρωτογενής-δευτερογενής) και ενδοκύττωση.¹
- **Σωληναριακή έκκριση:** Για το πλάσμα που δεν έχει διηθηθεί στο σπείραμα (~80%) υπάρχει ένας δεύτερος μηχανισμός απομάκρυνσης των άχρηστων ουσιών, ο οποίος έγκειται στην ικανότητα εκλεκτικής μεταφοράς ουσιών από τα περισωληναριακά τριχοειδή στον αυλό των σωληναρίων, που προσθέτουν τις ουσίες αυτές στο διήθημα του σπειράματος. Η μεταφορά γίνεται διακυτταρικά μέσω ενεργού μεταφοράς, ή παρακυτταρικά μέσω των συνδέσεων των κυττάρων.

Οποιοδήποτε συστατικό του πλάσματος δεν επαναρροφάται περνά από τα σωληνάκια στη νεφρική πύελο για να αποβληθεί από το σώμα μέσω των ούρων.¹

RENAL PHYSIOLOGY



Εικόνα 10. Διάγραμμα απεικόνισης φυσιολογίας του νεφρού¹³

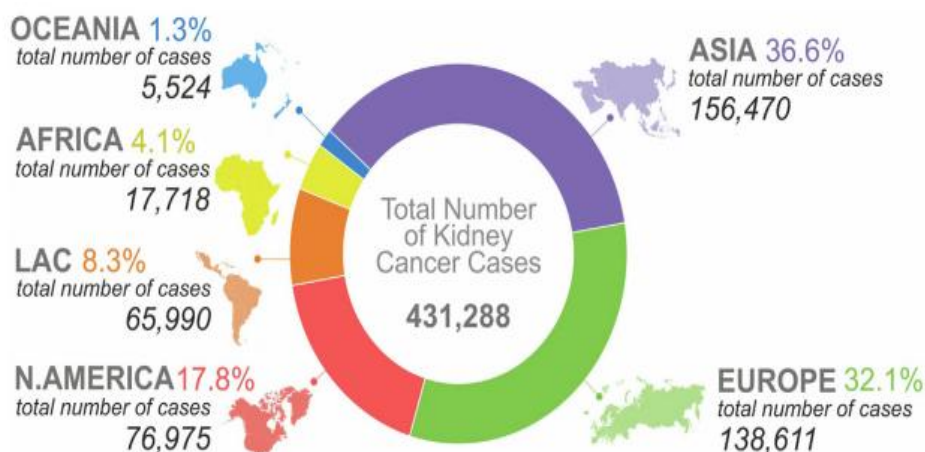


Εικόνα 11. Σύστημα Ρενίνης- Αγγειοτενσίνης- Αλδοστερόνης ¹⁴

1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ

1.2.1 Επιδημιολογία

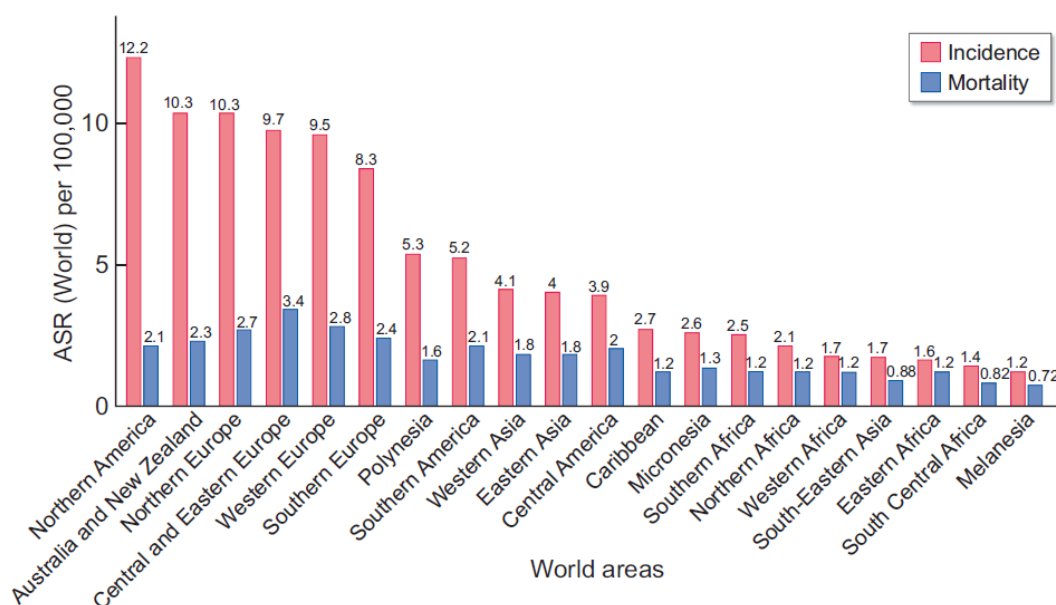
Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί τη 12^η σε συχνότητα κακοήθεια παγκοσμίως. Τα μεγαλύτερα ποσοστά σημειώνονται στην Ευρώπη και την Ασία. Οι περισσότερες περιπτώσεις καταγράφονται στην Λιθουανία και την Τσεχία, ενώ η Μπελίζ και οι νήσοι του Σολομώντα καταγράφουν τα μικρότερα ποσοστά της νόσου παγκοσμίως⁴⁴.



Εικόνα 12. Συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του νεφρού σε όλες τις ηπείρους σε μορφή ποσοστού και ο αριθμός των περιπτώσεων ανά περιοχή για το 2020. Δεδομένα από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο / Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ¹⁵

Ο καρκίνος του νεφρού κατέχει την 9^η σε συχνότητα θέση στα άρρενα άτομα και τη 14^η θέση στα θήλεα άτομα. Τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου είναι διπλάσια στα άρρενα άτομα

σε σχέση με τα θήλεα και υπάρχει αυξητική τάση στις χώρες υψηλού κατά κεφαλή εισοδήματος. Υψηλότερη επίπτωση καταγράφεται στη Βόρεια Αμερική, στην Αυστραλία, στη Νέα Ζηλανδία και στη Βόρεια Ευρώπη, ενώ η χαμηλότερη επίπτωση σημειώνεται στη Μέση Αφρική, στην Μελανησία και στην Νοτιοκεντρική Ασία.



Εικόνα 13. Επίπτωση και θνησιμότητα παγκοσμίως σύμφωνα με το Globocan 2020. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ASR ανά 100.000 παγκόσμιο πληθυσμό (Cancer today [Internet]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home> (13 July 2023, date last accessed).

Η πιθανότητα εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία, με τη μέση ηλικία διάγνωσης να ανέρχεται στα 72 έτη. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), περίπου το 45% των ατόμων με διάγνωση νεφροκυτταρικού καρκίνου θα καταλήξουν από τη νόσο. Η ραγδαία τεχνολογική ανάπτυξη τα τελευταία έτη έχει επιτρέψει την έγκαιρη διάγνωση και κατ' επέκταση την αύξηση του αριθμού των νέων περιπτώσεων, χωρίς ωστόσο να ακολουθεί αυξητική τάση και η θνησιμότητα^{15,16}.

1.2.2 Παράγοντες κινδύνου

Όπως και οι περισσότεροι καρκίνοι, ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί πολυπαραγοντική νόσο καθώς η ανάπτυξή του οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου εμπλέκονται μεταβλητοί αλλά και μη μεταβλητοί παράγοντες. Το φύλο, η ηλικία, η εθνικότητα και η γεωγραφική περιφέρεια αποτελούν μη μεταβλητές παράμετροι. Τα άρρενα άτομα παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου συγκριτικά με τα θήλεα άτομα, ενώ η αυξανόμενη ηλικία συνδέεται επίσης με υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. όσον αφορά στην εθνικότητα, προϋπάρχουσες μελέτες σε πληθυσμό των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής επισημαίνουν ότι οι Ιθαγενείς της Αμερικής και της Αλάσκας και οι Αφροαμερικανοί διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου^{15,16,17}.

Ωστόσο, στην ανάπτυξη της νόσου εμπλέκονται και μεταβλητοί παράγοντες κινδύνου που αφορούν κυρίως τον τρόπο ζωής και τις συνήθειες των ατόμων. Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου φαίνεται να είναι το κάπνισμα, το οποίο αυξάνει κατά 36% την πιθανότητα

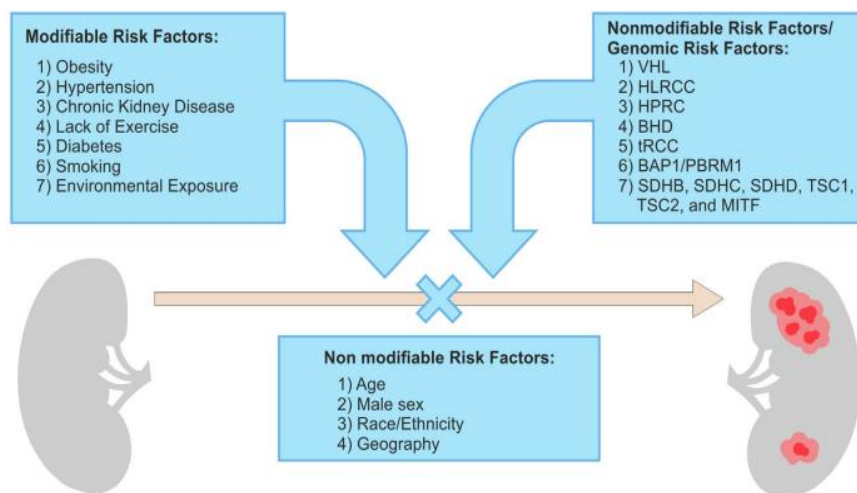
εμφάνισης της νόσου, ενώ το ποσοστό μειώνεται στο 20% περίπου στα άτομα που έχουν σταματήσει το κάπνισμα. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι είναι δόσοεξαρτώμενο και εμφανίζει κατακόρυφη αύξηση για άτομα που καπνίζουν >30 τσιγάρα ημερησίως. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το κάπνισμα ενισχύει την προδιάθεση για καρκίνο του νεφρού δεν είναι ακόμη γνωστός, όμως οι υποθέσεις συγκλίνουν στην επίδραση των καρκινογόνων ουσιών που εμπεριέχονται στα τσιγάρα και συσσωρεύονται στον οργανισμό^{15,16,17}.

Ακόμη, η παχυσαρκία αποτελεί σημαντικό παράγοντα προδιάθεσης της νόσου. Το υψηλό σωματικό βάρος παρουσιάζεται ως η κύρια αιτία για ποσοστό της τάξης του 20% των περιπτώσεων καρκίνου του νεφρού παγκοσμίως. Βέβαια, αν και η παχυσαρκία αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης της νόσου, δίνει, παραδόξως, και καλύτερες πιθανότητες επιβίωσης από αυτή. Η ενσωμάτωση της σωματικής άσκησης στην καθημερινότητα δείχνει να μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, αν και δεν έχει αποδειχθεί ξεκάθαρη σχέση μεταξύ της άθλησης και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του νεφρού.

Επιπρόσθετα, η υπέρταση αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του νεφρού κατά 67%, με τα σημερινά στοιχεία να υπαινίσσονται πως η συσχέτιση αυτή οφείλεται στην απορρύθμιση του Παράγοντα Απόκρισης σε Υποξία *HIF* (Hypoxia-inducible factor), της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και του σχηματισμού ενεργών ριζών οξυγόνου που προκαλεί στον οργανισμό η υπέρταση.

Εκτός των άλλων, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στους οποίους εκτίθεται το άτομο έχουν μελετηθεί σε πολλές περιστάσεις για τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της νόσου. Μικροπλαστικά και νανοπλαστικά σωματίδια έχουν αποδεδειγμένα συσχέτιση με την εμφάνιση της νόσου καθώς είναι τοξικά για τους νεφρούς λόγω του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονώδους αντίδρασης που προκαλούν. Επίσης, χλωριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία ως απολιπαντικά μετάλλων και στο στεγνό καθάρισμα δημιουργούν μεταβολίτες που συσσωρεύονται στους νεφρούς και αυξάνουν την προδιάθεση για καρκίνο.

Στους μη μεταβλητούς παράγοντες κινδύνου, που διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου συγκαταλέγεται και η γενετική ταυτότητα του εκάστοτε ατόμου. Πολλά αυτοσωμικά, κυρίαρχα, κληρονομήσιμα καρκινικά σύνδρομα προδιαθέτουν την ανάπτυξη κάποιας μορφής νεφροκυτταρικού καρκίνου στα άτομα που τα φέρουν. Το κυρίαρχο, αυτοσωμικό σύνδρομο von Hippel Lindau, που αφορά μετάλλαξη στο γονίδιο που παράγει την πρωτεΐνη *VHL* (von Hippel Lindau), το κυρίαρχο αυτοσωμικό κληρονομικό σύνδρομο λειομυομάτωσης και καρκίνου του νεφρού (Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma, HLRCC), που αφορά μεταλλάξεις στο γονίδιο ενός από τα ένζυμα του κύκλου του Krebs, τη φουμαράση *FH* (Fumarate Hydratase), η σπάνια διαταραχή θηλώδους καρκίνου του νεφρού (Hereditary Papillary Renal Carcinoma, HPRC), με μεταλλάξεις σε ένα πρωτο-ογκογονίδιο που προκαλεί ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η σπάνια γενετική διαταραχή Birt-Hogg-Dubé (BHD), που περιλαμβάνει μετάλλαξη του γονιδίου *Folliculin* (*FLCN*), το translocation Renal Cell Carcinoma (tRCC) που αναφέρεται σε καρκίνο του νεφρού που προκαλείται από μεταθέσεις σε σημαντικά γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, γονίδια αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και το γονίδιο της τελομεράσης *TERT*, η σχετιζόμενη με το *BAP-1* διαταραχή ανάπτυξης καρκίνου του νεφρού (BRCA1 associated protein-related-1/ Polybromo 1, *BAP1/PBRM1*), με μεταλλάξεις σε αναδιαμορφωτές της χρωματίνης που σχετίζονται επίσης με την επιδιόρθωση βλαβών του DNA και τη μεταγραφική ρύθμιση, καθώς και σύνδρομα που αφορούν μεταλλάξεις στις υπομονάδες του ογκοκατασταλτικού ενζυμικού συμπλόκου ηλεκτρική αφυδρογονάση *SDH* (Succinate dehydrogenase) αποτελούν μερικές από τις πιο σημαντικές γενετικές αιτίες ανάπτυξης της νόσου.^{15,17}



Εικόνα 14. Παράγοντες κινδύνου καρκίνου του νεφρού¹⁶

1.2.3 Ιστολογική Ταξινόμηση

Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί έναν όρο ομπρέλα για μία οικογένεια ποικιλόμορφων κακοηθειών. Η ιστολογική ταξινόμηση τους αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση και τη θεραπεία των ασθενών, καθώς τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε όγκου επηρεάζουν τόσο την κλινική συμπεριφορά του καρκίνου όσο και την απόκρισή του στη θεραπεία. Η ταξινόμηση των όγκων γενικά και του καρκίνου του νεφρού ειδικότερα πραγματοποιείται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) . Η ταξινόμηση διαφοροποιείται και εμπλουτίζεται τακτικά με βάση νέα επιστημονικά ευρήματα. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη σύγχρονων τεχνολογιών μοριακής βιολογίας με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) έχει συμβάλλει σε ένα συγκέρασμα μορφολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών του όγκου, οδηγώντας προς μία μορφομοριακή προσέγγιση, με απώτερο σκοπό την βέλτιστη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών.

Ο καρκίνος του νεφρού κατεξοχήν διακρίνεται σε δύο γενικές κατηγορίες: τα διανογκυτταρικά καρκινώματα (clear cell Renal Cell Carcinomas, ccRCC) και τα μη διανογκυτταρικά καρκινώματα (non-clear cell Renal Cell Carcinomas, non-ccRCC). Υπό την ομπρέλα των μη διανογκυτταρικών καρκινωμάτων εντάσσονται και οι δύο από τους πιο γνωστούς υποτύπους, το χρωμόφοβο και το θηλώδες καρκίνωμα. Το 2022 έγινε η τελευταία ενημέρωση του βιβλίου ταξινόμησης των νεφροκυτταρικών όγκων της WHO, η οποία συμπεριέλαβε ξεχωριστά κατηγορίες με σαφή και διακριτά μοριακά χαρακτηριστικά, ως ξεχωριστές πλέον οντότητες. Σύμφωνα με την πρόσφατη αναθεώρηση της WHO (5^η έκδοση, 2022) οι κύριες αλλαγές απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα της Εικόνας 15:

Table 1. Summary of most significant changes in the classification of renal cell carcinomas in WHO 2022 classification

Major changes	Examples
Structural reorganization	Creation of five morphological groups and a new category of molecularly defined renal carcinomas
Abolition of subclassification	Papillary RCC (PRCC) is no longer divided into type 1 and type 2 PRCC
Changes in nomenclature	Clear cell papillary renal cell carcinoma renamed Clear cell papillary renal cell tumor; Hereditary leiomyomatosis-associated RCC has been renamed as fumarate hydratase (FH)-deficient RCC; TCEB1-mutated RCC has been renamed as ELOC-mutated RCC
Molecularly defined renal carcinomas	TFE3-rearranged renal cell carcinomas; TFEB-altered renal cell carcinomas; ELOC (formerly TCEB1)-mutated renal cell carcinoma; Fumarate hydratase (FH)-deficient renal cell carcinoma; Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient renal cell carcinoma; ALK-rearranged renal cell carcinomas; SMARCB1-deficient renal medullary carcinoma
Other renal tumors category	Clear cell papillary renal cell tumor; Mucinous tubular and spindle cell carcinoma; Tubulocystic renal cell carcinoma; Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma; Eosinophilic solid and cystic renal cell carcinoma; Renal cell carcinoma NOS
Novel/emerging/provisional tumors	Thyroid-like follicular carcinoma; Biphasic hyalinizing psammomatous RCC; Low-grade oncocytic tumor; Eosinophilic vacuolated tumor

NOS, not otherwise specified; RCC, renal cell carcinoma; PRCC, papillary renal cell carcinoma; WHO, World Health Organization.]

Εικόνα 15. Περίληψη των πιο σημαντικών αλλαγών στην ταξινόμηση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος κατά τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας⁴⁴

Οι κύριοι ιστολογικοί υπότυποι και τα χαρακτηριστικά τους σύμφωνα με την αναθεωρημένη έκδοση της WHO (5η, 2022) είναι οι ακόλουθοι:

- *Διαυγοκυτταρικό Καρκίνωμα/ Clear Cell RCC*: Ο πιο κοινός υποτύπος καρκίνος του νεφρού. Χαρακτηρίζεται από κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα, λόγω της συσσώρευσης λιπιδίων και γλυκογόνου, καθώς και ένα πλούσιο δίκτυο τριχοειδών αγγείων. Φέρει μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *VHL* (von Hippel-Lindau), γεγονός που οδηγεί σε δυσλειτουργία των παραγόντων που προκαλούν υποξία (HIFs). Άλλες συχνές μεταλλάξεις αποτελούν αυτές στα γονίδια *PBRM1*, *SETD2* (SET domain containing 2), *BAP1* και *MTOR* (mechanistic target of rapamycin). Οι συχνότερες γενετικές παραλλαγές στα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα και η κλινική τους σημασία απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.

Common Genetic Alterations in ccRCCs

Mutations in 93% of ccRCC	Percentage of cases	Clinical Impact	
VHL	>70%	Diagnostic	No prognostic impact
PBRM1	~ 40%		Longer survival on MTORI
BAP1	~ 15-20%		High grade, poor outcomes on VEGFR TKI/ MTOR Inhibitor
SETD2	~ 7-11%		Worse survival, associated with metastases
KDM5C	~ 14%		Longer survival on VEGF TKI
TP53	2.2 – 8%		High grade, decreased survival
PIK3CA			Targetable
MTOR	~ 5%		Response to MTORI, mutations in metastases better response than mutations in primary
TSC1			Targetable
NF2	~ 3%		Targetable

Εικόνα 16. Συνήθεις γενετικές μεταλλάξεις στο διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα

- *Θηλώδες Καρκίνωμα Νεφρού/ Papillary RCC*: Παρουσιάζει θηλώδη ή σωληνοειδή/ θηλώδη αρχιτεκτονική με βασίφιλο ή ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Φέρει συχνά ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *MET* (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase), που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων. Σε μικρότερο ποσοστό, εμφανίζει επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο *GATA3* (GATA binding protein 3), το οποίο εμπλέκεται στον έλεγχο πολλών σημαντικών βιολογικά γονιδίων και στο γονίδιο *NF2* (Neurofibromin 2), το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Merlin, που λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Χαρακτηρίζεται επίσης από πλεονάσματα των χρωμοσωμάτων 7 και 17, καθώς και από αναδιατάξεις γονιδίων της οικογένειας *MiTF* (Microphthalmia-associated transcription factor).

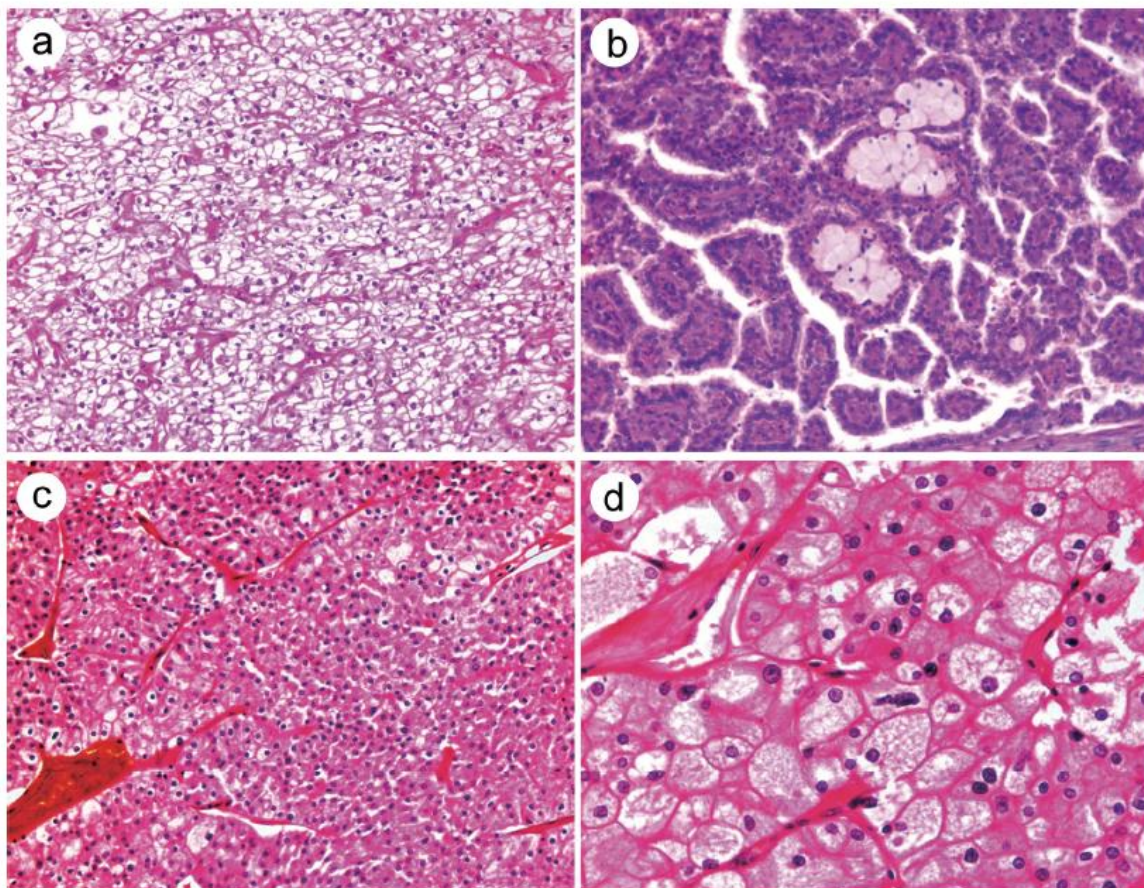
Χρωμόφοβο Καρκίνωμα Νεφρού/ Chromophobe RCC: Αφορά κύτταρα με διακριτές κυτταρικές μεμβράνες και αραιοχρωματικό ή ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Σπάνια εμφανίζει συγκεκριμένες μεταλλάξεις και χαρακτηρίζεται, συνήθως, από απώλεια πολλαπλών χρωμοσωμάτων όπως τα 1, 2, 6, 10, 13, 17 και 21. Μεταλλάξεις αφορούν σε γονίδια της *PI3K-AKT* (Phosphoinositide 3-kinase- Protein Kinase B) οδού.

- *Διαυγοκυτταρικό-Θηλώδες Καρκίνωμα νεφρού/ Clear Cell Papillary Renal Cell Tumor*: Τα κύτταρα του συγκεκριμένου υποτύπου εμφανίζουν διαυγές κυτταρόπλασμα και συμπαγείς, σωληνοειδείς και θηλώδεις σχηματισμούς. Σε αντίθεση και με τον διαυγοκυτταρικό και με τον θηλώδη, αυτός ο υποτύπος δεν εμφανίζει κάποια διακριτά μοριακά χαρακτηριστικά, ενώ εικάζεται πως οι επιγενετικές τροποποιήσεις του όγκου είναι αυτές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και την πορεία του.
- *Καρκίνωμα με Έλλειψη FH/ FH-deficient RCC*: Μορφολογικά εμφανίζει θηλώδη αρχιτεκτονική με ηωσινόφιλα κύτταρα, επιμήκεις πυρήνες και περιπυρηνική διαύγαση. Χαρακτηρίζεται μοριακά από την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης *FH* (Fumarate Hydratase), μία υδρατάσης που καταλύει τη μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε μηλικό. Η ανεπάρκεια του ενζύμου είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε σωματικά κύτταρα ή κύτταρα της βλαστικής σειράς. Έχει φτωχή πρόγνωση και δίνει πρώιμα εκτεταμένες μεταστάσεις. Σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα HIF1α, η ενεργοποίηση του οποίου προάγει την αγγειογένεση μέσω της *VEGF* (Vascular endothelial growth factor) σηματοδοτικής οδού.
- *Μυελοειδές Καρκίνωμα νεφρού με ανεπάρκεια SMARCB1/ SMARCB1-deficient renal medullary carcinoma*: πρόκειται για ένα διηθητικό και ιδιαίτερα επιθετικό υπότυπο νεφροκυτταρικού καρκίνου, που παρουσιάζει απώλεια ή μετατοπίσεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *SMARCB1* (SWI/SNF-related matrix associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1). Πρόκειται για μία βασική υπομονάδα του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και απαντά σε νέους με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Πρόκειται για έναν επιθετικό όγκο που αντιμετωπίζεται με χημειοθεραπεία και ενδεχομένως εφόσον είναι εφικτό και με χειρουργική επέμβαση.

- *Καρκίνωμα νεφρού με Έλλειψη του ενζύμου της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού Οξέος/ SDH-deficient RCC*: Παρουσιάζει ηωσινόφιλα κύτταρα, με κυτταροπλασματικά κενोटόπια ή έγκλειστα . Συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (*SDH*), ένα ακόμη ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Η απώλεια του ενζύμου της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης αυξάνει τα επίπεδα ελεύθερων ριζών (Reactive Oxygen Species, ROS) και οδηγεί σε μεταλλάξεις του DNA και σταθεροποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α. Ως θεραπεία προτείνεται η χειρουργική εκτομή και η χορήγηση στοχευμένης θεραπείας λαμβάνοντας υπόψη το στάδιο και τον βαθμό κακοηθείας του όγκου. Επιπρόσθετα, η παρουσία μεταλλάξεων βλαστικής σειράς στα γονίδια *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* και *SDHD* οδηγεί σε υποχρεωτικό γενετικό έλεγχο σε ασθενείς με διάγνωση ανεπάρκειας SDH.
- *Καρκίνωμα νεφρού με αναδιάταξη TFE3/ TFE3-rearranged RCC*: μικτά θηλώδη μοτίβα και μοτίβα φωλεών με διανυγή ή/και ηωσινόφιλα κύτταρα. Παρατηρούνται επίσης συχνά εναποθέσεις ασβεστίου (ψαμμώδη σωμάτια). Μοριακά, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν χρωμοσωμική μετατόπιση Xp11, που οδηγεί σε αναδιάταξη του γονιδίου *TFE3* (Transcription factor E3) που σχετίζεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης. Η συγκεκριμένη μετατόπιση προκαλεί ενίσχυση του *TFEB* (Transcription Factor EB) γονιδίου και απαντά σε ποσοστό της τάξης του 40% παιδιατρικών όγκων νεφρού.
- *Καρκίνωμα νεφρών με παραλλαγές του TFEB/ TFEB-altered RCC*: Ιστολογικά, η υποκατηγορία αυτή χαρακτηρίζεται από διφασικό μοτίβο ανάπτυξης, μεγάλα διανυγή και/ή ηωσινόφιλα κύτταρα, μικρότερα κύτταρα και υαλοειδή οζίδια. Χαρακτηρίζεται μοριακά από μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 6 και 11. Το γονίδιο *TFEB* συντήκεται με το γονίδιο *MALAT1* (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1). Το *TFEB* κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα που σχετίζεται με τη λυσοσωματική βιογένεση, ενώ το *MALAT1* δίνει ένα μη κωδικοποιητικό RNA που ελέγχει την έκφραση γονιδίων μετάστασης. Το *TFEB* γονίδιο μπορεί επίσης να απαντά και ενισχυμένο σε όγκους με πιο επιθετική συμπεριφορά. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος ιστολογικός υπότυπος είναι σπάνιος και απαντά σε ποσοστό μικρότερο του 0.1% στους ενήλικες.
- *Ηωσινοφιλικό Συμπαγές και Κυστικό Καρκίνωμα νεφρού/ Eosinophilic solid and cystic RCC*: Δίνει συνήθως μεγάλου μεγέθους όγκους, με συμπαγές-κυστικό πρότυπο ανάπτυξης, εμφάνιση αιμορραγίας και νέκρωση. Στις συμπαγείς περιοχές, τα κύτταρα είναι συνήθως οργανωμένα με κυψελοειδή τρόπο ή σχηματίζουν φωλεές, διαθέτουν επίσης άφθονο, ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα στις κυστικές περιοχές χαρακτηρίζονται από την παρουσία βασίφιλων κοκκίων στο κυτταρόπλασμα, που είναι αποτέλεσμα συμπύκνωσης του ενδοπλασματικού δικτύου. Ο υπότυπος σχετίζεται με μεταλλάξεις στο μονοπάτι TSC/MTOR (Tuberous Sclerosis Complex/ Mechanistic Target of Rapamycin), το οποίο συμμετέχει στην κυτταρική επιβίωση, αύξηση και πολλαπλασιασμό. Ως θεραπεία επιλογής προτείνεται το χειρουργείο και σε περίπτωση μεταστατικής νόσου χορηγούνται επίσης mTOR αναστολείς.

- *Καρκίνωμα νεφρού με Αναδιάταξη ALK/ ALK-rearranged RCC*: Μορφολογικά, ο όγκος εμφανίζεται ετερογενής, με βλεννώδη στοιχεία και ατρακτόμορφα κύτταρα. Η υποκατηγορία χαρακτηρίζεται από αναδιατάξεις του γονιδίου *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) με άλλα γονίδια. Απαντά σε παιδιά με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή ενήλικες και μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί λιγότερες από 25 περιπτώσεις. Σε περίπτωση που ο όγκος είναι πρωτοπαθής και σε πρώιμο στάδιο η θεραπεία που συστήνεται είναι η ριζική νεφρεκτομή ή η νεφροουρητηρεκτομή. Στην περίπτωση που έχουμε έναν μεταστατικό όγκο που φέρει αναδιάταξη του *ALK* γονιδίου, χορηγούνται συνήθως ALK αναστολείς.
- *Ογκοκυτταρικός Όγκος Χαμηλού Βαθμού Κακοηθείας/ Low-grade oncocytic tumour*: Τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα πυρηνικά χαρακτηριστικά όπως αυξημένη μίτωση, πολλούς πυρήνες, πλειομορφισμό κ.ο.κ. Τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μέτρια πυρηνική διόγκωση και περιπυρηνική διαύγαση. Μοριακά, οι όγκοι παρουσιάζουν γενωμική σταθερότητα και φέρουν αρκετές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια.
- *Καρκίνωμα Νεφρού με Μεταλλάξεις του γονιδίου ELOC/ ELOC-mutated RCC*: Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ξεχωριστή, σαφή κυτταρική μορφολογία που χαρακτηρίζεται από άφθονο διαυγές κυτταρόπλασμα. Στην περιφέρεια του όγκου παρατηρείται ένα θηλώδες ή κυψελοειδές μοτίβο ανάπτυξης. Οι όγκοι αυτοί παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *ELOC* (Elongin C) - (προηγουμένως ως *TCEB1*), το οποίο ενεργοποιεί την επιμήκυνση από την RNA πολυμεράση II. Συνυπάρχει συχνά μονοσωμία του χρωμοσώματος 8. Ως θεραπεία προτείνεται η μερική ή η ριζική νεφρεκτομή, ενώ δεν έχουν έως σήμερα αναφερθεί υποτροπές ή μεταστάσεις.
- *Ηωσινόφιλος Όγκος φέρων κενοτόπια/ Eosinophilic vacuolated tumour*: Υπό μικροσκοπική εξέταση, τα κύτταρα του όγκου αποκαλύπτουν έναν στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα στο οποίο υπάρχουν κενοτόπια. Χαρακτηρίζεται μοριακά από αλλοιώσεις στα γονίδια *mTOR*, *TSC2* και *TSC1*.^{18,19}

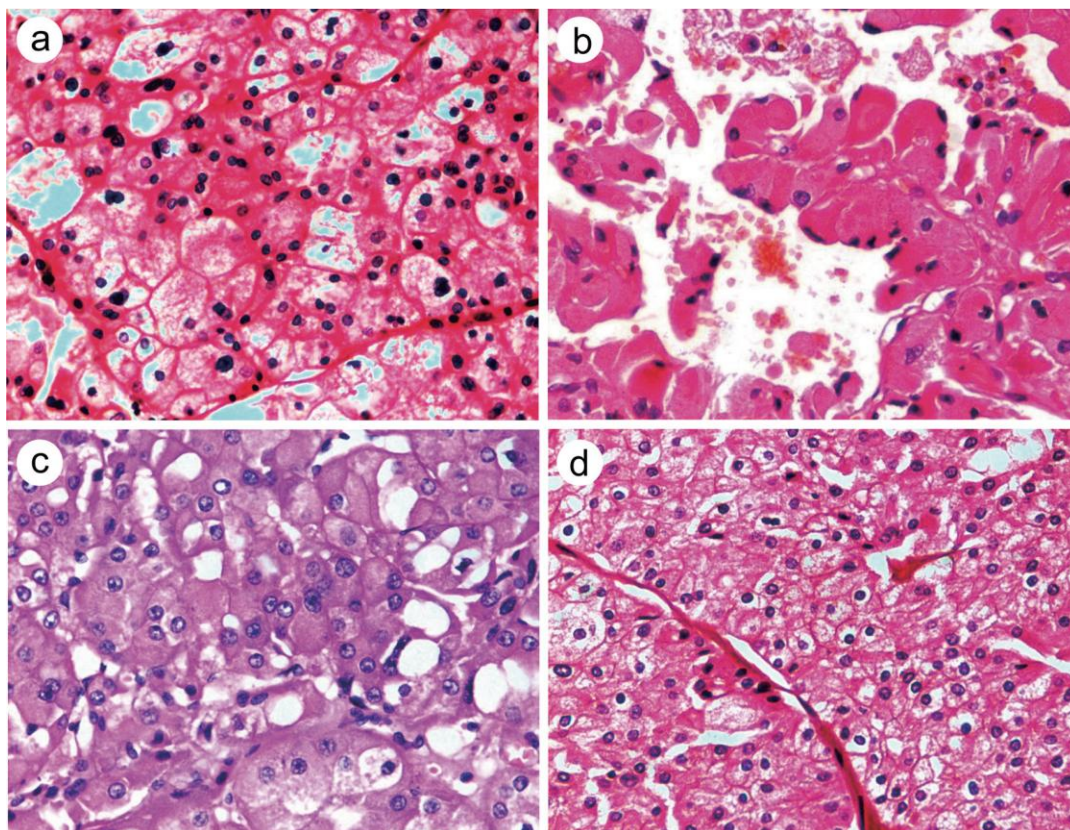
Όπως προκύπτει, ο νεφροκυτταρικός καρκίνος παρουσιάζει σημαντική ετερογένεια, ενώ σημειώνονται διαφορετικές μεταλλάξεις σε πρωτοπαθή και μεταστατικά νεοπλάσματα. Τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια δεν είναι άμεσα στοχεύσιμα, ενώ δεν συνεξετάζονται παράμετροι όπως είναι η μεθυλίωση, η απώλεια αριθμού αντιγράφων, τα miRNAs.



Εικόνα 17. Μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των κύριων ιστολογικών υποτύπων.

((Α) η ένθετη διάταξη καρκινικών κυττάρων με διαυγές κυτταρόπλασμα που περιβάλλεται από ινοαγγειακές σέπτες σε μία περίπτωση διαυγοκυτταρικού καρκινώματος νεφρικών κυττάρων (RCC). Τα καρκινικά κύτταρα έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα και πυρήνες χαμηλού βαθμού. Οι φωλεές των κυττάρων του όγκου περιβάλλονται από ατελείς ινοαγγειακές σептές (h&E, μεγέθυνση: 200×). (Β) RCC με θηλώδη αρχιτεκτονική σε θηλώδη RCC. Μερικοί από τους θηλώδεις πυρήνες περιέχουν αφρώδη ιστοκύτταρα στο κέντρο τους (h&E, μεγέθυνση: 200×). (Γ) προβολή medium-power του ογκοκυττώματος που χαρακτηρίζεται από φωλεές και φύλλα ηωσινοφιλικών κυττάρων με στρογγυλούς κεντρικά τοποθετημένους πυρήνες με μικρό πλειομορφισμό (h&E, μεγέθυνση: 200×) (δ) Χρωμόφοβο RCC με κύτταρα όγκου διατεταγμένα σε στερεά φύλλα διαχωρισμένα με λεπτές σептές. Δύο κύτταρα όγκου έχουν σταφιδοειδείς πυρήνες (h & E, μεγέθυνση: 400×). H & E, αιματοξυλίνη και ηωσίνη⁴⁴

Παρακάτω απεικονίζονται ορισμένα μικροσκοπικά, μορφολογικά χαρακτηριστικά ορισμένων αναδυόμενων/ νέων ιστολογικών υποτύπων.



Εικόνα 18. Μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά ορισμένων αναδυόμενων/ νέων ιστολογικών υποτύπων. ((Α) η κατά κύριο λόγο στερεή διάταξη κυττάρων όγκου με ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα με διάσπαρτους μεγάλους πυρήνες σε περίπτωση υβριδικού ογκοκυτταρικού/χρωμοφοβικού όγκου (HOCT) (h&E, μεγέθυνση: 400×). (Β) νεφρικός όγκος με θηλώδη αρχιτεκτονική επενδεδυμένη από ηωσινοφιλικά καρκινικά κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα και ήπιους φωτοσταθερούς πυρήνες σε παράδειγμα ηωσινοφιλικού θηλώδους όγκου με αντίστροφη πυρηνική πολικότητα (h&E, μεγέθυνση: 400×). (Γ) τα καρκινικά κύτταρα σε έναν ηωσινοφιλικό κενοτοπιασμένο όγκο (EVT) παρουσιάζουν μεγάλα ενδοκυτταροπλασματικά κενोटόπια και στρογγυλούς έως ωοειδείς πυρήνες με προεξέχοντες πυρήνες (h&E, μεγέθυνση: 400×). (δ) τα καρκινικά κύτταρα σε έναν ογκοκυτταρικό όγκο χαμηλού βαθμού (LOT) παρουσιάζουν άφθονο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και στρογγυλούς έως ωοειδείς πυρήνες με περιπυρηνικά φωτοστέφανα γύρω από πολλούς πυρήνες (h&E, μεγέθυνση: 400×). Η & Ε, αιματοξυλίνη και ηωσίνη⁴⁴

1.2.4 Σταδιοποίηση - Πρόγνωση

Για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του νεφρού, όπως και για την πλειοψηφία των όγκων, χρησιμοποιείται η ταξινόμηση TNM, η οποία κατατάσσει τις κακοήθειες και επιτρέπει, ένα κοινό σύστημα επικοινωνίας μεταξύ των διαφόρων ιατρικών ειδικοτήτων αλλά και μεταξύ θεράποντος ιατρού και ασθενούς. Το σύστημα αυτό βασίζεται στην αξιολόγηση του μεγέθους του όγκου, των διηθημένων τοπικών λεμφαδένων και της παρουσίας ή απουσίας μεταστάσεων με τον τρόπο που περιγράφεται κάτωθι:

T- Tumor: Περιγράφει το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου και τη διήθηση αυτού σε παρακείμενους ιστούς. Διαθέτει ένα σύστημα αρίθμησης από 0 έως 4, με το 0 να είναι ενδεικτικό απουσίας όγκου και τα 1 έως 4 να περιγράφουν τη σταδιακή αύξηση του μεγέθους και της έκτασης της διήθησης (χαρακτηριστική για κάθε τύπου καρκίνου). Ο όρος Tis χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα καρκίνωμα in situ, ενώ ο όρος T_x για έναν όγκο που δεν μπορεί να αξιολογηθεί.

- **N- Nodes:** Περιγράφει τη παρουσία διήθησης των επιχώριων λεμφαδένων. N0 σημαίνει ότι ο όγκος δεν έχει διηθήσει σε λεμφαδένα, ενώ N1-3 είναι ο βαθμός διήθησης του όγκου, με την απόσταση να μεγαλώνει αναλόγως του N. Nx χρησιμοποιείται για να περιγράψει ότι οι λεμφαδένες δεν είναι εφικτό να εξεταστούν.
- **M- Metastasis:** Χρησιμοποιείται για να εκτιμήσει την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (μακρινές μεταστάσεις). M0 συμβαδίζει με απουσία μεταστάσεων και M1 με την παρουσία αυτών. Ο αριθμός των μεταστάσεων περιγράφεται με τη χρήση περαιτέρω υποκατηγοριών του M1, χαρακτηριστικών ανά τύπο καρκίνου.²⁰

Για τον καρκίνο του νεφρού συγκεκριμένα, το TNM εφαρμόζεται σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες²¹:

T- Πρωτοπαθής Όγκος	
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Απουσία πρωτοπαθούς όγκου
T1	Όγκος ≤ 7 cm που περιορίζεται στον νεφρό
	T1a Όγκος ≤ 4 cm
	T1b Όγκος > 4 cm αλλά ≤ 7 cm
T2	Όγκος > 7 cm, περιορισμένος στον νεφρό
	T2a Όγκος > 7 cm αλλά ≤ 10 cm
	T2b Όγκος > 10 cm, περιορισμένος στον νεφρό
T3	Ο όγκος φτάνει σε νεφρικές φλέβες ή περινεφρικούς ιστούς, αλλά όχι πέραν της περιτονίας του Gerota ή στο σύστοιχο επινεφρίδιο
	T3a Όγκος επεκτείνεται στη νεφρική φλέβα ή στους τμηματικούς κλάδους αυτής ή όγκος που διηθεί το περινεφρικό και/ ή το παραπνευλικό λίπος αλλά δεν εκτείνεται πέραν της περιτονίας του Gerota
	T3b Όγκος που επεκτείνεται στην κάτω κοίλη φλέβα, πάνω από το διάφραγμα
	T3c Όγκος που επεκτείνεται στην κάτω κοίλη φλέβα ή στο τοίχωμα αυτής πάνω από το διάφραγμα ή που διηθεί το τοίχωμα αυτής
T4	Όγκος που επεκτείνεται πέραν της περιτονίας του Gerota ή διηθεί κατ' επέκταση το σύστοιχο επινεφρίδιο

Πίνακας 1. Σύστημα TNM²¹

N- Επιχώριοι Λεμφαδένες	
Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Απουσία μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε έναν επιχώριο λεμφαδένα
N2	Μετάσταση σε περισσότερους από έναν επιχώριους λεμφαδένες

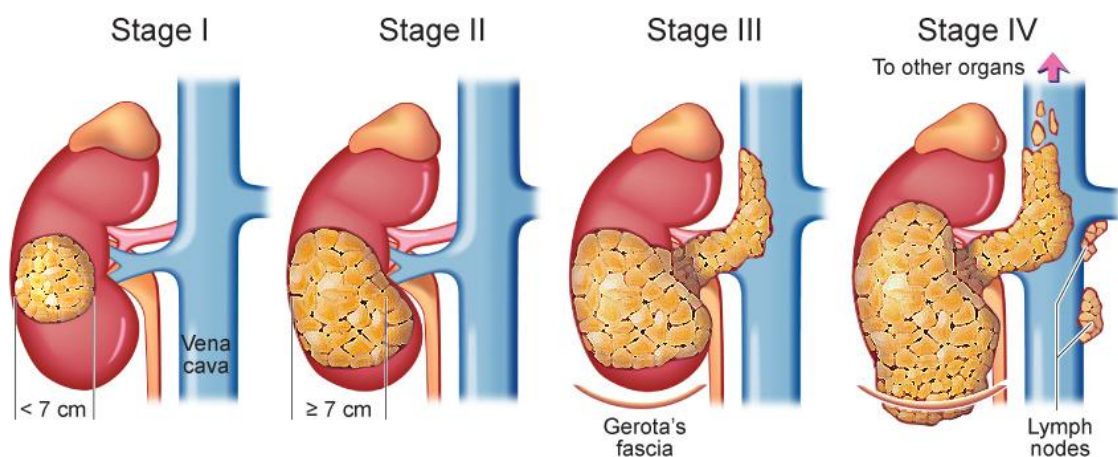
Πίνακας 2. Σύστημα TNM-N

M- Απομακρυσμένες Μεταστάσεις	
M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 3. Σύστημα TNM-M

TNM Stage Grouping			
Στάδιο	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IV	T4	N0-2	M0
	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 4. Σύστημα TNM- Σταδιοποίηση



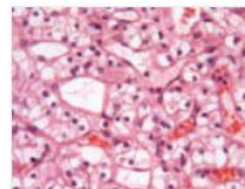
Εικόνα 20. Σταδιοποίηση RCC²³

Η σταδιοποίηση της νόσου αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της πρόγνωσης. Η πρόγνωση αφορά την εκτίμηση της πιθανής εξέλιξης της νόσου, καθώς επίσης και τις επιπτώσεις που αυτή μπορεί να έχει στον ασθενή. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των πιθανοτήτων ίασης, επιβίωσης ή υποτροπής, αλλά και για την επιλογή κατάλληλης εξατομικευμένης θεραπείας.

Η πρόγνωση γίνεται με τη βοήθεια των προγνωστικών παραγόντων. Οι προγνωστικοί παράγοντες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φυσική πορεία της νόσου και διακρίνονται σε μορφολογικούς, κλινικούς και μοριακούς παράγοντες.

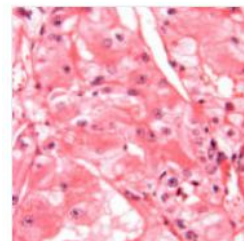
- **Μορφολογικοί προγνωστικοί παράγοντες:** Στην κατηγορία αυτή συγκατέχονται το σύστημα ταξινόμησης TNM, αλλά και ο βαθμός κακοηθείας (grade), ο ιστολογικός υπότυπος του , η παρουσία σαρκοματοειδών στοιχείων, η μικροαγγειακή διήθηση (MVI) και η νέκρωση του όγκου. Σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως η κλίμακα WHO/ISUP, η οποία τείνει τα τελευταία χρόνια να αντικαταστήσει την κλίμακα Fuhrman.²⁴ Οι δύο αυτές κλίμακες βαθμονόμησης κατατάσσουν τους νεφροκυτταρικούς καρκίνους σε 4 βαθμίδες με βάση την επιθετική συμπεριφορά (βαθμός κακοηθείας) που εμφανίζουν τα κύτταρα του όγκου. Οι βαθμίδες της κλίμακας WHO/ISUP είναι οι ακόλουθες:

- ♦ *Βαθμίδα 1 (Grade 1):* Τα κύτταρα ομοιάζουν με τα φυσιολογικά κύτταρα. Αποτελεί τη λιγότερο επιθετική μορφή και δεν δίνει μεταστάσεις. Απαντάται σπάνια.



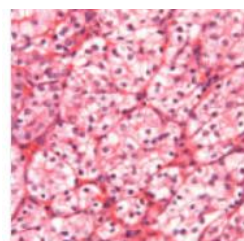
Εικόνα 21. WHO/ISUP Grade 1 μικροσκοπικά²⁵

- ♦ *Βαθμίδα 2 (Grade 2):* Τα κύτταρα ομοιάζουν λιγότερο με τα φυσιολογικά κύτταρα, έχουν πιο διακριτά πυρήνια και χαρακτηρίζουν πιο επιθετικούς όγκους. Αυτή αποτελεί τη συχνότερη βαθμίδα στον νεφροκυτταρικό καρκίνο.



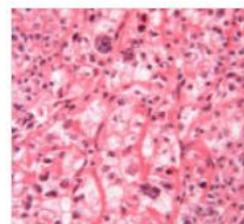
Εικόνα 22. WHO/ISUP Grade 2 μικροσκοπικά²⁵

- ♦ *Βαθμίδα 3 (Grade 3):* Τα κύτταρα μεγαλώνουν πιο γρήγορα, διαφέρουν σημαντικά από τα φυσιολογικά κύτταρα και έχουν υψηλό μεταστατικό δυναμικό.



Εικόνα 23. WHO/ISUP Grade 3 μικροσκοπικά²⁵

- ♦ *Βαθμίδα 4 (Grade 4):* Τα κύτταρα της βαθμίδας αυτής είναι ανώμαλα κύτταρα με μεγάλους και έντονα διακριτούς πυρήνισκους. Οι όγκοι αυτοί είναι ιδιαίτερα επιθετικοί και δίνουν πάντοτε μεταστάσεις. Επιπρόσθετα, η παρουσία σαρκωματοειδών στοιχείων κατατάσσει τον όγκο απευθείας στην 4^η βαθμίδα.²⁵



Εικόνα 24. WHO/ISUP Grade 4 μικροσκοπικά²⁵

Ο ιστολογικός υπότυπος του χρωμόφοβου νεφρικού καρκινώματος δεν περιγράφεται με την κλίμακα WHO/ISUP, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται για τον τύπο αυτό η κλίμακα Fuhrman (αν και εξετάζονται εναλλακτικές κλίμακες ταξινόμησης). Στην κλίμακα Fuhrman εξετάζονται το μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα, καθώς, επίσης, πόσο διακριτό είναι το πυρήνιο.

- ♦ *Βαθμίδα 1 (Grade 1):* Τα κύτταρα εμφανίζουν μικρούς, στρογγυλούς και ομοιόμορφους πυρήνες και τα πυρήνιά τους είναι αφανή ή απουσιάζουν σε μεγάλη μεγέθυνση (400x). Όγκοι που ανήκουν σε αυτή τη βαθμίδα υποδεικνύουν μικρό βαθμό κακοηθείας.
- ♦ *Βαθμίδα 2 (Grade 2):* Οι πυρήνες των κυττάρων είναι ελαφρώς μεγαλύτεροι και εμφανίζουν ήπια ποικιλομορφία ως προς το μέγεθός τους. Τα πυρήνια είναι εμφανή σε μεγέθυνση 400x, αλλά όχι έντονα. Οι όγκοι αυτής της βαθμίδας παρουσιάζουν ενδιάμεσο βαθμό κακοηθείας.

- ♦ *Βαθμίδα 3 (Grade 3):* Μεγάλοι πυρήνες με μεγάλη ποικιλομορφία μεγέθους και σχήματος. Τα πυρήνια είναι εμφανή και σε μεγέθυνση 100x. Ο όγκος χαρακτηρίζεται ως αρκετά επιθετικός.
- ♦ *Βαθμίδα 4 (Grade 4):* Μεγάλου μεγέθους και ακανόνιστου σχήματος πυρήνες με μεγάλη ποικιλομορφία σε όγκο και μέγεθος (πλειομορφισμός). Τα πυρήνια είναι ιδιαίτερα έντονα σε μεγέθυνση 100x, και παρατηρούνται στοιχεία σαρκωματοειδούς διαφοροποίησης. Ο όγκος είναι ιδιαίτερα επιθετικός και δυνητικά πιο επικίνδυνος (υψηλός βαθμός κακοηθείας).²⁶

Στην κλίμακα WHO/ISUP και στην κλίμακα Fuhrman, η μεγαλύτερη βαθμίδα ταξινόμησης συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση για τον ασθενή, αφού ο όγκος είναι πιο πιθανό να εμφανίσει μεταστάσεις και να είναι ανθεκτικός στη θεραπεία.²⁴

Fuhrman grading system, 1982			
Grade	Nuclear diameter	Nuclear shape	Nucleoli
1	Small (~10 μm)	Round, uniform	Absent, inconspicuous
2	Larger (~15 μm)	Irregularities in outline	Visible at ×400
3	Even larger (~20 μm)	Obvious irregular outline	Prominent at ×400
4	As for grade 3 plus bizarre multilobed nuclei ± spindle cells		

Εικόνα 25. Κλίμακα Fuhrman²⁷

- *Κλινικοί προγνωστικοί παράγοντες:* “Performance Status” (PS), συμπτώματα προσέλευσης ασθενούς, παρανεοπλασματικά σύνδρομα, τιμές ασβεστίου, αλβουμίνης ορού, αιμοσφαιρίνης, C-Reactive Protein (CRP).
- *Μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες:* Οι μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες δεν χρησιμοποιούνται ακόμη στην κλινική πράξη, καθώς έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα και απαιτούν διαδικασίες επικύρωσης. Σήμερα, με τη βοήθεια της τεχνολογίας έχουν ταυτοποιηθεί τόσο γενετικές αλλαγές όσο και επιγενετικές τροποποιήσεις και εξετάζεται ρόλος τους ως βιοδείκτες στην καθημερινή κλινική πράξη. Ωστόσο, κανένας προγνωστικός παράγοντας δεν μπορεί να θεωρηθεί επαρκής και να χρησιμοποιηθεί μόνος του. Χρειάζεται συνδυασμός πολλών εξ’ αυτών σε προγνωστικά μοντέλα. Αυτά διαφέρουν ως προς τις προγνωστικές μεταβλητές που εμπεριέχουν ανάλογα με τη χρήση για την οποία κατασκευάζονται. Συνεπώς, υπάρχουν προγνωστικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται μόνο κατά την έρευνα (π.χ. SSIGN score, Karakiewicz nomogram), μετεγχειρητικά προγνωστικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για υπολογισμό της πιθανότητας επιβίωσης και υποτροπής (π.χ. Leibovich prognostic score, UISS), μοντέλα που αφορούν τη μεταστατική μορφή της νόσου (π.χ. MSKCC, IMDC) αλλά και μοντέλα που συμπεριλαμβάνουν μοριακούς παράγοντες. Τα τελευταία, ωστόσο, βρίσκονται ακόμη σε πολύ πρώιμη μορφή, με αποτέλεσμα οι αλλαγές σε γενετικό ή επιγενετικό επίπεδο να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν ή να χαρακτηριστούν ως «βιοδείκτες». Υπάρχει τεράστια ανάγκη για έρευνα, ώστε να επικυρωθούν οι μοριακοί δείκτες που θα συμβάλλουν μέσα από τον χαρακτηρισμό της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου στην πρόγνωση.²⁴

1.2.5 Θεραπεία

Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, αν και ευρέως διαδεδομένες για πολλούς τύπους καρκίνου, δε φαίνεται να είναι αποτελεσματικές στον καρκίνο του νεφρού. Για τοπικά εντοπισμένους όγκους η μόνη τεχνική που πιθανώς θεραπεύει τον ασθενή είναι η πλήρης χειρουργική εκτομή του όγκου, ενώ όγκοι σταδίου T1a αντιμετωπίζονται με μερική νεφρεκτομή, καθώς αυτός φαίνεται να είναι ο καλύτερος δυνατός τρόπος για την οριοθέτηση του όγκου και τη διατήρηση της φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας. Ολική νεφρεκτομή γίνεται σε ασθενείς με καρκίνο νεφρού σταδίου T1b-T4. Ωστόσο, ένα ποσοστό της τάξης του 25-30% των ασθενών παρουσιάζουν ήδη μεταστάσεις κατά τη διάγνωση και περίπου 40% των ασθενών που υποβάλλονται σε εγχείρηση υποτροπιάζουν.

Για τη θεραπεία των μεταστατικών όγκων χρησιμοποιούνται κατά κόρον δύο οδοί: οι αναστολείς της κινάσης τυροσίνης VEGF (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs), που εξασθενούν τον όγκο μέσω αναστολής της αγγειογένεσης, και η ανοσοθεραπεία, κυρίως με τη χρήση δραστικών ουσιών που μπλοκάρουν σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού, υπεύθυνα για τον έλεγχο της ανοσολογικής ομοιόστασης και της αναγνώρισης του εαυτού. Πιο συγκεκριμένα, οι πιο συνήθεις καταστολείς σημείων ελέγχου αφορούν την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης Κυτταρικού Θανάτου 1 *PD-1* (Programmed Cell Death Protein 1) των ογκοειδικών T-κυττάρων και του προσδέτη της, τον προσδέτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 *PD-L1* (Programmed Death Ligand 1) που μπορεί να εκφράζεται είτε από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα είτε από κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική καθ' ότι η πρόσδεση του *PD-L1* των κυττάρων του όγκου στην *PD-1* περιοχή των T-κυττάρων απενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν καρκινικούς όγκους και, άρα, και την ανοσολογική απόκριση που θα οδηγούσε σε θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, επιτρέποντας στον όγκο να διαφύγει του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να αναπτυχθεί και να επεκταθεί.

Άλλα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού για την καταστολή των οποίων υπάρχουν δραστικές ουσίες είναι η CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) και το μονοπάτι της mTOR. Η CTLA-4 (Κυτταροτοξική Σχετιζόμενη με T-Λεμφοκύτταρα Πρωτεΐνη 4) είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας που εκφράζεται στην επιφάνεια των T-κυττάρων αφού αυτά ενεργοποιηθούν με σκοπό να μειώσει την ενεργότητά τους και να διατηρήσει την ανοσολογική ομοιόσταση. Ο CTLA-4 προσδένεται στα μόρια της οικογένειας B7, το B7-1 ή CD80 και το B7-2 ή CD86 αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να χρησιμοποιούν την έκφραση της πρωτεΐνης αυτής με σκοπό την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος. Το μονοπάτι της mTOR, από την άλλη, συνδέεται με την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό και εμφανίζεται υπερ-ενεργοποιημένο σε πολλούς τύπους καρκίνου, οδηγώντας σε ανάπτυξη του όγκου. Συνεπώς, η καταστολή του μονοπατιού αυτού επιβραδύνει ή και σταματά την εξέλιξη της νόσου.

Οι θεραπείες για τον καρκίνο του νεφρού διακρίνονται σε πρώτης και δεύτερης γραμμής, με τις πρώτες να χορηγούνται ως αρχική επιλογή για την αντιμετώπιση της νόσου και τις δεύτερες να χορηγούνται εάν οι πρώτες αποτύχουν ή εάν η νόσος υποτροπιάσει.

➤ Θεραπείες πρώτης γραμμής αποτελούν:

- I. *Συνδυασμός αναστολέων σημείων ελέγχου (ICB)*: αποτρέπουν την αλληλεπίδραση των μορίων ελέγχου που εκφράζονται στα T λεμφοκύτταρα και των προσδετών τους που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, επιτρέποντας έτσι στα κυτταροτοξικά T να ενεργοποιηθούν και να καταπολεμήσουν τον όγκο.

Συνήθως περιλαμβάνει έναν αναστολέα της αλληλεπίδρασης PD-1/PD-L1 (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab) κι έναν αναστολέα της αλληλεπίδρασης CTLA-4/B7 (ipilimumab, tremelimumab)

II. *Συνδυασμός αναστολέα σημείων ελέγχου και αναστολέα κινάσης τυροσίνης (ICB & TKI):* Ο καρκίνος του νεφρού χαρακτηρίζεται από έντονη αγγείωση λόγω υπερέκφρασης του παράγοντα HIF1α (Παράγοντας που επάγεται από την υποξία 1α) και των καθοδικών του στόχων, κυρίως του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF. Παράγοντες που λειτουργούν ως αναστολείς του VEGF σταματούν την αγγειογένεση στον όγκο, οδηγώντας σε σταθεροποίηση ή σμίκρυνσή του. Αυτοί αποτελούν TKIs (sorafenib, pazopanib, axitinib) και συνδυάζονται με τους ICB που περιεγράφηκαν προηγουμένως.

III. *Συνδυασμός Αντι-VEGF αντισωμάτων:* Χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα κατά του VEGF (Bevacizumab) μαζί με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού

➤ *Θεραπείες δεύτερης γραμμής:* Λίγοι ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο ανταποκρίνονται επιτυχώς στην πρώτη θεραπεία, ως εκ τούτου χορηγείται και θεραπεία δεύτερης γραμμής.

- I. *Cabozantinib:* αναστολέας κινάσης τυροσίνης που δρα σε πολλαπλές κινάσες
- II. *Axitinib:* αναστολέας κινάσης τυροσίνης, ειδικός για VEGF
- III. *Nivolumab:* αναστολέας σημείου ελέγχου ανοσοποιητικού

Εκτός από τις δύο γραμμές θεραπείας, χρησιμοποιείται και η επικουρική θεραπεία, η οποία χορηγείται μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου με στόχο να μειώσει τον κίνδυνο επανεμφάνισης της νόσου.

➤ *Επικουρική θεραπεία*

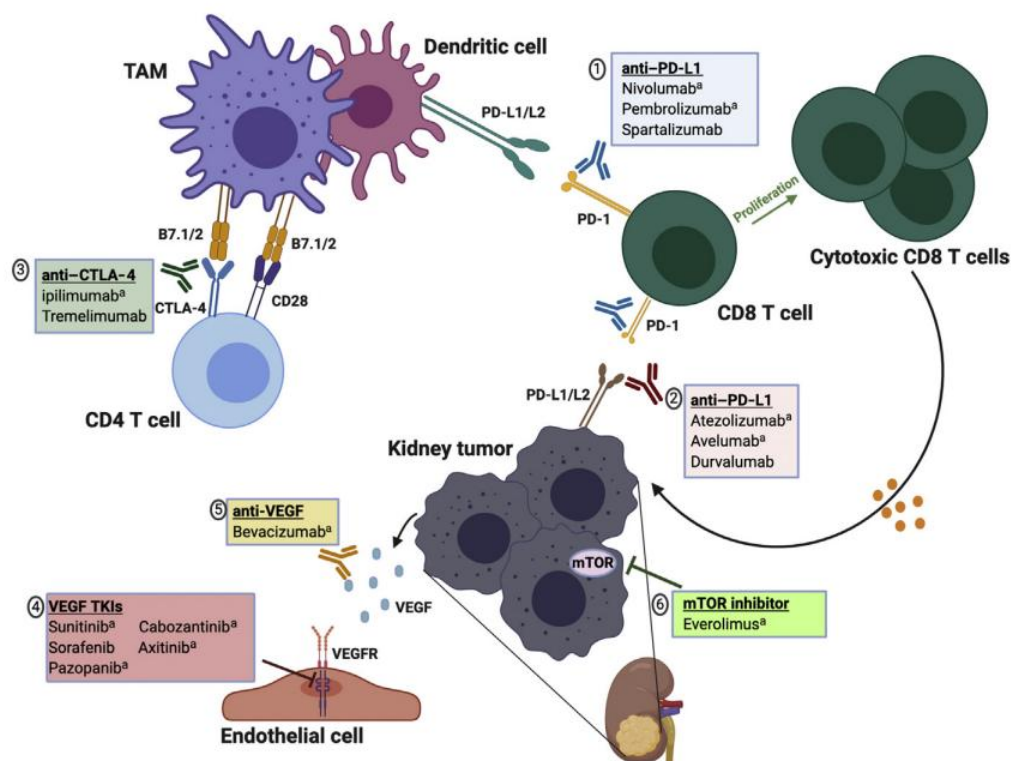
- I. *Επικουρική Θεραπεία με TKIs (sunitinib)*
- II. *Επικουρική Θεραπεία με ICBs ((ipilimumab, pembrolizumab, Nivolumab, atezolizumab, avelumab)*

Επιπρόσθετα, μπορεί να χορηγηθεί προεγχειρητικά στον ασθενή και η νεοεπικουρική θεραπεία.

➤ *Νεοεπικουρική Θεραπεία:*

- I. *SPARC-1:* προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη (IL)- 1β μπορούν να καταστείλουν την ανοσοαπόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Αντισώματα κατά της IL-1β (canakinumab), σε συνδυασμό με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (spartalizumab) επιτρέπουν επανενεργοποίηση των T κυττάρων και δράση τους κατά του όγκου.
- II. *Συνδυασμός Ανοσοθεραπείας με Κυτταρομειωτική Νεφρεκτομή- μελέτη CytoKIK:* χορήγηση nivolumab/cabozantinib πριν από εγχείρηση κυτταρομειωτικής νεφρεκτομής.

Η διαρκής έρευνα γύρω από τον καρκίνο του νεφρού φέρνει στο προσκήνιο νέα μόρια με πιθανό θεραπευτικό ρόλο και ποικίλους στόχους που αποτελούν σημεία κλειδιά στη φυσιολογία του όγκου.²⁸



Εικόνα 26. Μοριακοί στόχοι και στόχοι ανοσοθεραπείας στον μεταστατικό καρκίνο του νεφρού²⁸

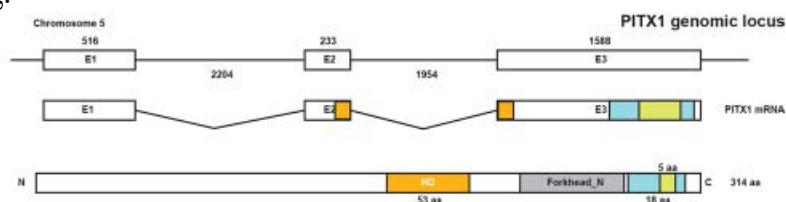
1.3 PITX1

1.3.1 PITX1: Θέση και Πρωτεΐνη

Το γονίδιο *PITX1* (Paired-like homeodomain transcription factor 1) κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα *PITX1* (Pituitary homeobox 1) και ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων *Pitx*, η οποία, στα σπονδυλωτά, αποτελείται από τρία μέλη: *PITX1*, *PITX2* και *PITX3*. Τα *Pitx* αποτελούν γονίδια της οικογένειας homeobox και χαρακτηρίζονται ως συγγενείς της πρωτεΐνης *bicoid* της *Drosophila* (Bicoid-Related). Κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες με ειδικευση αλληλουχίας (sequence-specific transcription factors/SSTFs), αναγνωρίζουν, δηλαδή, συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, ρυθμίζοντας γονιδια-στόχους που βρίσκονται καθοδικά αυτών. Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούνται από 180 ζεύγη βάσεων και δίνουν μία περιοχή πρόσδεσης που αποτελείται από 60 αμινοξέα- την ομοιεπικράτεια/ homeodomain, ιδιαίτερα συντηρημένη στους ευκαρυώτες. Τα homeobox γονίδια ρυθμίζουν την οργανογένεση, ενώ είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον χωρικό και χρονικό καθορισμό της ταυτότητας των κυττάρων. Στα ζώα, χωρίζονται σε 11 τάξεις, ανάλογα με τις συντηρημένες δομές ιντρονίων- εξωνίων και της αρχιτεκτονικής της ομοιεπικράτειας (ANTP, PRD, LIM, POU, HNF, SINE, TALE, CUT, PROS, ZF και CERS). Τα *Pitx* ανήκουν στην τάξη PRD και είναι βασικά για τον καθορισμό της ασυμμετρίας μεταξύ αριστερής και δεξιάς πλευράς. Γενικότερα, το *PITX1* ελέγχει τη διαμόρφωση των ιστών των οπίσθιων άκρων, την ανάπτυξη της υπόφυσης καθώς και το πρώτο βραγχιακό τόξο που δίνει γένεση σε πολλά

σημαντικά μέρη του προσώπου, του λαιμού και των αυτιών, το *PITX2* την ανάπτυξη των σκελετικών μυών, των μυών του προσώπου, της καρδιάς και του εντέρου, των δοντιών και της υπόφυσης και το *PITX3* την ανάπτυξη του οπτικού φακού και των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας.

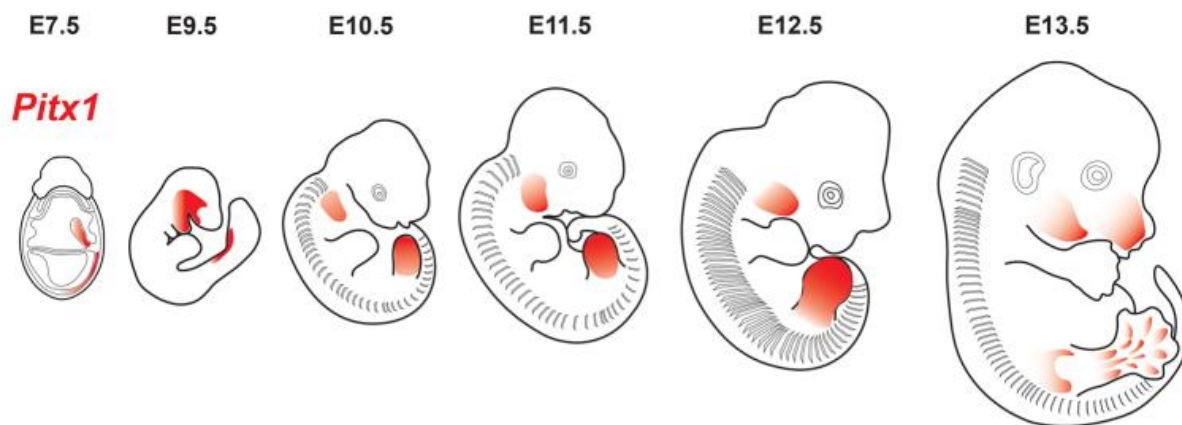
Το γονίδιο *PITX1* αποτελεί το επίκεντρο της παρούσης διπλωματικής. Στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 και αποτελείται από 6.495 ζεύγη βάσεων. Δίνει ένα μετάγραφο των 945 ζευγών βάσεων, το οποίο αποτελείται από τρία εξώνια και δίνει την πρωτεΐνη *PITX1* με 314 αμινοξέα. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί την ομοιεπικράτεια βρίσκεται ανάμεσα στο 2^ο και το 3^ο εξώνιο και εντοπίζεται εν τέλει στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ η πρωτεΐνη διαθέτει και το υψηλά συντηρημένο μοτίβο OAR στο καρβοξυ-τελικό άκρο, μία αλληλουχία 15 αμινοξέων που συμπεριλαμβάνει ένα μοτίβο πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) 5 αμινοξέων. Το μοτίβο OAR είναι πιθανό να μεσολαβεί για την ενεργοποίηση της δράσης της πρωτεΐνης in trans ή να εξασφαλίζει την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες.²⁹



Εικόνα 27. Γενετικός τόπος *PITX1*²⁹

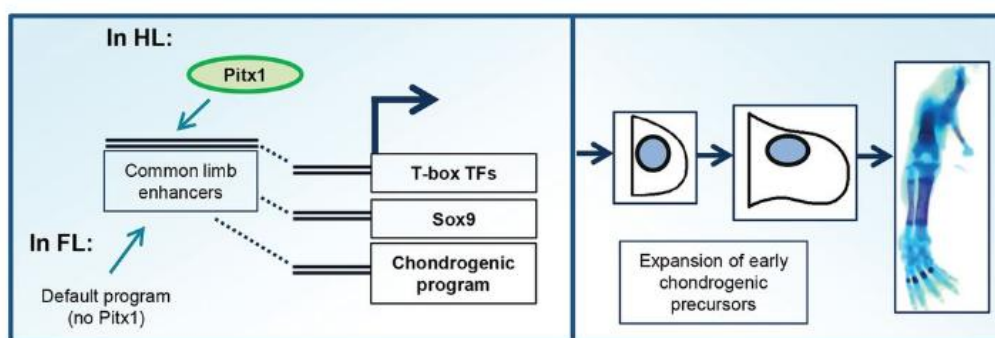
1.3.2 Αναπτυξιακός Ρόλος *PITX1*

Το *PITX1* ανήκει στην κατηγορία ακρο-ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που αποτελούν σημαντικό κομμάτι του αναπτυξιακού προγράμματος των άκρων³⁰. Είναι το πρώτο γονίδιο της οικογένειας *Pitx* που εκφράζεται κατά την εμβρυογένεση, στο στάδιο της γαστριδίωσης, στο οπίσθιο και το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα. Στη συνέχεια, η έκφραση του περιορίζεται στις πρόσθιες και τις οπίσθιες δομές, ενώ καταλήγει να εκφράζεται μόνο στο μεσέγχυμα των οπίσθιων άκρων, όπου και συνεχίζει να εκφράζεται μέχρις ότου ολοκληρωθεί η ανάπτυξη τους. Συμμετέχει στο σχηματισμό των τενόντων, των μυών, των χόνδρων και των οστών των οπίσθιων άκρων, ενώ μαζί με το *PITX2* συμμετέχουν στο σχηματισμό της θήκης του Rathke (Rathke's pouch), η οποία δίνει αργότερα γένεση στην αδενούποφυση. Το *PITX1* εκφράζεται, γενικότερα, σε μία πληθώρα ιστών, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη πολλών, διαφορετικών μοριακών διακοπών που επιτρέπουν τη μεταγραφή του^{29,31}. Παράλληλα, φαίνεται να διαθέτει έναν μηχανισμό αυτορρύθμισης, με το ίδιο το μόριο να δένεται στον υποκινητή του και να προάγει την μεταγραφή του, διατηρώντας την έκφραση του σε σταθερά επίπεδα.³²



Εικόνα 28. Έκφραση *PITX1* σε έμβρυο ποντικού κατά τη γαστριδίωση²⁹

Φυσικά, η δράση του *PITX1* εξασφαλίζεται μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλα μόρια και της συμμετοχής του σε διάφορα μοριακά μονοπάτια. Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους το γονίδιο αυτό ελέγχει τον σχηματισμό των οπίσθιων άκρων δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι, πειράματα σε ποντίκια έχουν υποδείξει το *PITX1* ως σημαντικό ανοδικό ρυθμιστή της αναπτυξιακής αυτής διεργασίας. Ο μεταγραφικός παράγοντας φαίνεται να παρεμβαίνει στο αναπτυξιακό μοτίβο μέσω της αλληλεπίδρασης του με ενισχυτές γονιδίων, παρεμβαίνοντας στη μεταγραφική ρύθμιση, ενώ πιθανότατα σχετίζεται άμεσα με την έκφραση των *Tbx4*, *Tbx15* και *Tbx18* (T-box transcription factors), επίσης σημαντικών ακρο-ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και του *SOX9* (Sry-related HMG-box gene 9). Ακόμη, το *PITX1* ρυθμίζει τον τόπο, τον χρόνο και την ποσότητα του χόνδρου που θα δημιουργηθεί κατά την ανάπτυξη των άκρων. Παρόμοια δεδομένα έχουν βρεθεί και για τη συμμετοχή του στο σχηματισμό της υπόφυσης, όπου η έκφρασή του διατηρείται σε όλα τα κύτταρα παραγωγής ορμονών κατά την ανάπτυξη αλλά και μετά το πέρας αυτής.^{30,33} Ακόμη, εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες- μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον *Tpit* (T-box expressed in pituitary), τον *Egr-1* (Early growth response 1) και τον *POU-HD* (POU domain, class 4, transcription factor), που οφείλονται για την παραγωγή των αδενοϋποφυσιακών ορμονών (κορτικοτρόπων, γοναδοτρόπων, θυρεοτρόπων κλπ.).³²



Εικόνα 29. Μοντέλο ρόλου *Pitx1* στην ανάπτυξη πίσω άκρων (HL). Για την εφαρμογή της ταυτότητας των HL, το *Pitx1* στοχεύει ενισχυτές των άκρων που βρίσκονται τόσο στα πρόσθια άκρα (FL) όσο και στα οπίσθια. Η χονδρογένεση είναι ένας σημαντικός στόχος της δράσης *Pitx1*.³⁰

1.3.3 Συμμετοχή στον Καρκίνο

Το *PITX1*, εκτός από τον αναπτυξιακό του ρόλο στη δημιουργία των οπίσθιων άκρων και της αδενοϋπόφυσης έχει βρεθεί να συμμετέχει σε αρκετά, σημαντικά, μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με την ογκοκαταστολή και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Το *PITX1* σχετίζεται με τη λειτουργία της τελομεράσης, την μεταγραφή της ογκοκατασταλτικής

πρωτεΐνης *p53*, το μονοπάτι των RAS GTPασών, καθώς και των παραγόντων απόκρισης σε υποξία HIF – και πιο συγκεκριμένα του *HIF-1*.

Η τελομεράση αποτελεί ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο, υπεύθυνο για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών. Τα τελομερή βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και είναι εξειδικευμένες δομές των χρωμοσωμάτων, αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που στοχεύουν στην προστασία της γενετικής πληροφορίας από τη φθορά, τη διασφάλιση της ακεραιότητας και τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων. Τα τελομερή, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μικραίνουν έπειτα από κάθε διαίρεση έως ότου φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος, οπότε και το κύτταρο σταματά να διαιρείται και πεθαίνει. Η τελομεράση ενεργοποιείται κατά την εμβρυογένεση και εξασφαλίζει τη δημιουργία των προστατευτικών αυτών αλληλουχιών, ενώ, μετά τη γέννηση, η δραστηριότητά της μειώνεται δραματικά στα περισσότερα κύτταρα (εκτός των βλαστικών και των κυττάρων του ανοσοποιητικού).

Η διατήρηση της ενεργότητας του συγκεκριμένου ενζύμου είναι πολλές φορές υπεύθυνη για την αθανатоποίηση των καρκινικών κυττάρων. Η ενεργότητα της τελομεράσης οφείλεται, κυρίως, στην έκφραση της αντίστροφης μεταγραφάσης, γνωστής και ως *TERT*, μίας εκ των δύο κύριων υπομονάδων του ολοενζύμου της τελομεράσης.³⁴ Η υπομονάδα *TERT* έχει αναφερθεί ως μεταγραφικός ρυθμιστής των μονοπατιών Wnt/ β -catenin και NF-kappaB, ενορχηστρώνοντας την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους και, κατ' επέκταση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανθεκτικότητα στην απόπτωση, χαρακτηριστικά που ευνοούν τον καρκίνο. Ο *PITX1* μεταγραφικός παράγοντας έχει ταυτοποιηθεί ως καταστολέας της μεταγραφής της *TERT*, μέσω απευθείας πρόσδεσής του στον υποκινητή της *TERT*. Αυτό συνάδει με τη μείωση των επιπέδων του *PITX1* που παρατηρείται σε πολλούς τύπους καρκίνου.³⁵



Εικόνα 30. Διάγραμμα που δείχνει τον υποκινητή *hTERT* (*h*=human) και τρία λευκά κουτιά που υποδεικνύουν περιοχές δέσμησης *PITX1* (*PITX1* Response Elements/RPE)³⁵

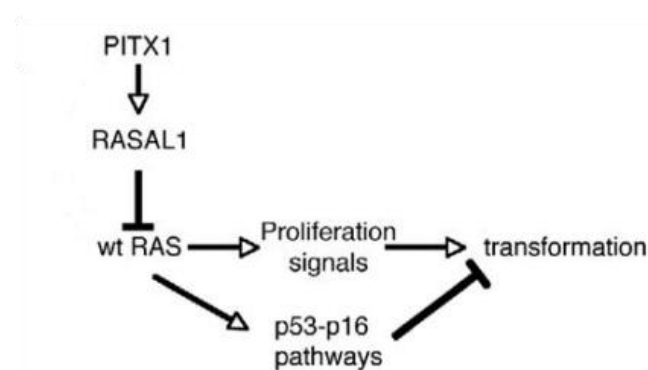
Το *PITX1* έχει, επίσης, ρόλο μεταγραφικού ρυθμιστή της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης *p53*. Η ογκοκατασταλτική *p53* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση, συμμετέχοντας στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, καθώς, επίσης, και στην επιδιόρθωση του DNA. Μεταλλάξεις, μείωση της έκφρασης ή απώλεια του γονιδίου της παρατηρούνται σε πληθώρα καρκινικών υποτύπων. Σε κανονικά κύτταρα, η *p53* μεταγράφεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, με την έκφραση της να επάγεται περαιτέρω σε περιπτώσεις βλάβης του DNA, ενεργοποίησης ογκογονιδίων, υποξίας και σε συνθήκες stress για τον οργανισμό. Η ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης φαίνεται να γίνεται κυρίως σε μετα-μεταφραστικό ή μεταφραστικό επίπεδο, ενώ οι γνώσεις που αφορούν την ρύθμιση της μεταγραφής της είναι σημαντικά λιγότερες.

Ο *PITX1*, λοιπόν, αποτελεί μεταγραφικό ενεργοποιητή της *p53*, αφού προσδένεται σε δύο ειδικές για αυτό αλληλουχίες στο γονίδιο της πρωτεΐνης – μία στον υποκινητή της και μία στο πρώτο εξώνιο της - και προάγει την μεταγραφή της. Επακολούθως, η *p53* προσδένεται σε γονίδια στόχους και προάγει την μεταγραφή τους. Πολλά από αυτά, όπως ο αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών *p21* και ο αυξητικός παράγοντας *PTGFb* (Platelet-derived

growth factor beta), σχετίζονται με την κυτταρική απόπτωση. Ως αποτέλεσμα, ο *PITX1* ελέγχει έμμεσα την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω άμεσης μεταγραφικής ρύθμισης της *p53*.³⁶

Επιπροσθέτως, η μεταγραφή και η μετατόπιση της *p53* στον πυρήνα, αναστέλλεται από την *HSPA9*, μέλος της οικογένειας Heat Shock Proteins 70 (*HSP70*). Έτσι, η *HSPA9* προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση, αποτελώντας έναν τρόπο για τα καρκινικά κύτταρα να επιτυγχάνουν την αθανатоποίηση. Ο *PITX1* αλληλεπιδρά με την *HSPA9*, αποτρέποντας την ογκογόνο δράση της. Παράλληλα, ωστόσο, μπορεί να αποτρέψει τη δράση της *HSPA9* και έμμεσα, χάρη στην ικανότητα του να αναστέλλει τη λειτουργία της τελομεράσης. Αυτό συμβαίνει καθώς, αν και τα κύτταρα αποφεύγουν την απόπτωση, τα τελομέρη τους διαρκώς μικραίνουν. Χωρίς τη δράση της τελομεράσης, η οποία βοηθά τα κύτταρα να αποφύγουν την γήρανση, η διαρκής σμίκρυνση των τελομερών προκαλεί κυτταρικό στρες σε βαθμό που δεν επιτρέπει την επιβίωση των κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν τον πολύπλοκο ρόλο του *PITX1* στην ογκοκατασταλτική ρύθμιση.³⁵

Ο *PITX1* δρα επιπρόσθετα ως καταστολέας της ενεργότητας και την ογκογόνου δράσης του μονοπατιού RAS. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας RAS αποτελούν μερικά από τα πιο συνήθη ογκογονίδια που εμφανίζονται ενεργοποιημένα στον καρκίνο. Οι RAS είναι μικρές, μονομερείς GTPάσες που μεταβιβάζουν σιγάλα αύξησης από υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας στον πυρήνα, μέσω της υδρόλυσης του δεσμευμένου GTP σε GDP. Η ενεργοποίηση της υδρόλυσης αυτής διαμεσολαβείται από *GEFs* (GTP Exchange Factors) και ο τερματισμός της από *GAPs* (GTP Activating Proteins). Μεταλλάξεις στις RAS πρωτεΐνες προάγουν τη μεταμόρφωση των κυττάρων σε καρκινικά μέσω της διέγερσης της κυτταρικής επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού ανεξαρτήτως σήματος στους υποδοχείς της επιφάνειας. Το *PITX1* γονίδιο, δρώντας ως ογκοκατασταλτικό, έχει βρεθεί να καταστέλλει το υπερενεργοποιημένο μονοπάτι των RAS μέσω απευθείας πρόσδεσης στον υποκινητή της RAS-GAP πρωτεΐνης *RASAL1* (RAS protein activator like 1) και ενεργοποίησης της μεταγραφής της. Παράλληλα, στα φυσιολογικά κύτταρα, η παρατεταμένη επαγωγή του μονοπατιού των RAS ισοσταθμίζεται ενδογενώς και από την ενεργοποίηση των *p53* και *p16* που καταστέλλουν μονοπάτια κυτταρικής αύξησης, με την *p53* να αποτελεί, όπως σημειώθηκε προηγουμένως, ακόμη έναν στόχο του *PITX1*.³⁷

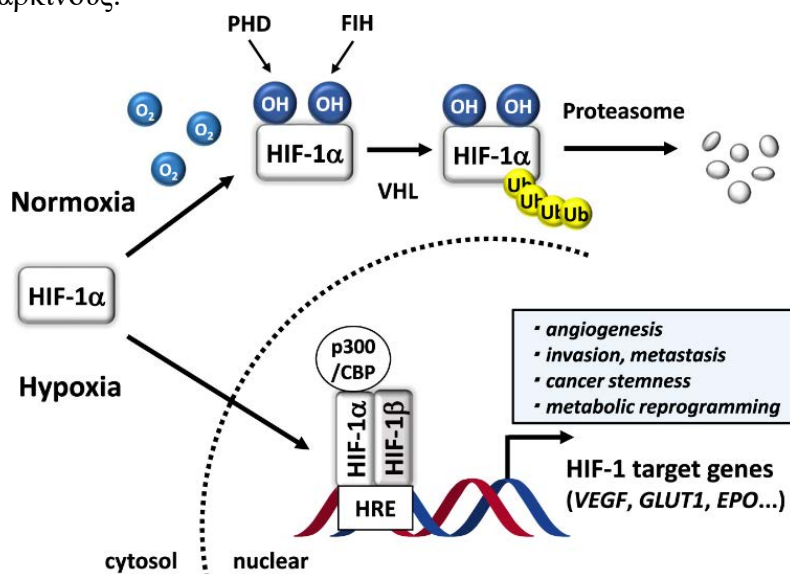


Εικόνα 31. Σχηματικό μοντέλο που δείχνει τον μηχανισμό μέσω του οποίου ο *PITX1* αναστέλλει το δυναμικό κυτταρικού μετασχηματισμού του wt-RAS³⁷

Ο μεταγραφικός παράγοντας *PITX1* σχετίζεται και με την μεταγραφική απόκριση του οργανισμού στις συνθήκες υποξίας, καθιστώντας τον έτσι πιθανό στόχο σε υποξικούς καρκινικούς όγκους. Ως υποξία χαρακτηρίζεται η κατάσταση κατά την οποία οι ιστοί ή/ και τα κύτταρα δεν λαμβάνουν αρκετό οξυγόνο προκειμένου να λειτουργήσουν σωστά. Σε περίπτωση έλλειψης οξυγόνου, τα κύτταρα ενεργοποιούν τη μεταγραφή μίας πληθώρας γονιδίων που

εξασφαλίζουν την κυτταρική επιβίωση και επαναφέρουν την ομοιόσταση του οξυγόνου. Η οικογένεια Παραγόντων που επάγονται από την Υποξία/ *HIF* διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην μεταγραφική απόκριση του κυττάρου στις συνθήκες υποξίας.

Η ενεργοποίηση των *HIF* οδηγεί στην μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό και την αυτοφαγία, με τρόπο ειδικό, κάθε φορά, για την περίπτωση. Ο *HIF-1* αποτελεί μέλος αυτής της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, σχετίζεται κυρίως με συνθήκες οξείας υποξίας, απαρτίζεται από τις υπομονάδες *HIF-1α* και *HIF-1β* και προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements/ HREs) στους υποκινητές γονιδίων-στόχων ενεργοποιώντας μονοπάτια επιβίωσης, αγγειογένεσης και μεταβολισμού. Ο μελετώμενος στην παρούσα διπλωματική *PITX1* έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί ρυθμιστή της υπομονάδας *HIF-1α* και οδηγεί στη διαφορική έκφραση μερικών εκ των γονιδίων στόχων του *HIF-1* σε συνθήκες υποξίας. Πιο συγκεκριμένα, ο *PITX1* δένει στην υπομονάδα *HIF-1β* και ελέγχει την στρατολόγηση του ετεροδιμερούς στους υποκινητές-στόχους, ρυθμίζοντας, έτσι, τη δράση του *HIF-1α*. Το *PITX1* είναι απαραίτητο για την έκφραση μερικών απομεθυλασών των ιστονών, οι οποίες παρουσιάζονται απορυθμισμένες σε υποξικούς καρκίνους.³⁸

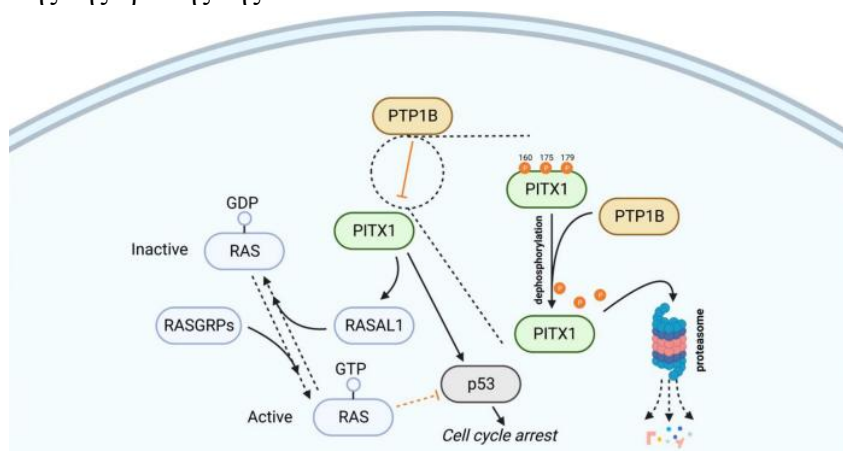


Εικόνα 32. Μοριακός μηχανισμός σηματοδότησης του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (*HIF-1*). Υπό νορμοξία, ο *HIF-1α* υδροξυλιώνεται από την προλυλ-4-υδροξυλάση (PHD) και τον ανασταλτικό παράγοντα *HIF-1* (FIH) και αλληλεπιδρά με τον von Hippel-Lindau (VHL), με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Αντίθετα, το *HIF-1α* συσσωρεύεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα υπό υποξία, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός ετεροδιμερούς του *HIF-1α*/*HIF-1β*. Στη συνέχεια, τα σύμπλοκα συνδέονται στο στοιχείο απόκρισης υποξίας (HRE) μαζί με το p300/CBP, γεγονός που ενεργοποιεί την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1) και της ερυθροποιητίνης (EPO).³⁹

Η έκφραση του *PITX1* διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου, με τα επίπεδα του να εμφανίζονται είτε μειωμένα – σε καρκίνους όπως το κακοήθες μελάνωμα, ο καρκίνος του οισοφάγου ή ο καρκίνος του πνεύμονα- είτε αυξημένα – όπως στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού και άλλους. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, πέραν της συμμετοχής του μεταγραφικού παράγοντα σε μονοπάτια με ογκοκατασταλτικό ρόλο, υπάρχουν περαιτέρω λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει ή μοριακού τύπου τροποποιήσεις που επηρεάζουν την πρωτεΐνη *PITX1* με τρόπους διαφορετικούς απ' όσους έχουν αναφερθεί έως τώρα.

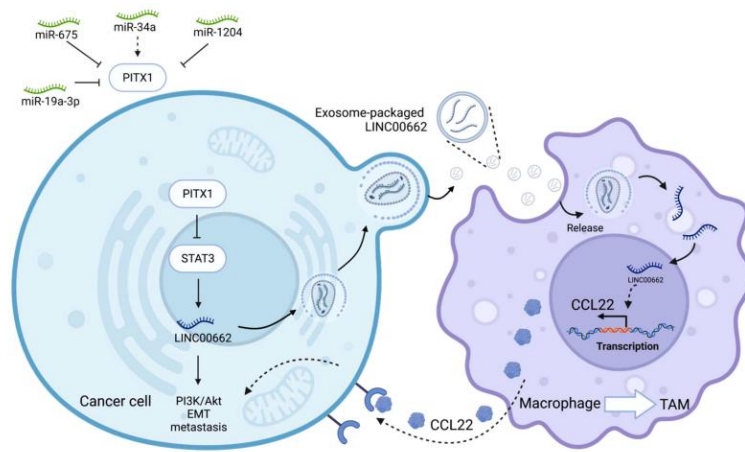
- **Φωσφορυλίωση:** Η φωσφατάση *PTP1B* (Protein tyrosine phosphatase 1B) έχει βρεθεί να αποφωσφορυλιώνει την *PITX1* μειώνοντας τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και προάγοντας την αποικοδόμηση της από το πρωτεάσωμα. Μεταλλάξεις στις θέσεις αποφωσφορυλίωσης αποτρέπουν την δράση της φωσφατάσης, επιτρέποντας στην

PITX1 να επιδράσει στο μονοπάτι RAS και να το καταστείλει. Υπερέκφραση της *PTP1B* φαίνεται να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Ακόμη, φωσφορυλίωση της *PITX1*, π.χ. από την κινάση *c-Abl* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), προάγει το μονοπάτι της κυτταρικής απόπτωσης μέσω σταθεροποίησης της πρωτεΐνης και ενίσχυσης της δράσης της.



Εικόνα 33. Το *PTP1B* αποφωσφορυλιώνει και προάγει την αποικοδόμηση του *PITX1* μέσω της οδού του πρωτεασώματος. Καθώς ανοδικά του *PITX1*, το *PTP1B* εμπλέκεται άμεσα στην αναστολή της έκφρασης του *PITX1*, το *PTP1B* μπορεί να αποφωσφορυλιώσει το *PITX1*, καθιστώντας το ασταθές και έτοιμο για αποικοδόμηση μέσω. Έτσι το *PITX1* δεν μπορεί να προάγει την επαγόμενη από το *RASAL1* αδρανοποίηση του *RAS* και την έναρξη της οδού σηματοδότησης *p53*. Επομένως, η υπερέκφραση του *PTP1B* μπορεί να αναστείλει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από το *PITX1* και να προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.⁴⁰

- **Μεθυλίωση:** Μεθυλίωση του γονιδίου της *PITX1* έχει βρεθεί αυξημένη σε καρκινικούς ιστούς και έχει συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση για τον ασθενή. Ωστόσο, οι μηχανισμοί πίσω από το φαινόμενο αυτό δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς ακόμη.
- **Μη κωδικοποιητικά RNAs:** Αυξημένη έκφραση του μη κωδικοποιητικού RNA LINC00662 είναι συνδεδεμένη με την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης των μονοπατιών Wnt/β-κατενίνης, SMD και Hippo. Το *PITX1* εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης του LINC00662, καθώς αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) και καταστέλλει την μεταγραφική ενεργοποίηση του LINC00662. Παράλληλα, η υπερέκφραση του *PITX1* μειώνει την έκφραση του *STAT3* και προάγει την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα, αποτρέποντας, έτσι, το LINC00662 να εκφραστεί και να δράσει υπέρ της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Εκτός αυτού, τα τρία μη κωδικοποιητικά RNA miR-675, miR-19a-3p και miR-1204 έχουν συνδεθεί σε μερικούς καρκίνους με μειορρύθμιση του *PITX1* μέσω πρόσδεσης στην 3'-UTR του και μετέπειτα αρνητικής ρύθμισης της έκφρασής του, προάγοντας, έτσι, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Αντιθέτως, το miR-34a φαίνεται να επάγει την διαμεσολαβούμενη από το *PITX1* απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Τα κυκλικά RNA (circRNAs) έχουν αναγνωρισθεί, τα τελευταία χρόνια, ως κρίσιμοι αρωγοί στις ανθρώπινες κακοήθειες, μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών σηματοδότησης ειδικών στα καρκινικά κύτταρα. Ένα εξ' αυτών είναι το CircPITX1, το οποίο προέρχεται από το γονίδιο του *PITX1* και επηρεάζει πολλές, σημαντικές για τον όγκο, διεργασίες, όπως τον πολλαπλασιασμό και τη γλυκόλυση. Ακόμη, το κυκλικό αυτό RNA αλληλεπιδρά με μη κωδικοποιητικά RNA που δρουν κατά των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας τη δράση τους.



Εικόνα 34. Το *PITX1* ρυθμίζει και ρυθμίζεται από μη κωδικοποιητικά RNA. Το *PITX1* μπορεί να αναστείλει άμεσα τη μεταγραφική δραστηριότητα του *STAT3* και στη συνέχεια να αναστείλει την μεταμόρφωση των μακροφάγων που προκαλείται από το *LINC00662* και τη μετάσταση του όγκου. Το *LINC00662* μπορεί να ενθυλακωθεί από εξωσώματα και στη συνέχεια να εκκριθεί εξωκυτταρικά για να πάει στα μακροφάγα. Το *LINC00662* μπορεί να προάγει τον μετασχηματισμό των μακροφάγων σε μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους (TAM) και να προάγει τη μεταγραφή και μετάφραση του φλεγμονώδους παράγοντα *CCL22* σε μακροφάγα. Μακροφάγα εκκρίνουν *CCL2* που θα ληφθεί από καρκινικά κύτταρα, προάγοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η υπερέκφραση του *PITX1* μπορεί να αναστείλει αυτή τη διαδικασία. Στην επάνω αριστερή γωνία της εικόνας υπάρχουν άλλα μη κωδικοποιητικά RNA που μπορούν να εμπλακούν στη ρύθμιση του *PITX1*.⁴⁰

Πρόσφατες έρευνες έχουν συνδέσει τον *PITX1* μεταγραφικό παράγοντα με μείωση της αντοχής των όγκων στη θεραπεία (Drug Resistance), με ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτοφαγίας και επιβίωση των βλαστικών κυττάρων. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι το *PITX1* γονίδιο ενδέχεται να έχει και ογκογόνο δράση, η οποία διερευνάται.⁴⁰

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο μεταγραφικός παράγοντας *PITX1* έχει σημαντικό αναπτυξιακό ρόλο, ωστόσο πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν την εμπλοκή του σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του νεφρού. Ο μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως κατανοητός, καθώς αν και το εν λόγω γονίδιο θεωρείται ότι έχει ογκοκατασταλτική δράση, στην τρέχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την υπερέκφρασή του σε ποικίλους όγκους. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PITX1* σε ασθενείς με καρκίνο νεφρού και σε σύγκριση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό των ίδιων ατόμων, προκειμένου να δούμε εάν διαφοροποιούνται. Παράλληλα η συσχέτιση των ευρημάτων με τις κλινικοϊστολογικές παραμέτρους των ασθενών θα ρίξει φως στον πιθανό ρόλο του παράγοντα *PITX1* στην καρκινογένεση του νεφρού και στην εκτίμηση του μορίου ως μελλοντικός βιοδείκτης .

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

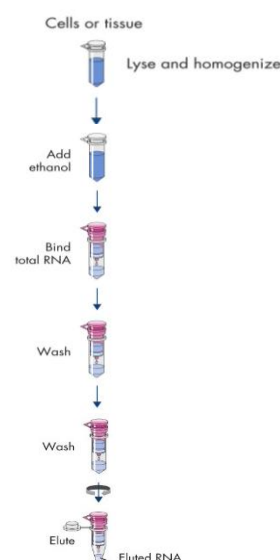
3.1 Υλικό Μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 44 ασθενείς με καρκίνο νεφρού, εκ των οποίων το 59,1% ήταν άνδρες και το 36,4% ήταν γυναίκες με μέση ηλικία 65,1 έτη (ηλικιακό εύρος: +/- 9,87). Οι ασθενείς χειρουργήθηκαν στην Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Μετά το χειρουργείο, το παρασκεύασμα πήγε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, όπου συλλέχθηκε νωπός ιστός από κάθε ασθενή - καρκινικός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός σε απόσταση >10 εκ. από τον όγκο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα διατήρησης RNA later και καταψύχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη -80°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασία τους.

3.2 Απομόνωση ολικού RNA (RNA extraction)

Η απομόνωση του ολικού RNA από το νωπό ιστό έγινε με τη χρήση του RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN), σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- I. Για κάθε ασθενή τα ιστοτεμάχια του κατεψυγμένου ιστού (καρκινικός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός), τεμαχίστηκαν σε πολύ μικρά κομμάτια σε τρυβλίο petri με τη βοήθεια λεπίδων.
- II. Ο ιστός διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2 ml, για ευκολότερη ομογενοποίηση.
- III. Έγινε προσθήκη λυτικού διαλύματος RLT με προσθήκη 10 µl β-μερκαπτοαιθανόλης ανά 1 ml RLT.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης ολικού RNA⁴¹

- IV. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση του δείγματος (vortex) και επώαση του για 1 h και 30 min με το λυτικό διάλυμα σε ψυχόμενο δοχείο με ενδιάμεση ανάδευση (vortex) ανά 20 min.
- V. Φυγοκέντρωση του δείγματος σε 21.000 g για 3 min και 30 sec και μεταφορά του υπερκείμενου.
- VI. Προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης 70% στο υπερκείμενο και ανάδευση με τη χρήση πιπέτας.
- VII. Μεταφορά 700 μ L του ομογενοποιημένου δείγματος σε στήλη παρεχόμενη από το kit και φυγοκέντρωση στα 8.000 g για 1 min και 30 sec.
- VIII. Απόρριψη του συλλεχθέντος υγρού και επανάληψη της διαδικασίας όσες φορές χρειαστεί, ώστε να περάσει όλο το δείγμα από τη στήλη.
- IX. Προσθήκη 700 μ L του διαλύματος πλύσης 1 (WB1) στη στήλη και φυγοκέντρωση στα 8.000 g για 1 min και 30 sec. Απόρριψη του συλλεχθέντος υγρού.
- X. Προσθήκη 500 μ L διαλύματος RPE στη στήλη και φυγοκέντρωση της στα 8.000 g για 1 min και 30 sec. Απόρριψη του συλλεχθέντος υγρού.
- XI. Επανάληψη του βήματος X με φυγοκέντρωση για 2 min και 30 sec.
- XII. Φυγοκέντρωση της στήλης στις 21.000 g για 1 min και 30 sec, ώστε να στεγνώσει η στήλη.
- XIII. Τοποθέτηση της στήλης σε καινούριο, αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf και προσθήκη 35 μ L νερού ελεύθερου από RNάσες.
- XIV. Επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρωση στα 8.000 g για 1 min και 30 sec.
- XV. Προσθήκη του διηθήματος που παίρνουμε από τη φυγοκέντρωση πίσω στη στήλη και επανάληψη του βήματος XIV.
- XVI. Φύλαξη του διηθήματος στους -80°C έως την επόμενη χρήση.



Εικόνα 14. Στήλη απομόνωσης RNA από kit QIAGEN

3.3. Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός RNA

Ακολούθησε εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του ολικού RNA που απομονώσαμε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.3.1 Φωτομέτρηση

Για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του κάθε δείγματος, χρησιμοποιήσαμε φασματοφωτόμετρο τύπου NanoDrop της εταιρείας Thermo Fisher, το οποίο ρυθμίσαμε σε λειτουργία μέτρησης RNA. Χρησιμοποιήσαμε 1.5 μ L νερού ελεύθερου από RNάσες ως τυφλό και στη συνέχεια φωτομετρήσαμε τα δείγματα RNA που είχαμε απομονώσει.

Η συγκέντρωση, του RNA εκτιμήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης κάθε δείγματος σε μήκος κύματος 260 nm. Για κάθε δείγμα κάναμε τρεις μετρήσεις και η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίστηκε με βάση τον μέσο όρο των μετρήσεων. Δεδομένης της ανάγκης για επαρκή ποσότητα RNA για την αντίστροφη μεταγραφή, επιλέχθηκαν μόνο τα δείγματα των οποίων η συγκέντρωση υπερέβαινε τα 100 ng/ μ L.

Η καθαρότητα του RNA εκτιμήθηκε επίσης από το φασματοφωτόμετρο, με βάση τον λόγο A_{260}/A_{280} . Ο λόγος αυτός δίνει μία εικόνα της καθαρότητας, αφού λαμβάνει υπόψη τον τους πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες που απορροφούν επίσης στο υπεριώδες φως (π.χ. πρωτεΐνες). Το επιθυμητό εύρος τιμών για τον συγκεκριμένο λόγο ορίζεται ως 1.9-2.3. Εάν ο λόγος είναι σημαντικά χαμηλότερος μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών, που απορροφούν ισχυρά στα 280 nm ή κοντά στα 280 nm.

3.3.2 Παρασκευή Πηκτώματος Αγαρόζης

Ελέγξαμε τα RNA που απομονώσαμε και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για να επιτύχουμε τη μέγιστη δυνατή ανάλυση.

- Αρχικά, έγινε παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE από 10X TBE. Το TBE (Tris Borate EDTA) είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του πηκτώματος και παράλληλα ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα στο δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αποτελείται από Tris, που διατηρεί το pH σταθερό κατά την ηλεκτροφόρηση, από βορικό οξύ ή βορικό νάτριο (Borate), που διατηρεί το pH και εξασφαλίζει τη σταθερότητα του διαλύματος και από τον χηλικό παράγοντα EDTA, ο οποίος δεσμεύει τα μεταλλικά ιόντα, που ειδιάλλως θα αποτελούσαν συμπαράγοντες στα νουκλεολυτικά ένζυμα. Για την παρασκευή 1 L διαλύματος 1X TBE από 10X TBE γίνεται προσθήκη 100 mL 10X TBE σε 900 mL δις απεσταγμένου νερού, όπως προκύπτει από τον νόμο της αραίωσης ($10XV_{APX}=1XV_{TEL} \rightarrow 10XV_{APX}=1X*1\text{ L} \rightarrow V_{APX}=0.1\text{ L}=100\text{ mL}$)
- Προκειμένου η συγκέντρωση της αγαρόζης να αποτελεί το 2% βάρος/όγκο του πηκτώματος, πρέπει ανά 100 mL 1X TBE να προσθέσουμε 2 gr αγαρόζης. Λόγω της χωρητικότητας του εκμαγείου που διατίθεται για την παρασκευή του πηκτώματος, χρησιμοποιούμε 300 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE και 6 gr αγαρόζης. Η μέτρηση της ποσότητας αγαρόζης έγινε σε ζυγό ακριβείας.
- Αγαρόζη και TBE προστίθενται σε κωνική φιάλη των 500 mL και, τοποθετούνται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνονται έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί πλήρως.
- Στο διαυγές διάλυμα που προκύπτει μετά από τη διάλυση αγαρόζης, προστίθενται 20 μ L βρωμιούχου αιθιδίου, προκειμένου να διευκολυνθεί η οπτικοποίηση και η

ανάλυση του RNA, αφού το βρωμιούχο αιθίδιο δένει ανάμεσα στις βάσεις των νουκλεϊκών οξέων και εκπέμπει φθορισμό όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV light).

- Τέλος, το διάλυμα τοποθετείται στο εκμαγείο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί ειδικά χτενάκια για τη δημιουργία κατάλληλων βοθρίων και αφήνεται να κρυώσει και να πήξει πριν τη χρήση.
- Όταν είναι έτοιμο, εφόσον δεν χρησιμοποιηθεί άμεσα, τοποθετείται σε μεμβράνη για τη διατήρηση της υγρασίας και τυλίγεται σε αλουμινόχαρτο, καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο.
- Φυλάσσεται στο ψυγείο (συντήρηση) μέχρι τη χρήση του.

	Συστατικά		
1X TBE BUFFER (1 L)	100 mL 10x TBE BUFFER	900 mL dH ₂ O	
AGAROSE GEL 2% (300 mL)	300 mL 1X TBE BUFFER	6 gr agarose	20 μL Ethidium bromide

Πίνακας 5. Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης σύστασης 2% βάρος/όγκο.

3.3.3 Ηλεκτροφόρηση RNA

Η ηλεκτροφόρηση των RNA έγινε σε πήκτωμα αгарόζης σύστασης 2% βάρος/ όγκο. Για τη φόρτωση των βοθρίων του πηκτώματος χρησιμοποιήσαμε 5 μL του εκάστοτε δείγματος αναμιγμένα με 6 μL χρωστικής φόρτωσης (gel loading buffer). Μετά την ανάμιξη χρωστικής και δείγματος, το μίγμα φορτώθηκε στο κατάλληλο βοθρίο του πηκτώματος, το οποίο είχαμε τοποθετήσει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Εφαρμόσαμε ηλεκτρικό πεδίο 150 Volt στο πήκτωμα αгарόζης, το οποίο ώθησε το αρνητικά φορτισμένο RNA να κινηθεί προς τον θετικό πόλο της συσκευής. Ακολούθησε η τοποθέτηση του πηκτώματος της ηλεκτροφόρησης υπό το φως υπεριώδους ακτινοβολίας στη συσκευή MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems). Η υπεριώδης ακτινοβολία ενεργοποιεί το φθορισμό του βρωμιούχου αιθιδίου, και τα αποτελέσματα αποθηκεύονται με τη μορφή εικόνας σε υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή MiniBIS Pro (Εικόνες 34 & 35).

3.4 Κατασκευή cDNA

Προκειμένου να μετρήσουμε τα επίπεδα έκφρασης του PITX1, τόσο στον καρκινικό όσο και στον φυσιολογικό ιστό, ήταν, αρχικά, απαραίτητη η κατασκευή cDNA από το ολικό RNA που απομονώθηκε. Η μετατροπή αυτή είναι σημαντική καθώς, το mRNA του γονιδίου-στόχου, που θα αναδείξει μετέπειτα τα επίπεδα έκφρασής του, είναι ιδιαίτερα εύθραυστο, δυσκολεύοντας την επεξεργασία του. Για την μετατροπή ακολουθήθηκε πρωτόκολλο Reverse Transcriptase PCR (Solis BioDyne FIREScript RT cDNA synthesis kit). Κατ' αυτό, 1 μg από το RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα, αναμίχθηκε με 1μl από τυχαίους εκκινητές (random primers) και προστέθηκε νερό ελεύθερο από νουκλεάσες έως τελικό όγκο 16 μl. Το μίγμα επωάστηκε στη συνέχεια για 5 min στους 65°C εντός του Mastercycler της Eppendorf, με σκοπό οι εκκινητές να υβριδίσουν στο RNA-εκμαγείο που τους δόθηκε. Η θερμοκρασία των 25°C είναι αρκετή ώστε να υβριδίσουν οι εκκινητές, χωρίς ωστόσο να δημιουργήσουν μη

ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, ενώ, παράλληλα, εξασφαλίζει πως το RNA δε θα σχηματίσει δευτεροταγείς δομές που θα απέτρεπαν την αντίστροφη μεταγραφή του. Μετά το πέρας των 5 min οι αντιδράσεις συνεχίστηκαν στον πάγο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Προκειμένου να μετρήσουμε τα επίπεδα έκφρασης του PITX1 γονιδίου, στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, προχωρήσαμε στη σύνθεση cDNA από το ολικό RNA που απομονώθηκε. Η σύνθεση του cDNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο της Reverse Transcriptase PCR (Solis BioDyne FIREScript RT cDNA synthesis kit). Κατ' αυτό, 1 µg από το RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα, αναμίχθηκε με 1µl από τυχαίους εκκινητές (random primers) και προστέθηκε νερό ελεύθερο από νουκλεάσες έως τελικό όγκο 16 µl. Το μίγμα επώαστηκε για 5 min στους 65°C εντός του κυκλοποιητή Mastercycler της εταιρείας Eppendorf, με σκοπό οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στο RNA-εκμαγείο. Η θερμοκρασία των 25°C είναι αρκετή ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές, χωρίς να δημιουργήσουν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, ενώ, παράλληλα, εξασφαλίζει πως το RNA δε θα σχηματίσει δευτεροταγείς δομές που θα απέτρεπαν την αντίστροφη μεταγραφή του. Μετά το πέρας των 5 min οι αντιδράσεις συνεχίζονται στον πάγο, σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση (20µl)
Δείγμα RNA	2 µg	Ανάλογα το δείγμα
Τυχαίοι εκκινητές (100µM)	1µl	5 µM
H ₂ O ελεύθερο από νουκλεάσες	Έως 16 µl	
Σύνολο	16 µl	

Πίνακας 6. Πρωτόκολλο παρασκευής cDNA/ 1^ο μέρος

Στα 16 µl προστίθενται 2 µl από διάλυμα της αντίδρασης, το οποίο περιείχε DTT και είχε συγκέντρωση 10X, 0.5 µl από το μίγμα των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), 1 µl από την αντίστροφη μεταγραφάση FIREScript και 0.5 µl αναστολέας RNάσης RiboGrip, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση (20µl)
10x RT διάλυμα αντίδρασης με DTT	2 µl	1x
dNTP μίγμα (20 mM από το καθένα)	0.5 µl	5 µM
FIREScript RT αντίστροφη μεταγραφάση	1 µl	10 U/µl
RiboGrip RNase αναστολέας (40 U/µl)	0.5 µl	1 U/µl
Συνολικός Όγκος	20 µl	

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο παρασκευής cDNA/ 2^ο μέρος

Τα δείγματα τοποθετούνται ξανά στον κυκλοποιητή Mastercycler της εταιρείας Eppendorf, και η σύνθεση του cDNA έγινε σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Υβριδισμός εκκινητών	25°C	10 min
Αντίστροφη Μεταγραφή	50°C	30 min
Απενεργοποίηση Ενζύμου	85°C	5 min

Πίνακας 8. Συνθήκες παρασκευής cDNA

Το πρώτο βήμα λειτουργεί όπως και η αρχική επώαση, διασφαλίζοντας τη σωστή υβριδοποίηση των εκκινητών και την αποφυγή των δευτεροταγών δομών RNA. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 50°C, θερμοκρασία βέλτιστη για τη λειτουργία του ενζύμου. Με το πέρας των 30 min της σύνθεσης του cDNA, η θερμοκρασία αυξάνει έως τους 80°C, όπου και παραμένει για άλλα 5 min με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Το πρώτο βήμα λειτουργεί όπως και η αρχική επώαση, διασφαλίζοντας τη σωστή υβριδοποίηση των εκκινητών και την αποφυγή των δευτεροταγών δομών RNA. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 50°C, θερμοκρασία βέλτιστη για τη λειτουργία του ενζύμου. Με το πέρας των 30 min της σύνθεσης του cDNA, η θερμοκρασία αυξάνει έως τους 80°C, όπου και παραμένει για άλλα 5 min με σκοπό την αδρανοποίηση του ενζύμου.

3.5 PCR Ελέγχου

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν ήταν επιτυχής η διεργασία της αντίστροφης μεταγραφής κι εάν παράχθηκε πράγματι cDNA από το ολικό RNA που απομονώσαμε, ακολούθησε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για το γονίδιο του Υποδοχέα του Ρετινοϊκού Οξέος Άλφα (RARA). Στην αντίδραση προστίθεται και αρνητικός μάρτυρας που περιέχει δις απεσταγμένο νερό αντί για 5 μl cDNA, ώστε να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση παρατίθενται στον ακόλουθο Πίνακα (Πίνακας 9).

Αντιδραστήρια	Όγκος
5x ρυθμιστικό διάλυμα	10 μl
Μίγμα dNTPs (40 mM)	1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl
RARA 6 εκκινητής	2 μl
RARA 8 εκκινητής	2 μl
Kapa Taq (5U/μl)	0.3 μl
cDNA (μg/μl)	5 μl
ddH ₂ O	27.7 μl
Συνολικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 9. Πρωτόκολλο PCR RARA

Τα δείγματα θερμαίνονται στους 94°C για 5 min, με σκοπό την αποδιάταξη της δίκλωνης έλικας του cDNA. Ακολουθούν 40 κύκλοι ενίσχυσης που περιλαμβάνουν: 1 min στους 94°C για την αποδιάταξη, 1 min στους 53°C με σκοπό την πρόσδεση των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία και 1 min στους 72°C για την επιμήκυνση του ενισχυόμενου τμήματος. Μετά το πέρας των 40 κύκλων, ακολούθησε άλλο ένα βήμα για 10 min στους 72°C με σκοπό την επιμήκυνση τμημάτων που πιθανώς να μην είχαν ολοκληρωθεί.

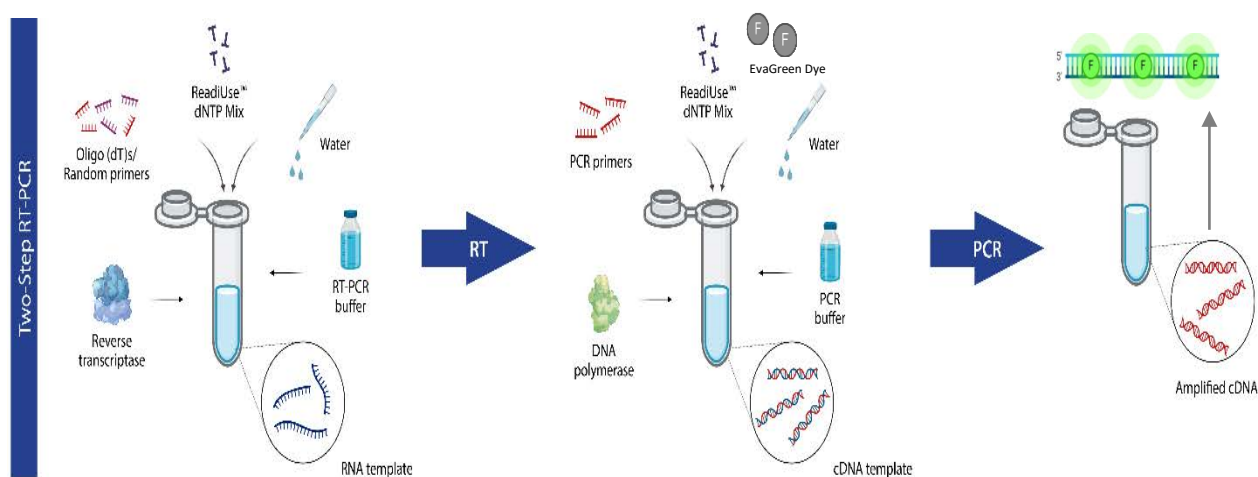
Τα προϊόντα της PCR ελέγχου ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης σύστασης 2% βάρος/όγκο. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp για να ελεγχθεί το μέγεθος της ζώνης που λαμβάνουμε από την PCR (~300 bp) (Εικόνα 36)

3.6 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative real time PCR, q-rtPCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (q-rtPCR) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους μέτρησης των επιπέδων έκφρασης των νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων γίνεται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Για την ανίχνευση των προϊόντων, στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική EvaGreen Dye (Solis BioDyne). Αποτελείται από δύο μονομερείς χρωστικές, συνδεδεμένες μεταξύ τους με ένα εύκαμπτο διαχωριστικό στοιχείο που τις φέρνει κοντά αποτρέποντας το φθορισμό τους. Παρουσία δίκλωνου DNA, η EvaGreen προσδένεται σε αυτό, με αποτέλεσμα οι χρωστικές να απομακρύνονται η μία από την άλλη και να εκπέμπουν φθορισμό. Κατά την πορεία της αντίδρασης, η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά, με αποτέλεσμα τα μόρια χρωστικής που προσδένονται σε αυτό να αυξάνονται επίσης και, άρα, και ο φθορισμός να πολλαπλασιάζεται. Το θετικό της παρούσης χρωστικής είναι πως η ιδιαίτερη στερεοδιαμόρφωσή της μειώνει σημαντικά τον «θόρυβο» από το φθορισμό της μη δεσμευμένης χρωστικής.

Στην παρούσα διπλωματική, για την προετοιμασία της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το κιτ HOT FIREPol EvaGreen qPCR της Solis BioDyne σε συνδυασμό με ειδικούς για το *PITXI* γονίδια εκκινητές. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ο κυκλοποιητής το RotorGene 5plex.



Εικόνα 15. Two-Step RT-PCR⁴²

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, καθώς και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στους ακόλουθους πίνακες:

Αντιδραστήρια	Όγκος
HOT FIREPol EvaGreen qPCR μίγμα αντιδραστηρίων (5x)	4 μl
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0.2 μl
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0.2 μl
DNA υπόστρωμα	Μεταβλητός
H ₂ O	έως 20 μL
Σύνολο	20 μl

Πίνακας 10. Πρωτόκολλο qPCR

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Ενεργοποίηση	95°C	12 min	1
Αποδιάταξη	95 °C	15 s	40
Υβριδισμός εκκινητών	62 °C	30 s	
Κλωνική Επέκταση	72 °C	30 s	

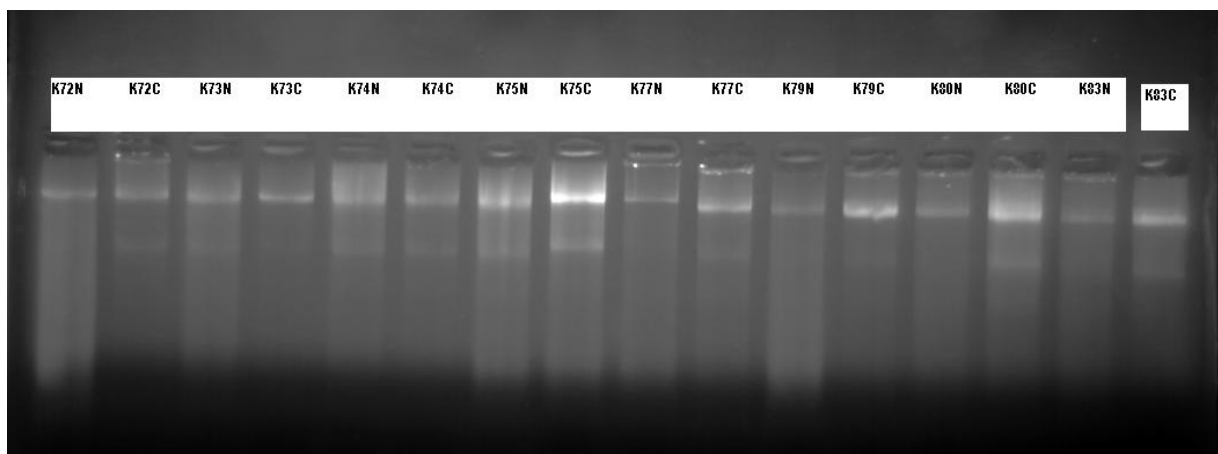
Πίνακας 11. Πρόγραμμα qPCR

3.7 Στατιστική Ανάλυση

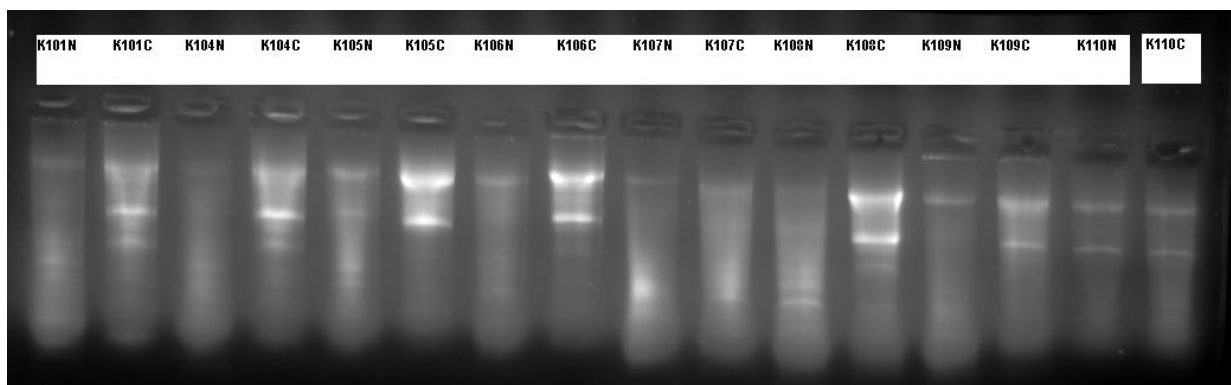
Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των δεδομένων, για την οποία έγινε συλλογή των Ct των q-rPCR σε excel όπου προστέθηκαν και τα κλινικοϊστολογικά χαρακτηριστικά όπως αυτά αναφέρονται στις εκθέσεις που μας δόθηκαν από την Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική. (Εικόνα 47). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS 29.0.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

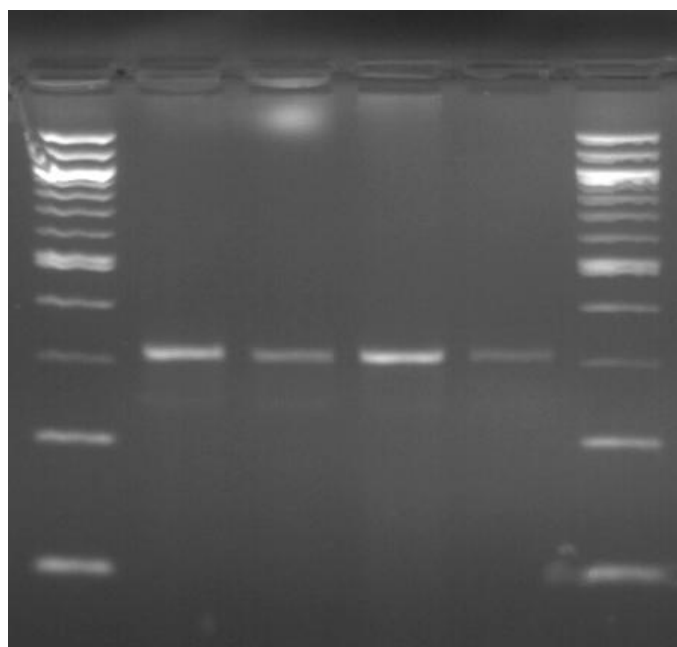
Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν 120 ασθενείς, για τους οποίους συλλέχθηκε νωπός ιστός, τόσο καρκινικός όσο και παρακείμενος φυσιολογικός. Από αυτούς τους ιστούς απομονώθηκε RNA, του οποίου η ποιότητα ελέγχθηκε μέσω φωτομέτρησης και ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία σε πρωτόκολλο Reverse Transcription PCR με σκοπό την παραγωγή cDNA. Από τα 120 δείγματα, 61 πληρούσαν τις προδιαγραφές του πρωτοκόλλου παραγωγής cDNA. Η επιτυχία της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής, έπειτα, ελέγχθηκε μέσω PCR για το γονίδιο του υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος άλφα (RARA) και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων αυτής. Εν συνεχεία, το cDNA χρησιμοποιήθηκε σε πρωτόκολλο qPCR με σκοπό την ανίχνευση των διακυμάνσεων των επιπέδων του γονιδίου PITX1 σε καρκινικούς ιστούς έναντι των φυσιολογικών ιστών.



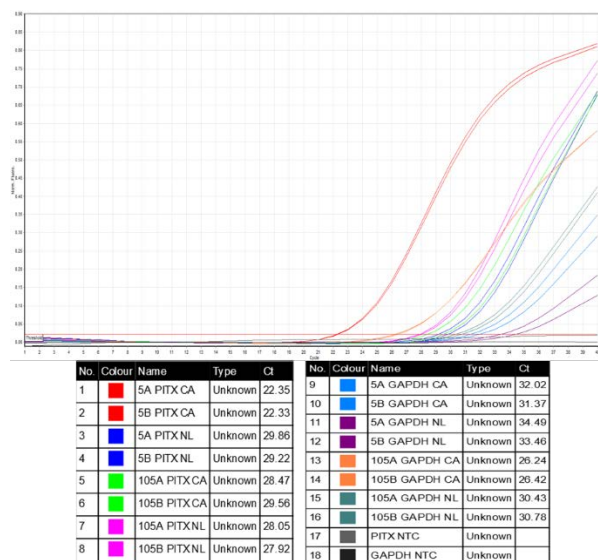
Εικόνα 16 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης απομονωμένου RNA



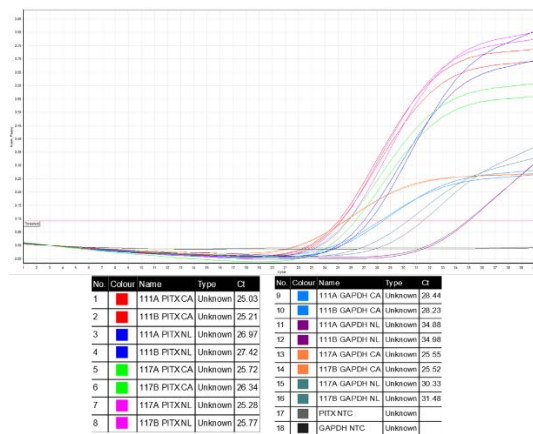
Εικόνα 17 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης απομονωμένου RNA



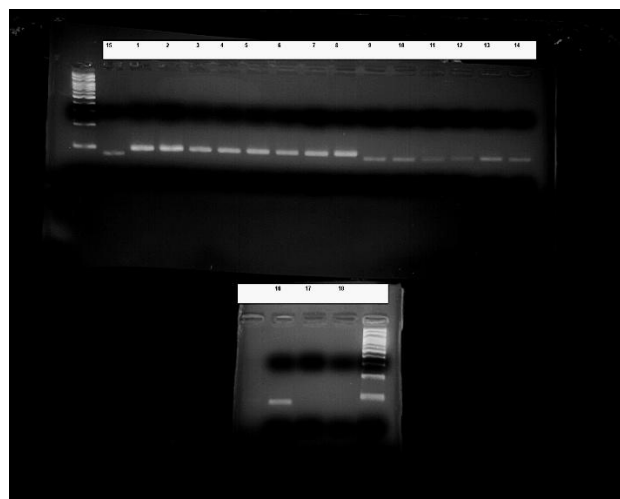
Εικόνα 18 Αποτελέσματα PCR ελέγχου (γονίδιο RARA, προϊόν 306 ζεύγη βάσεων, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους)



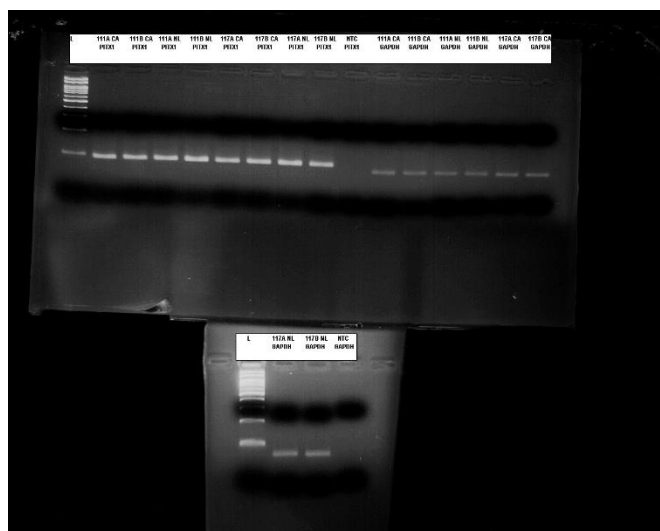
Εικόνα 19 Αποτελέσματα qPCR



Εικόνα 20 Αποτελέσματα qPCR



Εικόνα 21 Οπτικοποίηση Αποτελεσμάτων Εικόνας 37



Εικόνα 22 Οπτικοποίηση Αποτελεσμάτων Εικόνας 38

Σε συνέχεια των πειραμάτων, ακολούθησε η στατιστική ανάλυση με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS Statistics 29.0. Εκτιμήσαμε τα επίπεδα έκφρασης για το γονίδιο αναφοράς GAPDH και το γονίδιο PITX1 και υπολογίσαμε το εύρος των επιπέδων έκφρασής τους με βάση τον κύκλο (Ct) όπου μπαίνουν σε εκθετική φάση τα δείγματά μας. Υπολογίσαμε επίσης τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση σε κάθε περίπτωση

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Μέσος Όρος PITX1	44	17.16	30.72	24.89	2.92
Μέσος Όρος NL PITX1	44	22.27	31.08	27.13	2.32
Μέσος Όρος GAPDH	44	20.02	37.60	28.23	3.63
Μέσος Όρος NL GAPDH	44	23.71	37.81	30.78	3.10

Εικόνα 41 Συγκριτικές Στατιστικές Δοκιμές

Έπειτα διεκπεραιώσαμε ένα Independent Samples t-Test με σκοπό να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης του PITX1 καθώς και τη μεταβολή αυτών μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού.

Independent Samples Test για PITX1 σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό

	F	Sig.	t	df	p	p	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower Upper	
PITX1 / PITX1 Normal	0.331	0.567	3.984	86	<0.001	<0.001	2.23886	0.56200	1.12165	3.35607

Εικόνα 23 Independent Samples Test για εκτίμηση επιπέδων έκφρασης PITX1 σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό

Έπειτα κάναμε σχετική ποσοτικοποίηση του εξεταζόμενου γονιδίου PITX1 σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς GAPDH τόσο για τα καρκινικά όσο και για τα μη καρκινικά δείγματα των ασθενών της μελέτης μας.

Δείκτης	Τύπος	Μέσος όρος (C _t)	Αποτέλεσμα
Σχετική ποσοτικοποίηση καρκινικών δειγμάτων	2 [^] (-Ct_Ca)	24.89	3.22 x 10 ⁻⁸
Σχετική ποσοτικοποίηση φυσιολογικών δειγμάτων	2 [^] (-Ct_Normal)	27.13	6.81 x 10 ⁻⁹
Λόγος σχετικής ποσοτικοποίησης καρκινικών/φυσιολογικών δειγμάτων	Σχετική ποσοτικοποίηση καρκινικών δειγμάτων / Σχετική ποσοτικοποίηση φυσιολογικών δειγμάτων	-	4.73

Εικόνα 43 Σχετική ποσοτικοποίηση σε καρκινικά και μη καρκινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο νεφρού

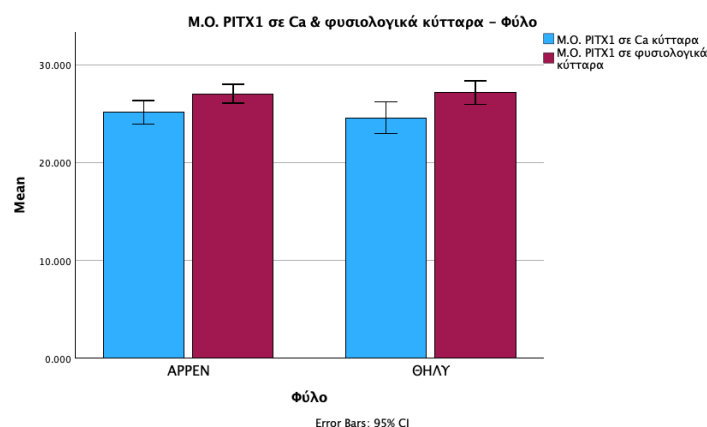
Και χρησιμοποίησαμε τα δεδομένα για ένα ακόμη Independent Samples t-Test με το οποίο κατορθώσαμε να συσχετίσουμε το γονίδιο μας με το ιδιοσύστατο GAPDH.

Independent Samples Test

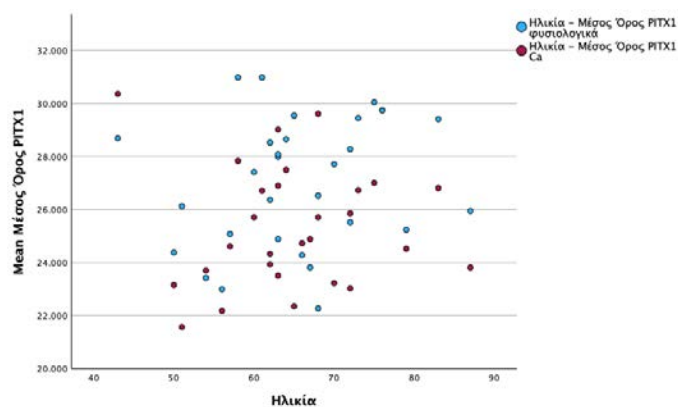
								95% Confidence Interval of the Difference	
				Significance		Mean Difference	Std. Error Difference		
				One-Sided p	Two-Sided p			Lower	Upper
PITX1 / GAPDH	2.061	0.155	4.768	86	<0.001	<0.001	3.34602	0.70176	1.95098 4.74107
σε Ca κύτταρα									

Εικόνα 44 Έλεγχος ανεξάρτητων δειγμάτων (independent samples t-test)

Στη συνέχεια συσχετίσαμε τα επίπεδα έκφρασης του PITX1 γονιδίου με παραμέτρους όπως η ηλικία των ασθενών, το φύλο και ορισμένα κλινικοϊστολογικά στοιχεία.



Εικόνα 45 Επίπεδα έκφρασης του PITX1 σε CA & NL δείγματα στα δύο φύλα



Εικόνα 46 Κατανομή των επιπέδων έκφρασης του PITX1 γονιδίου σε σχέση με την ηλικία

Για να εξετάσουμε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ύπαρξης διαυγοκυτταρικού τύπου κυττάρων έναντι των άλλων για το Μέσο Όρο έκφρασης του γονιδίου PITX1, πραγματοποιήσαμε έναν ανεξάρτητο t-test, με $t(27) = 0.292$ και $p = 0.755$.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις απεικονίζονται παρακάτω:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

Εικόνα 47 Excel με πληροφορίες δειγμάτων ασθενών

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί την 12^η πιο συχνή κακοήθεια παγκοσμίως, με τα ποσοστά θνησιμότητας της να ανέρχονται στο 45%, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Πρόκειται για πολυπαραγοντική νόσο, η οποία επηρεάζεται από το φύλο, την ηλικία, την εθνικότητα, τον τρόπο ζωής (π.χ. κάπνισμα, παχυσαρκία) και, κυρίως, τη γενετική ταυτότητα του ατόμου, με γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις που αυξάνουν κατακόρυφα τον κίνδυνο εμφάνισής της νόσου.¹⁵

Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί όρο-ομπρέλα που εμπεριέχει μία σειρά κακοηθειών με ποικίλα χαρακτηριστικά. Χωρίζεται σε δύο μεγάλες υποκατηγορίες, τα διαυγοκυτταρικά και τα μη διαυγοκυτταρικά καρκινώματα, με τη δεύτερη να περιέχει πολλές μικρότερες υποκατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των χρωμόφοβων και των θηλώδων καρκινωμάτων. Λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης της τεχνολογίας τα τελευταία χρόνια, η ταξινόμηση των νεοπλασμάτων γίνεται με μία μορφομοριακή προσπέλαση.^{18,19}

Το αναπτυξιακό γονίδιο *PITX1* κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα PITX1 που εκφράζεται σε μία πληθώρα ιστών μέσω μοριακών διακοπών που επιτρέπουν τη μεταγραφή του, ενώ φαίνεται να διαθέτει έναν μηχανισμό αυτορρύθμισης για να διατηρεί την έκφραση του σε σταθερά επίπεδα. Ωστόσο, εκτός από τη συμμετοχή του στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, το *PITX1* γονίδιο φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλά μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με την καταστολή του όγκου και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Σχετίζεται με τη λειτουργία της τελομεράσης, τη μεταγραφή της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, το μονοπάτι των RAS GTPασών, καθώς και με τους παράγοντες απόκρισης σε υποξία HIF – και πιο συγκεκριμένα τον HIF-1 και φαίνεται να ασκεί κυρίως ογκοκατασταλτική δράση.^{34,35,36,37,38,39}

Λόγω των πολλαπλών και πολύπλοκων ρόλων του PITX1, ο μεταγραφικός παράγοντας επιλέχθηκε ως αντικείμενο μελέτης της παρούσης διπλωματικής εργασίας, με σκοπό να μελετηθούν οι τυχόν διαφορές στα επίπεδα έκφρασής του σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό, καθώς και αν αυτές είναι επαρκείς για να θεωρηθεί το PITX1 πιθανός βιοδείκτης στον καρκίνο

του νεφρού. Για αυτό το σκοπό, μελετήσαμε 44 ασθενείς που χειρουργήθηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (συλλέξαμε καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό για κάθε ασθενή). Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε, εν συνεχεία, ολικό RNA, δημιουργήθηκε cDNA και ακολούθησε ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Τα επίπεδα έκφρασης του PITX1 γονιδίου εκτιμήθηκαν και συσχετίστηκαν στατιστικά με παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο των ασθενών και ιστολογικά στοιχεία του όγκου. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistics (έκδοση 29.0). Η μέση ηλικία των συμμετεχόντων ήταν τα 65,1 έτη (τυπική απόκλιση 9.87 έτη), ενώ το πληθυσμιακό δείγμα αποτελείται κατά 59.1% από άντρες και 36.4% από γυναίκες. Η μέση τιμή έκφρασης του PITX1 (σε Ct) ήταν 24.98 στα καρκινικά δείγματα και 27.13 στα φυσιολογικά, με τυπικές αποκλίσεις 2.92 και 2.32 αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές για το GAPDH ήταν 28.23, 30.78, 3.63 και 3.10. Τα Independent T-tests που διεκπεραιώθηκαν έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου PITX1 είναι σημαντικά υψηλότερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον φυσιολογικό ($t(86)=3.98$, $P\text{-value} < 0.001$).

Η σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Quantification) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου με βάση την Ct τιμή που προέκυψε από την ανάλυση της qPCR. Οι τιμές Ct στην παρούσα ανάλυση ήταν 28.23 για τα καρκινικά δείγματα και 30.78 για τα φυσιολογικά δείγματα. Η σχετική ποσοτικοποίηση έδειξε ότι η γονιδιακή έκφραση στα καρκινικά δείγματα είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα φυσιολογικά. Συγκεκριμένα, η σχετική ποσότητα mRNA στα καρκινικά δείγματα είναι περίπου 3.22×10^{-8} , ενώ στα φυσιολογικά δείγματα είναι 6.81×10^{-9} . Ο λόγος καρκινικών προς φυσιολογικών κυττάρων της σχετικής ποσοτικοποίησης είναι περίπου 4.73, κάτι που σημαίνει ότι το γονίδιο εμφανίζει 4.73 φορές υψηλότερη έκφραση στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αυτή η διαφορά υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να συσχετίζεται με την καρκινογένεση και να εμπλέκεται σε μηχανισμούς κυτταρικής δυσλειτουργίας που παρατηρούνται στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

Για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PITX1* και *GAPDH* πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανεξάρτητων δειγμάτων (independent samples t-test). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων *PITX1* και *GAPDH* σε καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, το t-test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($t(86) = 4.77$, $p = 0.000008 < 0.001$), υποδηλώνοντας ότι τα δύο γονίδια εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο.

Δεν αναδείχθηκαν στατιστικές σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του PITX1 γονιδίου με το φύλο και την ηλικία των ασθενών, καθώς και με τον ιστολογικό τύπο του νεφροκυτταρικού καρκίνου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσης πτυχιακής υποδεικνύουν ότι το *PITX1* εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη έκφραση στον καρκινικό ιστό σε σύγκριση με τον φυσιολογικό. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες που θέλουν το *PITX1* να έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο σε αρκετούς τύπους καρκίνου, ενώ ενισχύει την πεποίθηση ότι η δράση του εναλλάσσεται ανάλογα με το είδος του καρκίνου καθώς και το εκάστοτε μικροπεριβάλλον του όγκου. Το *PITX1* πιθανώς να συμμετέχει σε μονοπάτια κυτταρικής ανάπτυξης, κυτταρικής μετανάστευσης ή ρύθμισης άλλων ογκογονιδίων, πέραν της ήδη γνωστής ογκοκατασταλτικής δράσης που επιδεικνύει με τη συμμετοχή του στα μονοπάτια των *p-53*, *TERT*, *HIF-1* και *RAS*.⁴⁰ Η θεωρία αυτή ενισχύεται τόσο από τον έντονο αναπτυξιακό του ρόλο, όσο και από παρεμφερείς μελέτες που δείχνουν αυξορρυθμισή του σε κάποιους καρκινικούς υποτύπους^{40,43}. Για παράδειγμα, η έκφραση του *PITX1* φαίνεται να είναι αρκετά αυξημένη σε πολλούς επιθετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού καθώς αλληλεπιδρά με και

εμποδίζει τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (*Estrogen Receptor Alpha/ Era*)^{40,45}. Ομοίως, η αυξημένη έκφρασή του στη λευχαιμία συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση λόγω σύνδεσης της έκφρασης του *PITX1* με τη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και το μονοπάτι *NOTCH*.^{40,46} Παράλληλα, ο μεταστατικός καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει υψηλά επίπεδα *PITX1* με τη δράση του να συσχετίζεται με υψηλή πρωτεολυτική δράση και γένεση οστεοκλαστών στα οστά.^{40,47} Εκτός αυτών, ορισμένες μελέτες έχουν χαρακτηρίσει το *PITX1* ως ογκογονίδιο, αναφέροντας πως αυτό αλληλεπιδρά με τα επίσης αναπτυξιακά γονίδια SRY-box transcription factor 2 (*SOX2*), Krüppel-like factor 4 (*KLF4*), Transformation related protein 63 (*TRP63*) τα οποία και συνδέονται με τη βλαστοκυτταρικότητα^{40,48}, ενώ δεδομένα RNA-seq έχουν συνδέσει την αυξορρύθμιση του *PITX1* με τον νεφρικό καρκίνο (kidney renal clear cell carcinoma/ KIRC) σε ευρύτερη κλίμακα⁴⁹. Βέβαια, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η αύξηση της έκφρασης του *PITX1* επηρεάζει το νεφροκυτταρικό καρκίνο δεν έχει διαλευκανθεί ακόμη. Συνεπώς, μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και συμπληρωματικές τεχνικές, όπως η ανάλυση της πρωτεϊνικής του έκφρασης και οι *in vitro* λειτουργικές δοκιμές, θα μπορούσαν να προσφέρουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα του ρόλου του *PITX1* στον καρκίνο του νεφρού.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Lauralee Sherwood, Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου: Από τα κύτταρα στα συστήματα, 8^η έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2016, σελ. 637-692
- (2) Knapp, S. (2020, October 28). Urinary system - definition, function and organs. Biology Dictionary. <https://biologydictionary.net/urinary-system/>
- (3) Μέντζα Δ., Δρακόπουλος Α., ANATOMIA ΝΕΦΡΟΥ, ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΠΑΤΡΑΣ - αρθρογραφία - anatomia ΝΕΦΡΟΥ. (n.d.). <http://www.nephrologia.gr/neph/articles/article.jsp?categoryid=3126&context=103&globalid=10126&articleid=3187>
- (4) Boron WF (2004). Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach. Elsevier/Saunders. ISBN 978-1-4160-2328-9.
- (5) Clapp WL (2009). "Renal Anatomy". In Zhou XJ, Laszik Z, Nadasdy T, D'Agati VD, Silva FG (eds.). Silva's Diagnostic Renal Pathology. New York: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-87702-2.
- (6) Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436. - Own work
- (7) Massa, Filippo. (2012). The crucial roles played by HNF1β during kidney development.
- (8) Dewangan, N. (2023a, August 3). Nephron- definition, structure, physiology, functions. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/nephron-structure-functions/>
- (9) Yale. (n.d.). Systems cell biology@yale. medcell.org. https://medcell.org/systems_cell_biology/urinary_system_lab.php
- (10) Team PhysiologyWeb, P. (n.d.). Physiology image: Renal corpuscle. https://www.physiologyweb.com/figures/physiology_image_TvKcIccyvFuiIvXAWDRXu5GuzkBK8RHt_renal_corpuscle.html

- (11)** Madrazo-Ibarra, A. (2023, February 17). Histology, Nephron. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554411/>
- (12)** Tanaka Y. et al. (2012, January). Autophagy and diabetic nephropathy. PubMed. https://www.researchgate.net/publication/342951234_Autophagy_and_Diabetic_Nephropathy
- (13)** Maxwell, S. (2021). CPT-02-09-01 - Renal physiology. Vimeo. <https://vimeo.com/>
- (14)** Klabunde, R. E. (2022, December 13). Renin-angiotensin-aldosterone system. CV Physiology | Renin-Angiotensin-Aldosterone System. <https://cvphysiology.com/blood-pressure/bp015>
- (15)** Laura Bukavina, Karim Bensalah, Freddie Bray, Maria Carlo, Ben Challacombe, Jose A. Karam, Wassim Kassouf, Thomas Mitchell, Rodolfo Montironi, Tim O'Brien, Valeria Panebianco, Ghislaine Scelo, Brian Shuch, Hein van Poppel, Christopher D. Blosser, Sarah P. Psutka, Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update, European Urology, Volume 82, Issue 5, 2022, Pages 529-542
- (16)** Padala, S. A., Barsouk, A., Thandra, K. C., Saginala, K., Mohammed, A., Vakiti, A., Rawla, P., & Barsouk, A. (n.d.). Epidemiology of renal cell carcinoma. World Journal of Oncology.
- (17)** Capitanio, U., et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. Eur Urol, 2019. 75: 74.
- (18)** Goswami PR, Singh G, Patel T, Dave R. The WHO 2022 Classification of Renal Neoplasms (5th Edition): Salient Updates. Cureus. 2024 Apr 17;16(4):e58470. doi: 10.7759/cureus.58470. PMID: 38765391; PMCID: PMC11100973.
- (19)** Raghavan, A. A., Gibson, I. W., Wightman, R., Czaykowski, P., & Graham, J. (2023). Redefining renal cell carcinoma: A molecular perspective on classification and clinical implications. European Medical Journal, 116–123. <https://doi.org/10.33590/emj/10301071>
- (20)** Rosen, R. D. (2023, February 13). TNM classification. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
- (21)** Sobin LH., G.M., Wittekind C. (eds). TNM classification of malignant tumors. 2009. 7th edn.
- (22)** Maller V, Walizai T, Campos A, et al. Renal cell carcinoma (TNM staging). Reference article, Radiopaedia.org (Accessed on 19 Aug 2024) <https://doi.org/10.53347/rID-4699>
- (23)** Enoque Healthcare Services (EHS). (2019, May 10). Kidney cancer treatment in India - cost and procedure. India EHS. <https://www.indiaehs.com/kidney-cancer-treatment-in-india/>
- (24)** Klatte, T., Rossi, S.H. & Stewart, G.D. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. World J Urol 36, 1943–1952 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2309-4>
- (25)** Kidney cancer grade. KCCure. (n.d.). <https://kccure.org/kidney-cancer-grade/>

- (26) Fuhrman, Susan A. M.D.; Lasky, Larry C. M.D.; Limas, Catherine M.D.. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 6(7):p 655-664, October 1982
- (27) Delahunt B, Egevad L, Samaratunga H, Martignoni G, Nacey JN, Srigley JR. Gleason and Fuhrman no longer make the grade. *Histopathology*. 2016 Mar;68(4):475-81. doi: 10.1111/his.12803. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26266664.
- (28) Nivedita Chowdhury, Charles G. Drake, *Kidney Cancer: An Overview of Current Therapeutic Approaches*, Urologic Clinics of North America, Volume 47, Issue 4, 2020, Pages 419-431
- (29) Tran TQ, Kioussi C. Pitx genes in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Jun;78(11):4921-4938. doi: 10.1007/s00018-021-03833-7. Epub 2021 Apr 12. PMID: 33844046; PMCID: PMC11073205.
- (30) Nemec S, Luxey M, Jain D, Huang Sung A, Pastinen T, Drouin J. Pitx1 directly modulates the core limb development program to implement hindlimb identity. *Development*. 2017 Sep 15;144(18):3325-3335. doi: 10.1242/dev.154864. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28807899.
- (31) Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*. 1999 Feb 15;13(4):484-94. doi: 10.1101/gad.13.4.484. PMID: 10049363; PMCID: PMC316471.
- (32) Goodyer, C. G., Tremblay, J. J., Paradis, F. W., Marcil, A., Lanctôt, C., Gauthier, Y., & Drouin, J. (2003). Pitx1 in vivo Promoter Activity and Mechanisms of Positive Autoregulation. *Neuroendocrinology*, 78(3), 129–137. doi:10.1159/000072794
- (33) Alatzoglou, K. S., Gregory, L. C., & Dattani, M. T. (2020). Development of the Pituitary Gland. *Comprehensive Physiology*, 389–413. doi:10.1002/cphy.c150043
- (34) Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M, Kugoh H. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol Cell Biol*. 2011 Apr;31(8):1624-36. doi: 10.1128/MCB.00470-10. Epub 2011 Feb 7. PMID: 21300782; PMCID: PMC3126332.
- (35) Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Osaki M, et al. (2019) PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription. *PLoS ONE* 14(8)
- (36) Liu, D. X., & Lobie, P. E. (2007). Transcriptional activation of p53 by Pitx1. *Cell Death & Differentiation*, 14(11), 1893–1907.
- (37) Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*. 2005 Jun 17;121(6):849-58. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.017. PMID: 15960973.
- (38) Sharon Mudie, Daniel Bandarra, Michael Batie, John Biddlestone, Sonia Moniz, Brian Ortmann, Alena Shmakova & Sonia Rocha (2014) PITX1, a specificity determinant in the HIF-1 α -mediated transcriptional response to hypoxia, *Cell Cycle*, 13:24, 3878-3891, DOI: 10.4161/15384101.2014.972889

- (39) Ikeda, H., Kakeya, H. Targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling with natural products toward cancer chemotherapy. *J Antibiot* 74, 687–695 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00451-0>
- (40) Zhao J and Xu Y (2023) PITX1 plays essential functions in cancer. *Front. Oncol.* 13:1253238. doi: 10.3389/fonc.2023.1253238
- (41) AllPrep DNA/RNA/MIRNA universal kit: DNA/RNA preps. QIAGEN. (n.d.). <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/multianalyte-and-virus/allprep-dnarnamirna-universal-kit>
- (42) Reverse Transcription PCR (RT-PCR). AAT Bioquest. (n.d.). <https://www.aatbio.com/catalog/reverse-transcription-pcr-rt-pcr>
- (43) Song X., Zhao C., Jiang L., Lin S., Bi J., Wei Q., et al. (2018). High PITX1 expression in lung adenocarcinoma patients is associated with DNA methylation and poor prognosis. *Pathol. Res. Pract.* 214, 2046–2053. 10.1016/j.prp.2018.09.025
- (44) Mubarak M, Rashid R. Updates from the 2022 WHO Classification of Kidney Epithelial Tumors. *J Clin Transl Pathol* 2024;4(2):70–75. doi: 10.14218/JCTP.2024.00002
- (45) Stender JD, Stossi F, Funk CC, Charn TH, Barnett DH, Katzenellenbogen BS. The estrogen-regulated transcription factor PITX1 coordinates gene-specific regulation by estrogen receptor-alpha in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* (2011) 25(10):1699 709. doi: 10.1210/me.2011-0102
- (46) Nagel S, Venturini L, Przybylski GK, Grabarczyk P, Schneider B, Meyer C, et al. Activation of Paired-homeobox gene PITX1 by del(5)(q31) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* (2011) 52(7):1348–59. doi: 10.3109/10428194.2011.566391
- (47) Luis-Ravelo D, Anton I, Zanduetta C, Valencia K, Ormazabal C, Martinez Canarias S, et al. A gene signature of bone metastatic colonization sensitizes for tumor induced osteolysis and predicts survival in lung cancer. *Oncogene* (2014) 33(43):5090 9. doi: 10.1038/onc.2013.440
- (48) Sastre-Perona A, Hoang-Phou S, Leitner MC, Okuniewska M, Meehan S, Schober M. De novo PITX1 expression controls bi-stable transcriptional circuits to govern self-renewal and differentiation in squamous cell carcinoma. *Cell Stem Cell* (2019) 24(3):390–404.e398. doi: 10.1016/j.stem.2019.01.003
- (49) Zhang, Yinglang, Zhang, Zhe, Zhang, Wei, Hu, Hailong, Bao, Guochang, Upregulated Transcription Factor PITX1 Predicts Poor Prognosis in Kidney Renal Clear Cell Carcinoma-Based Bioinformatic Analysis and Experimental Verification, *Disease Markers*, 2021, 7694239, 19 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7694239>

7. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα μου, κυρία Σαμαρά Μαρία, επίκουρο καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στην Μοριακή Ιστοπαθολογία, και τους Συνεπιβλέποντες μου κύριο Αντώνη Γιακουντή, επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και κυρία Θώδου Ελένη, επίκουρος καθηγήτρια Κυτταρολογίας.

Τους φίλους και συναδέλφους μου που με στήριξαν και με βοήθησαν να μην εγκαταλείψω την προσπάθεια μου.

Και τον εαυτό μου, που τα κατάφερε.