



“Μελέτη πολυμορφισμών σε γονίδια της οδού επιδιόρθωσης NER σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο.”

“Study of polymorphisms in nucleotide excision repair (NER) pathway genes in patients with renal cell carcinoma (RCC)”

Ονοματεπώνυμο: Ταταρίδης Δημήτριος

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 και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος: κ. Ελένη Θώδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρολογίας, 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:

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την κυρία Σαμαρά Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη διαρκή στήριξή της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Ευχαριστώ επίσης τους συνεπιβλέποντες καθηγητές, τον κύριο Αντώνη Γιακουντή, Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, και την κυρία Θώδου Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρολογίας, των οποίων η συμβολή υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου προς τον φίλο και απόφοιτο του Τμήματος, Φωτιάδη Δημήτριο, για την πολύτιμη συμβολή του στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, καθώς και όλους τους φίλους και συναδέλφους μου, για την αμέριστη αγάπη, ενθάρρυνση και στήριξη που μου προσέφεραν σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	σελ 7
Abstract.....	σελ 8
1.Εισαγωγή	σελ 9
1.1 Νεφρός.....	σελ 9
1.1.1 Ανατομία-Μακροσκοπική περιγραφή του νεφρού.....	σελ 9
1.1.2 Αγγείωση του Νεφρού.....	σελ 12
1.1.3 Ιστολογία του Νεφρού.....	σελ 13
1.1.4 Φυσιολογία του Νεφρού.....	σελ 19
1.1.4.1 Λειτουργίες του Νεφρώνα.....	σελ 21
1.2 Καρκίνος του Νεφρού.....	σελ 23
1.2.1 Επιδημιολογία	σελ 23
1.2.2 Αιτιοπαθογένεια	σελ 24
1.2.2.1 Μοριακές Οδοί.....	σελ 24
1.2.2.2 Γενετική Προδιάθεση.....	σελ 25
1.2.2.3 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες.....	σελ 25
1.2.3 Υπότυποι.....	σελ 26
1.2.3.1 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού (clear cell RCC – ccRCC).....	σελ 26
1.2.3.2 Θηλώδες καρκίνωμα νεφρού (papillary RCC – pRCC).....	σελ 26
1.2.3.3 Χρωμόφοβο Καρκίνωμα Νεφρού (chromophobe RCC – chRCC).....	σελ 27
1.2.3.4 Διαυγοκυτταρικό-θηλώδες νεόπλασμα (clear cell papillary renal cell tumor – ccrRCC).....	σελ 27
1.2.3.5 Ογκοκύττωμα νεφρού (renal oncocytoma).....	σελ 27
1.2.3.6 Καρκίνωμα νεφρού με αναδιάταξη TFE3- Xp11.2 Translocation RCC (TFE3-rearranged RCC).....	σελ 27
1.2.3.7 Καρκίνωμα νεφρών με παραλλαγή του TFEB -TFEB-altered RCC.....	σελ 28

1.2.3.8 Καρκίνωμα Νεφρού με Έλλειψη Ηλεκτρικής Αφυδρογονάσης - Succinate Dehydrogenase-deficient RCC (SDH-def RCC).....	σελ 28
1.2.3.9 Καρκίνωμα με Έλλειψη FH- FH-deficient RCC.....	σελ 28
1.2.3.10 Καρκίνωμα νεφρού με Αναδιάταξη ALK -ALK-rearranged RCC.....	σελ 28
1.2.3.11 Θηλώδες αδένωμα-Papillary Adenoma	σελ 28
1.2.4 Σταδιοποίηση –Βαθμός Κακοήθειας-Προγνωστικά μοντέλα....	σελ 30
1.2.4.1 Σταδιοποίηση.....	σελ 30
1.2.4.2 Βαθμός Κακοήθειας.....	σελ 32
1.2.4.3 Προγνωστικά μοντέλα.....	σελ 34
1.2.5 Θεραπεία.....	σελ 34
1.2.5.1 Εναλλακτικές Θεραπείες σε Επιλεγμένους Ασθενείς.....	σελ 35
1.2.5.2 Συστηματική Θεραπεία για Προχωρημένη/Μεταστατική Νόσο.....	σελ 35
1.2.5.2.1 Πρώτης γραμμής θεραπεία.....	σελ 36
1.2.5.2.2 Θεραπευτικές επιλογές δεύτερης και τρίτης γραμμής.....	σελ 37
2.Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί DNA και νεφροκυτταρικός καρκίνο...σελ 37	
2.1 Γενετικές παραλλαγές και Καρκινογένεση.....σελ 37	
2.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA.....σελ 37	
2.3 Μονοπάτι επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων (NER)σελ 38	
2.3.1 Το γονίδιο XPC και ο λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης.....σελ 41	
2.3.2 Πολυμορφισμοί στο γονιδίου XPC και νεφροκυτταρικός καρκίνοσελ 42	
2.3.3 Το γονίδιο XPD και ο λειτουργικός ρόλος.....σελ 43	
2.3.4 Πολυμορφισμοί στο γονιδίου XPD και νεφροκυτταρικός καρκίνοςσελ 44	

3.Σκοπός.....	σελ 46
3.1 Υλικά και μέθοδοι.....	σελ 47
3.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA(DNA extraction).....	σελ 47
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός γονιδιωματικού DNA.....	σελ 48
3.4 Παρασκευή Πηκτώματος Αγαρόζης.....	σελ 48
3.5 Ηλεκτροφόρηση για ποιοτικό έλεγχο του γονιδιωματικού DNA	σελ 49
3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων γονιδιώματος.....	σελ 50
3.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....	σελ 52
3.8 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα.....	σελ 53
4.Αποτελέσματα.....	σελ 54
5.Συζήτηση.....	σελ 72
6.Βιβλιογραφία.....	σελ 77

Περίληψη

Ο νεφροκυτταρικός καρκίνος (RCC) αποτελεί έναν από τους συχνότερους καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος με αυξανόμενη επίπτωση παγκοσμίως. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, και ειδικότερα το μονοπάτι Nucleotide Excision Repair (NER), διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας. Πολυμορφισμοί στα γονίδια XPC και XPD, βασικά συστατικά του μονοπατιού NER, ενδέχεται να επηρεάζουν την ευαισθησία σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στη διεθνή βιβλιογραφία οι μελέτες αναφέρουν αντικρουόμενα ευρήματα, ενώ στον ελληνικό πληθυσμό, μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί ανάλογες μελέτες για την επίδραση των πολυμορφισμών των γονιδίων του μονοπατιού NER στον νεφροκυτταρικό καρκίνο. Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε δείγματα από 67 ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο και 40 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) για τους πολυμορφισμούς XPC-PAT του XPC γονιδίου, rs1799793 (εξώνιο 10) και rs13181 (εξώνιο 23) του XPD γονιδίου. Απομονώσαμε γενωμικό DNA, ενισχύσαμε επιλεκτικά τα τμήματα των γονιδίων που περιλαμβάνουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς και κάναμε γονοτυπική ανάλυση με τη χρήση ηλεκτροφόρησης και περιοριστικών ενζύμων. Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των ευρημάτων με το πρόγραμμα R 4.4. Αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης της νόσου και του XPC-PAT πολυμορφισμού ($p=0,017$). Ο γονότυπος 344/344 (+/+) συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ($OR=0,134$, $p=0,016$), καταδεικνύοντας τον ισχυρό προστατευτικό ρόλο του πολυμορφισμού. Η πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαίωσε την προστατευτική επίδραση ($OR=0,034$, $p=0,0015$), ενώ η ανάλυση του επικρατούς μοντέλου κληρονομικότητας έδειξε ότι παρουσία του πολυμορφισμού σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος ($OR=0,261$, $p=0,025$). Οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου XPD δεν ανέδειξαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις. Ειδικότερα, για τον πολυμορφισμό rs1799793 στο εξώνιο 10, όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (ασθενείς – υγιή άτομα) είχαν τον ίδιο γονότυπο. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs13181 στο εξώνιο 23 παρατηρείται μία τάση συσχέτισης η οποία δεν είναι στατιστικώς σημαντική, ενδεχομένως λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων της μελέτης ($OR=3,642$, $p=0,079$). Η στατιστική ανάλυση παραμέτρων όπως το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοηθείας κατά Fuhrman και ο ιστολογικός υπότυπος δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις τους με τους γονοτύπους των υπό εξέταση πολυμορφισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη ηλικία (άνω των ≥ 62 ετών) συσχετίστηκε με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας κατά Fuhrman ($OR=16,936$, $p=0,017$), ενώ όσον το φύλο υπήρχε τάση συσχέτισης των θήλεων ατόμων με μη-διαυγοκυτταρικό ιστολογικό υπότυπο ($OR=25,482$, $p=0,025$). Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό τον προστατευτικό ρόλο του XPC-PAT πολυμορφισμού στον νεφροκυτταρικό καρκίνο. Ωστόσο, τα ευρήματα χρήζουν περαιτέρω μελέτες γενετικής σύνδεσης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για την επικύρωση των ευρημάτων μας.

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) represents one of the most common malignancies of the urinary system, with an increasing incidence worldwide. DNA damage repair mechanisms, and particularly the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway, play a crucial role in maintaining genomic integrity. Polymorphisms in the XPC and XPD genes, key components of the NER pathway, may influence susceptibility to various cancer types. International studies report conflicting findings, while to date, no similar studies have been reported in the Greek population regarding the impact of NER gene polymorphisms on RCC. In the present study, we analyzed samples from 67 patients with RCC and 40 healthy individuals (control group) for the XPC-PAT polymorphism of the XPC gene and the rs1799793 (exon 10) and rs13181 (exon 23) polymorphisms of the XPD gene. Genomic DNA was isolated, the regions of the genes containing the polymorphisms under investigation were selectively amplified, and genotyping was performed using restriction enzyme digestion and electrophoresis. Statistical analysis of the findings was conducted using R software (version 4.4). A statistically significant association was observed between disease risk and the XPC-PAT polymorphism ($p = 0.017$). The 344/344 (+/+) genotype was associated with significantly reduced risk ($OR = 0.134$, $p = 0.016$), demonstrating the strong protective role of this polymorphism. Multivariate analysis confirmed this protective effect ($OR = 0.034$, $p = 0.0015$), while analysis under the dominant inheritance model showed that the presence of the polymorphism in either heterozygosity or homozygosity was associated with reduced RCC risk ($OR = 0.261$, $p = 0.025$). The two XPD gene polymorphisms did not show statistically significant associations. Specifically, for the rs1799793 polymorphism in exon 10, all samples (patients and controls) exhibited the same genotype. Regarding rs13181 in exon 23, a non-significant trend was observed, possibly due to the small sample size ($OR = 3.642$, $p = 0.079$). Statistical analysis of parameters such as tumor size, Fuhrman grade, and histological subtype did not reveal significant associations with the genotypes of the polymorphisms under investigation. Notably, older age (≥ 62 years) was associated with a higher Fuhrman grade ($OR = 16.936$, $p = 0.017$), while female sex showed a trend toward association with non-clear cell histological subtype ($OR = 25.482$, $p = 0.025$). This study demonstrates for the first time in the Greek population the protective role of the XPC-PAT polymorphism in RCC. However, further genetic association studies with larger sample sizes are required to validate these findings.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΝΕΦΡΟΣ

1.1.1 Ανατομία- μακροσκοπική περιγραφή του νεφρού

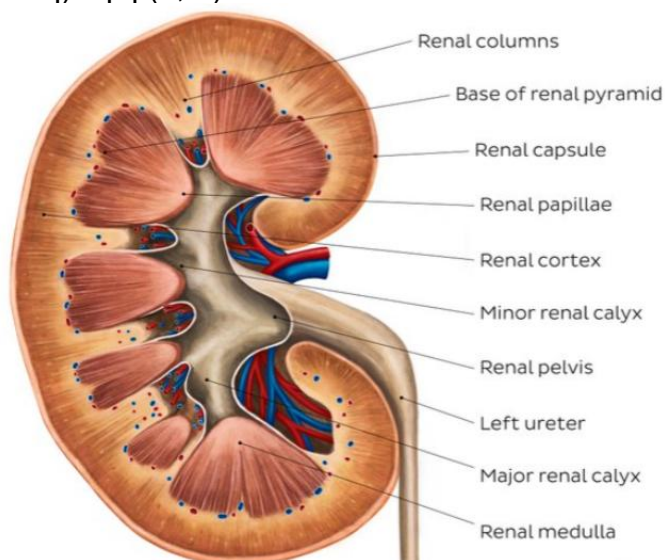
Το ουροποιητικό σύστημα συμβάλλει στην απομάκρυνση άχρηστων ή βλαβερών ουσιών από τον οργανισμό, στη ρύθμιση των υγρών, των ηλεκτρολυτών και στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας. Περιλαμβάνει τους νεφρούς, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα. Οι νεφροί αποτελούν το εκκριτικό μέρος καθώς εκκρίνουν τα ούρα. Οι νεφρικοί κάλυκες και η πύελος, μαζί με τους ουρητήρες συγκροτούν το αποχετευτικό τμήμα του ουροποιητικού συστήματος (1, 2)

Οι νεφροί βρίσκονται οπισθοπεριτοναϊκά, στην οπίσθια κοιλιακή χώρα εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, στο ύψος περίπου της οσφυϊκής περιοχής, και καλύπτονται μερικώς από τις κατώτερες πλευρές.(1),(3)

Κάθε νεφρός έχει σχήμα φασολιού, με κυρτή πλάγια επιφάνεια και κοίλη έσω επιφάνεια όπου εντοπίζεται η νεφρική πύλη (τόπος εισόδου και εξόδου αγγείων και ουρητήρα). Σε ένα ενήλικο άτομο, οι διαστάσεις του νεφρού είναι περίπου 10-12 cm σε μήκος, 5 cm πλάτος και 3 cm σε πάχος, ενώ το βάρος του καθενός προσεγγίζει τα 125-170 γρ. στους άντρες και τα 115-155 γρ στις γυναίκες (1),(5). Περιβάλλεται από έναν ινώδη χιτώνα, τη νεφρική κάψα, που συγκρατεί και προστατεύει το παρέγχυμα. Περιμετρικά και εξωτερικά της κάψας εντοπίζεται μία παχιά στιβάδα περινεφρικού λίπους, η οποία μαζί με τον ινώδη χιτώνα προσφέρουν μηχανική προστασία, Συναντάμε πυκνές κολλαγόνες ίνες, λίγες ελαστικές ίνες και λεία μυϊκά κύτταρα.(1, 2).

Εσωτερικά, το νεφρικό παρέγχυμα διακρίνεται σε δύο περιοχές: τον φλοιό εξωτερικά και τον μυελό εσωτερικά. Ο μυελός αποτελείται από πολυάριθμες τριγωνικές νεφρικές πυραμίδες, οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από επεκτάσεις του φλοιώδους ιστού, τις νεφρικές στήλες. Η κορυφή κάθε πυραμίδας (νεφρική θηλή) κατευθύνεται προς τη νεφρική πύελο και προβάλλει σε έναν μικρό κάλυκα (ελάσσων κάλυκας), ενώ η βάση της πυραμίδας εντοπίζεται στο όριο μεταξύ φλοιού και μυελού.(Εικόνα 1) Κάθε πυραμίδα μαζί με τον περιβάλλοντα φλοιό συγκροτούν έναν νεφρικό λοβό. Συνολικά, κάθε νεφρός φέρει 8-18 λοβούς, σε αναλογία με τον αριθμό των πυραμίδων. Ο φλοιός φέρει πολυάριθμα σπειράματα και σωληνάκια, που προσδίδουν μία κοκκώδη όψη, ενώ ο μυελός, λόγω των σωληναρίων και αγγείων που

διατρέχουν κατά μήκος τις πυραμίδες και σε παράλληλη διάταξη εμφανίζει αυλακωτή (ραβδωτή) όψη (2, 4).



Εικόνα 1. Μακροσκοπική εικόνα του νεφρού σε διατομή (2).

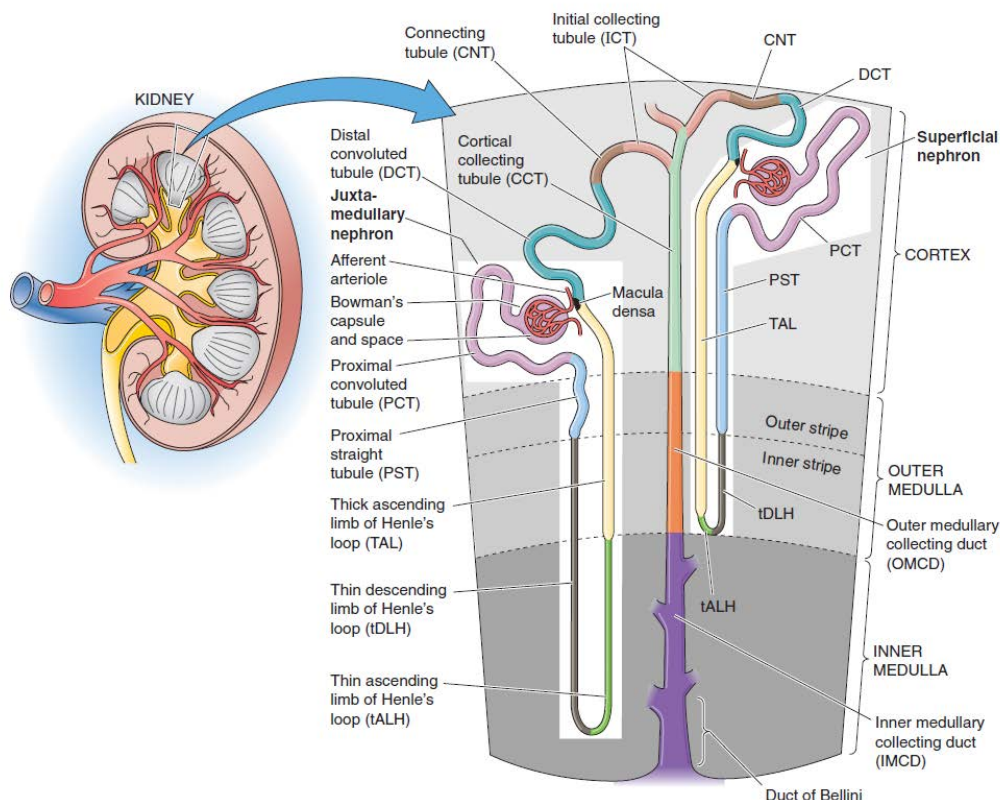
Αναφορικά με την εντόπιση οι νεφροί εντοπίζονται οπισθοπεριτοναϊκά, στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης. Εκτείνονται κατά προσέγγιση από το επίπεδο του 12^{ου} θωρακικού έως τον 3^ο οσφυϊκό σπόνδυλο. Ο αριστερός νεφρός εντοπίζεται συνήθως ελαφρώς υψηλότερα από τον δεξιό νεφρό. Η ασυμμετρία αυτή οφείλεται κυρίως στην παρουσία του ήπατος στη δεξιά πλευρά, που ωθεί τον δεξιό νεφρό πιο χαμηλά. Οι άνω πόλοι των νεφρών προστατεύονται εν μέρει από τις κατώτερες πλευρές (11η και 12η πλευρά), ενώ ολόκληρο το όργανο περιβάλλεται και υποστηρίζεται από τους παρακείμενους μύες της οσφύς. Επιπρόσθετα, σε κάθε άνω πόλο του νεφρού εφάπτεται ο αδένας του επινεφριδίου, ο οποίος διαχωρίζεται από τον νεφρό με ενδιάμεσο λιπώδη ιστό. Ο νεφρός και το επινεφρίδιο περιβάλλονται από την περινεφρική περιτονία (περιτονία Gerota) που τα συγκρατεί στη θέση τους (2, 3). Ο δεξιός νεφρός βρίσκεται πίσω από το ήπαρ, το δωδεκαδάκτυλο και το ανιόν κόλον, ενώ ο αριστερός νεφρός βρίσκεται κοντά στον σπλήνα, το στομάχι και το κατιόν κόλον. Πίσω από κάθε νεφρό παρεμβάλλεται το διάφραγμα και οι οπίσθιοι κοιλιακοί μύες, ενώ και οι δύο νεφροί περιβάλλονται από άφθονο λιπώδη ιστό που απορροφά τους κραδασμούς και τις μεταβολές της πίεσης (1).

Η νεφρική πύελος είναι μια πλατιά, χοανοειδής κοιλότητα στην έσω (κοίλη) μοίρα του νεφρού, που λειτουργεί ως χώρος συλλογής των παραγόμενων ούρων και ως σημείο έναρξης του ουρητήρα. Η πύελος σχηματίζεται από τη συνένωση των μεγάλων (μείζονων) καλύκων του νεφρού. Κατά κανόνα δύο με τρεις μείζονες κάλυκες συγκλίνουν, ώστε να δημιουργήσουν τη νεφρική πύελο. Καθε μείζων κάλυκας σχηματίζεται από τη συμβολή πολλών μικρών (ελάσσονων) καλύκων, οι οποίοι περιβάλλουν τις θηλές των νεφρικών πυραμίδων. Τα ούρα που εκχέονται από κάθε νεφρική πυραμίδα συλλέγονται αρχικά στους ελάσσονες κάλυκες, ρέουν στους μείζονες κάλυκες και τελικά συγκεντρώνονται στη νεφρική πύελο. Αυτή στενεύει προοδευτικά στο κατώτερο άκρο της και εξέρχεται από την πύλη του νεφρού, όπου συνεχίζει πλέον ως ουρητήρας. Ο χώρος που περιβάλλει την πύελο και τις διακλαδώσεις της, μαζί

με τα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία και νεύρα, αποτελεί τον νεφρικό κόλπο, μία κοιλότητα που εμπεριέχει την πύελο, τους νεφρικούς κάλυκες, τα αγγεία και λιπώδη ιστό για προστασία (3, 4).

Οι βασικές λειτουργικές μονάδες του νεφρού, στις οποίες λαμβάνει χώρα η διήθηση του αίματος και ο σχηματισμός των ούρων είναι οι νεφρώνες. Σε κάθε νεφρό περιέχονται ένα εκατομμύριο περίπου επιμήκεις νεφρώνες, οι οποίοι εκτείνονται από τον φλοιό προς τον μυελό και συνδέονται με αθροιστικά σωληνάκια, μέσω των οποίων τα ούρα μεταφέρονται προς τις νεφρικές θηλές και τους κάλυκες. Κάθε νεφρώνας περιλαμβάνει δύο τμήματα: (α) το νεφρικό σωματίο, που εντοπίζεται αποκλειστικά στον φλοιό και αποτελείται από το αγγειώδες σπείραμα περιβαλλόμενο από την κάψα του Bowman και (β) το σύστημα σωληναρίων, το οποίο κατέρχεται στον μυελό και επιστρέφει στον φλοιό, καταλήγοντας σε έναν αθροιστικό σωληνάριο. Όλο αυτό το σύστημα εξυπηρετεί την επεξεργασία του διηθήματος και τη διαμόρφωση των ούρων που τελικά θα αποβληθούν (5, 6).

Οι νεφρώνες διακρίνονται σε δύο κύριους τύπους, με βάση τη θέση και τη μορφολογία τους. Στον φλοιό απαντούν οι φλοιώδεις νεφρώνες που αντιπροσωπεύουν τη μεγάλη πλειονότητα, περίπου το 85% των νεφρώνων. (Εικόνα 2) Η άλλη κατηγορία νεφρώνων είναι οι παραμυελικοί, οι οποίοι είναι λιγότεροι αριθμητικά, αλλά ιδιαίτερα σημαντικοί για την παραγωγή υπερσυμπυκνωμένων ούρων. Το σωματίό τους βρίσκεται κοντά στο όριο φλοιού-μυελού και διαθέτουν μία επιμήκη αγκύλη του Henle που κατέρχεται βαθιά στον μυελό. Οι δύο τύποι νεφρώνων συνεργάζονται στενά μεταξύ τους, εξασφαλίζοντας τη ρύθμιση του διηθήματος και τη διατήρηση της ομοιόστασης (4,5).



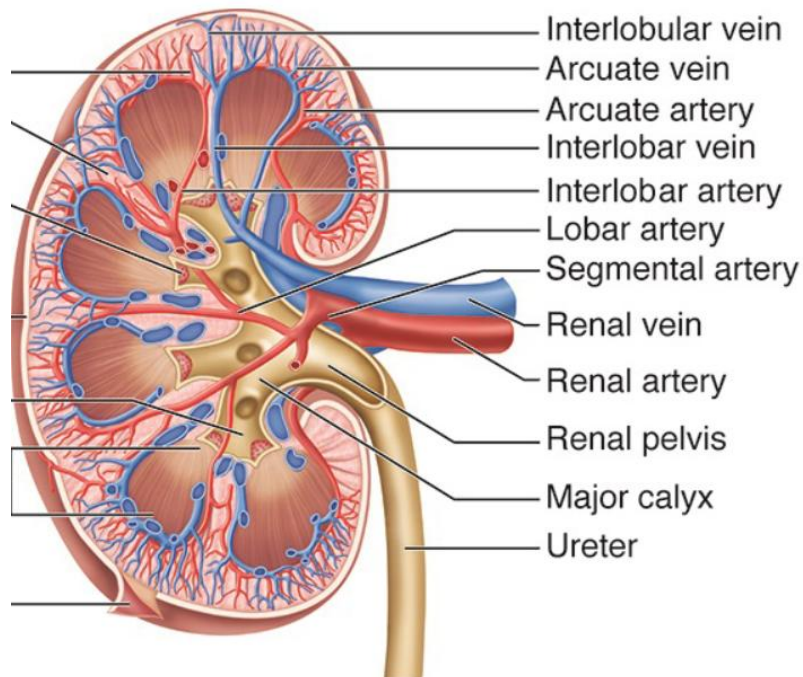
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του νεφρώνα και της πορείας του από τον φλοιό έως τον μυελό. Διακρίνεται η διαδρομή των σωληναρίων, η διάκριση σε φλοιώδη και παραμυελικούς νεφρώνες και ο διαχωρισμός φλοιού – μυελού (5)

1.1.2 Αγγείωση του Νεφρού

Η νεφρική αρτηρία εκφύεται απευθείας από την κοιλιακή αορτή, εισέρχεται στην πύλη του νεφρού και μεταφέρει το αίμα στους νεφρούς. Εκεί διακλαδίζεται σε λοβιακούς κλάδους (2–3 κατά κανόνα), οι οποίοι αντιστοιχούν σε επιμέρους νεφρικούς λοβούς. Από αυτούς εκφύονται οι μεσολόβιες αρτηρίες, οι οποίες ακολουθούν την πορεία ανάμεσα στις νεφρικές πυραμίδες, εντός των στηλών του Bertin, φτάνοντας ως το όριο μεταξύ φλοιού και μυελού. Στο σημείο αυτό διακλαδίζονται σε τοξοειδείς αρτηρίες, που ρέουν παράλληλα προς τη βάση των πυραμίδων. Από τις τοξοειδείς αρτηρίες εκφύονται οι μεσολοβίδες αρτηρίες του φλοιού, γνωστές και ως φλοιώδεις ακτινικές αρτηρίες, καθώς κατανέμονται σε ακτινική διάταξη στο φλοιό. Οι τελευταίες δίνουν τα προσαγωγά αρτηρίδια, που καταλήγουν στα νεφρικά σπειράματα. Πρόκειται για ένα σύστημα τριχοειδών αγγείων στα οποία επιτελείται η αρχική διήθηση του πλάσματος.

Το αίμα που εξέρχεται από τα σπειράματα διοχετεύεται μέσω των απαγωγών αρτηριδίων, τα οποία δεν καταλήγουν απευθείας σε φλέβες, αλλά διαμορφώνουν νέα τριχοειδικά δίκτυα. Στο σημείο αυτό παρατηρείται μια διαφορά στο γεγονός ότι στους νεφρώνες που εντοπίζονται στο φλοιό τα αρτηρίδια αυτά σχηματίζουν περισωληναριακά τριχοειδή, που περιβάλλουν τα εγγύς και άπω σωληνάρια, σε αντίθεση με τους παρασπειραματικούς νεφρώνες όπου τα απαγωγά αρτηρίδια κατέρχονται στον μυελό σχηματίζοντας τα ευθεία αγγεία του νεφρού (*vasa recta*). Πρόκειται για λεπτά, ευθύγραμμα αγγεία με καθοδική και ανιούσα πορεία παράλληλα με τις αγκύλες του Henle, τα οποία συμμετέχουν στον μηχανισμό αντίρροπτης διάταξης και είναι κρίσιμα για τη διατήρηση του ωσμωτικού περιβάλλοντος του μυελού.

Το φλεβικό αίμα από τα περισωληναριακά τριχοειδή και τα ευθεία αγγεία αποχετεύεται αρχικά στις μεσολοβίδες φλέβες, που συμβάλλουν στις τοξοειδείς φλέβες στη βάση των πυραμίδων. Από εκεί το αίμα ρέει προς τις μεσολόβιες φλέβες στις νεφρικές στήλες και συγκεντρώνεται στη νεφρική φλέβα, η οποία εκβάλλει στην κάτω κοίλη φλέβα. Οι νεφροί δέχονται το 20–25% περίπου της καρδιακής παροχής, ποσοστό εντυπωσιακά υψηλό για το μέγεθός τους, που υπογραμμίζει τη σημαντική λειτουργία τους (3,4).



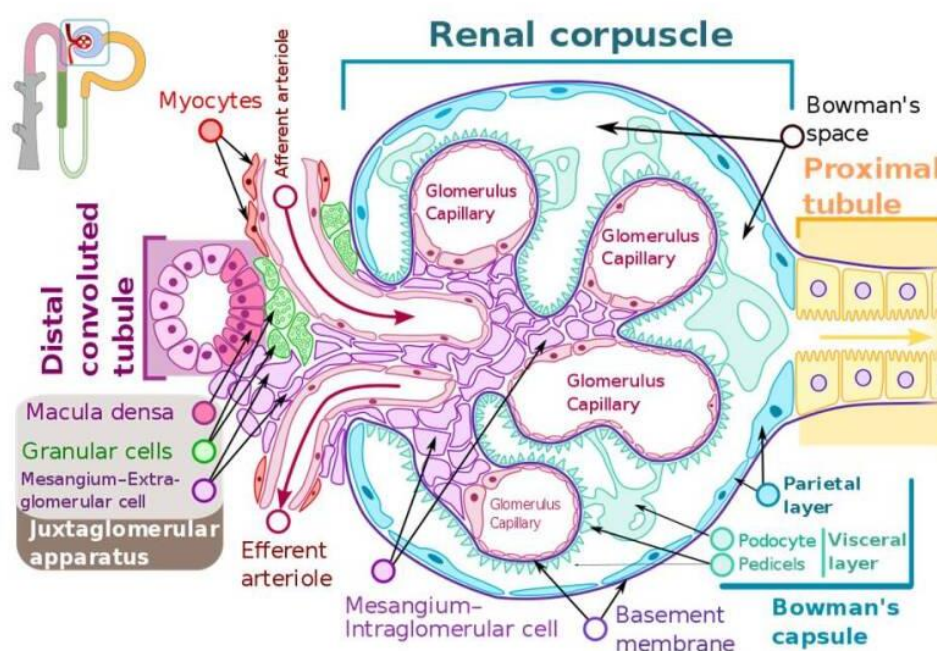
Εικόνα 3. Αγγείωση του νεφρού. Διακρίνονται οι κύριοι κλάδοι της νεφρικής αρτηρίας και φλέβας και τα ανατομικά στοιχεία της νεφρικής πυέλου, του φλοιού και του μυελού (7)

1.1.3 Ιστολογία του νεφρού

Ο νεφρός περιβάλλεται εξωτερικά από τη νεφρική κάψα, έναν ανθεκτικό ινώδη χιτώνα, αποτελούμενο κυρίως από πυκνό κολλαγόνο συνδετικό ιστό. Στην κάψα υπάρχουν επίσης ελαστικές ίνες και μερικές λείες μυϊκές ίνες (μυοϊνοβλάστες). Η ινώδης κάψα προστατεύει και στηρίζει το παρέγχυμα του νεφρού, ενώ συνδέεται χαλαρά με τον υποκείμενο φλοιό. Η νεφρική κάψα εκτείνεται προς τον νεφρικό κόλπο, δηλαδή την εσωτερική κοιλότητα που περιέχει την πύελο, τους κάλυκες, τα αγγεία και τον ουρητήρα και συνεχίζει στο εσωτερικό του κόλπου, επενδύοντας τα τοιχώματά του μέχρι και την έξοδο από την πύλη του νεφρού (5,8).

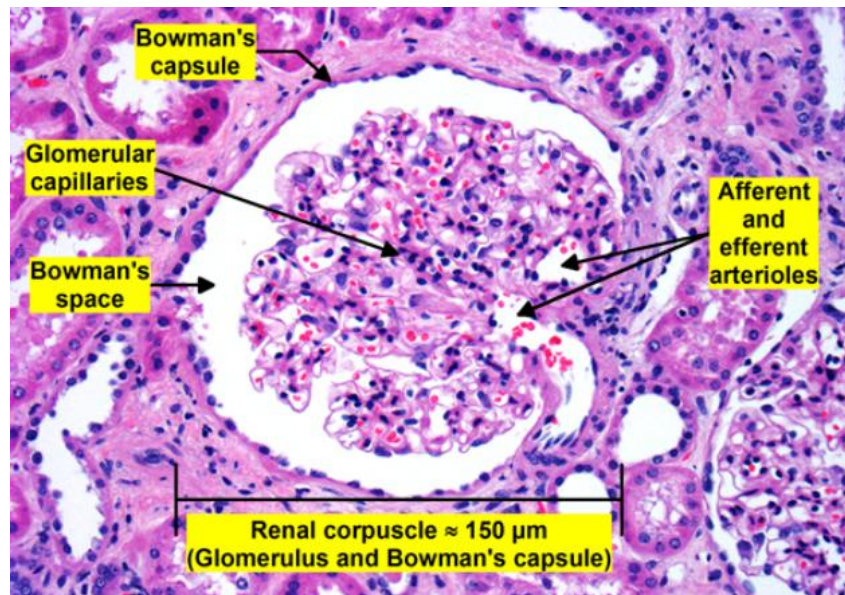
Το νεφρικό σωματίο εντοπίζεται στο φλοιό και αποτελεί τη μονάδα διήθησης του νεφρού. Αποτελείται από δύο κύρια δομικά στοιχεία: το αγγειώδες σπείραμα και την περιφερική σπειραματική κάψα (κάψα του Bowman). (Εικόνα 4) Το

σπείραμα είναι ένα σφαιρικό πλέγμα τριχοειδών που δέχεται αίμα από το προσαγωγό αρτηρίδιο και το μεταφέρει στο απαγωγό αρτηρίδιο, τα οποία συναντώνται στον αγγειακό πόλο του σωματίου. Ανάμεσα στα τριχοειδή του σπειράματος βρίσκονται τα μεσαγγειακά κύτταρα, τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα, που παρέχουν δομική υποστήριξη στο αγγειώδες πλέγμα. Το σύνολο των μεσαγγειακών κυττάρων και της παραγόμενης θεμέλιας ουσίας τους ονομάζεται μεσάγγειο. Τα κύτταρα αυτά δεν αναγνωρίζονται εύκολα με το οπτικό μικροσκόπιο, ωστόσο είναι πολύ σημαντικά λόγω της ικανότητάς του να συσπώνεται και να επιτελούν φαγοκυττάρωση. Μέσω της συστολή τους ρυθμίζεται η διάμετρος των τριχοειδών και η ενδοσπειραματική πίεση, με αποτέλεσμα τη μεταβολή του ρυθμού διήθησης, ενώ με τη φαγοκυτταρική τους δράση απομακρύνουν τα εναποτιθέμενα σύμπλοκα πρωτεϊνών ή ανοσοσυμπλέγματα από το φίλτρο (5, 9).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του νεφρικού σωματίου, όπου διακρίνονται τα τριχοειδή αγγεία του σπειράματος, η κάψα του Bowman, το προσαγωγό και απαγωγό αρτηρίδιο, τα ποδοκύτταρα και η πυκνή ωχρά κηλίδα (9).

Η σπειραματική κάψα περιβάλλει το σπείραμα και οριοθετεί το χώρο της διήθησης. Αποτελείται από δύο στιβάδες: το εξωτερικό πέταλο που αποτελείται από πλακώδες επιθήλιο και οριοθετεί εξωτερικά το νεφρικό σωματίο, και το εσωτερικό σπλαχνικό πέταλο που εφάπτεται των τριχοειδών του σπειράματος. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5. Ιστολογική τομή σπειραματικού σωματίου σε εγκάρσια τομή από νεφρό αρουραίου με χρώση H&E. Διακρίνεται το αγγειακό πλέγμα του σπειράματος, ο χώρος του Bowman, η κάψα του σπειράματος και τα προσαγωγά και απαγωγά αρτηριόλια (11).

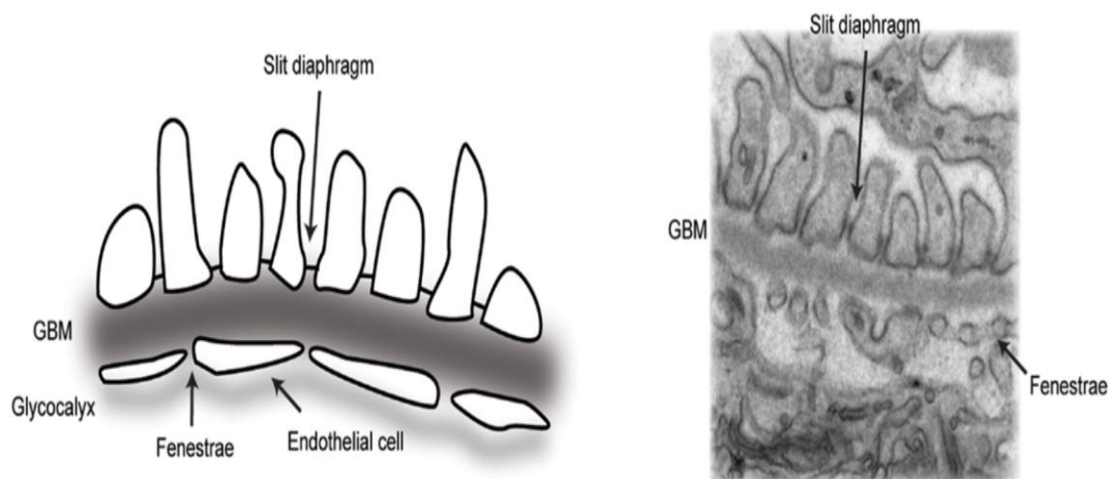
Το σπλαχνικό πέταλο σχηματίζεται από εξειδικευμένα ατρακτόμορφα επιθηλιακά κύτταρα που ονομάζονται ποδοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά φέρουν ποδίσκους με τους οποίους περιβάλλουν στενά τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος. Μεταξύ των αποφυάδων των γειτονικών ποδοκυττάρων δημιουργούνται στενά ανοίγματα (περίπου 25 nm) που γεφυρώνονται από ένα λεπτό διάφραγμα σαν σχισμή. Ο χώρος μεταξύ του σπλαχνικού και του τοιχωματικού πετάλου της κάψας (ουρητικός χώρος) είναι το σημείο στο οποίο συλλέγεται το πρωτογενές διήθημα πριν προωθηθεί στο εγγύς σωληνάριο, στον πόλο του νεφρικού σωματίου (4, 9). Το σπειραματικό φίλτρο (φραγμός διήθησης) του νεφρού αποτελείται από τρεις στιβάδες, που λειτουργούν σαν ημιπερατή μεμβράνη με βάση το μέγεθος και το φορτίο των μορίων:

- Ενδοθήλιο των τριχοειδών: τα σπειραματικά τριχοειδή διαθέτουν ένα λεπτό θυριδωτό ενδοθήλιο με πόρους διαμέτρου περίπου 70–100 nm, που επιτρέπουν την ελεύθερη δίοδο ύδατος και μικρών διαλυμένων ουσιών, συγκρατώντας όμως τα κύτταρα του αίματος. Επιπρόσθετα, στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων υπάρχει ένα αρνητικά φορτισμένο στρώμα γλυκοκάλυκα που απωθεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος.

- Σπειραματική βασική μεμβράνη: περιβάλλει εξωτερικά το ενδοθήλιο και αποτελεί μια παχιά συνεχή βασική μεμβράνη κοινή μεταξύ ενδοθηλίου και ποδοκυττάρων. Αποτελείται από ένα πλέγμα ειδικών πρωτεογλυκανών, γλυκοπρωτεϊνών (λαμίνη, φιμπρονεκτίνη) και κολλαγόνου τύπου IV. Λειτουργεί ως φυσικό και ηλεκτροστατικό φράγμα, εμποδίζοντας τη δίοδο μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων λόγω του πυκνού δικτύου και αρνητικών φορτίων.

Ποδοκύτταρα: αποτελούν το σπλαχνικό επιθήλιο της κάψας και περιβάλλουν εξωτερικά τη βασική μεμβράνη των τριχοειδών, ολοκληρώνοντας τον φραγμό. Οι ποδίσκοι τους αλληλοδιαπλέκονται δημιουργώντας τα λεπτά διαφράγματα των σχισμών, που επιτρέπουν τη δίοδο πολύ μικρών μορίων. Τα ποδοκύτταρα, πέρα από μηχανική στήριξη, συμβάλλουν και στη συντήρηση του φίλτρου. Συγκεκριμένα φαγοκυτταρώνουν και διασπούν, με τη βοήθεια των λυσοσωμάτων, τις πρωτεΐνες που προσκολλώνται στη μεμβράνη διήθησης, διατηρώντας με τον τρόπο αυτό τη διαπερατότητά της. (Εικόνα 6)

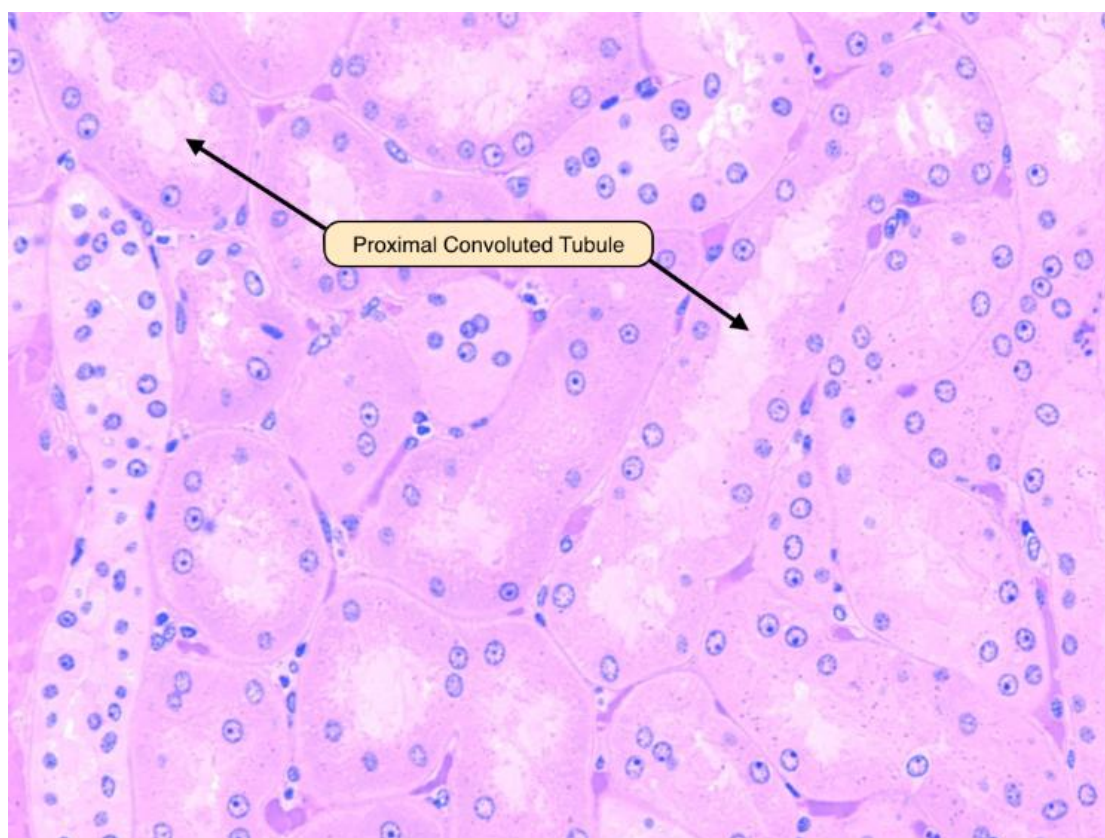
Μόλις το αίμα διηθηθεί μέσω του τριπλού αυτού φίλτρου, προκύπτει υγρό (πρωτογενές ούρο) που συλλέγεται αρχικά στον ουρητικό χώρο της κάψας και ρέει στον αυλό του εγγύς σωληναρίου στο ουρητικό πόλο του νεφρικού σωματίου. Συνολικά το πρωτοδιήθημα παράγεται με ρυθμό περίπου 120 mL/λεπτό και περιέχει προς επεξεργασία νερό, ηλεκτρολύτες, γλυκόζη, αμινοξέα και άχρηστα προϊόντα (9).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του φυσιολογικού σπειραματικού φίλτρου αριστερά και με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) δεξιά. Παρατηρούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι μεταξύ τους σχισμές, η βασική μεμβράνη του σπειράματος (GBM), και οι ποδίσκοι των ποδοκυττάρων (10).

Το διήθημα προχωρά στη συνέχεια προς το εγγύς εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο (ΕΕΣ), που αποτελεί το πρώτο τμήμα του νεφρώνα. Το εγγύς σωληνάριο βρίσκεται εξ ολοκλήρου στον φλοιό, συνήθως κοντά στο αντίστοιχο σπείραμα και έχει διάμετρο περίπου 60–65 μm . Η ιστολογική του δομή είναι χαρακτηριστική για τη λειτουργία του καθώς το τοίχωμά του αποτελείται από μία στιβάδα κυβικών επιθηλιακών κυττάρων με έντονα ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, πλούσιο σε μιτοχόνδρια. Η ελεύθερη επιφάνεια φέρει πυκνά διατεταγμένες μικρολάχνες και σχηματίζει τη βλεννογόνια ακρολοφία, που αυξάνει σημαντικά την επιφάνεια επαναρρόφησης. (Εικόνα 7) Το ΕΕΣ επαναρροφά περίπου το 65-80% του διηθήματος που καταλήγει σε αυτό. Το διήθημα μεταφέρεται μέσω ενός πυκνού δικτύου τριχοειδών που περιβάλλει τα εγγύς σωληνάκια και προέρχεται από τα απαγωγά αρτηρίδια των φλοιωδών νεφρώνων. Σε ιστολογικές εγκάρσιες τομές, ο αυλός του ΕΕΣ συχνά

εμφανίζεται άδειος από υγρό, αλλά περιέχει αποκολλημένα κυτταρικά υπολείμματα και φυσαλίδες (5, 9).



Εικόνα 7. Τομή εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (PCT). Διακρίνονται το μονόστιβο κυβικό επιθήλιο, το ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και η παρουσία μικρολαχνών στην προς τον αυλό επιφάνεια (7).

Μετά το εγγύς εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο φτάνουμε στο κατιόν σκέλος που εισέρχεται στη μυελική μοίρα. Ακολουθεί η αγκύλη του Henle, η οποία αποτελείται από ένα λεπτό κατιόν σκέλος, ένα ελικοειδές και ένα παχύ ανιόν σκέλος. Το λεπτό κατιόν τμήμα έχει μικρή διάμετρο και λεπτά τοιχώματα που επενδύονται από μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο, λίγα μιτοχόνδρια και ελάχιστες μικρολάχνες. Αντίθετα, στο παχύ ανιόν τμήμα, καθώς επανέρχεται προς τον φλοιό, αναγνωρίζεται μονόστιβο κυβικό επιθήλιο με υψηλότερα κύτταρα, εμφανείς πυρήνες και πτυχώσεις της βασικής τους επιφάνειας. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο παχύ ανιόν σκέλος διαθέτουν εξειδικευμένους μεταφορείς ιόντων που αραιώνουν το διήθημα. Το ανιόν σκέλος είναι ουσιαστικά μη διαπερατό στο νερό, σε αντίθεση με το λεπτό κατιόν σκέλος που είναι εξαιρετικά διαπερατό στο νερό αλλά όχι στα άλατα.

Η αγκύλη του Henle αφού επανέλθει στον φλοιό συνεχίζεται στο άπω εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο (ΑΕΣ), το οποίο βρίσκεται επίσης στον φλοιό αλλά είναι πιο μακριά από το σπείραμα. Το άπω σωληνάριο έχει μικρότερο μήκος και διάμετρο (περίπου 30–40 μm) σε σχέση με το εγγύς, και λιγότερες διακλαδώσεις, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται λιγότερες τομές του ανά

μονάδα φλοιώδους ιστού. Το επιθήλιό του είναι μονόστιβο κυβικό επίσης, ωστόσο τα κύτταρα είναι μικρότερα και πιο χαμηλά. Διαθέτουν επίσης λιγότερο κυτταρόπλασμα, λιγότερο ηωσινόφιλο σε σχέση με τα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου. Τα εν λόγω κύτταρα διαθέτουν άφθονα μιτοχόνδρια, τα οποία είναι συσσωρευμένα στις πτυχώσεις, δίνοντας χαρακτηριστική γραμμωτή εμφάνιση στη βάση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (5, 9).

Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (τελικό τμήμα του νεφρώνα) εκβάλλει στο συνδετικό σωληνάριο και στη συνέχεια στα αθροιστικά σωληνάρια. Πολλά τέτοια σωληνάρια ενώνονται σε φλοιϊκά και μυελικά αθροιστικά σωληνάρια, οι οποίοι συγκλίνουν στους πόρους του Bellini και εκβάλλουν στους ελάσσονες κάλυκες. Το επιθήλιο τους είναι μονόστιβο κυβικό στην περιοχή του φλοιού και γίνεται κυλινδρικό προς τον μυελό. Αποτελείται από κύρια κύτταρα (με υποδοχείς ADH) υπεύθυνα για την επαναρρόφηση νερού και ιόντων Na^+ και την έκκριση ιόντων K^+) και εμβόλιμα κύτταρα (με ρόλο στη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας). Η ADH και η αλδοστερόνη είναι αυτές που ρυθμίζουν τη σύνθεση των τελικών ούρων (5, 9).

Δίπλα στον αγγειακό πόλο του σπειράματος βρίσκεται η παρασπειραματική συσκευή, μία ενδοκρινής μικροσκοπική δομή, η οποία αποτελείται από:

- Κύτταρα της πυκνής ωχράς κηλίδας, που είναι εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα του άπω σωληναρίου, στη θέση επαφής του με το σπείραμα και ανιχνεύουν την πυκνότητα NaCl .

- Παρασπειραματικά κύτταρα που είναι τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα του προσαγωγού (και σε μικρότερο βαθμό του απαγωγού) αρτηριδίου, οποία εκκρίνουν ρενίνη.

- Εξωτριχοειδικά μεσαγγειακά κύτταρα, τα οποία συνδέουν λειτουργικά την πυκνή ωχρά κηλίδα με τα παρασπειραματικά κύτταρα.

Η παρασπειραματική συσκευή είναι κρίσιμη για την αυτορρύθμιση του GFR μέσω της σωληναριο-σπειραματικής ανατροφοδότησης. Αυξημένα επίπεδα NaCl ενεργοποιούν την πυκνή ωχρά κηλίδα, προκαλώντας σύσπαση του προσαγωγού αρτηριδίου και μείωση του ρυθμού διήθησης. Παράλληλα, όταν η πίεση ή η συγκέντρωση κατιόντων Na^+ είναι σε χαμηλά επίπεδα, τα παρασπειραματικά κύτταρα εκκρίνουν ρενίνη, ενεργοποιώντας το σύστημα ρενίνης-αγγιοτενσίνης-αλδοστερόνης και με τον τρόπο αυτό αυξάνουν την αρτηριακή πίεση και τον όγκο του αίματος.

Στους παραμυελικούς νεφρώνες, το απαγωγό αρτηρίδιο σχηματίζει τα ευθέα αγγεία που κατέρχονται στον μυελό, μετατρέπονται σε τριχοειδή και επιστρέφουν ως φλέβες. Τα ευθέα αγγεία διατηρούν τη βαθμιαία αύξηση της ωσμωτικότητας στο μυελό και επιτρέπουν την επαναρρόφηση ύδατος χωρίς διαταραχή της συγκέντρωσης. Το φλεβικό αίμα συλλέγεται μέσω των ελικοειδών φλεβών και καταλήγει στη νεφρική φλέβα. Η ιδιαίτερη αγγειακή αρχιτεκτονική του νεφρού υποστηρίζει τόσο την παραγωγή διηθήματος, όσο και την ακριβή ρύθμιση της σύστασής του μέσω μηχανισμών επαναρρόφησης και έκκρισης (4, 5, 9).

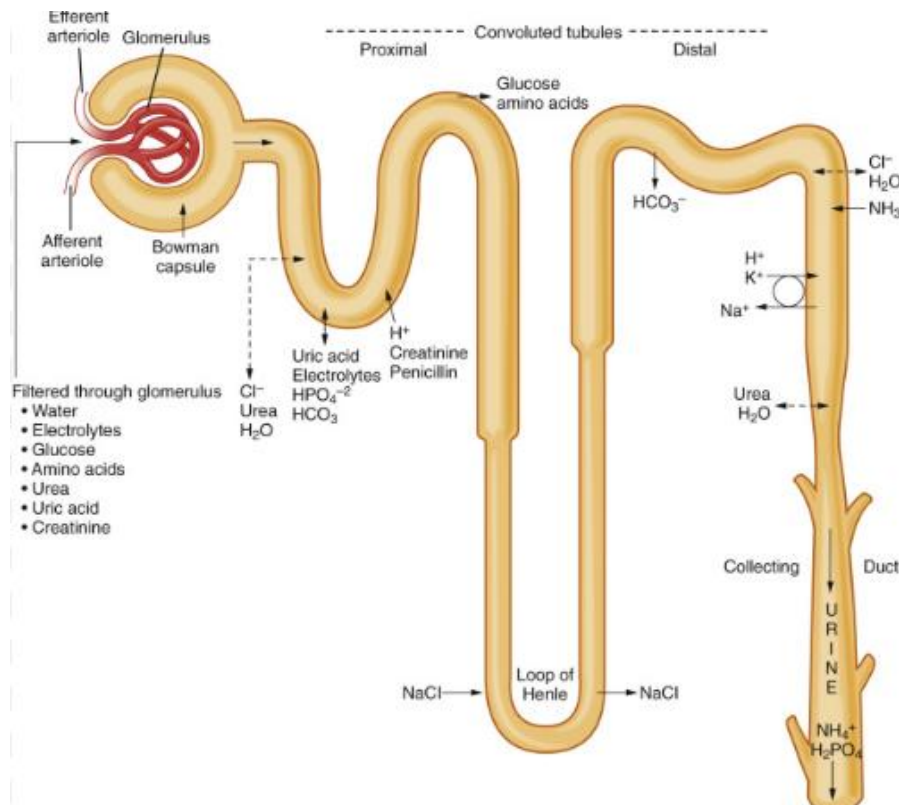
1.1.4 Φυσιολογία του νεφρού

Η φυσιολογία των νεφρών περιλαμβάνει τη διατήρηση της ομοιόστασης του εσωτερικού περιβάλλοντος. Μέσω του σχηματισμού των ούρων, φιλτράρουν καθημερινά 200 περίπου λίτρα αίματος, επιτρέποντας την απομάκρυνση τοξινών, μεταβολικών αποβλήτων και περίσσειας ιόντων, ενώ διατηρούν τις απαραίτητες ουσίες στον οργανισμό. Παράλληλα, ρυθμίζουν την ωσμωτικότητα και τον όγκο των σωματικών υγρών μέσω του ελέγχου της απέκκρισης νερού και ηλεκτρολυτών, συμβάλλουν στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας και συμμετέχουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Επιπρόσθετα, οι νεφροί επιτελούν ενδοκρινείς λειτουργίες, όπως η παραγωγή της ερυθροποιητίνης και η ενεργοποίηση της βιταμίνης D, ενώ παράγουν τη ρενίνη που ενεργοποιεί το σύστημα RAAS για την ρύθμιση της πίεσης (12).

Οι νεφροί εκτός των άλλων παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του όγκου των σωματικών υγρών και της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών στο πλάσμα. Η ρύθμιση των υγρών επιτυγχάνεται με προσαρμογή της διούρησης, καθώς οι νεφροί μπορούν να παράγουν από πολύ αραιά έως πολύ συμπυκνωμένα ούρα, ανάλογα με τις ανάγκες του σώματος σε νερό. Όταν υπάρχει στο σώμα περίσσεια ύδατος αυξάνεται η απέκκρισή του με παραγωγή μεγάλου όγκου αραιών ούρων, ενώ σε συνθήκες αφυδάτωσης, οι νεφροί περιορίζουν τις απώλειες νερού, παράγοντας μικρό όγκο συμπυκνωμένων ούρων. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στη δημιουργία υψηλής ωσμωτικής διαβάθμισης στον μυελό των νεφρών και στη δράση ορμονών, όπως είναι η αντιδιουρητική ορμόνη.

Η ρύθμιση των ηλεκτρολυτών επιτυγχάνεται μέσω ειδικού ελέγχου της επαναρρόφησης και έκκρισης ιόντων. Ο κυριότερος ηλεκτρολύτης του εξωκυττάριου χώρου, το νάτριο, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τον όγκο των υγρών. Η επαναρρόφηση νατρίου στο εγγύς σωληνάριο είναι μαζική και ανεξάρτητη από ορμόνες, ωστόσο στα άπω τμήματα ρυθμίζεται από την αλδοστερόνη και άλλους παράγοντες, επιτρέποντας τον συντονισμένο έλεγχο της νατριούρησης. Το κάλιο είναι ο κύριος ενδοκυττάριος ηλεκτρολύτης και οι νεφροί ελέγχουν και διατηρούν σταθερά τα επίπεδά του. Σε περιπτώσεις που τα επίπεδα καλίου είναι αυξημένα στον οργανισμό το πλεόνασμα ιόντων καλίου αποβάλλεται, ενώ όταν ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα ιόντων καλίου, η έκκριση μειώνεται ώστε να περιοριστούν οι απώλειες (4, 5).

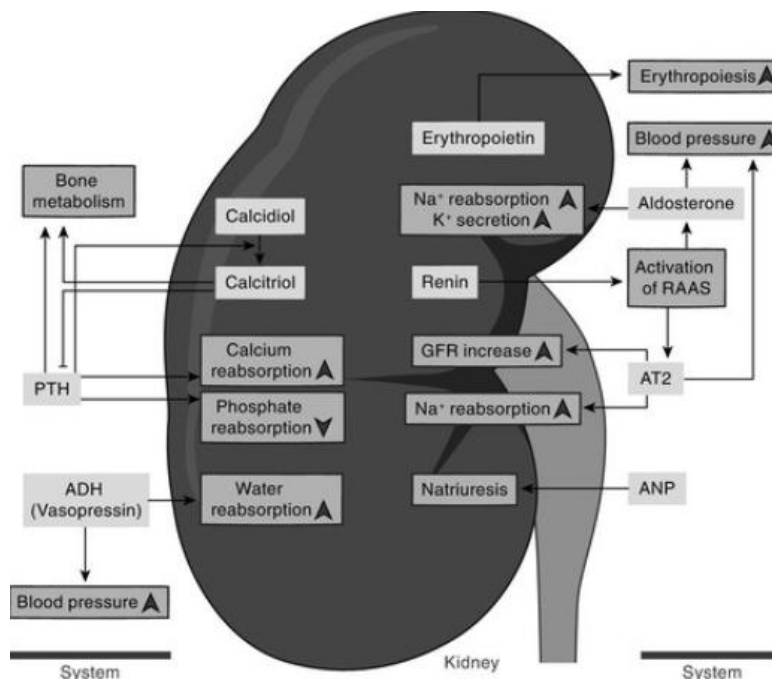
Οι νεφροί αποτελούν τον κύριο μηχανισμό ρύθμισης της οξεοβασικής ισορροπίας και συμβάλλουν στη διατήρηση του φυσιολογικού pH του αίματος (περίπου 7,4). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της έκκρισης πρωτονίων (H^+) και της επαναρρόφησης διττανθρακικών ιόντων (HCO_3^-). Σε αλκαλικές καταστάσεις, οι νεφροί μπορούν επίσης να αποβάλλουν διττανθρακικά ιόντα και να μειώσουν την έκκριση πρωτονίων. Η ανταπόκριση των νεφρών είναι πιο αργή σε σύγκριση με τους πνεύμονες, οι οποίοι ρυθμίζουν άμεσα το pH μέσω της απομάκρυνσης CO_2 , ωστόσο η νεφρική ρύθμιση είναι πιο ισχυρή και μακροχρόνια (4). (Εικόνα 8)



Εικόνα 8. Φυσιολογία του νεφρού (Υγρά, ηλεκτρολύτες, οξεοβασική ισορροπία) (14)

Οι νεφροί συμβάλλουν καθοριστικά στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσα από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS). Το σύστημα RAAS αποτελεί έναν ορμονικό μηχανισμό αυξητικής ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης μέσω αγγειοσυστολής και ανάκτησης ιόντων νατρίου/νερού και δρα συνεργικά με άλλα ρυθμιστικά συστήματα για τη διατήρηση της πίεσης σε φυσιολογικά επίπεδα.

Οι νεφροί έχουν επίσης σημαντικές ενδοκρινικές λειτουργίες. Παράγουν την ορμόνη ερυθροποιητίνη (EPO), η οποία συντίθεται από κύτταρα του διάμεσου ιστού του φλοιού των νεφρών ως απόκριση στην υποξία. Η ερυθροποιητίνη διεγείρει τον μυελό των οστών να παράξει ερυθροκύτταρα, αυξάνοντας την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος. Με τον τρόπο αυτό, ο νεφρός συμβάλλει στην αιμοποίηση, ιδιαίτερα σε συνθήκες χαμηλής παροχής οξυγόνου και διασφαλίζει την επαρκή μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Οι νεφροί εκκρίνουν επιπρόσθετα την 1,25-διυδροξυβιταμίνη D₃ (καλσιτριόλη), που είναι η ενεργός μορφή της βιταμίνης D. Η καλσιτριόλη δρα ως ορμόνη, αυξάνει την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο και συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου. Μέσω της ενεργοποίησης της βιταμίνης D, οι νεφροί διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ισορροπία των μεταλλικών στοιχείων και της υγείας των οστών(4). (Εικόνα 9)



Εικόνα 9. Ορμονική ρύθμιση των νεφρών μέσω του συστήματος RAAS, της παραγωγής EPO και της έκκρισης καλσιτριόλης (15).

1.1.4.1 Λειτουργίες του Νεφρώνα

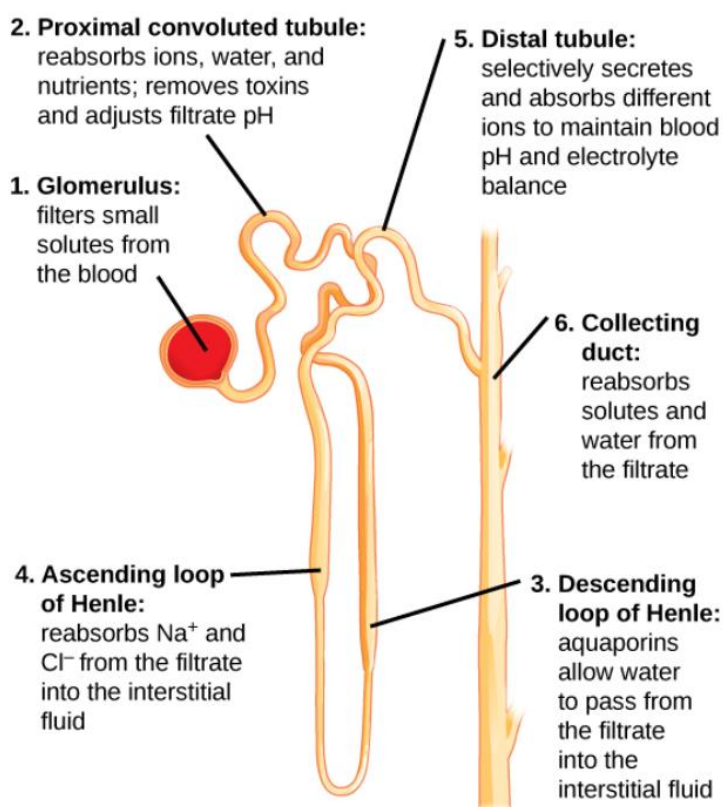
Η κύρια λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας ο οποίος μέσω της σπειραματικής διήθησης, της επαναρρόφησης, της έκκρισης και της τελικής απέκκρισης σχηματίζει τα ούρα. Η σπειραματική διήθηση λαμβάνει χώρα στο νεφρικό σωμάτιο και είναι μία παθητική διαδικασία κατά την οποία το πλάσμα του αίματος διηθείται μέσω της ημιδιαπερατής μεμβράνης των τριχοειδών του σπειράματος. Η υψηλή υδροστατική πίεση στο σπείραμα ωθεί το υγρό και μικρά διαλυτά μόρια να περάσουν στην κάψα του Bowman, ενώ τα κύτταρα του αίματος και οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες παραμένουν στην κυκλοφορία. Δεν απαιτείται δαπάνη ενέργειας στο στάδιο αυτό και ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης (GFR) αποτελεί βασικό δείκτη της νεφρικής λειτουργίας και εκτιμάται περίπου στα 125 mL/λεπτό στους υγιείς ενήλικες.

Κατά την επαναρρόφηση, το μεγαλύτερο μέρος του διηθήματος επιστρέφει από το νεφρικό σωληνάριο στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των τριχοειδών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο επαναρροφά το μεγαλύτερο ποσοστό των θρεπτικών ουσιών και των ιόντων, συμπεριλαμβανομένης και όλης της γλυκόζης και των αμινοξέων. Η επαναρρόφηση γίνεται με συνδυασμό μηχανισμών παθητικής και ενεργητικής μεταφοράς (Ενεργητική μεταφορά νατρίου έξω από τα κύτταρα των σωληναρίων και παθητική διάχυση του ύδατος).

Αντιθέτως κατά την έκκριση συγκεκριμένες ουσίες μεταφέρονται από το αίμα στα σωληνάρια με δαπάνη ενέργειας. Στο εγγύς σωληνάριο εκκρίνονται φάρμακα και οργανικές ενώσεις (οξέα/βάσεις), ενώ στο άπω σωληνάριο και στο αθροιστικό σωληνάριο η έκκριση των ιόντων καλίου και υδρογόνου είναι κρίσιμη για την διατήρηση της ομοιόστασης. Μέσω της διαδικασίας της

έκκρισης, οι νεφροί μπορούν να αποβάλουν ταχύτερα ουσίες που δεν απομακρύνονται επαρκώς με τη διήθηση (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες) και να ρυθμίζουν τη συγκέντρωση των ιόντων καλίου και το pH του αίματος.

Η απέκκριση είναι το τελευταίο στάδιο της όλης διεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο αυτό γίνεται η σύνθεση των ούρων που αποβάλλονται από τους νεφρούς και περιέχουν νερό, ηλεκτρολύτες και άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού (όπως ουρία, κρεατινίνη), σε ποσότητες που αντικατοπτρίζουν την ανάγκη διατήρησης της ομοιόστασης του οργανισμού. Στην πραγματικότητα, τα ούρα αποτελούν εκείνο το μέρος του διηθήματος που δεν επαναρροφήθηκε και περιέχουν πλεονάσματα ή τοξικές ουσίες που πρέπει να απομακρυνθούν (4, 13). (Εικόνα 10)

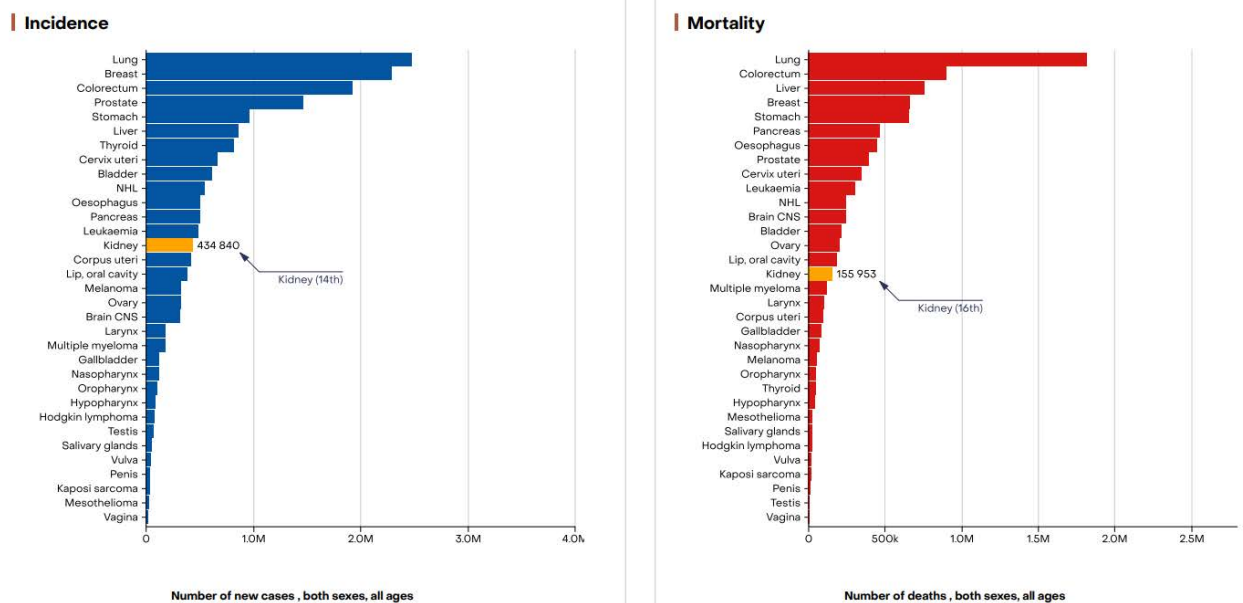


Εικόνα 10. Δομή του νεφρώνα στην οποία απεικονίζεται η διαφορετική λειτουργία που λαμβάνει χώρα σε κάθε επιμέρους τμήμα, με τελικό σκοπό το φιλτράρισμα των αποβλήτων και τη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας (13)

1.2 Καρκίνος του Νεφρού

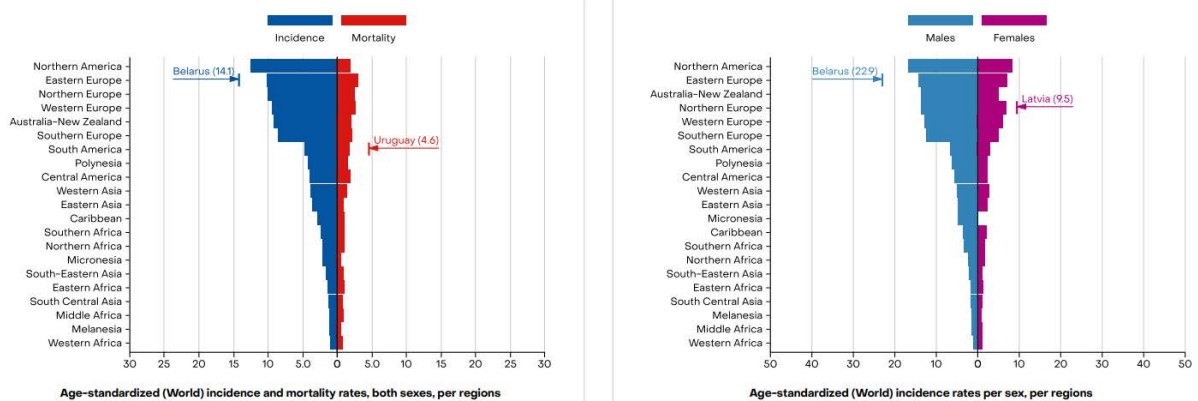
1.2.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του νεφρού (ΚΝ) κατατάσσεται ως ο 14ος συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως, με συνολικά 434.840 νέα περιστατικά το 2022, αντιπροσωπεύοντας ποσοστό επίπτωσης (ASR, world-standardized) 4,4 ανά 100.000 κατοίκους. Αντίστοιχα, καταγράφηκαν 155.953 θάνατοι από ΚΝ, κατατάσσοντάς τον στη 16η θέση σε παγκόσμια θνησιμότητα, με ASR θνησιμότητας 1,5/100.000.(16),(17)



Εικόνα 11. Απόλυτος αριθμός νέων περιστατικών και θανάτων από καρκίνο του νεφρού το 2022 παγκοσμίως. (17)

Η επίπτωση είναι σχεδόν διπλάσια στους άνδρες (περίπου 6,6/100.000) σε σχέση με τις γυναίκες (περίπου 3,3/100.000). Ο αθροιστικός κίνδυνος εμφάνισης ΚΝ έως την ηλικία των 74 ετών υπολογίζεται στο 0,52%, δηλαδή περισσότερο από 1 στους 200 ανθρώπους αναμένεται να αναπτύξει την ασθένεια εντός αυτού του ηλικιακού πλαισίου. (16),(17)



Εικόνα 12. Τυποποιημένα κατά ηλικία ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας του καρκίνου του νεφρού το 2022 ανά περιοχή και φύλο.(17)

Όσο αφορά την γεωγραφική κατανομή, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο γεγονός ότι οι χώρες υψηλού εισοδήματος εμφανίζουν μεν υψηλότερη επίπτωση, αλλά σημαντικά χαμηλότερο λόγο θνησιμότητας προς επίπτωση (M/I ratio), συγκριτικά με τις χώρες χαμηλού εισοδήματος. Το παράδοξο αυτό μπορεί εύκολα να ερμηνευτεί από την χαοτική διαφορά, σε κάποιες περιπτώσεις, (τουλάχιστον μεταξύ ανεπτυγμένων και μη χωρών) στην ποιότητα των υπηρεσιών υγείας, την πρόσβαση σε πρώιμη διάγνωση και τις καταγραφικές ικανότητες του συστήματος υγείας κάθε χώρας.

Παρότι αναμένεται αύξηση του απόλυτου αριθμού νέων περιστατικών τα επόμενα έτη λόγω γήρανσης του πληθυσμού, οι εκτιμήσεις δείχνουν σταθεροποίηση ή και μείωση του ASR σε πολλές αναπτυγμένες χώρες, ως αποτέλεσμα της βελτίωσης των παραπάνω παραγόντων. Δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο ωστόσο και για τις μη προνομιούχες χώρες.(16),(17)

1.2.2 Αιτιοπαθογένεια

Είναι γεγονός ότι ο καρκίνος του νεφρού(KN) πρόκειται για πολυπαραγοντική νόσο, που περιλαμβάνει γενετικούς, επιγενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του KN έχει επεκταθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, οδηγώντας στην αναγνώριση διακριτών μοριακών οδών που εμπλέκονται στους διάφορους υποτύπους.

1.2.2.1 Μοριακές Οδοί

Το μονοπάτι του γονιδίου von Hippel-Lindau (VHL) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος του νεφρού (ccRCC), του συχνότερου υποτύπου καρκίνου του νεφρού(KN). Το γονίδιο VHL, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p25, κωδικοποιεί μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την αποικοδόμηση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α) υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης. Η απενεργοποίηση του VHL, είτε μέσω μεταλλάξεων, απώλειας ετεροζυγωτίας ή επιγενετικής σίγησης, οδηγεί σε συσσώρευση του HIF-1α και επακόλουθη

υπερέκφραση γονιδίων-στόχων που προάγουν την αγγειογένεση,τη γλυκόλυση τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αποφυγή απόπτωσης.

Το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR αποτελεί έναν άλλο κρίσιμο μηχανισμό στην παθογένεση του ΚΝ. Η απορρύθμιση αυτού του μονοπατιού, συχνά λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια PTEN, TSC1/2 ή mTOR, οδηγεί σε αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης. Ιδιαίτερα στον θηλώδη ΚΝ, μεταλλάξεις στο γονίδιο MET, που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα-κινάση τυροσίνης, οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR, προωθώντας την ογκογένεση.

Το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης εμπλέκεται επίσης στην παθογένεση του ΚΝ, ιδιαίτερα σε συγκεκριμένους υποτύπους όπως το χρωμόφοβο καρκίνωμα νεφρού.(18),(19),

1.2.2.2 Γενετική Προδιάθεση

Περίπου 5% των περιπτώσεων καρκίνου του νεφρού έχουν κληρονομική βάση, συνδεόμενα με συγκεκριμένα σύνδρομα που αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης νεφρικών όγκων:

- Το σύνδρομο von Hippel-Lindau (VHL) είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο κληρονομικό σύνδρομο που σχετίζεται με τον ΚΝ, προκαλούμενο από μεταλλάξεις στο γονίδιο VHL όπως αναφέρθηκε και πιο πριν.

- Το σύνδρομο κληρονομικού θηλώδους καρκινώματος νεφρού (HPRC) χαρακτηρίζεται από βλαστικές μεταλλάξεις στο γονίδιο MET, οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης θηλώδους ΚΝ.

- Το σύνδρομο Birt-Hogg-Dubé (BHD), που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο FLCN, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για χρωμόφοβο καρκίνωμα νεφρού, υβριδικών όγκων και ογκοκυτωμάτων.

Άλλα κληρονομικά σύνδρομα που συνδέονται με τον ΚΝ περιλαμβάνουν το σύνδρομο κληρονομικής λειομυώματωσης και καρκινώματος νεφρού (HLRCC), που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο FH και συνδέεται με επιθετικό θηλώδη ΚΝ, και το σύνδρομο BAP1-σχετιζόμενου καρκίνου, που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο BAP1 και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ccRCC.(21)

1.2.2.3 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Πέρα από τους γενετικούς παράγοντες, διάφοροι περιβαλλοντικοί και μεταβλητοί παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου του νεφρού(ΚΝ).

Το κάπνισμα αποτελεί έναν καλά τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου, αυξάνοντας τον κίνδυνο ΚΝ κατά περίπου 38-50% και συνδεόμενο ιδιαίτερα με τον διαυγοκυτταρικό υπότυπο. Οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν επιβεβαιωθεί ακόμη ωστόσο η άμεση έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες,η πρόκληση χρόνιας υποξίας και η επαγωγή οξειδωτικού στρες είναι οι πιο πιθανοί λόγοι.Να

σημειωθεί ότι η διακοπή του καπνίσματος μειώνει σταδιακά αυτούς τους κινδύνους.(22)

Η παχυσαρκία αποτελεί έναν άλλο σημαντικό παράγοντα κινδύνου, με την αύξηση του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) να συνδέεται γραμμικά με αυξημένο κίνδυνο ΚΝ, ιδιαίτερα στις γυναίκες. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν χρόνια φλεγμονή, αντίσταση στην ινσουλίνη και μεταβολές στα επίπεδα ορμονών και αυξητικών παραγόντων.(23)

Η επαγγελματική έκθεση σε συγκεκριμένες ουσίες, όπως το τριχλωροαιθυλένιο(TCE), ο μόλυβδος, το κάδμιο και άλλα βαρέα μέταλλα, έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ΚΝ. Αυτές οι ουσίες μπορούν να προκαλέσουν άμεση βλάβη στο DNA των νεφρικών κυττάρων, να επάγουν οξειδωτικό στρες και να διαταράξουν τις επιγενετικές ρυθμίσεις.(25),(24)

1.2.3 Υπότυποι

Η ταξινόμηση του καρκίνου του νεφρού έχει εξελιχθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, με την πιο πρόσφατη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2022) να αναγνωρίζει διάφορους ιστολογικούς υποτύπους με διακριτά μορφολογικά, κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Οι κυριότερες κακοήθεις μορφές περιλαμβάνουν το διαυγοκυτταρικό, το θηλώδες, το χρωμόφοβο καρκίνωμα, καθώς και νέα, μοριακά προσδιορισμένα νεοπλάσματα. Η κατανόηση αυτών των υποτύπων είναι κρίσιμη για να έχουμε όσο το δυνατόν πιο ακριβή διάγνωση, πρόγνωση και εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση στο μέλλον. Η ανοσοϊστοχημεία με την χρήση δεικτών αλλά και ειδικά η μοριακή ταυτοποίηση υποτύπων με αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) έχουν δώσει μια νέα διάσταση στην ταξινόμηση και κατανόηση. (26)

1.2.3.1 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού (clear cell RCC – ccRCC)

Το διαυγοκυτταρικό RCC είναι ο συχνότερος ιστολογικός τύπος, καλύπτοντας περίπου 70–80% των περιπτώσεων. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα και πλούσιο αγγειακό δίκτυο και οι όγκοι είναι συνήθως μονήρεις, σφαιρικοί και καλώς περιγεγραμμένοι, με χαρακτηριστική χρυσοκίτρινη επιφάνεια τομής λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια και γλυκογόνο. Μοριακά, σχετίζεται με απενεργοποίηση του γονιδίου VHL και ενεργοποίηση του άξονα HIF–VEGF, ενώ συχνές είναι οι μεταλλάξεις στα PBRM1, SETD2, BAP1 και στο μονοπάτι PI3K/mTOR όπως αναφέραμε πιο πάνω. (18)

1.2.3.2 Θηλώδες καρκίνωμα νεφρού (papillary RCC – pRCC)

Το θηλώδες RCC είναι ο δεύτερος πιο συχνός υπότυπος (10–15%). Η WHO 2022 δεν υιοθετεί πλέον τον διαχωρισμό σε τύπο 1 και 2, καθώς οι πρώην τύποι 2 περιλαμβάνουν πλέον διακριτές μοριακές οντότητες. Ο “κλασικός” θηλώδης τύπος εμφανίζει θηλώδη ή σωληνώδη αρχιτεκτονική, με χαρακτηριστική τρισωμία χρωμοσωμάτων 7 και 17, απώλεια του Y στους άνδρες και μεταλλάξεις στο γονίδιο MET, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σύνδρομο κληρονομικού θηλώδους καρκινώματος νεφρού (HPRC). (26),(27)

1.2.3.3 Χρωμόφοβο Καρκίνωμα Νεφρού (chromophobe RCC – chRCC)

Το χρωμόφοβο καρκίνωμα νεφρού αποτελεί περίπου 5% των RCC. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από μεγάλα πολυγωνικά κύτταρα με διαυγές, ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, εμφανή κυτταρικά όρια και ανώμαλους πυρήνες. Μοριακά, σχετίζεται με μονοσωμίες πολλών χρωμοσωμάτων (1, 2, 6, 10, 13, 17, 21) και μεταλλάξεις στα TP53, PTEN και FLCN, με σύνδεση με το σύνδρομο Birt–Hogg–Dubé. Η πρόγνωση είναι συνήθως καλή, εκτός αν εμφανιστεί σαρκωματοειδής διαφοροποίηση όπου παρατηρείται πιο επιθετική συμπεριφορά. (26),(27)

1.2.3.4 Διαυγοκυτταρικό-θηλώδες νεόπλασμα (clear cell papillary renal cell tumor – ccrRCC)

Το ccrRCC είναι διακριτός, χαμηλής κακοήθειας τύπος, με στοιχεία τόσο του ccRCC όσο και του pRCC. Παρουσιάζει διαυγές κυτταρόπλασμα και θηλώδη δομή, χωρίς μεταλλάξεις VHL ή τυπικές ανευπλοειδίες. Η πρόγνωση είναι εξαιρετική και η μετάσταση σπάνια. (26),(27)

1.2.3.5 Ογκοκύττωμα νεφρού (renal oncocytoma)

Το ογκοκύττωμα είναι καλόηθες επιθηλιακό νεόπλασμα του νεφρού, που αντιπροσωπεύει περίπου 3–7% των νεφρικών όγκων. Μακροσκοπικά είναι συνήθως σφαιρικό, καλά περιγεγραμμένο, με καφέ-πορτοκαλί χρωματισμό. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από μεγάλα πολυγωνικά κύτταρα με άφθονο ηωσινόφυλο, κοκκιώδες κυτταρόπλασμα, πλούσιο σε μιτοχόνδρια. Μοριακά, σχετίζεται με μετατοπίσεις χρωμοσωμάτων 1 και Y και σε ορισμένες περιπτώσεις με μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA. Εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με σύνδρομο Birt–Hogg–Dubé, και η διάκρισή του από το χρωμόφοβο RCC, με το οποίο μοιάζουν αρκετά σε μορφολογία, είναι αρκετά σημαντική για την κλινική εικόνα του ασθενή. (26),(27)

1.2.3.6 Καρκίνωμα νεφρού με αναδιάταξη TFE3- Xp11.2 Translocation RCC (TFE3-rearranged RCC)

Σπάνιος υπότυπος που χαρακτηρίζεται από αναδιάταξη του γονιδίου *TFE3* στο χρωμόσωμα Xp11.2. Παρατηρείται κυρίως σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες, εμφανίζοντας ποικίλη μορφολογία (θηλώδη, συμπαγή ή μικτή) . (26),(27)

1.2.3.7 Καρκίνωμα νεφρών με παραλλαγή του TFEB -TFEB-altered RCC

Περιλαμβάνει αναδιατάξεις ή ενισχύσεις του *TFEB* και χαρακτηρίζεται από διφασική κυτταρική αρχιτεκτονική με καθαρά ή ηωσινόφιλα κύτταρα.Μοριακά συμβαίνει μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 6 και 11. (26),(27)

1.2.3.8 Καρκίνωμα Νεφρού με Έλλειψη Ηλεκτρικής Αφυδρογονάσης - Succinate Dehydrogenase-deficient RCC (SDH-def RCC)

Σπάνιος όγκος που σχετίζεται με μεταλλάξεις στο *SDHB* (συνήθως σε κληρονομικά σύνδρομα). Ιστολογικά εμφανίζει ηωσινόφιλα κύτταρα με κυτταροπλασματικά κενोटόπια και χαρακτηριστική απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης SDHB.

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. (26),(27)

1.2.3.9 Καρκίνωμα με Έλλειψη FH- FH-deficient RCC

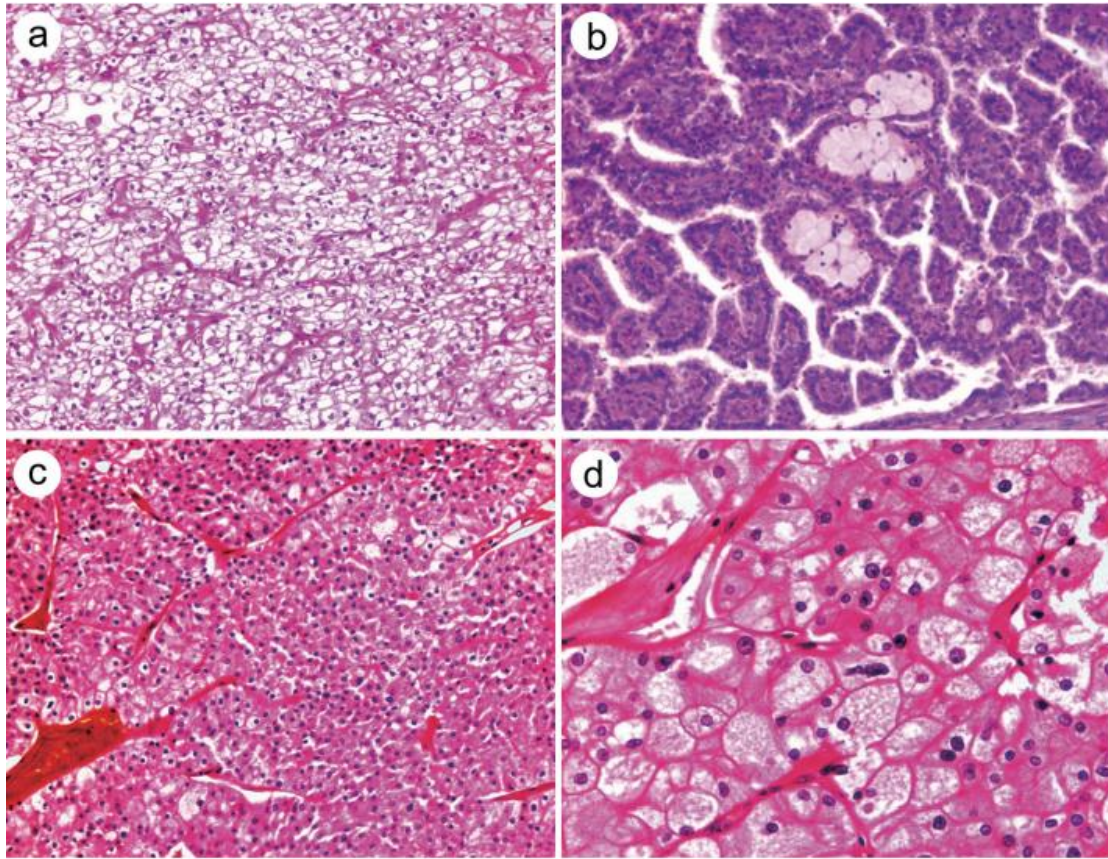
Σύνδεση με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FH*, ενίοτε στο πλαίσιο του συνδρόμου HLRCC. Εμφανίζει ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα ,θηλώδη αρχιτεκτονική και επιμήκεις πυρήνες.Μοριακά σχετίζεται με την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης *FH* (Fumarate Hydratase), μιας υδρατάσης που καταλύει τη μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε μηλικό. (26),(27)

1.2.3.10 Καρκίνωμα νεφρού με Αναδιάταξη ALK -ALK-rearranged RCC

Εξαιρετικά σπάνιο νεόπλασμα με ποικίλη μορφολογία, περιλαμβάνοντας ραβδοειδή κύτταρα, βλεννώδη στοιχεία και βλεννογόνους εγκλεισμούς. (26),(27)

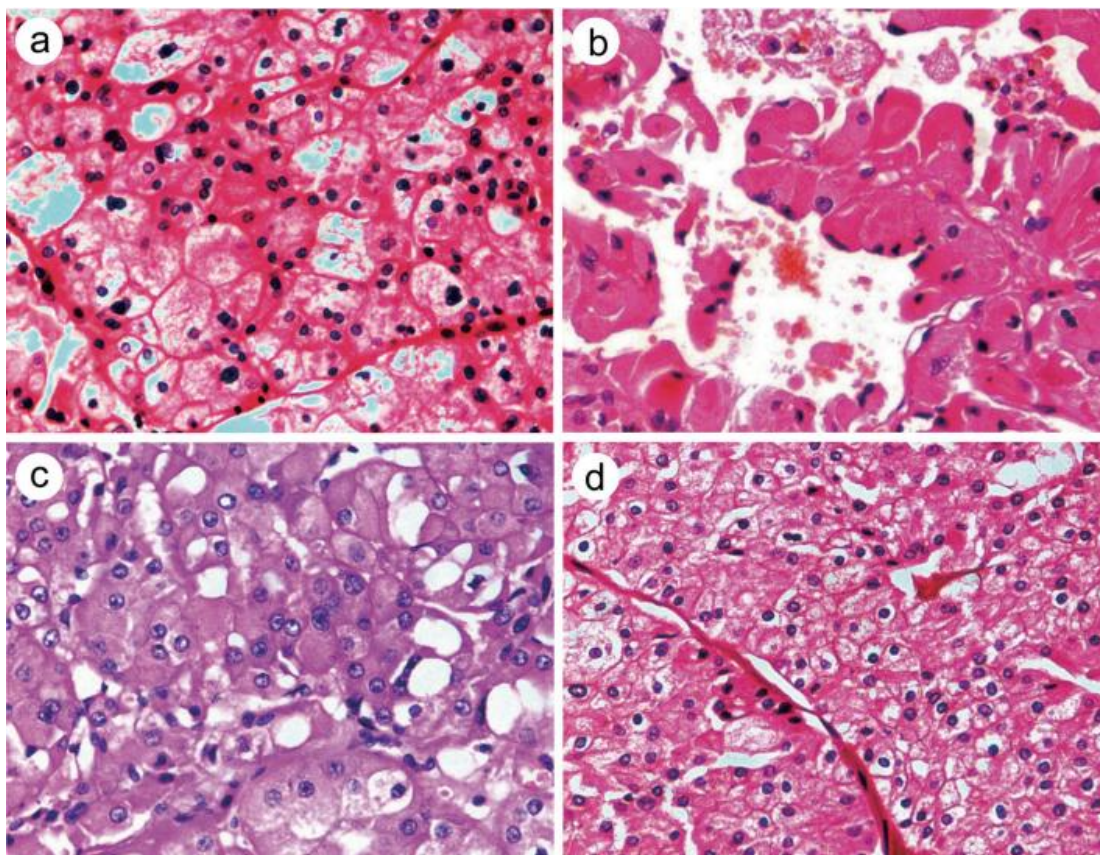
1.2.3.11 Θηλώδες αδένωμα-Papillary Adenoma

Μικρού μεγέθους (<15 mm) θηλώδες νεόπλασμα με μοριακές ομοιότητες με pRCC. Συνήθως θεωρείται προκαρκινωματώδης αλλοίωση, ιδιαίτερα σε συνθήκες τελικού σταδίου νεφρικής νόσου. (26),(27)



Μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυριότερων ιστολογικών υποτύπων καρκινώματος νεφρικών κυττάρων (RCC). (a) Διαυγοκυτταρικό RCC: φωλεοειδής διάταξη καρκινικών κυττάρων με άφθονο διαυγές κυτταρόπλασμα και χαμηλόβαθμους πυρήνες, περιβαλλόμενα από ατελή ινωαγγειακά διαφράγματα (H&E, ×200). (b) Θηλώδες RCC: χαρακτηριστική θηλώδης αρχιτεκτονική, με ορισμένους θηλώδεις άξονες που περιέχουν αφρώδη ιστιοκύτταρα στο κέντρο τους (H&E, ×200). (c) Ογκοκύττωμα: φωλεές και πλάκες ηωσινοφιλικών κυττάρων με στρογγυλούς, κεντρικά τοποθετημένους πυρήνες και ελάχιστο πλειομορφισμό (H&E, ×200). (d) Χρωμόφοβο RCC: κύτταρα όγκου διατεταγμένα σε συμπαγείς πλάκες, διαχωρισμένες με λεπτά διαφράγματα· παρατηρούνται πυρήνες με χαρακτηριστική «σταφιδοειδή» μορφολογία (H&E, ×400). Χρώση: αιματοξυλίνη-ηωσίνη.(26)

Ορισμένοι νέοι/αναδυόμενοι ιστολογικοί υπότυποι απεικονίζονται παρακάτω:



Μικροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά νεοεμφανιζόμενων/σπάνιων υποτύπων καρκινωμάτων νεφρικών κυττάρων (RCC). (a) Υβριδικός όγκος ογκοκυττώματος/χρωμόφοβου RCC (HOCT): συμπαγής διάταξη ηωσινόφιλων κυττάρων με διάσπαρτους μεγάλους πυρήνες (H&E, ×400). (b) Ηωσινόφιλος θηλώδης όγκος νεφρού: θηλώδης αρχιτεκτονική με ηωσινόφιλα καρκινικά κύτταρα, άφθονο κυτταρόπλασμα και αντιστροφή πολικότητας των πυρήνων (H&E, ×400). (c) Ηωσινόφιλος κενοτοπιώδης όγκος (EVT): κύτταρα με μεγάλες ενδοκυττάρειες κενοτοπιώδεις δομές και στρογγυλούς έως ωσειδείς πυρήνες με εμφανή πυρήνια (H&E, ×400). (d) Χαμηλόβαθμος ογκοκυτταρικός όγκος (LOT): άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και στρογγυλοί έως ωσειδείς πυρήνες με περικυτταρικούς διαυγαστικούς δακτυλίους (H&E, ×400). Χρώση: αιματοξυλίνη-ηωσίνη.(26)

1.2.4 Σταδιοποίηση – Βαθμός Κακοήθειας -Προγνωστικά Μοντέλα

1.2.4.1 Σταδιοποίηση

Η ακριβής σταδιοποίηση του καρκίνου του νεφρού είναι θεμελιώδους σημασίας για τον καθορισμό της πρόγνωσης και την επιλογή της βέλτιστης θεραπευτικής προσέγγισης. Η σταδιοποίηση αποτελεί μια συμφωνημένη ταξινόμηση για τον καθορισμό της έκτασης ενός κακοήθους όγκου. Το σύστημα στηρίζεται κυρίως στην ανατομική εξάπλωση του πρωτοπαθούς όγκου πέρα από τρία σημεία αναφοράς: την τοπογραφία του πρωτοπαθούς όγκου(T) , τους επιχώριους λεμφαδένες (N), και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (M). Αυτά τα τρία σημεία αναφοράς ορίζουν το σύστημα TNM που έχει προωθηθεί από την Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (UICC) και την Αμερικανική Κοινή Επιτροπή κατά του Καρκίνου (AJCC)

Η 8η έκδοση, που εφαρμόζεται από το 2018, περιλαμβάνει τις ακόλουθες κατηγορίες:

Πρωτοπαθής Όγκος (T)

TX: Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να αξιολογηθεί

T0: Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου

T1: Όγκος ≤ 7 cm στη μέγιστη διάσταση, περιορισμένος στο νεφρό

T1a: Όγκος ≤ 4 cm στη μέγιστη διάσταση, περιορισμένος στο νεφρό

T1b: Όγκος >4 cm αλλά ≤ 7 cm στη μέγιστη διάσταση, περιορισμένος στο νεφρό

T2: Όγκος >7 cm στη μέγιστη διάσταση, περιορισμένος στο νεφρό

T2a: Όγκος >7 cm αλλά ≤ 10 cm στη μέγιστη διάσταση, περιορισμένος στο νεφρό

T2b: Όγκος >10 cm στη μέγιστη διάσταση, περιορισμένος στο νεφρό

T3: Όγκος επεκτείνεται στις μεγάλες φλέβες ή διηθεί περινεφρικούς ιστούς, αλλά όχι πέρα από τη νεφρική περιτονία

T3a: Όγκος επεκτείνεται μακροσκοπικά στη νεφρική φλέβα ή τους κλάδους της ή διηθεί το περινεφρικό λίπος ή το λίπος του νεφρικού κόλπου, αλλά όχι πέρα από τη νεφρική περιτονία

T3b: Όγκος επεκτείνεται μακροσκοπικά στην κάτω κοίλη φλέβα κάτω από το διάφραγμα

T3c: Όγκος επεκτείνεται μακροσκοπικά στην κάτω κοίλη φλέβα πάνω από το διάφραγμα ή διηθεί το τοίχωμα της κάτω κοίλης φλέβας

T4: Όγκος διηθεί πέρα από τη νεφρική περιτονία (συμπεριλαμβανομένης της εκτεταμένης διήθησης στο ομόπλευρο επινεφρίδιο)

Επιχώριοι Λεμφαδένες (N)

NX: Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν

N0: Δεν υπάρχει μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες

N1: Μετάσταση σε επιχώριο λεμφαδένα

Απομακρυσμένες Μεταστάσεις (M)

M0: Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

M1: Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

Στάδια

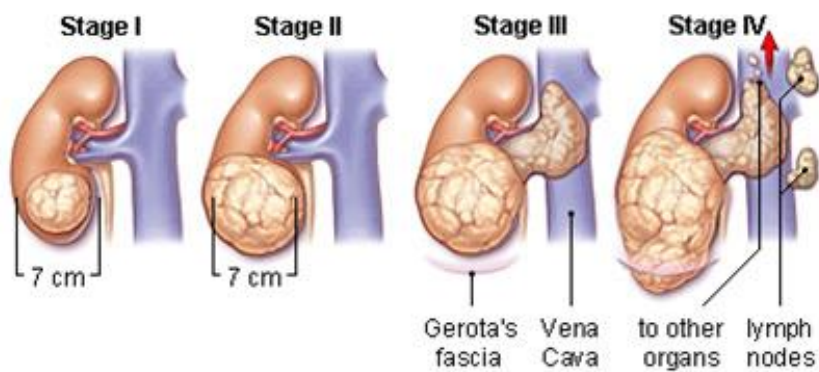
Στάδιο I: T1, N0, M0

Στάδιο II: T2, N0, M0

Στάδιο III: T1-T2, N1, M0 ή T3, N0-N1, M0

Στάδιο IV: T4, οποιοδήποτε N, M0 ή οποιοδήποτε T, οποιοδήποτε N, M1

Σημαντικές αλλαγές στην 8η έκδοση περιλαμβάνουν τη μετάταξη της διήθησης του ομόπλευρου επινεφριδίου από την κατηγορία T3a στην T4, αναγνωρίζοντας τη δυσμενή πρόγνωση αυτής της εύρεσης, και την αναδιάταξη της κατηγορίας T3a, συμπεριλαμβάνοντας τη διήθηση του λίπους του νεφρικού κόλπου μαζί με τη διήθηση του περινεφρικού λίπους.(32),(33),(34)



Εικόνα 13. Σταδιοποίηση του RCC. (30)

1.2.4.2 Βαθμός κακοήθειας (Grade)

Ο βαθμός κακοήθειας αποτελεί εκτίμηση της κακοήθειας και της επιθετικότητας του όγκου με βάση την εμφάνιση των καρκινικών κυττάρων στο μικροσκόπιο και τον αριθμό των κακοήθων χαρακτηριστικών που διαθέτουν. Η βαθμολόγηση, μαζί με τη σταδιοποίηση του όγκου, βοηθά τους ιατρούς στον σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών. Γενικά, οι όγκοι υψηλότερου βαθμού και σταδίου απαιτούν πιο επιθετική θεραπεία από τους όγκους χαμηλότερου βαθμού και σταδίου. (32)

Σύστημα Fuhrman

Το σύστημα βαθμολόγησης Fuhrman για το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα αποτελείται από τέσσερις βαθμούς βασισμένους στο μέγεθος/περίγραμμα του πυρήνα και την διακριτικότητα των πυρηνίσκων. Η έλλειψη σταθερότητας μεταξύ παρατηρητών (διαφορετικές ερμηνείες για τον καθένα), μαζί με την αμφισβητήσιμη προγνωστική σημασία, ώθησε τη Διεθνή Εταιρεία Ουρολογικής Παθολογίας (ISUP) να προτείνει ένα νέο σύστημα βαθμολόγησης.

Σύστημα WHO/ISUP

Έτσι σύστημα διαβάθμισης WHO/ISUP (International Society of Urological Pathology) έχει αντικαταστήσει το παραδοσιακό σύστημα Fuhrman για το διαυγοκυτταρικό και θηλώδες καρκίνωμα νεφρού. Αυτό το σύστημα βασίζεται κυρίως στην εμφάνιση των πυρηνίσκων και περιλαμβάνει τέσσερις βαθμούς:

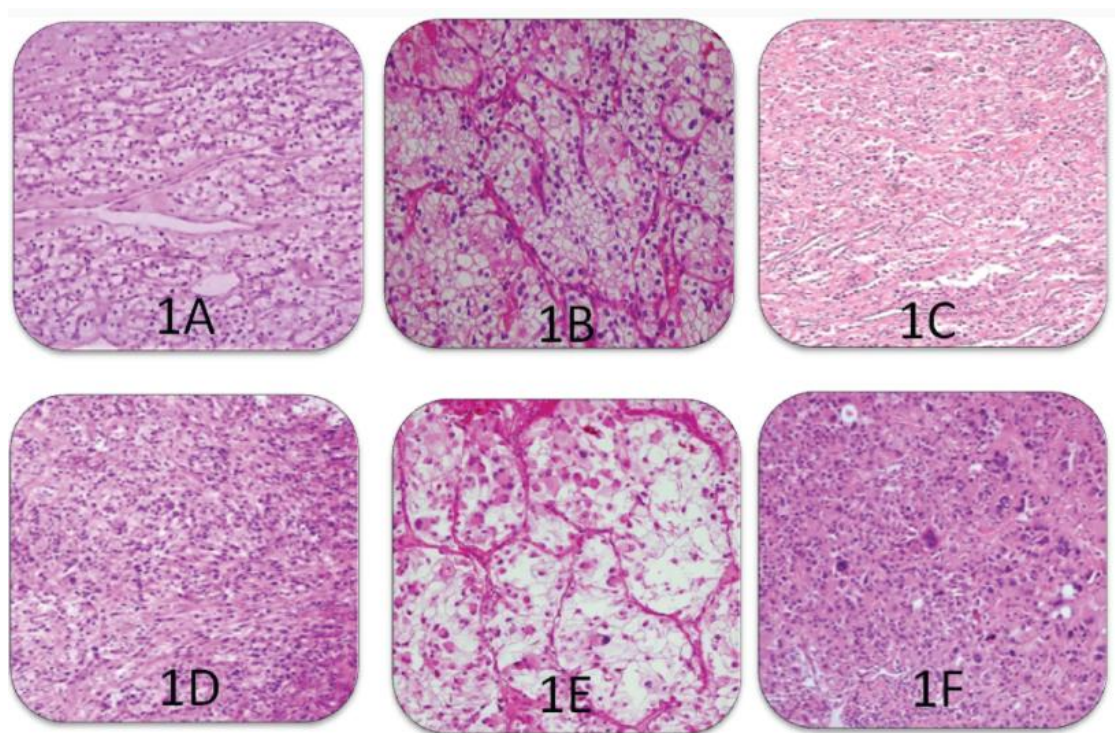
- Βαθμός 1: Πυρηνίσκοι απόντες ή αδιάκριτοι σε μεγέθυνση x400
- Βαθμός 2: Πυρηνίσκοι διακριτοί σε μεγέθυνση x400, αλλά αδιάκριτοι ή απόντες σε μεγέθυνση x100
- Βαθμός 3: Πυρηνίσκοι διακριτοί σε μεγέθυνση x100
- Βαθμός 4: Παρουσία σαρκωματοειδούς διαφοροποίησης, ραβδοειδών ή γιγαντοκυτταρικών χαρακτηριστικών, ή έντονης πυρηνικής πλειομορφίας, πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων ή μικροσκοπικής νέκρωσης.

Αυτό το σύστημα βαθμολόγησης επικυρώθηκε για το διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και το θηλώδες νεφροκυτταρικό καρκίνωμα ενώ η ISUP πρότείνει να μην βαθμολογείται το χρωμοφοβικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα σύμφωνα με αυτό το σύστημα αλλά με το σύστημα Fuhrman.

Grading system	Fuhrman (AJSP, 1982) (historic)		WHO / ISUP (2022) (current)	
	Nuclei (shape & size)	Nucleoli	Nuclei (shape & size)	Nucleoli
Grade 1	Small, round, uniform (10 μ m)	Absent / inconspicuous	-	Absent / inconspicuous at 400x
Grade 2	Larger (15 μ m)	Visible at 400x	-	Eosinophilic and visible at 400x
Grade 3	Larger, irregular (20 μ m)	Visible at 100x	-	Eosinophilic and prominent at 100x
Grade 4	Pleomorphic, bizarre, giant	Chromatin clumps	Pleomorphic, giant, rhabdoid, sarcomatoid	-

Εικόνα 14. Συγκριτικά οι διαφορές των δύο συστημάτων για το RCC.(35)

Ο υψηλότερος βαθμός σε έναν όγκο καθορίζει το συνολικό βαθμό. Η σαρκωματοειδής διαφοροποίηση, που μπορεί να εμφανιστεί σε οποιονδήποτε υπότυπο καρκίνου του νεφρού, συνδέεται με επιθετική συμπεριφορά και δυσμενή πρόγνωση.(34)(35)



Εικόνα 15. WHO/ISUP Grading σύστημα στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού (clear cell RCC).(1A) Grade 1 (H&E, x200),(1B) Grade 2 (H&E, x200),(1C) Grade 3 (H&E, x100),(1D) Grade 4, σαρκωματοειδής διαφοροποίηση (H&E, x200),(1E) Grade 4, ραβδοειδής διαφοροποίηση (H&E, x200),(1F) Grade 4, γιγαντοκυτταρική μορφολογία (H&E, x200).(31)

1.2.4.3 Προγνωστικά Μοντέλα

Η ανάγκη για πιο αξιόπιστη προγνωστική εκτίμηση πέρα από το στάδιο TNM και το ιστολογικό grade οδήγησε στην ανάπτυξη πολυπαραγοντικών προγνωστικών μοντέλων, τα οποία συνδυάζουν προγνωστικούς δείκτες για την καλύτερη εκτίμηση της κλινικής πορείας των ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC).

Τα πρώτα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν σε RCC, όπως το UISS (University of California Integrated Staging System), συνδυάζαν απλούς δείκτες όπως το στάδιο TNM, το πυρηνικό grade και την γενική κατάσταση του ασθενούς (ECOG PS). Ωστόσο, πιο εξελιγμένα μοντέλα όπως το Leibovich score (2003) ειδικά για το διαυγοκυτταρικό RCC (clear cell RCC), προσφέρουν σημαντικά αυξημένη διακριτική ικανότητα, ενσωματώνοντας επιπλέον χαρακτηριστικά όπως η παρουσία όγκου νέκρωσης και το μέγεθος του όγκου. Για τον θηλώδη τύπο RCC (papillary RCC), έχει αναπτυχθεί το εξειδικευμένο VENUSS μοντέλο, το οποίο έχει εξωτερικά επικυρωθεί και θεωρείται σήμερα το πλέον αξιόπιστο εργαλείο προγνωστικής εκτίμησης για αυτόν τον υπότυπο.

Πιο πρόσφατα, το Leibovich 2018 μοντέλο επεκτάθηκε ώστε να καλύπτει πέρα από το διαυγοκυτταρικό και άλλους υποτύπους RCC, όπως το χρωμόφοβο (chromophobe RCC) και τον θηλώδη RCC, ενσωματώνοντας πληθώρα παραμέτρων όπως η σαρκωματοειδής διαφοροποίηση, η διήθηση του περινεφρικού λίπους, η ηλικία και η παρουσία θρόμβων.

Σε περιπτώσεις μεταστατικού RCC (mRCC), τα μοντέλα MSKCC και IMDC αποτελούν τα κύρια προγνωστικά μέσα. Το IMDC μοντέλο αξιολογεί έξι δείκτες, περιλαμβάνοντας αιματολογικές και μεταβολικές παραμέτρους, και έχει αποδειχθεί πιο αξιόπιστο στην εκτίμηση της πρόγνωσης και στην καθοδήγηση θεραπευτικών επιλογών σε ασθενείς με mRCC. (34),(36)

1.2.5 Θεραπεία

Η επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του σταδίου της νόσου, του ιστολογικού υποτύπου, των προγνωστικών παραγόντων και της γενικής κατάστασης του ασθενούς. Το κύριο θεραπευτικό μέσο για τον τοπικά εντοπισμένο RCC είναι η χειρουργική επέμβαση και η μερική ή η ριζική νεφρεκτομή.

Η μερική νεφρεκτομή περιλαμβάνει την τοπική εξαίρεση του όγκου με περιβάλλοντα υγιή νεφρικό ιστό, διατηρώντας το υπόλοιπο νεφρικό παρέγχυμα. Ενδείκνυται για μικρού μεγέθους όγκους (≤ 7 cm), ιδιαίτερα εκείνους σε ευνοϊκή θέση, σε ασθενείς με μονήρη νεφρό, αμφοτερόπλευρους όγκους ή προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία.

Η ριζική νεφρεκτομή περιλαμβάνει την αφαίρεση ολόκληρου του νεφρού μαζί με την περιβάλλουσα νεφρική περιτονία, και σε ορισμένες περιπτώσεις, του ομόπλευρου επινεφριδίου και των επιχώριων λεμφαδένων. Ενδείκνυται για μεγάλου μεγέθους όγκους (> 7 cm), με πολύπλοκη ανατομία, που διηθούν το νεφρικό κόλπο ή τα αγγεία, ή σε περιπτώσεις που η μερική νεφρεκτομή δεν είναι εφικτή.

1.2.5.1 Εναλλακτικές Θεραπείες σε Επιλεγμένους Ασθενείς

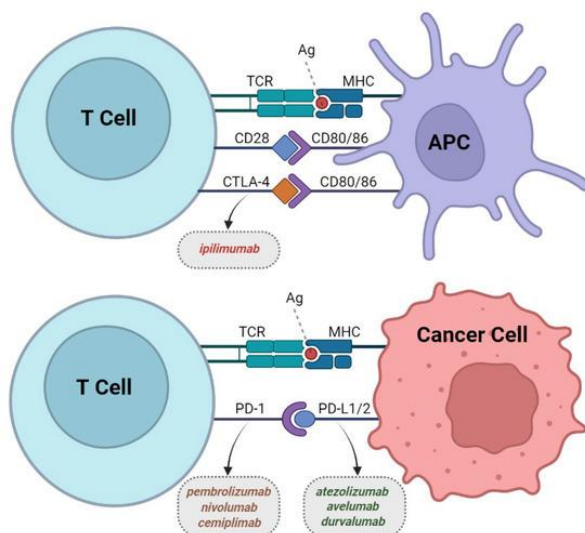
Σε ηλικιωμένα άτομα ή ασθενείς με πολλές συνοδές παθήσεις και μικρούς όγκους (<4 cm), η ενεργός παρακολούθηση (active surveillance, AS) αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή, με συχνές απεικονιστικές εξετάσεις (CT ή MRI) σε καθορισμένα διαστήματα. Η AS έχει αποδειχθεί ασφαλής σε T1a καρκίνους.

Για ασθενείς που δεν επιθυμούν ή δεν μπορούν να υποβληθούν σε επέμβαση, υπάρχουν επιλογές θεραπειών κυτταρικής καταστροφής (ablative therapies), όπως είναι η κρυοκαυτηρίαση και οι ραδιοσυχνότητες (RFA), οι οποίες προσφέρουν παραπλήσια αποτελέσματα σε μικρούς όγκους (T1a), με την προϋπόθεση της επαρκούς παρακολούθησης για τον έλεγχο της υπολειπόμενης νόσου με τοπική απεικόνιση (38, 39, 40).

1.2.5.2 Συστηματική Θεραπεία για Προχωρημένη/Μεταστατική Νόσο

Η θεραπευτική προσέγγιση του μεταστατικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος (mRCC) έχει υποστεί ριζικές αναθεωρήσεις τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της ενσωμάτωσης των ανοσοθεραπευτικών παραγόντων και των συνδυαστικών σχημάτων που στοχεύουν στο ανοσοποιητικό σύστημα και στους αγγειογενετικούς μηχανισμούς. Η κλασική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία έχει πρακτικά καταργηθεί, καθώς το RCC είναι ανθεκτικό σε αυτή και έχει αντικατασταθεί από πιο στοχευμένες και αποτελεσματικές θεραπείες.

Η βάση των προαναφερόμενων θεραπειών στηρίζεται 1) στην χρήση δραστικών ουσιών που μπλοκάρουν σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (Immune Checkpoint Inhibitors-ICI), όπως το nivolumab (anti-PD-1) και το ipilimumab (anti-CTLA-4) και επιδιώκουν την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων 2) στους αναστολείς κινάσης τυροσίνης (Tyrosine Kinase Inhibitors-TKIs) όπως τα axitinib, cabozantinib, lenvatinib, τα οποία είναι μικρά μόρια αναστολείς που στοχεύουν στον υποδοχέα του VEGF και άλλους αυξητικούς υποδοχείς, με στόχο την αναστολή της αγγειογένεσης.



Εικόνα 15. Παράδειγμα ανοσοθεραπευτικών αναστολέων σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors). Το μόριο CTLA-4 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86) στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), ασκώντας ανασταλτική δράση στα Τ-λεμφοκύτταρα. Ομοίως, η αλληλεπίδραση του PD-1 με τους υποδοχείς PD-L1/PD-L2 στα καρκινικά κύτταρα συμβάλλει στην εξασθένηση της ανοσολογικής απόκρισης. Οι αναστολείς αυτών των μονοπατιών (anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1) έχουν εγκριθεί για την ενίσχυση της ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων και την καταστολή της ανοσοδιαφυγής του όγκου.(41)

1.2.5.2.1 Πρώτης γραμμής θεραπεία

Σήμερα η πρώτη γραμμή θεραπείας περιλαμβάνει τρεις βασικές προσεγγίσεις:

-Διπλή ανοσοθεραπεία immune checkpoint inhibitors (ICI+ICI): Ο συνδυασμός ipilimumab + nivolumab (αναστολείς CTLA-4 και PD-1) έχει εγκριθεί σε ασθενείς μέσου και υψηλού κινδύνου και έχει δείξει σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης (OS) σε σχέση με τη sunitinib. Σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου, το ipilimumab/nivolumab προσφέρει παρόμοιο αποτέλεσμα επιβίωσης με μονοθεραπεία sunitinib, αλλά μπορεί να επιτύχει μεγαλύτερη διάρκεια ανταπόκρισης.

-Ανοσοθεραπεία + tyrosine kinase inhibitors (ICI+TKI): Οι συνδυασμοί pembrolizumab + axitinib, nivolumab + cabozantinib και lenvatinib + pembrolizumab περιλαμβάνουν ανοσοθεραπεία (αναστολέας PD-1) σε συνδυασμό με αναστολέα κινασών VEGF. Τα παραπάνω έχουν υψηλά ποσοστά συνολικής ανταπόκρισης και σημαντική παράταση του χρόνου μέχρι την εξέλιξη της νόσου (PFS), ωστόσο απαιτούν συνεχή χορήγηση του TKI και συχνά συνεπάγονται παρενέργειες σχετικές με τη στόχευση του VEGF (π.χ. υπέρταση, διάρροια, παρενέργειες στο δέρμα).

-Μονοθεραπεία με TKI: Ιστορικά, η μονοθεραπεία με αναστολέα κινασών (π.χ. sunitinib) ήταν η καθιερωμένη επιλογή πρώτης γραμμής μέχρι το 2018. Σήμερα η χρήση της περιορίζεται σε ασθενείς με πολύ ευνοϊκή πρόγνωση. Η μονοθεραπεία με TKI τυπικά χαρακτηρίζεται από γρήγορη μείωση του όγκου αλλά πιο σύντομη διάρκεια ανταπόκρισης σε σύγκριση με τους συνδυασμούς ανοσοθεραπείας.

1.2.5.2.2 Θεραπευτικές επιλογές δεύτερης και τρίτης γραμμής

Η δεύτερη και τρίτη γραμμή θεραπείας εξαρτώνται κυρίως από το είδος της θεραπείας πρώτης γραμμής που έλαβε ο ασθενής. Σε ασθενείς που έλαβαν αναστολείς σημείων ελέγχου (είτε διπλό ICI είτε ICI+TKI), η συνήθης δεύτερη γραμμή θεραπείας περιλαμβάνει αναστολείς κινάσης VEGF. Χρησιμοποιούνται συνήθως τα cabozantinib ή axitinib ως μονοθεραπεία.

Ο συνδυασμός των προαναφερόμενων θεραπευτικών επιλογών έχει βελτιώσει σημαντικά τη συνολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του νεφρού (RCC). Η κατανόηση της βιολογίας και της ανοσολογίας του καρκίνου έχει συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών και είναι πολλά υποσχόμενη για το μέλλον (18, 20, 37).

2.Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί DNA και νεφροκυτταρικός καρκίνος

2.1. Γενετικές παραλλαγές και Καρκινογένεση

Ένας γενετικός τύπος ορίζεται ως οποιαδήποτε θέση στο γονιδίωμα με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές συντεταγμένες ανεξάρτητα από την βιολογική του λειτουργία. Ένας τύπος με δύο ή περισσότερα αλληλόμορφα που το καθένα είναι παρόν σε πάνω από 1% των μελών ενός είδους θεωρείται πολυμορφικός και τα αλληλόμορφα του καλούνται γενετικές παραλλαγές (43). Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP) αποτελούν τη συχνότερη μορφή γενετικών παραλλαγών. Πρόκειται ουσιαστικά για αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου (π.χ. A → G). Μπορεί να είναι σιωπηλοί, να αλλάζουν το αμινοξύ ή να επηρεάζουν την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Επιπρόσθετα, συναντάμε κι άλλα είδη γενετικών παραλλαγών, με βάση το μέγεθος και την πολυπλοκότητα, όπως είναι τα DIPs ή Indels που περιλαμβάνουν την ένθεση ή απαλοιφή μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων. Τα SSRs (Simple Sequence Repeats) αποτελούν επίσης επαναλήψεις μικρού μήκους νουκλεοτιδικών μοτίβων δύο ή τριών βάσεων (43).

Οι γενετικές παραλλαγές, είτε πρόκειται για SNPs είτε για DIPs ή SSRs, μπορούν να επηρεάσουν κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες, όπως τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, την ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και την απόδοση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, αυξάνοντας τον κίνδυνο για καρκινογένεση.

2.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA

Τα ζώντα κύτταρα προϋποθέτουν την σωστή λειτουργία χιλιάδων γονιδίων τα οποία είναι εκτεθειμένα σε βλάβες μέσω των μεταλλάξεων. Για την διαιώνιση του γενετικού υλικού οι οργανισμοί πρέπει να διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα το ποσοστό των μεταλλάξεων ώστε οι αλληλουχίες του DNA να μεταβιβάζονται σε μεγάλο βαθμό αναλλοίωτες. Ταυτόχρονα εάν υπήρχε απόλυτη πιστότητα δεν

θα είχαμε γενετική ποικιλοότητα και άρα εξέλιξη νέων ειδών συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Συνεπώς μια ισορροπία μεταξύ μεταλλάξεων και επιδιόρθωσης αυτών είναι αυτό που κρατά σε αρμονία την ζωή και την βιοποικιλοότητα.(42) Καθημερινά, το γενετικό υλικό υφίσταται πολυάριθμες βλάβες, είτε λόγω ενδογενών παραγόντων, όπως το οξειδωτικό στρες και τα σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA, είτε λόγω εξωγενών, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), οι ακτίνες X και οι χημικές καρκινογόνες ενώσεις. Για να αντιμετωπιστούν αυτές οι βλάβες, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους και πολύπλοκους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA, καθένας από τους οποίους αναγνωρίζει και αποκαθιστά συγκεκριμένους τύπους βλάβης.

Οι βασικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA περιλαμβάνουν: την επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair – BER), η οποία αποκαθιστά μικρές αλλοιώσεις όπως οξειδωμένες ή αλκυλιωμένες βάσεις μέσω ειδικών DNA γλυκοζυλασών, την επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair – NER), υπεύθυνη για την απομάκρυνση σημαντικών δομικών παραμορφώσεων, όπως τα διμερή πυριμιδινών που προκαλούνται από υπεριώδη ακτινοβολία, την επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών (Mismatch Repair – MMR), η οποία διορθώνει αταίριαστες βάσεις που προκύπτουν κατά την αντιγραφή του DNA, τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination – HR), έναν ακριβή μηχανισμό επιδιόρθωσης διπλών ρηγμάτων με χρήση ομόλογου προτύπου, και τη σύνδεση μη ομόλογων άκρων (Non-Homologous End Joining – NHEJ), έναν ταχύτερο αλλά λιγότερο πιστό μηχανισμό επιδιόρθωσης διπλών ρηγμάτων που δεν απαιτεί ομόλογη αλληλουχία.(45) Ο συνδυασμός των παραπάνω συστημάτων διασφαλίζει τη σταθερότητα του γονιδιώματος και λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της καρκινογένεσης.

2.3 Μονοπάτι επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων (NER)

Στην παρούσα εργασία, τα γονίδια που μελετήθηκαν (XPC, XPD) κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ρόλο στην αναγνώριση και επιδιόρθωση βλαβών του DNA μέσω του μηχανισμού NER και για αυτό τον λόγο θα αναλυθεί το συγκεκριμένο μονοπάτι. Αρχικά στο συγκεκριμένο σύστημα τα ένζυμα δεν αναγνωρίζουν κάποια συγκεκριμένη βλάβη αλλά ογκώδεις βλάβες και παραμορφώσεις στο σχήμα της διπλής έλικας. Τέτοιες αλλοιώσεις είναι τα διμερή θυμίνης και οι προσθήκες μεγάλων χημικών ενώσεων σε μια βάση. Τα κύρια χαρακτηριστικά αυτής της οδού επιδιόρθωσης είναι ο εντοπισμός της βλάβης στην μία μόνο αλυσίδα DNA, η αφαίρεση ενός μικρού μονόκλωνου τμήματος (24-32 νουκλεοτίδια) που περιλαμβάνει την βλάβη και τέλος συμπλήρωση του κενού που δημιουργείται από την DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την ανέπαφη συμπληρωματική αλυσίδα.(42),(46)

Το σύστημα επιδιόρθωσης NER, περιλαμβάνει πάνω από 20 πρωτεΐνες στο σημείο εκτομής και διαχωρίζεται σε 2 υπομονοπάτια ανάλογα με τον μηχανισμό αναγνώρισης της βλάβης DNA. Το μονοπάτι του καθολικού γονιδιώματος (Global Genome-GG-NER) ελέγχει ολόκληρο το γονιδίωμα για βλάβες στην δομή της έλικας, ενώ το μονοπάτι συζευγμένο με τη

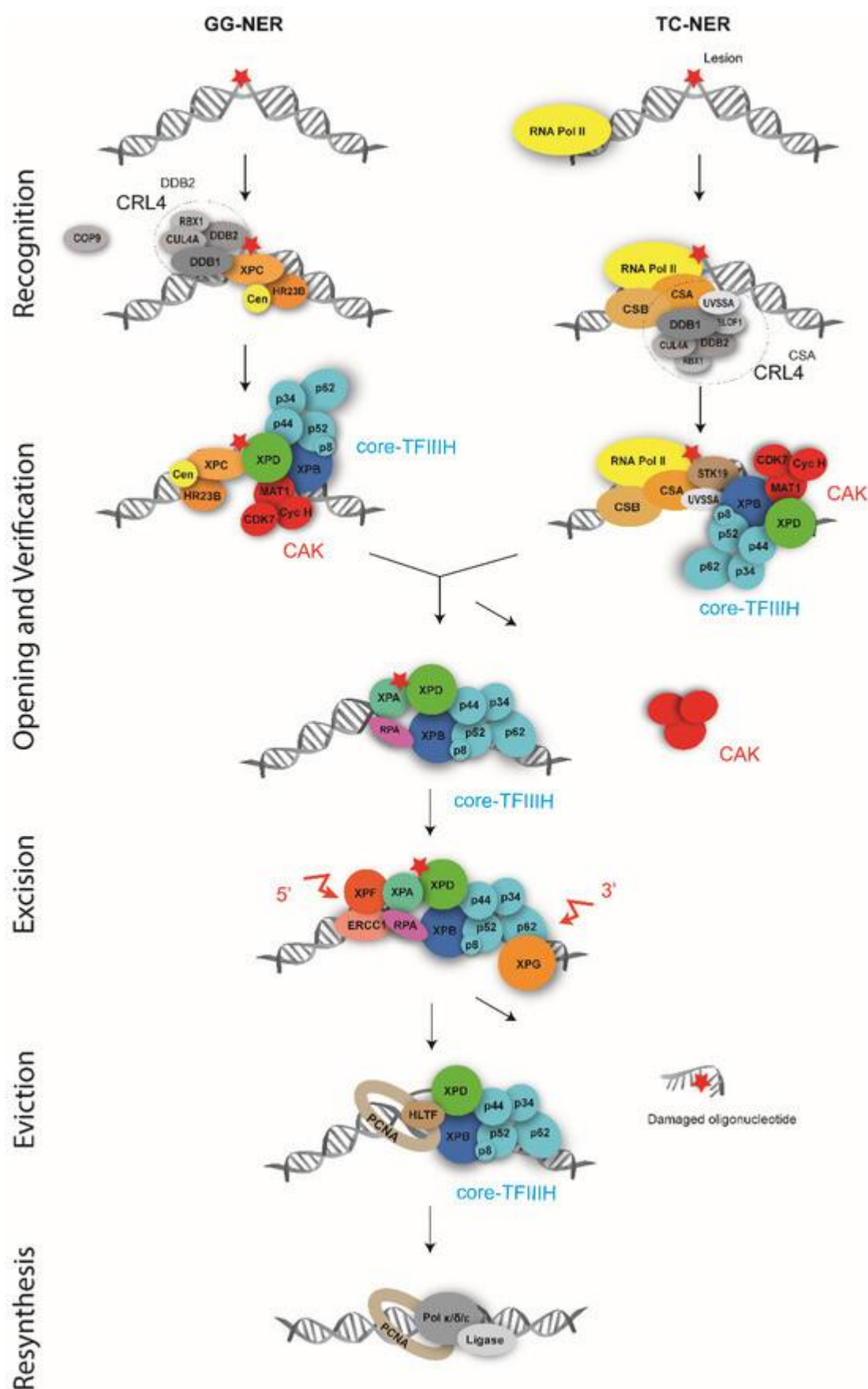
μεταγραφή(Transcription-Coupled-TC-NER) εστιάζει τα επιδιορθωτικά ένζυμα στο DNA(και άρα γονίδια) που είναι ενεργώς μεταγραφόμενο.(47)

Στο GG-NER, η αναγνώριση της βλάβης γίνεται αρχικά από το σύμπλοκο XPC-HR23B-Centrin 2, το οποίο εντοπίζει τοπικές διαταραχές στη διπλή έλικα του DNA. Ωστόσο, κάποιες βλάβες, όπως τα CPDs,δηλαδή χαρακτηριστικές βλάβες DNA που προκαλεί η UV μέσω σχηματισμού κυκλοβουτανίων διμερών πυριμιδινών,δεν προκαλούν έντονη παραμόρφωση της έλικας και επομένως απαιτούν πρώτα την δράση του συμπλόκου CRL4^{DDB2} (που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες CUL4A, RBX1, DDB1 και DDB2), το οποίο προσδένεται στα σημεία της βλάβης, προσελκύοντας και ενεργοποιώντας το XPC. Το CRL4^{DDB2} δρα ως E3-ουβικουιτίνη λιγάση, διευκολύνοντας την αποδιάταξη της χρωματίνης μέσω ουβικουιτίνωσης ιστονών και της ίδιας της DDB2.

Στο TC-NER, το σύστημα ενεργοποιείται όταν η RNA πολυμεράση II (Pol II) σταματά και παγιδεύεται λόγω βλάβης στο μεταγραφόμενο DNA. Αυτό οδηγεί στην πρόσληψη των πρωτεϊνών CSA και CSB, καθώς και του συμπλόκου CRL4^{CSA} με δράση E3- λιγάσης ουβικουιτίνης, οι οποίες διευκολύνουν τη σταθεροποίηση και απομάκρυνση του μεταγραφικού συμπλόκου.

Και τα δύο μονοπάτια καταλήγουν στη στρατολόγηση του βασικού μεταγραφικού συμπλόκου TFIIH, το οποίο περιλαμβάνει δύο σημαντικές πρωτεΐνες με ενεργότητα ATPασης και ελικάσης, την XPB (ERCC3) και XPD (ERCC2). Ταυτόχρονα με την απομάκρυνση του συμπλόκου CAK (CDK-activating kinase) στρατολογείται η XPA πρωτεΐνη (Xeroderma Pigmentosum group A protein) που επιβεβαιώνει την βλάβη και αφότου απομακρυνθεί το σύμπλοκο CAK από τον TFIIH ,δρουν οι XPB και XPD ξετυλίγοντας μια περιοχή 25-34 νουκλεοτιδίων.Έπειτα η πρωτεΐνη RPA(Replication Protein A-αποτελούμενη από τις RPA14, RPA32, and RPA70) προστατεύει το μονόκλωνο DNA,σταθεροποιεί το σύμπλοκο εκτομής και τους παράγοντες του NER.

Μετά την αναγνώριση και επιβεβαίωση της βλάβης δρουν οι ενδονουκλεάσες XPG και XPF-ERCC1, οι οποίες κόβουν το DNA στην 3' πλευρά και 5' πλευρά της βλάβης αντίστοιχα. Η αποκοπή απομακρύνει ένα ολιγονουκλεοτιδικό τμήμα 24–32 νουκλεοτιδίων που περιέχει τη βλάβη. Η κενή περιοχή επιδιορθώνεται από DNA πολυμεράσες, όπως η Pol δ/ε/κ, ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ η τελική σύνδεση επιτυγχάνεται με τη δράση της DNA λιγάσης I ή III.(42),(47)



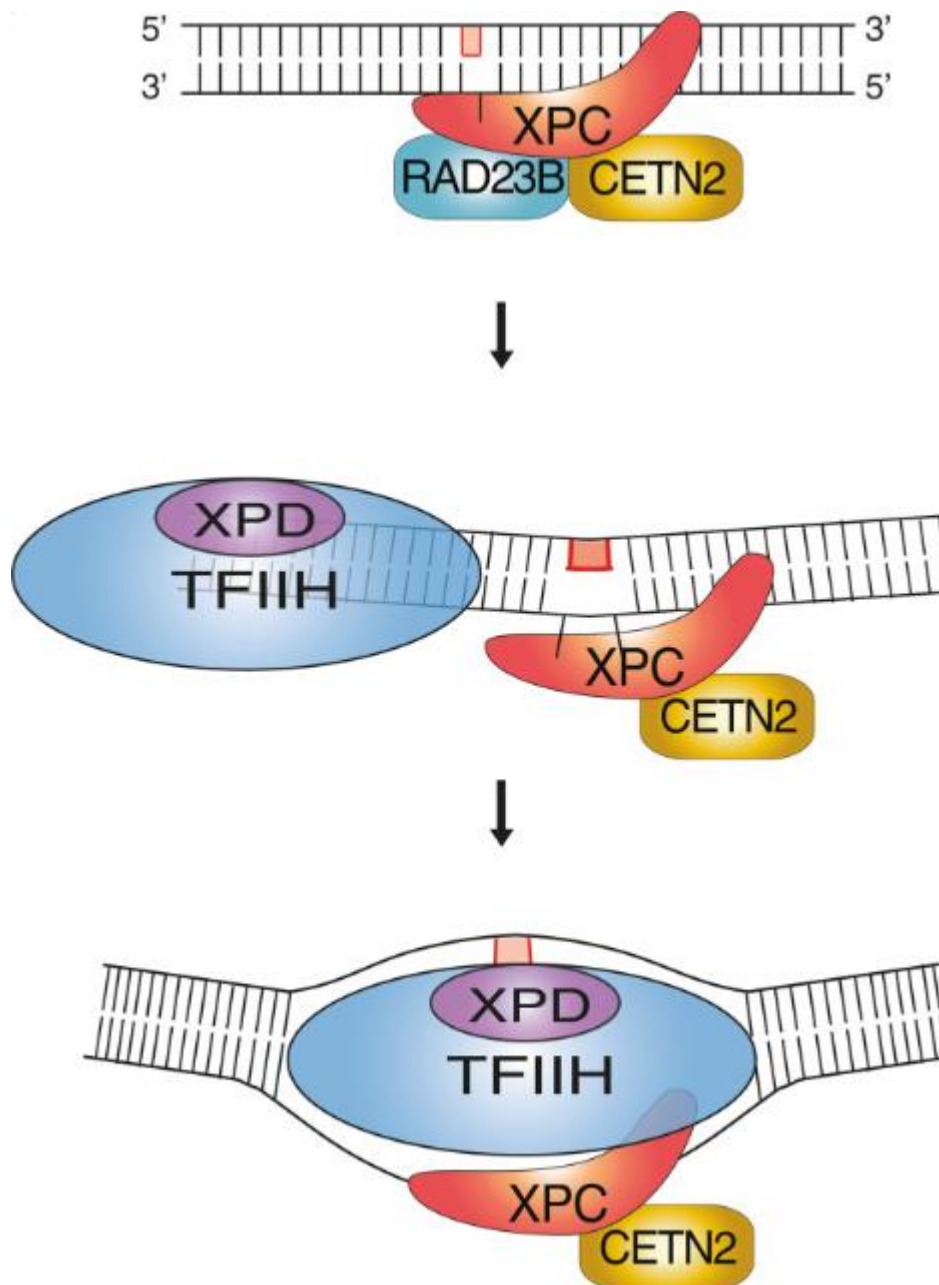
Εικόνα 16. Το μονοπάτι επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων (NER) μαζί με τις υποκατηγορίες του (GG-NER) και (TC-NER). Με κόκκινους αστερίσκους απεικονίζονται οι βλάβες του DNA, και με κόκκινα βέλη τα σημεία των τομών από τις XPF-ERCC1 και XPG. (Figure 2 -Zachayus et al., 2025)(47)

2.3.1 Το γονίδιο XPC και ο λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης

Το γονίδιο XPC (Xeroderma Pigmentosum group C) εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 (3p25.1) και μήκος περίπου 33 kb (44). Ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων Xeroderma Pigmentosum (XP-A έως XP-G), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διαμεσολάβηση του μηχανισμού NER και σχετίζονται με το ομώνυμο σύνδρομο όταν φέρουν μεταλλάξεις. Αποτελείται από 16 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 940 αμινοξέων, η οποία λειτουργεί ως αισθητήρας βλαβών στο GG-NER μονοπάτι επιδιόρθωσης εκτομής βλαβών. Η πρωτεΐνη XPC εντοπίζει τις βλάβες μέσω της διαταραχής της διπλής έλικας που προκαλούν τοπική αποσταθεροποίηση στο δίκλωνο DNA. Η αναγνώριση της βλάβης από την XPC πρωτεΐνης συνοδεύεται από την ταχύτατη επιστράτευση των υπολοίπων μελών του μηχανισμού επιδιόρθωσης NER. Πιο συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με τον TFIIH και συμβάλλει στην πρόσδεση της ελικάσης XPD στο σημείο. Το σύμπλοκο XPC-RAD23B-CETN2 λειτουργεί ως πλατφόρμα που σηματοδοτεί τον εντοπισμό της βλάβης και πάνω σε αυτή προσδένεται το σύνολο των υπολοίπων ενζύμων που θα δράσουν (44).

Το XPC γονίδιο συνεργάζεται επίσης και με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο E2F1 και προσελκύει συμπλέγματα που ρυθμίζουν τη μεταγραφή (48).

Η μη λειτουργική XPC πρωτεΐνη δε δύναται να αναγνωρίσει τις διάχυτες βλάβες στην αλληλουχία του DNA. Επιπρόσθετα, η παρουσία φυσικών πολυμορφισμών στο XPC γονίδιο μπορεί να επηρεάσει, σε μικρότερο βέβαια βαθμό, την απόδοση αυτού του “αισθητήρα βλαβών”, οδηγώντας σε μικρές διαφορές στην επιδιόρθωση που ενδέχεται να επηρεάσουν τον κίνδυνο της καρκινογένεσης ή την απόκριση σε θεραπείες με φάρμακα που προκαλούν βλάβες στο DNA (44).



Εικόνα 17. Ο εντοπισμός βλάβης στο GG-NER μονοπάτι μέσω της πρωτεΐνης XPC και η αλληλεπίδραση με τον TFIIH για την πρόσδεση της XPD στο σημείο. (44)

2.3.2 Πολυμορφισμοί στο γονίδιο XPC και νεφροκυτταρικός καρκίνος

Οι πολυμορφισμοί ένθεσης/απαλοιφής (DIPs ή Indels) είναι γενετικές παραλλαγές που προκύπτουν από την εισαγωγή ή διαγραφή λίγων βάσεων DNA (συνήθως μήκους 1–50 ζεύγη βάσεων). Αποτελούν το δεύτερο συχνότερο είδος πολυμορφισμού στο ανθρώπινο γονιδίωμα μετά τα SNPs (43). Οι πολυμορφισμοί DIPs ενδέχεται να έχουν μεγαλύτερη λειτουργική επίπτωση συγκριτικά με τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, καθώς μπορεί να προκαλέσουν την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και να οδηγήσει σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης. Η παρουσία τους ακόμη και σε μη-

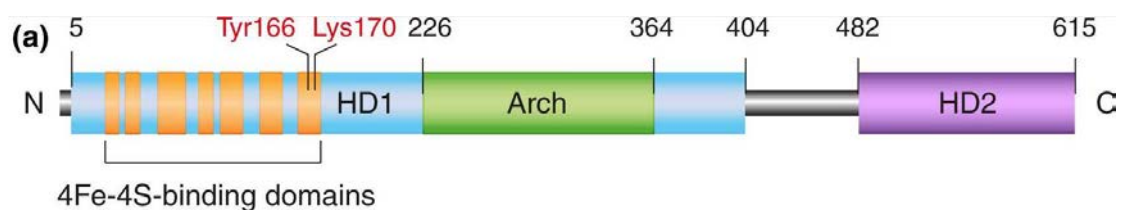
κωδικοποιητικές περιοχές, μπορεί να επηρεάσει κρίσιμα στοιχεία σχετικά με τη ρύθμιση του γονιδίου, όπως διαταραχή του ματίσματος (splicing) των εξωνίων ή μεταβολή της σταθερότητας και της μετάφρασης του mRNA. Επομένως, οι DIPs μπορούν να συμβάλλουν στη γενετική προδιάθεση για νόσους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου.

Ένας από τους πιο μελετημένους πολυμορφισμούς ένθεσης/απαλοιφής στο XPC γονίδιο είναι ο λεγόμενος XPC-PAT. Πρόκειται για μία μετάλλαξη στο ιντρόνιο 9 του γονιδίου, όπου παρατηρείται ένθεση μίας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας μήκους περίπου 83 βάσεων που αποτελείται από επαναλήψεις αδερίνης/θυμίνης (πολυ(AT)) σε συνδυασμό με την απαλοιφή 5 βάσεων (GTAAC)(49). Το αλληλόμορφο που φέρει την ένθεση/απαλοιφή σημειώνεται ως PAT+ (παρουσία του επιπρόσθετου τμήματος), ενώ το φυσιολογικό αλληλόμορφο χωρίς την ένθεση αναφέρεται ως PAT-. Ο πολυμορφισμός XPC-PAT έχει συσχετιστεί στενά (σε επίπεδο σύνδεσης ανισορροπίας) με το SNP Lys939Gln, υποδηλώνοντας ότι τα PAT+ και Lys939Gln τείνουν να κληρονομούνται μαζί επηρεάζοντας ενδεχομένως τη δράση του μηχανισμού επιδιόρθωσης NER (49).

Ωστόσο, έως σήμερα, όσον αφορά τον καρκίνο του νεφρού, καμία από τις μικρής έκτασης μελέτες δεν έχει αναδείξει κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του XPC-PAT πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του νεφρού. Συγκεκριμένα σε αναλύσεις που αφορούσαν πολλά διαφορετικά είδη καρκίνων, ο πολυμορφισμός PAT δεν φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας, αλλά τα δεδομένα για τον καρκίνο του νεφρού είναι ελάχιστα (50). Αντιθέτως, σε άλλους καρκίνους έχουν παρατηρηθεί μικρές αλλά υπαρκτές επιδράσεις του XPC-PAT πολυμορφισμού. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μετα-ανάλυση του καρκίνου του πνεύμονα βρέθηκε ότι οι ομόζυγοι φορείς του PAT- φυσιολογικού γονότυπου είχαν σημαντικά μειωμένο κίνδυνο σε σύγκριση με τους φορείς του πολυμορφισμού PAT+ σε Καυκάσιους πληθυσμούς (51). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ένθεση των νουκλεοτιδίων αυξάνει ελαφρώς την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Παρόμοιες ενδείξεις έχουν αναφερθεί και για άλλες μορφές καρκίνου (π.χ. κεφαλής και τραχήλου) σε συγκεκριμένες ομάδες, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι ομοιογενή (50).

2.3.3 Το γονίδιο XPD και ο λειτουργικός ρόλος

Το γονίδιο XPD (γνωστό και ως ERCC2) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 (περιοχή 19q13.3) και έχει μήκος περίπου 54 kb DNA. Αποτελείται από 23 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 760 αμινοξέων.(52). Η XPD πρωτεΐνη είναι μια ATP-εξαρτώμενη 5'→3' ελικάση DNA, μέλος της υπερικογένειας II (SF2) και αποτελεί υπομονάδα-κλειδί του μεταγραφικού συμπλόκου TFIIH. Δομικά, η XPD διαθέτει δύο κύριους "πυρήνες" τύπου RecA (domain HD1 και HD2) που συνιστούν τον κινητήριο ATPάση/ελικάση μηχανισμό της, καθώς και δύο επιπρόσθετους δομικούς τομείς. Ο ένας είναι ο τομέας FeS, ο οποίος περιέχει ένα συμπύρηννα 4Fe-4S (σύμπλοκο σιδήρου-θείου), και ο άλλος ο "Arch" που σχηματίζει μια χαρακτηριστική προεξοχή-θηλιά πάνω από την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Οι τέσσερις αυτοί τομείς (HD1, HD2, 4FeS, Arch) συνεργάζονται για να δημιουργήσουν μια δομή σαν δακτύλιο, μέσω του οποίου περνάει το μονόκλωνο DNA καθώς η XPD το ξετυλίγει (47)



Εικόνα 18. Τα τέσσερα domains της XPD πρωτεΐνης με δράση ATPάσης/ελικάσης(44)

Η XPD πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος ~76 kDa και αποτελεί απαραίτητο συνδότη του TFIIH, ο οποίος συμμετέχει τόσο στην NER διδαδικασία όσο και στην κλασική μεταγραφή. Στο πλαίσιο της οδού NER, η κύρια λειτουργία της XPD είναι να δρα ως 5'→3' ελικάση που ανοίγει το DNA γύρω από τη βλάβη, σε συνεργασία με την XPB (3'→5' ελικάση). Μόλις το σύμπλεγμα XPC στρατολογήσει τον TFIIH παράγοντα πάνω στη βλάβη, η XPD ενεργοποιείται να “σαρώσει” την κατεστραμμένη αλυσίδα με κατεύθυνση από 5' προς 3' άκρο, και ξετυλίγει μία έκταση μήκους περίπου 20–30 νουκλεοτίδια. Η XPD φαίνεται να παίζει ρόλο στην ταυτοποίηση της βλάβης καθώς προχωρά κατά μήκος της αλυσίδας και ακινητοποιείται όταν συναντήσει τη θέση της βλάβης σηματοδοτώντας το ακριβές σημείο που θα πρέπει να γίνει η επιδιόρθωση. Ο μηχανισμός αυτός διασφαλίζει ότι η εκτομή που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των XPF και XPG ενζύμων θα πραγματοποιηθεί στις σωστές θέσεις εκατέρωθεν της βλάβης.

Επιπρόσθετα, η XPD συμμετέχει και στην συζευγμένη με τη μεταγραφή επιδιόρθωση (TC-NER). Όταν η RNA πολυμεράση II ακινητοποιείται από μια βλάβη στο εκμαγείο DNA, η XPD βοηθά στην τοπική απομάκρυνση της πολυμεράσης (μέσω ξετυλίσματος της γύρω περιοχής) και επιτρέπει την επιδιόρθωση της βλάβης στην μεταγραφόμενη αλυσίδα (44, 47).

Ο σημαντικός ρόλος που κατέχει η XPD πρωτεΐνη φαίνεται και από τα διάφορα σύνδρομα που σχετίζονται με κληρονομήσιμες μεταλλάξεις του γονιδίου που την κωδικοποιεί. Το σύνδρομο Xeroderma Pigmentosum (XP-D), συνδέεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ενώ τα σύνδρομα Cockayne ή τριχοθειοδυστροφίας (Trichothiodystrophy, TTD) με σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα και όχι καρκινογένεση. Η ερμηνεία είναι ότι διαφορετικές μεταλλάξεις επηρεάζουν διαφορετικές λειτουργίες της XPD πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις που εξαλείφουν εντελώς την ελικάση οδηγούν σε XP/CS σύνδρομο, ενώ οι μεταλλάξεις που αποσταθεροποιούν την αλληλεπίδραση με το υποσύμπλεγμα CAK του TFIIH διαταράσσουν τη μεταγραφή και προκαλούν το TTD σύνδρομο που δεν συνδέεται με την καρκινογένεση (52).

2.3.4 Πολυμορφισμοί στο γονίδιο XPD και νεφροκυτταρικός καρκίνος

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που εντοπίζονται στα εξώνια του XPD γονιδίου ενδέχεται να επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Δύο

αρκετά μελετημένοι πολυμορφισμοί στο *XPB* γονίδιο είναι ο Asp312Asn (G>A νουκλεοτιδική αντικατάσταση στη θέση 312, εξώνιο 10) και ο Lys751Gln (A>C νουκλεοτιδική αντικατάσταση στη θέση 751, εξώνιο 23)(53). Οι συγκεκριμένες παραλλαγές προκαλούν αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος με ασπαραγίνη στη θέση 312 και λυσίνης από γλουταμίνη στη θέση 751 αντίστοιχα. Οι δύο πολυμορφισμοί εμφανίζουν υψηλή συχνότητα στους Καυκάσιους πληθυσμούς (54).

Οι μελέτες σχετικά με τη σύνδεση των προαναφερθέντων πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος παρουσιάζουν αντικρουόμενα ευρήματα υποδεικνύοντας την μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται γεωγραφικά. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που έγινε σε πληθυσμό Καυκάσιων -325 ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο και 335 υγιή άτομα, ως ομάδα ελέγχου- διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του αλληλόμορφου ασπαραγίνης στη θέση 312 συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Οι φορείς του πολυμορφισμού (γονότυπος Asp/Asn) είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου συγκριτικά με τα άτομα που έφεραν σε ομοζυγωτία το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ (γονότυπος Asp/Asp) (55).

Σε μία άλλη μελέτη σε πληθυσμό της Ρουμανίας, σε μικρότερο αριθμό ασθενών-υγιών ατόμων - 73 ασθενείς με διαυγοκυτταρικό καρκίνο νεφρού, 100 υγιή άτομα ως ομάδα ελέγχου), ο πολυμορφισμός του *XPB* γονιδίου Lys751Gln φάνηκε να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για νεφροκυτταρικό καρκίνο και ο γονότυπος Lys/Gln (πολυμορφισμός σε ετεροζυγωτία), καταγράφηκε σε υψηλότερο αριθμό ασθενών έναντι των υγιών ατόμων. Επομένως, ο πολυμορφισμός Lys751Gln του *XPB* γονιδίου ενδέχεται να λειτουργεί ως παράγοντας προδιάθεσης για το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (56). Σε ανάλογη μελέτη στην Ιαπωνία (215 περιπτώσεις RCC, 215 υγιή άτομα) δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την κατανομή των γονοτύπων Asp312Asn ή Lys751Gln στις δύο ομάδες. Ωστόσο σημειώθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν περισσότερα από 3 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα λόγω πολυμορφισμών σε γονίδια επιδιόρθωσης είχαν μικρότερη εξάπλωση του όγκου τοπικά και βελτιωμένη επιβίωση ιδιαίτερα των καπνιστών. Μία πιθανή ερμηνεία του ανωτέρω ευρήματος είναι ότι κάπνισμα, σε συνδυασμό με ταυτόχρονες μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς συσσωρεύει βλάβες και ενεργοποιεί ταχύτερα τον μηχανισμό της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό την εξάπλωση του όγκου (57). Οι παραπάνω μελέτες καταδεικνύουν ότι η επίδραση των πολυμορφισμών στο *XPB* γονίδιο μπορεί να ασκείται συνδυαστικά και αθροιστικά ενισχύοντας την επίδραση ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι στις περισσότερες μελέτες ο αριθμός των εξεταζόμενων ατόμων είναι σχετικά μικρός, σε συνδυασμό και με το γεγονός ότι υπάρχει σημαντική γεωγραφική και φυλετική ετερογένεια, απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

3.Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών σε γονίδια της οδού επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων (NER) με την ανάπτυξη νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC). Πιο συγκεκριμένα θα μελετηθούν οι πολυμορφισμοί XPC-PAT στο εσώνιο 9 του γονιδίου *XPC* και οι πολυμορφισμοί Asp312Asn (rs1799793, εξώνιο 10) και Lys751Gln (rs13181, εξώνιο 23) στο γονίδιο *XPB/ERCC2*. Τα δεδομένα που έχουμε για τη σύνδεση των προαναφερόμενων πολυμορφισμών με τον νεφροκυτταρικό καρκίνο είναι περιορισμένα και κυρίως αντικρουόμενα. Η μελέτη αυτή στον ελληνικό πληθυσμό, στοχεύει στην κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων παραλλαγών στην αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του νεφρού και στην αξιολόγηση της πιθανής τους σημασίας τους μεμονωμένα ή συνδυαστικά ως γενετικοί δείκτες.

3.1 Υλικό Μελέτης-Πληθυσμός

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 67 ασθενείς με καρκίνο του νεφρού και 40 υγιείς μάρτυρες που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Όλοι οι συμμετέχοντες προήλθαν από την Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Για κάθε ασθενή συλλέχθηκε νωπός καρκινικός ιστός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός σε απόσταση μεγαλύτερη των 10 εκατοστών από τον όγκο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα διατήρησης RNA later και καταψύχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) έως την περαιτέρω επεξεργασία τους.

3.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA(DNA extraction)

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από νωπό ιστό έγινε με την χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin Tissue της εταιρείας Macherey-Nagel που βασίζεται στην χρήση στηλών/μεμβρανών για την δέσμευση των νουκλεϊκών οξέων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε είναι η ακόλουθη:

- I. Κάθε δείγμα ιστού καρκινικού και υγιή τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά κομμάτια σε τρυβλίο petri με την χρήση λεπίδων. Για πιο εύκολη ομογενοποίηση μεταφέρθηκαν αυτά σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2 ml.
- II. Για να γίνει λύση των ιστών προσθέσαμε 360μL διαλύματος λύσης Buffer T1 , και 50 μL πρωτεϊνάσης K στο Eppendorf με τον ιστό.
- III. Επακολούθως έγινε καλή ανάδευση με χρήση Vortex , σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση σε θερμαντική πλάκα (heatblock) στους 56°C για ένα ολόκληρο βράδυ.
- IV. Ακολουθεί καλή ανάδευση με vortex και προσθήκη 400μL διάλυμα λύσης Buffer B3 .Έπειτα πάλι έντονη ανάδευση με vortex πριν και μετά από επώαση των δειγμάτων στους 70°C για 10 λεπτά σε heatblock.
- V. Στην συνέχεια προστίθεται 420 μL απόλυτης αιθανόλης(96-100%),έντονη ανάδευση και μεταφορά του διαλύματος σε ειδική στήλη του kit τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής.Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 11.000 στροφές και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής.
- VI. Οι πλύσεις των στηλών ξεκινούν με προσθήκη 500 μL του πρώτου διαλύματος πλύσης Buffer BW,φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 3 λεπτά και απόρριψη της περίσσειας τους σωληναρίου συλλογής.
- VII. Έπειτα προστίθεται 600 μL του διαλύματος πλύσης Buffer B5 στην στήλη, φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 3 λεπτά και απόρριψη της περίσσειας τους σωληναρίου συλλογής.

- VIII. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 11.000 στροφές για την απομάκρυνση υπολειμάτων αιθανόλης και μεταφορά της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf για να γίνει η τελική συλλογή του.
- IX. Αυτό επιτυγχάνεται στο τελικό στάδιο όπου προστίθεται 50 μ L διαλύματος έκλουσης Buffer BE ,γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 11.000 στροφές.
- X. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4° C μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθούν.

3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός γονιδιωματικού DNA

Προκειμένου να εκτιμήσουμε την συγκέντρωση των δειγμάτων και την καθαρότητα σε DNA φωτομετρήσαμε σε NanoDrop της εταιρείας Thermo Fisher.Χρησιμοποιήσαμε 1,5 μ L Elution Buffer(BE) του kit απομόνωσης του DNA ως τυφλό και στην συνέχεια φωτομετρήσαμε τα δείγματα DNA που είχαμε.Έγιναν 3 μετρήσεις για καθένα και το τελικό αποτέλεσμα ήταν ο μέσος όρος αυτών .Όσο αφορά την καθαρότητα πάλι μετρήθηκε από τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων του λόγου A260/A280.Το επιθυμητό εύρος είναι 1,8-2 για υψηλή καθαρότητα , ενώ τιμές κάτω του 1,7 δηλώνουν πρόσμιξη πρωτεϊνών ή φαινόλης ,ενώ πάνω του 2 δείχνουν πιθανή ύπαρξη άλλων μακρομορίων.

3.4 Παρασκευή Πηκτώματος Αγαρόζης

Ανάλογα το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήσαμε και πηκτώματα διαφορετικής σύστασης σε αγαρόζη.Για επιπλέον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων χρησιμοποιήσαμε 2% και για τον έλεγχο επιτυχημένης ενίσχυσης μέσω PCR αλλά και την ηλεκτροφόρηση για διάκριση των προϊόντων πέψεις χρησιμοποιήσαμε 3%. Αρχικά, παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE με αραιώση από το απόθεμα 10X TBE. Το TBE (Tris-Borate-EDTA) χρησιμοποιήθηκε τόσο για την παρασκευή του πηκτώματος όσο και ως διάλυμα αγωγιμότητας στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης. Το Tris δρα ως ρυθμιστικό, διατηρώντας το pH σταθερό κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, το βορικό άλας (Borate) συνεισφέρει στη ρύθμιση του pH και στη σταθερότητα του διαλύματος, ενώ το EDTA δεσμεύει μεταλλικά ιόντα που διαφορετικά θα λειτουργούσαν ως συμπράγοντες νουκλεασών. Για την παρασκευή 1 L διαλύματος 1X TBE, προστέθηκαν 100 mL 10X TBE σε 900 mL δις-απεσταγμένου νερού, σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης ($C_1V_1 = C_2V_2$).

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 2% w/v, απαιτούνται 2 g αγαρόζης ανά 100 mL διαλύματος 1X TBE.Αντίστοιχα για πήκτωμα 3% απαιτούνται 3 g αγαρόζης ανά 100 mL. Επειδή το εκμαγείο που χρησιμοποιήθηκε έχει χωρητικότητα 300 mL, παρασκευάστηκαν 300 mL διαλύματος με 6 g αγαρόζης(για το 2%) και με 9 g αγαρόζης αντίστοιχα(για το 3%), τα οποία ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας. Αγαρόζη και TBE τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη 500 mL και θερμάνθηκαν σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων με συνεχείς αναδεύσεις μέχρι να επιτευχθεί πλήρης διάλυση.

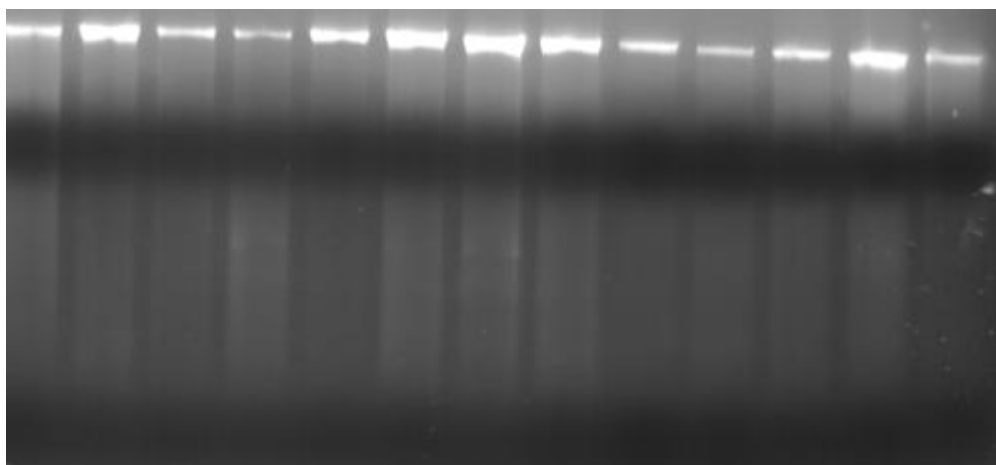
Στο διάφανο διάλυμα που προέκυψε, προστέθηκαν 20 μL βρωμιούχου αιθιδίου ώστε να είναι δυνατή η οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων υπό υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς αυτό διασπείρεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει υπό UV. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρθηκε στο εκμαγείο με τα ειδικά «χτενάκια» για να δημιουργηθούν πηγαδάκια και αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Εφόσον το πήκτωμα δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως, τυλίγεται με μεμβράνη για τη διατήρηση της υγρασίας και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο (για την προστασία του φωτοευαίσθητου βρωμιούχου αιθιδίου) για αποθήκευση στο ψυγείο έως τη χρήση του.

3.5 Ηλεκτροφόρηση για ποιοτικό έλεγχο του γονιδιωματικού DNA

Σε πήκτωμα αгарόζης 2% ηλεκτροφορήσαμε τα δείγματα DNA για να ελέγξουμε αν είναι ακέραια για περαιτέρω χρήση στην πειραματική διαδικασία. Για τη φόρτωση των βοθρίων του πηκτώματος χρησιμοποιήσαμε 10 μL του εκάστοτε δείγματος αναμιγμένα με 3 μL χρωστικής φόρτωσης (gel loading buffer). Μετά την ανάμιξη χρωστικής και δείγματος, το μείγμα φορτώθηκε στο κατάλληλο βοθρίο του πηκτώματος, το οποίο είχαμε τοποθετήσει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Αφού εφαρμόσαμε ηλεκτρικό πεδίο περίπου 100 Volt στο πήκτωμα αгарόζης το αρνητικά φορτισμένο DNA ξεκινά να κινείται προς τον θετικό πόλο της συσκευής. Στην συνέχεια τοποθετείται το πήκτωμα 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 .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αгарόζης 2%

3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων γονιδιώματος

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί βασική μοριακή τεχνική για την επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του DNA. Η μέθοδος αξιοποιεί τη δράση μίας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, η οποία συνθέτει νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς ένα πρότυπο μόριο. Για να ξεκινήσει η σύνθεση απαιτούνται ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), οι οποίοι υβριδίζονται εκατέρωθεν της περιοχής στόχου και καθορίζουν το τμήμα που θα ενισχυθεί. Μέσω διαδοχικών κύκλων αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης επιτυγχάνεται εκθετικός πολλαπλασιασμός του επιλεγμένου τμήματος του γονιδιώματος.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων XPC και XPD(εξώνια 10 και 23).Ο συνολικός τελικός όγκος για την αντίδραση ήταν 50μL για τα XPD10 και XPD23 με 5 μL δείγματος ,ενώ για το XPC που δεν απαιτούσε διάκριση γονοτύπων με πέψεις ο συνολικός τελικός όγκος ήταν 20 μL με 2 μL δείγματος.Οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf και συγκεκριμένα σε ειδικά PCR σωληνάρια των 0,2μL.Εκεί προστίθεται μείγμα αντιδραστηρίων (master mix) και στο τέλος το DNA δείγμα , ενώ δεν παραλείπεται η χρήση ενός αρνητικού μάρτυρα που η ποσότητα του DNA αντικαθιστάται από δις αποσταγμένο νερό για να ελέγχουμε σε κάθε αντίδραση PCR πιθανές επιμολύνσεις.Το μείγμα λοιπόν της αντίδρασης PCR περιέχει γενικότερα δις αποσταγμένο νερό, ρυθμιστικό διάλυμα,MgCl₂,τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια(dNTPs), εκκινητές(primers), DNA πολυμεράση , και τα δείγματα DNA.

Η διαδικασία της PCR για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδιακών περιοχών πραγματοποιείται σε τρία κύρια στάδια. Αρχικά εφαρμόζεται η πρώτη αποδιάταξη, που διαρκεί 5 λεπτά στους 94 °C και έχει ως στόχο τη διάσπαση της δίκλωνης έλικας του DNA σε δύο μονόκλωνα μόρια, τα οποία λειτουργούν ως εκμαγεία για τη νέα σύνθεση. Στη συνέχεια ακολουθούν 35 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι με τρεις διαδοχικές φάσεις:αποδιάταξη στους 90°C για 1 λεπτό,υβριδοποίηση των εκκινητών στους 64 °C για 1 λεπτό, όπου οι εκκινητές προσδένονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA,και επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό με δράση της DNA πολυμεράσης.

Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης στους 72 °C, διάρκειας 10 λεπτών, το οποίο διασφαλίζει την πλήρη σύνθεση όλων των ενισχυμένων τμημάτων.

Τα πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση παρατίθενται παρακάτω.

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών (Eurofins Genomics) για ενίσχυση των XPC,XPD10,XPD23

Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'→3'
XPC-F πρόσθιος	TAG CAC CCA GCA GTC AAA G

XPC-R ανάστροφος	TGT GAA TGT GCT TAA TGC TG
XPD10-F πρόσθιος	TGG CCC CTG TCT GAC TTG TCC C
XPD10-R ανάστροφος	GAC GGG GAG GCG GGAAAG GGA CT
XPD23-F πρόσθιος	GCC CGC TCT GGA TTA TAC G
XPD23-R ανάστροφος	CTA TCA TCT CCT GGC CCC C

Πίνακας 2. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση του ιντρονίου 9 του γονιδίου XPC με τη χρήση της FIREPol DNA πολυμεράσης (Solis BioDyne)

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα σε μL
10X ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer B)	2
25mM MgCl_2	1,5
dNTPs (40 mM)	0,5
XPC-F εκκινητής (10 μM)	0,3
XPC-R εκκινητής (10 μM)	0,3
10x GC-rich Enhancer	3
FIREPol DNA Polymerase (5 U/ μl)	0,2
ddH ₂ O	Μέχρι τα 18 μL (αφού τα άλλα 2 είναι το DNA δείγμα)

Να σημειωθεί ότι για την ενίσχυση του γονιδίου XPC στο μείγμα αντίδρασης προστέθηκε επιπλέον το 10× GC-rich Enhancer (Solis BioDyne), καθώς η περιοχή στόχος είναι πλούσια σε ζεύγη G–C, τα οποία σχηματίζουν ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου και σταθερότερες δευτεροταγείς δομές, δυσκολεύοντας την αποδιάταξη και την υβριδοποίηση των εκκινητών.

Πίνακας 3. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση του εξωνίου 10 του γονιδίου XPD με τη χρήση της FIREPol DNA πολυμεράσης (Solis BioDyne)

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα σε μL
10X ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer B)	5

25mM MgCl ₂	3
dNTPs (40 mM)	1
XPD10-F εκκινητής (10μM)	0,5
XPD10-R εκκινητής (10μM)	0,5
FIREPol DNA Polymerase (5 U/μl)	0,5
ddH ₂ O	Μέχρι τα 45μL(αφού τα άλλα 5 είναι το DNA δείγμα)

Πίνακας 4. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση του εξωνίου 23 του γονιδίου XPD με τη χρήση της FIREPol DNA πολυμεράσης (Solis BioDyne)

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα σε μL
10X ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer B)	5
25mM MgCl ₂	3
dNTPs (40 mM)	1
XPD23-F εκκινητής (10μM)	0,5
XPD23-R εκκινητής (10μM)	0,5
FIREPol DNA Polymerase (5 U/μl)	0,5
ddH ₂ O	Μέχρι τα 45μL(αφού τα άλλα 5 είναι το DNA δείγμα)

Επιπλέον να σημειωθεί ότι σε όλες τις αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας που είχε το mix της αντίδρασης αλλά αντι του DNA δείγματος την ίδια ποσότητα σε δις αποσταγμένο νερό. Επιπλέον οι ποσότητες ανά δείγμα δεν περιλαμβάνουν και το +10% τελικής ποσότητας κάθε αντιδραστήριου στην αντίδραση λόγω απωλειών στο πιπτετάρισμα.

3.8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Μετά την ολοκλήρωση της PCR για να ελέγξουμε την επιτυχία της επιθυμητής ενίσχυσης ηλεκτροφορήσαμε τα προϊόντα σε πηκτώματα αγαρόζης 3%. Για τη φόρτωση παρασκευάστηκε μείγμα που περιλάμβανε 10 μL PCR προϊόντος και 4 μL διαλύματος φόρτωσης, το οποίο περιείχε γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης (loading buffer). Η γλυκερόλη συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στο βοθρίο, ενώ η χρωστική επιτρέπει την οπτική παρακολούθηση της μετακίνησης του δείγματος κατά την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε παράλληλα δείκτης μοριακού βάρους 100 bp (Invitrogen, Life Sciences) για τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους των ενισχυμένων προϊόντων γνωστός και ως Ladder. Μετά το πέρας της διαδικασίας, το πήκτωμα εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και η εικόνα

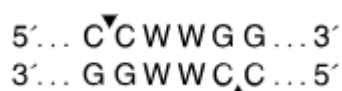
καταγράφηκε ψηφιακά μέσω συστήματος καταγραφής συνδεδεμένου με τον υπολογιστή όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω.

3.9 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν και κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, δημιουργώντας χαρακτηριστικά θραύσματα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία για την ανάλυση πολυμορφισμών (PCR-RFLP), καθώς η παρουσία ή απουσία ενός πολυμορφισμού μπορεί να μεταβάλλει τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου. Έτσι, η πέψη των PCR προϊόντων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα επιτρέπει τη διάκριση διαφορετικών γονοτύπων μέσω του μοριακού μεγέθους των θραυσμάτων που προκύπτουν.

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού XPC-PAT που μελετήθηκε δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο περιοριστικό ένζυμο καθώς ανήκει στην κατηγορία των DIPs, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλη ενότητα, και η ένθεση/απαλοιφή των νουκλεοτιδίων είναι διακριτή με απλή ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης.

Για τον πολυμορφισμό rs1799793 του γονιδίου XPD10 χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Styl της εταιρίας New England Biolabs που αναγνωρίζει και τέμνει την ακόλουθη αλληλουχία αναγνώρισης στο δίκλωνο DNA:



Όπου W= A ή T

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl, αποτελούμενος από 20 μl προϊόντος PCR και 30 μL μείγματος αντιδραστηρίων. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5. Πρωτόκολλο πέψης με το περιοριστικό ένζυμο Styl για τον πολυμορφισμό rs1799793 στο εξώνιο 10 του γονιδίου XPD

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα σε μL
10x ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer	5
Ένζυμο Styl (20 u/μl)	1,5
ddH ₂ O	23,5

Για τον πολυμορφισμό rs13181 στο γονίδιο XPD23 χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο PstI της εταιρίας FastGene που αναγνωρίζει και τέμνει την ακόλουθη αλληλουχία αναγνώρισης στο δίκλωνο DNA:



Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μ l, αποτελούμενος από 20 μ l προϊόντος PCR και 30 μ L μείγματος αντιδραστηρίων. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6. Πρωτόκολλο πέψης με το περιοριστικό ένζυμο PstI για τον πολυμορφισμό rs13181 στο εξώνιο 23 του γονιδίου XPD

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα σε μ L
10x ρυθμιστικό διάλυμα Buffer III	5
Ένζυμο PstI (20 u/ μ l)	1
ddH ₂ O	24

Οι αντιδράσεις των πέψεων έγιναν σε θερμοκρασίες σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των κιτ. Ενδεικτικά για την αντίδραση του Styl έγινε επώαση σε heatblock στους 37° C για 15 λεπτά και έπειτα για απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65° C για 20 λεπτά, ενώ για το PstI έγινε στους 37° C για 1 ώρα και έπειτα απενεργοποίηση στους 80° C για 20 λεπτά.

4.Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ο πολυμορφισμός XPC-PAT στο ιντρόνιο 9 του γονιδίου XPC και οι πολυμορφισμοί XPD Asp312Asn (rs1799793, εξώνιο 10) και XPD Lys751Gln (rs13181, εξώνιο 23) στο γονίδιο XPD/ERCC2, σε συνολικό δείγμα 67 ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) και 40 υγιών μαρτύρων. Η πληροφορία φύλου ήταν διαθέσιμη για 56/67 ασθενείς (Α: 42, Θ: 14) και για 40/40 μάρτυρες (Α: 32, Θ: 8). Ηλικιακά, μεταξύ των ασθενών υπήρχαν 20 άτομα <62 ετών και 25 άτομα $\geq$ 62 ετών (υπόλοιπα ελλείποντα), ενώ στην ομάδα ελέγχου 8 άτομα <62 και 28 άτομα $\geq$ 62 ετών (υπόλοιπα ελλείποντα).

Παρακάτω ακολουθεί ένας πίνακας με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μπόρεσαν να συλλεχθούν και χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση μας.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΘΜΟΣ ΚΑΤΑ FURHMAN	ΥΠΟΤΥΠΟΣ RCC	ΜΕΓΙΣΤΗ ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΟΓΚΟΥ
Ασθενής 1	73	3	Διαυγοκυτταρικός	7
Ασθενής 2	53	1	Διαυγοκυτταρικός	7,5
Ασθενής 3	73	2	Διαυγοκυτταρικός	6
Ασθενής 4	77	2	Θηλώδης	9,5
Ασθενής 5	87	-	Διαυγοκυτταρικός	-
Ασθενής 6	52	2	Διαυγοκυτταρικός	4
Ασθενής 7	62	1	Διαυγοκυτταρικός	3

Ασθενής 8	63	3	Διαυγοκυτταρικός	9
Ασθενής 9	72	1	Διαυγοκυτταρικός	4,2
Ασθενής 10	60	2	Διαυγοκυτταρικός	6,2
Ασθενής 11	51	2	Διαυγοκυτταρικός	5,5
Ασθενής 12	32	1	Θηλώδες	7,5
Ασθενής 13	62	-	Χρωμοφόβου	6,2
Ασθενής 14	66	3	Θηλώδες	9
Ασθενής 15	76	1	Διαυγοκυτταρικός	3
Ασθενής 16	-	2	Διαυγοκυτταρικός	8
Ασθενής 17	82	3	-	-
Ασθενής 18	80	2	Διαυγοκυτταρικός	6,5
Ασθενής 19	59	2	Διαυγοκυτταρικός	8,5
Ασθενής 20	42	1	Διαυγοκυτταρικός	3,2
Ασθενής 21	68	-	Χρωμοφόβου	4
Ασθενής 22	67	-	Χρωμοφόβου	7,6
Ασθενής 23	76	3	Διαυγοκυτταρικός	5
Ασθενής 24	77	2	Διαυγοκυτταρικός	4,5
Ασθενής 25	61	2	Διαυγοκυτταρικός	3,7
Ασθενής 26	54	-	Χρωμοφόβου	9,2
Ασθενής 27	58	1	Διαυγοκυτταρικός	5,5
Ασθενής 28	50	2	Διαυγοκυτταρικός	8
Ασθενής 29	-	-	Χρωμοφόβου	3
Ασθενής 30	80	2	Διαυγοκυτταρικός	7,5
Ασθενής 31	47	1	Διαυγοκυτταρικός	4
Ασθενής 32	59	1	Ογκοκύττωμα	7,7
Ασθενής 33	66	2	Διαυγοκυτταρικός	1,6
Ασθενής 34	63	3	Διαυγοκυτταρικός	2,5
Ασθενής 35	80	3	Διαυγοκυτταρικός+ Θηλώδες	6,2
Ασθενής 36	56	2	Διαυγοκυτταρικός	8,5
Ασθενής 37	69	1	Διαυγοκυτταρικός	2,1
Ασθενής 38	62	2	Θηλώδες	1,6
Ασθενής 39	42	2	Διαυγοκυτταρικός	3,2
Ασθενής 40	43	2	Διαυγοκυτταρικός	7
Ασθενής 41	63	2	Διαυγοκυτταρικός	4,3
Ασθενής 42	66	3	Διαυγοκυτταρικός+ Θηλώδες	12
Ασθενής 43	57	1	Διαυγοκυτταρικός	6,8
Ασθενής 44	72	3	Διαυγοκυτταρικός	9,5

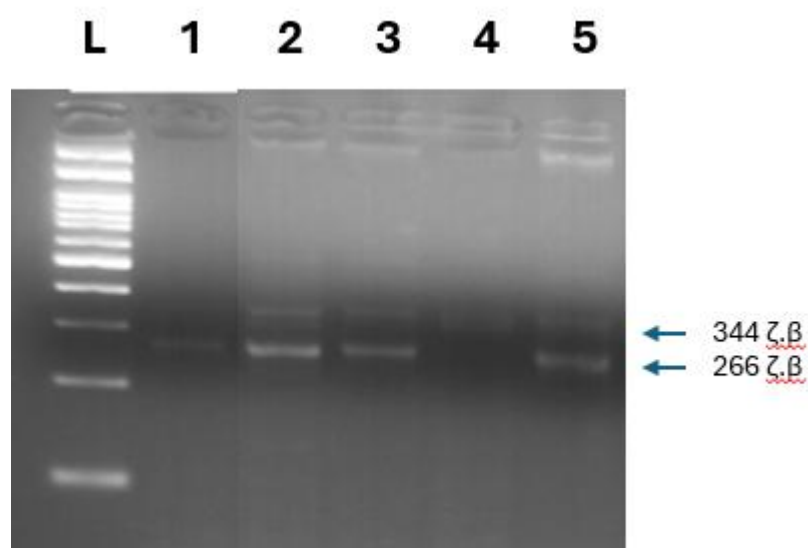
Για τον σκοπό της παρούσας μελέτης λοιπόν, απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό νεφρού.

Με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών ενισχύθηκαν επιλεκτικά οι περιοχές που περιέχουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς. Τα προϊόντα PCR

ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση των περιοχών στόχων. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100 bp (Invitrogen, Life Sciences) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των τμημάτων.

Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων PCR για κάθε πολυμορφισμό με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

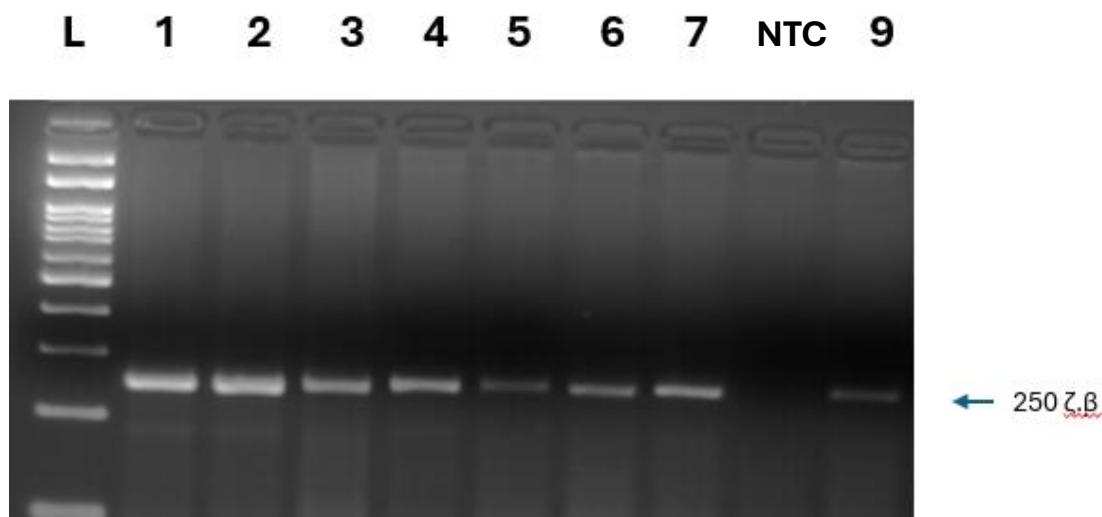
Για τον πολυμορφισμό XPC-PAT, 266 ή 344 ζ.β. ανάλογα με το αλληλόμορφο (εικόνα 20), για τον XPD Asp312Asn (εξώνιο 10), 250 ζ.β. (εικόνα 21) και για τον πολυμορφισμό XPD Lys751Gln (εξώνιο 23), 436 ζ.β. (εικόνα 22).



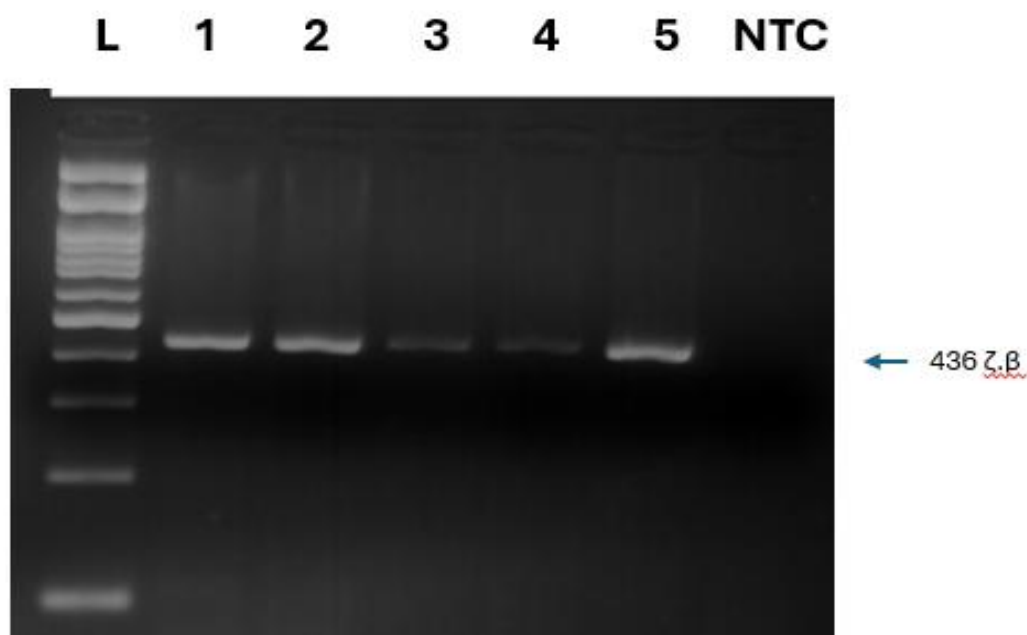
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για τον πολυμορφισμό XPC PAT μεγέθους 266/344 ζευγών βάσεων σε πήκτωμα αγαρόζη 3%, L: μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Invitrogen). Δείγμα 1: 266/266 ζ.β. (ομόζυγωτία -/-), Δείγματα: 2, 3, 5: 266/344 ζ.β. (ετεροζυγωτία), δείγμα 4: 344/344 (ομόζυγωτία +/+).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 20, ο ομόζυγος γονότυπος (-/-) είναι αυτός στον οποίο δεν παρατηρείται η ένθεση των 83 νουκλεοτιδίων. Στον ετερόζυγο γονότυπο (+/-) μόνο το ένα από τα δύο αλληλόμορφα γονίδια *XPC* φέρει την ένθεση των 83 νουκλεοτιδίων, ενώ στον ομόζυγο γονότυπο (+/+) η ένθεση απαντά και στα δύο αλληλόμορφα γονίδια. Στο *XPC* τυποποιήθηκαν επιτυχώς 52/67 ασθενείς και 40/40 μάρτυρες.

Στις εικόνες 21 και 22 απεικονίζονται οι ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων για τους πολυμορφισμούς που απαντούν στα εξώνια 10 και 23 αντίστοιχα του *XPD* γονιδίου.



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων του πολυμορφισμού rs1799793, στο εξώνιο 10 του *XPB* γονιδίου, μεγέθους 250 ζ.β., σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. 1-7, 9: δείγματα ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνο, 8: NTC (Non-Template Control) αρνητικός μάρτυρας

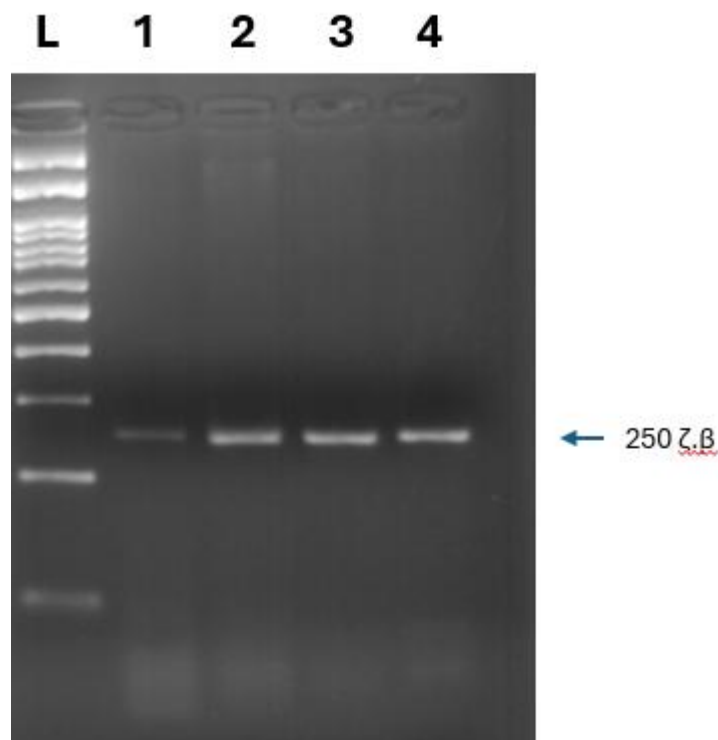


Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων του πολυμορφισμού rs13181, στο εξώνιο 23 του *XPB* γονιδίου μεγέθους 436 ζ.β., σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. 1-5: δείγματα ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνο, NTC : (Non-Template Control) αρνητικός μάρτυρας

Μετά την επιτυχή ενίσχυση των PCR προϊόντων για τα εξώνια 10 και 23 του *XPB* γονιδίου ακολούθησαν πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Για τον πολυμορφισμό rs1799793 του γονιδίου *XPB* (εξώνιο 10) η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *StyI* αναμένεται να δώσει μία ζώνη μεγέθους 250 ζ.β για τον ομόζυγο γονότυπο (απουσία πολυμορφισμού), δύο ζώνες μήκους 250 ζ.β και 185 ζ.β για τον ετερόζυγο γονότυπο (παρουσία πολυμορφισμού στο ένα

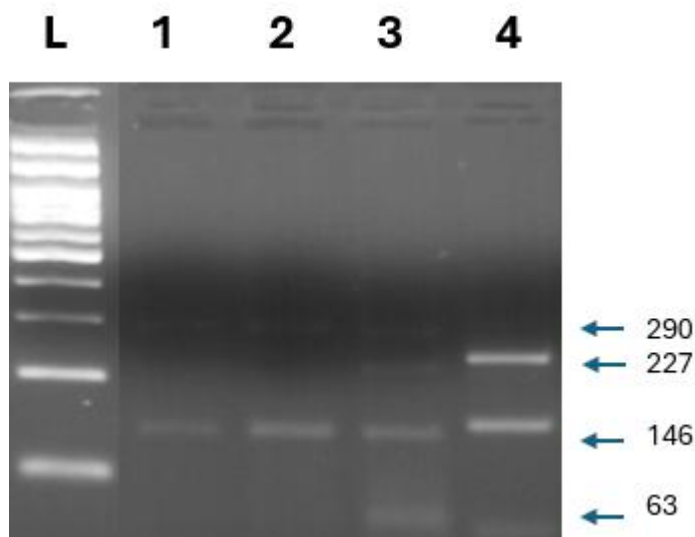
αλληλόμορφο) και μία ζώνη των 185 ζ.β για τον ομόζυγο πολυμορφικό γονότυπο (παρουσία πολυμορφισμού και στα δύο αλληλόμορφα).

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα (67 ασθενείς/ 40 υγιή άτομα), που αναλύσαμε για τον πολυμορφισμό rs1799793 του γονιδίου *XPB* (εξώνιο 10), δεν έφεραν τον υπό εξέταση πολυμορφισμό (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πολυμορφισμού rs1799793 του γονιδίου *XPB* με το ένζυμο περιορισμού *StyI* σε πήκτωμα αгарόζης 3%. (1-4 :NI/Ni ομόζυγος γονότυπος δηλαδή αρνητικό για τον πολυμορφισμό)

Για τον πολυμορφισμό rs13181 του γονιδίου *XPB* (εξώνιο 23) η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *PstI* αναμένεται να δώσει δύο ζώνες μεγέθους 290 ζ.β και 146 ζ.β για τον ομόζυγο γονότυπο (απουσία πολυμορφισμού), τέσσερις ζώνες των 290 ζ.β., 227 ζ.β., 164 ζ.β. και 63 ζ.β. για τον ετερόζυγο γονότυπο (παρουσία του πολυμορφισμού στο ένα αλληλόμορφο) και τρεις ζώνες μεγέθους 227 ζ.β., 146 ζ.β. και 63 ζ.β για τον ομόζυγο γονότυπο (παρουσία του πολυμορφισμού και στα δύο αλληλόμορφα) (Εικόνα 24). Από το σύνολο του αρχικού δείγματος τυποποιήθηκαν επιτυχώς 34/67 ασθενείς και 40/40 μάρτυρες.



Εικόνα 24 . Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πολυμορφισμού rs1799793 του γονιδίου *XPD* με το ένζυμο περιορισμού *PstI* σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Ομόζυγος γονότυπος(-/-)(290 +146): 1,2 - Ετερόζυγος γονότυπος(-/+)(290+227+146+63): 3 -Ομόζυγος πολυμορφικός γονότυπος(+/+)(227+146+63):4

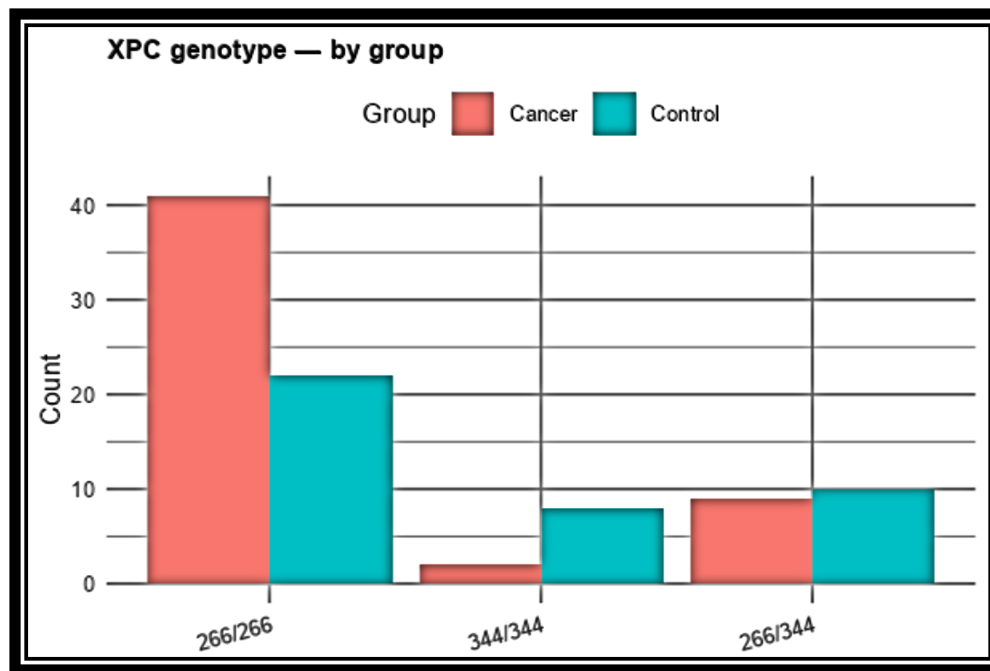
Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των γονότυπων των γονιδίων *XPC* και *XPD* (εξώνια 10 και 23) μεταξύ ασθενών με καρκίνο του νεφρού και υγιών ατόμων. Για τη διερεύνηση διαφορών ως προς την κατανομή των γονότυπων μεταξύ των δύο ομάδων εφαρμόστηκαν έλεγχοι χ^2 (με Monte Carlo p-value, όπου απαιτούνταν λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων) και το Fisher's exact test. Για την εκτίμηση της συσχέτισης των γονότυπων με την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου χρησιμοποιήθηκε μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση. Όταν εντοπίστηκαν σπάνιες ή απούσες κατηγορίες που δημιουργούσαν το φαινόμενο του "separation", εφαρμόστηκε η μέθοδος Firth logistic regression για την παραγωγή σταθερών και αξιόπιστων εκτιμήσεων.

Πραγματοποιήθηκε επίσης αποκλειστικά στους ασθενείς πρόσθετη ανάλυση για τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων των γονότυπων με προγνωστικούς δείκτες της νόσου, συμπεριλαμβανομένου του βαθμού κατά Fuhrman (υψηλός ≥ 3 έναντι χαμηλού ≤ 2), του μεγέθους του όγκου (≥ 7 cm έναντι < 7 cm) και του ιστολογικού τύπου (άλλος έναντι διαυγοκυτταρικού).

Κατανομές γονότυπων μεταξύ ομάδων

Πολυμορφισμός *XPC-PAT*

Εξετάζοντας την κατανομή των γονότυπων *XPC* (τρία επίπεδα: 266/266, 344/344, 266/344), διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και ελέγχων (χ^2 Monte-Carlo $p=0,0169$, Fisher $p=0,0177$). Αξιοσημείωτα, ο γονότυπος 344/344 παρουσιάζεται σημαντικά συχνότερα στα υγιή άτομα σε σχέση με τους ασθενείς, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό προστατευτικό ρόλο αυτού του γονότυπου.



Διάγραμμα 1 .Κατανομή γονοτύπων μεταξύ των δύο group (καρκινικά και control) για τον πολυμορφισμό XPC-PAT

Ασθενείς: (n=52 μη-ελλείποντες):

266/266: 41 (78,8%)

266/344: 9 (17,3%)

344/344: 2 (3,8%)

Μάρτυρες (n=40):

266/266: 22 (55,0%)

266/344: 10 (25,0%)

344/344: 8 (20,0%)

Πολυμορφισμός XPD23

Αντιθέτως, για τον πολυμορφισμό rs13181 στο εξώνιο 23 του *XPD* γονιδίου, από την κατανομή των γονοτύπων δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0,294$). Αυτό ενδεχομένως αιτιολογείται και από τον μικρό αριθμό των εξεταζόμενων ατόμων.

Ασθενείς (n=34 μη-ελλείποντες):

NL/NL: 7 (20,6%)

NL/+: 19 (55,9%)

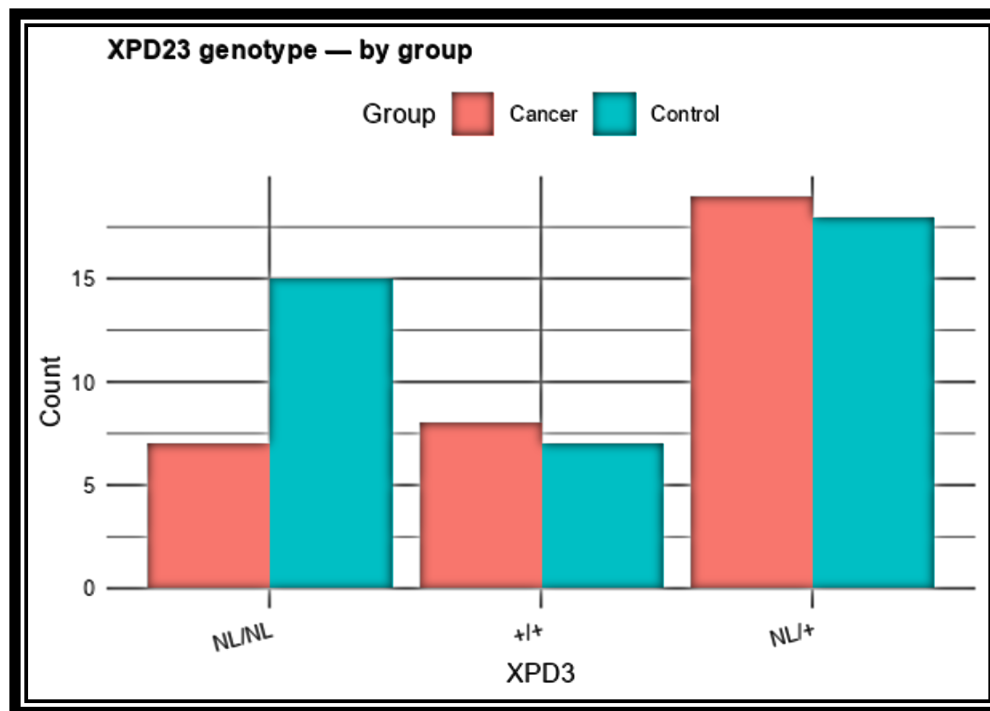
+/: 8 (23,5%)

Μάρτυρες (n=40):

NL/NL: 15 (37,5%)

NL/+: 18 (45,0%)

+/: 7 (17,5%)



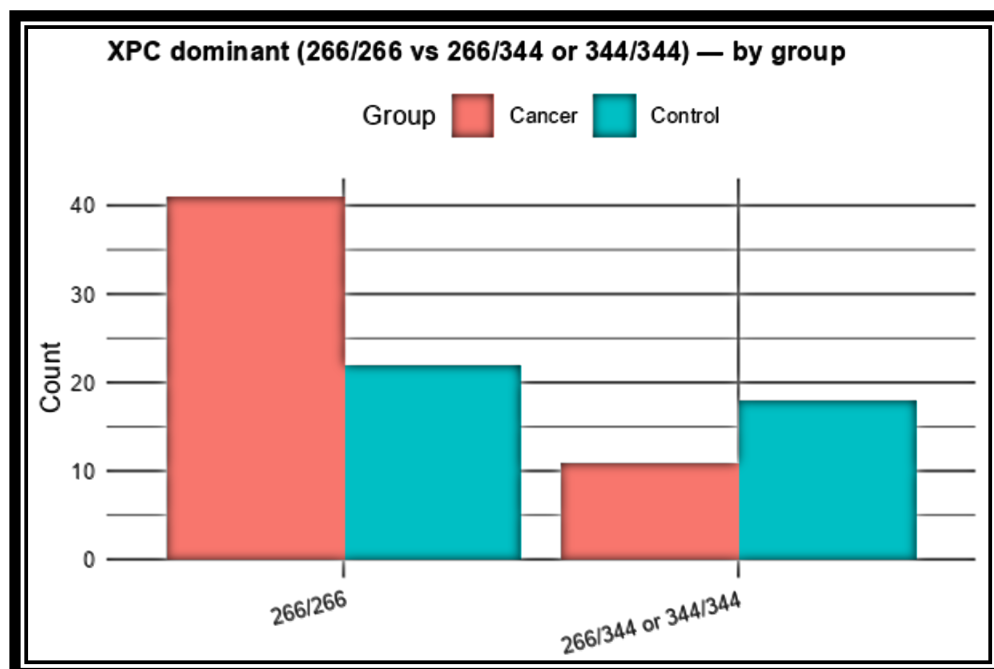
Διάγραμμα 2. Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs13181 του *XPD* γονιδίου (εξώνιο 23) σε ασθενείς και υγιή άτομα.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs1799793 στο εξώνιο 10 του γονιδίου *XPD* όλοι οι συμμετέχοντες (56 ασθενείς και 40 υγιή άτομα) είχαν τον ίδιο γονότυπο και δεν έφεραν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Ως εκ τούτου, λόγω της απουσίας γενετικής ποικιλότητας ήταν αδύνατη η περαιτέρω στατιστική ανάλυση για αυτόν τον πολυμορφισμό.

Ακολούθησε στη συνέχεια μονοπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση για τους δύο πολυμορφισμούς που εμφάνιζαν γενετική ποικιλότητα. Η μονοπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση για τον πολυμορφισμό XPC PAT επιβεβαίωσε τα ανωτέρω ευρήματα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τον γονότυπο 266/266 (-/-) ως κατηγορία αναφοράς, ο γονότυπος 344/344 συσχετίστηκε με στατιστικώς σημαντική μείωση των πιθανοτήτων εμφάνισης νόσου (OR=0,134, 95% ΔΕ: 0,026–0,687, $p=0,016$). Ο ετερόζυγος γονότυπος 266/344 (-/+) εμφάνισε μία μη στατιστικώς σημαντική προστατευτική τάση προστασίας (OR=0,483, $p=0,170$). Ο συνολικός έλεγχος καταλληλότητας του μοντέλου ήταν στατιστικά σημαντικός (LRT $p=0,017$), επιβεβαιώνοντας την συνολική επίδραση του XPC PAT πολυμορφισμού στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του νεφρού.

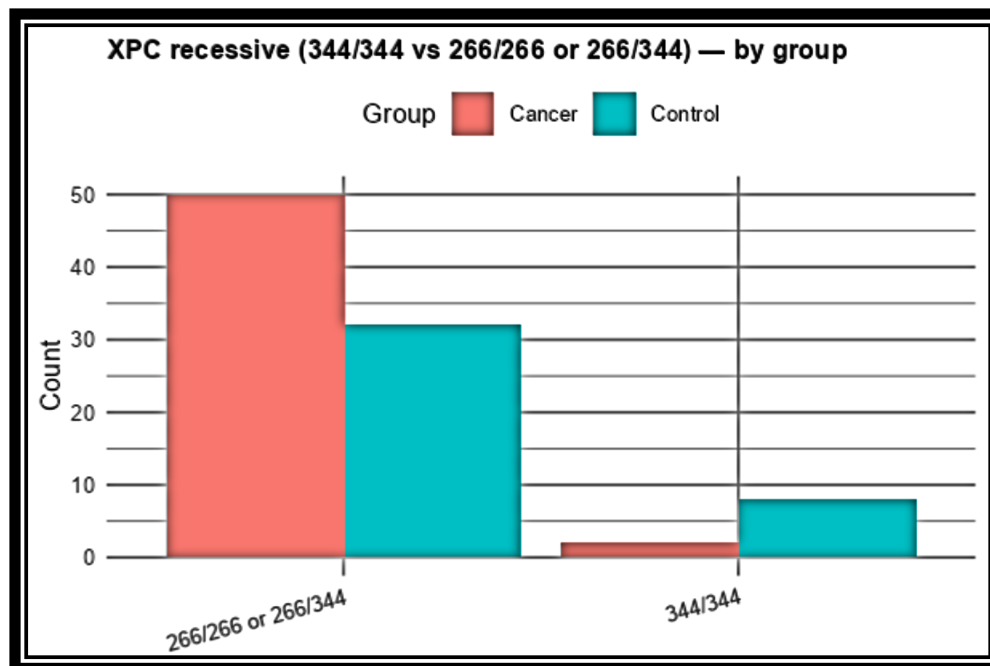
Παρομοίως, για τον πολυμορφισμό XPD23, χρησιμοποιώντας τον γονότυπο Lys751Lys ως γονότυπο αναφοράς, η παρουσία του πολυμορφισμού σε ομοζυγωτία Gln751Gln (OR=2,449, $p=0,195$) ή σε ετεροζυγωτία Lys751Gln (OR=2,262, $p=0,148$) δεν ανέδειξαν κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Ο συνολικός έλεγχος του μοντέλου ήταν επίσης μη στατιστικά σημαντικός ($p\approx 0,275$).

Για τη βελτίωση της στατιστικής ισχύος και την απλούστευση της ερμηνείας, εφαρμόστηκαν επιπρόσθετα μοντέλα επικρατούς (dominant) και υπολειπόμενης (recessive) κληρονομικότητας, τα οποία αποτυπώνονται στα ακόλουθα διαγράμματα.



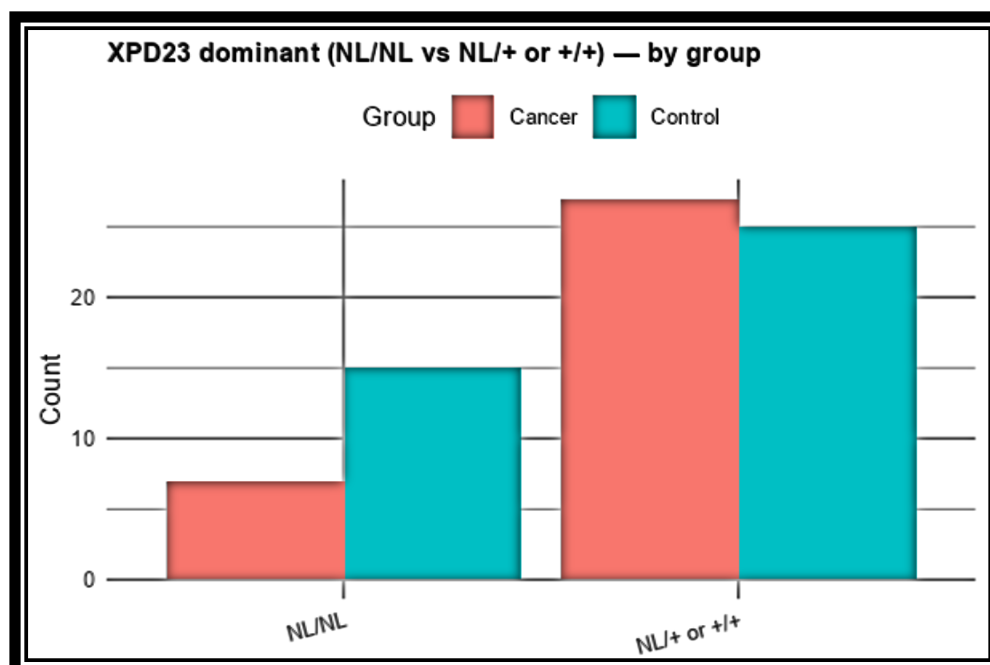
Διάγραμμα 3. Κατανομή του επικρατούς μοντέλου κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό XPC PAT (266/266 έναντι 266/344 ή 344/344) μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων.

Όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 3 η παρουσία του πολυμορφισμού σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα των υγιών ατόμων έναντι των ασθενών με καρκίνο νεφρού, γεγονός που ενισχύει την πιθανή προστατευτική δράση που έχει ο εν λόγω πολυμορφισμός.

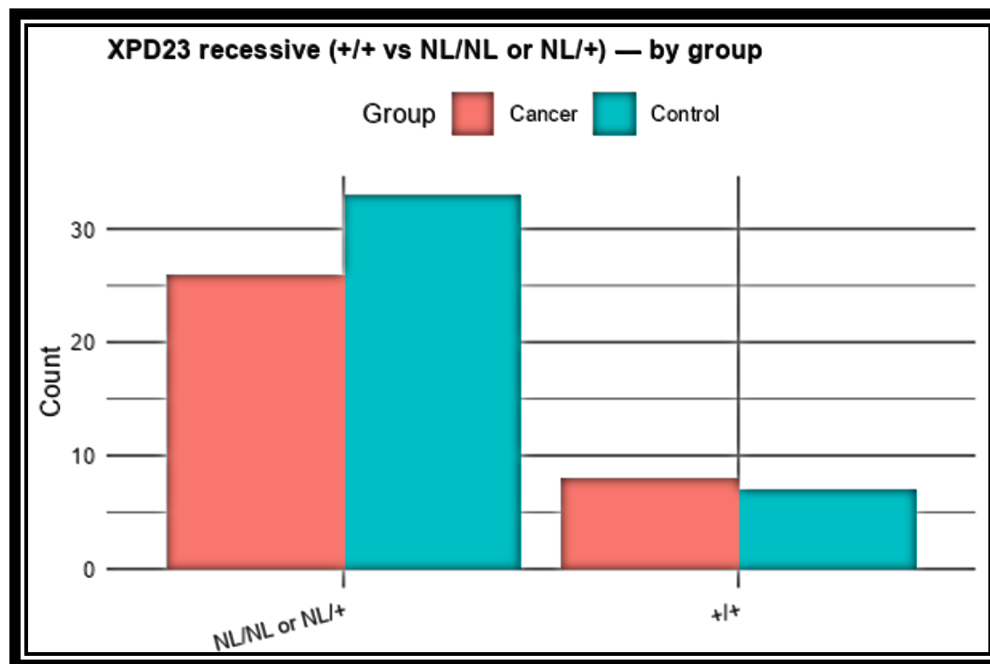


Διάγραμμα 4. Κατανομή του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό XPC PAT (344/344 έναντι 266/266 ή 266/344) μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων.

Όπως προκύπτει στο Διάγραμμα 4, η παρουσία του πολυμορφισμού XPC PAT σε ομοζυγωτία (γονότυπος 344/344) εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα υγιή άτομα, καταδεικνύοντας ισχυρή προστατευτική επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού.



Διάγραμμα 5. Κατανομή του επικρατούς μοντέλου κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό rs13181 του XPD (εξώνιο 23) (Lys751Lys έναντι Lys751Gln ή Gln751Gln) μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων.



Διάγραμμα 6. Κατανομή του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό rs13181 του *XPD* (εξώνιο 23) (Gln751Gln έναντι Lys751Lys ή Lys751Gln) μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων.

Όπως προκύπτει από την ανάλυση των διαγραμμάτων 5 και 6, η κατανομή του πολυμορφισμού rs13181 του *XPD* (εξώνιο 23) στις ομάδες των ασθενών και των υγιών ατόμων παρουσιάζει ελάχιστες διαφορές, χωρίς να αναδεικνύεται κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ακολουθώντας το μοντέλο υπολειπόμενης κληρονομικότητας η κατανομή του πολυμορφισμού σε ομοζυγωτία είναι παρόμοια στις δύο ομάδες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκίνου, τουλάχιστον όχι στο υλικό της δικής μας μελέτης.

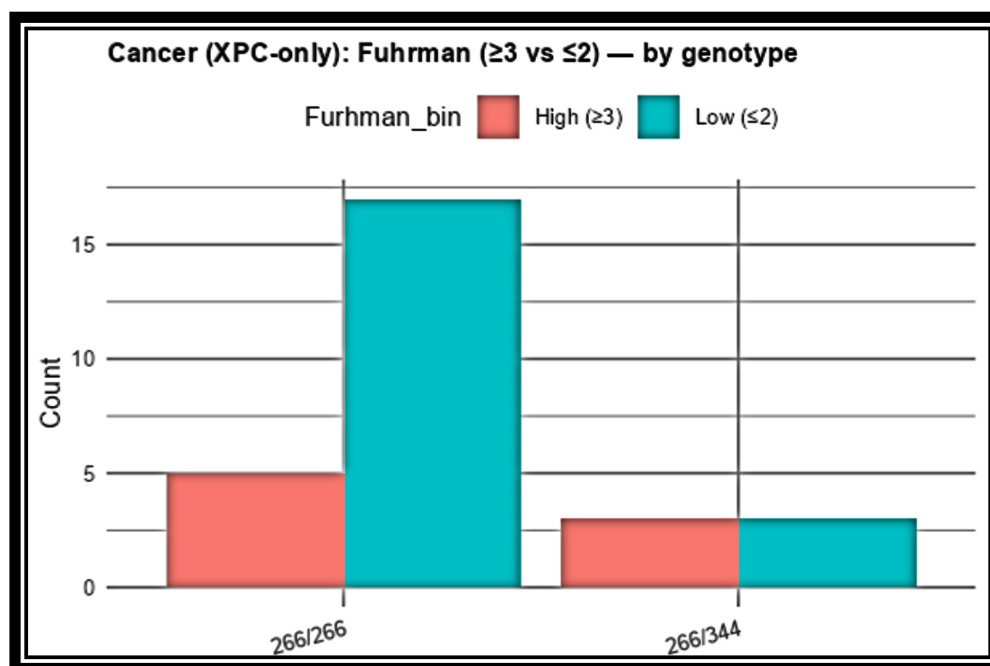
Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε πολυπαραγοντική ανάλυση συσχετίζοντας και κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών, όπως το φύλο, η ηλικία, ο ιστολογικός υπότυπος, ο βαθμός κακοηθείας και το μέγεθος του όγκου. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση με έκβαση την ομάδα νόσου (ασθενείς έναντι υγιών ατόμων) και προσαρμογή για την ηλικιακή ομάδα και φύλο, το αποτέλεσμα για τον πολυμορφισμό *XPC PAT* παρέμεινε ισχυρό. Λόγω της πολύ μικρής συχνότητας του γονότυπου 344/344 (+/+) στους ασθενείς, εφαρμόστηκε η μέθοδος Firth regression. Η εκτίμηση έδειξε ότι ο γονότυπος 344/344 (+/+) διατηρεί έντονα προστατευτική δράση (OR=0,034, 95% ΔΕ: 0,00024–0,344, $p=0,0015$), ενώ ο γονότυπος 266/344 (-/+) δεν παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα (OR=0,569, $p=0,358$).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ούτε η ηλικία ≥ 62 ετών (OR=0,415, $p=0,113$), ούτε το θηλυκό φύλο (OR=2,111, $p=0,222$) εμφάνισαν ανεξάρτητη στατιστική συσχέτιση στην ομάδα των ασθενών της μελέτης μας. Ο συνολικός έλεγχος του μοντέλου ήταν ισχυρά θετικός (LRT $p=0,002$), ενισχύοντας την άποψη ότι ο γονότυπος *XPC PAT* 344/344 (+/+) ασκεί προστατευτική δράση ανεξάρτητα από άλλους συμπαραγόντες.

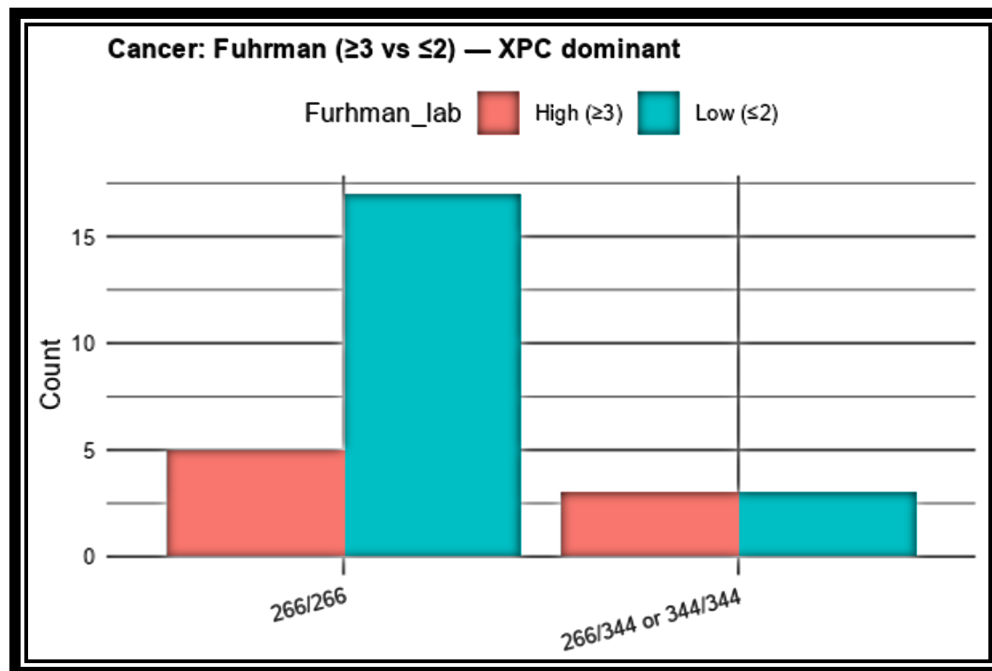
Προχωρήσαμε περαιτέρω στην ανάλυση των επικρατών και υπολειπόμενων μοντέλων στην πολυπαραγοντική προσέγγιση. Για τον πολυμορφισμό XPC PAT τόσο στο επικρατές όσο και στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας φαίνεται ξεκάθαρα η προστατευτική επίδραση του πολυμορφισμού έναντι της ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ανάλυση του επικρατούς μοντέλου «οποιοδήποτε 344, δηλαδή 266/344 ή 344/344 έναντι 266/266» δείχνει καθαρή προστατευτική επίδραση τόσο στη μονοπαραγοντική ($OR=0,278$, $p=0,023$), όσο και μετά την προσαρμογή για ηλικία και φύλο ($OR=0,261$, $p=0,025$). Αντιστοίχως, κατά την ανάλυση του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας (344/344 έναντι 266/266 ή 266/344), η μικρή συχνότητα εμφάνισης του 344/344 στους ασθενείς οδήγησε σε εκτίμηση με Firth regression, η οποία έδειξε πολύ ισχυρό προστατευτικό αποτέλεσμα ($OR=0,0396$, $p=0,00223$).

Κατά αναλογία, ο πολυμορφισμός rs13181 του XPD γονιδίου (εξώνιο 23), στο επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (Lys751Gln ή Gln751Gln έναντι Lys751Lys) εμφάνισε μη στατιστικώς σημαντική τάση προς αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου (προσαρμοσμένο $OR=3,642$, $p\approx0,079$), ενώ από την ανάλυση του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας (Gln751Gln έναντι των υπολοίπων) δεν αναδείχθηκε επίσης κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση (προσαρμοσμένο $OR=1,746$, $p\approx0,428$).

Αξιολογήσαμε επιπρόσθετα την πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών με κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών όπως η ηλικία, ο βαθμός κακοηθείας κατά Fuhrman, το μέγεθος του όγκου και ο ιστολογικός υπότυπος. Η ανάλυση των πολυμορφισμών σε συνάρτηση με τον βαθμό κακοηθείας κατά Fuhrman (υψηλός έναντι χαμηλού βαθμού) δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού κακοηθείας και των γονοτύπων του πολυμορφισμού XPC PAT. Αντιθέτως, η μεγαλύτερη ηλικία ≥ 62 ετών συσχετίστηκε ισχυρά με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας ($OR=16,936$, $p=0,017$), εύρημα εύλογο βιολογικά, καθώς η ηλικία αποτελεί γνωστό προγνωστικό παράγοντα (Διαγράμματα 7, 8).



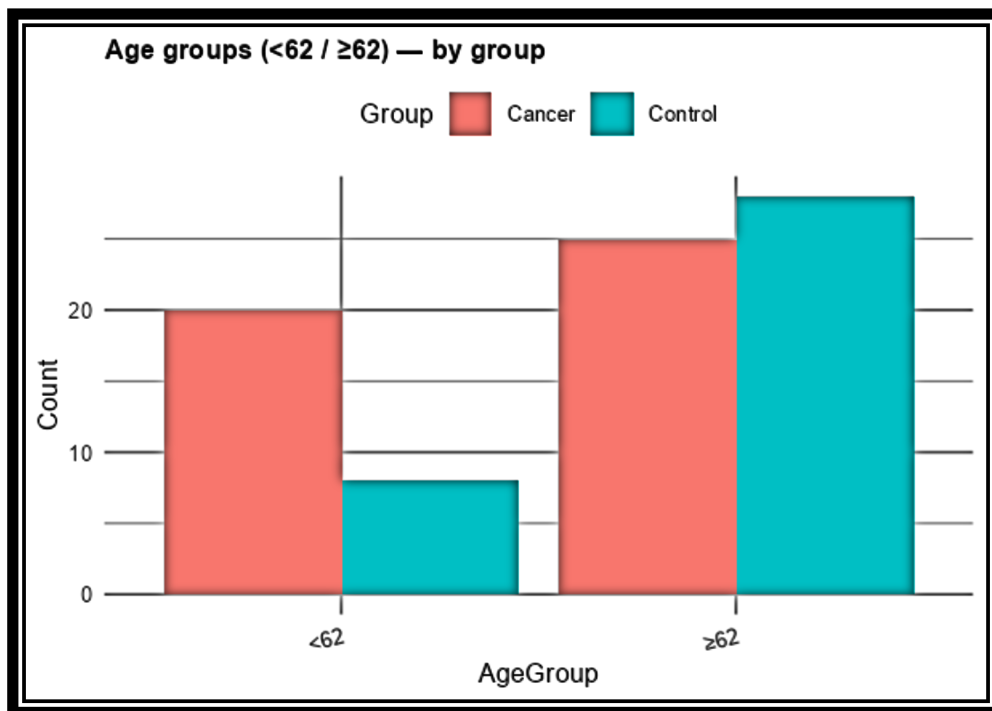
Διάγραμμα 7. Κατανομή του βαθμού κακοηθείας κατά Fuhrman (υψηλός ≥ 3 , χαμηλός ≤ 2) ανά γονότυπο XPC στους ασθενείς. Δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονότυπων, ωστόσο ο 266/266 (-/-) γονότυπος εμφανίζεται σε περισσότερους ασθενείς με χαμηλό βαθμό κακοηθείας.



Διάγραμμα 8. Κατανομή του βαθμού κακοηθείας κατά Fuhrman σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας του XPC PAT πολυμορφισμού.

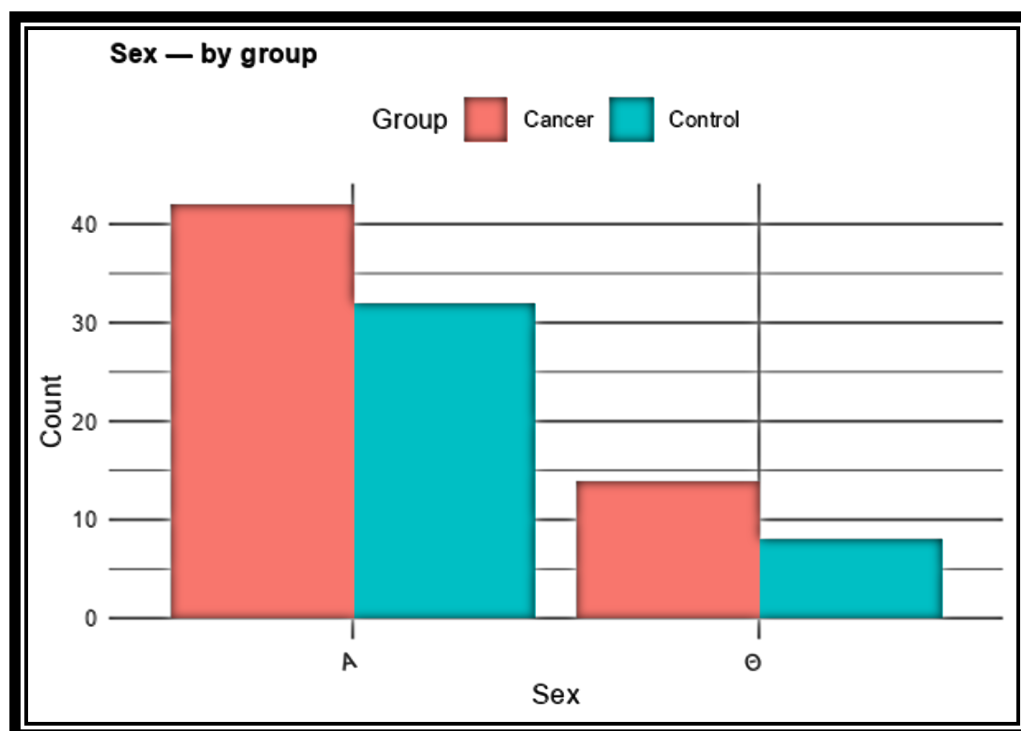
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 8 η κατανομή των γονοτύπων 266/344 (-/+) ή 344/344 (+/+) είναι παρόμοια σε ασθενείς με υψηλό ή χαμηλό βαθμό κακοηθείας κατά Fuhrman.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ασθενείς και τα υγιή άτομα κατανεμήθηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες, < 62 ετών και ≥ 62 ετών. Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 9) παρατηρείται μία μικρή υπεροχή νεότερων ατόμων στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



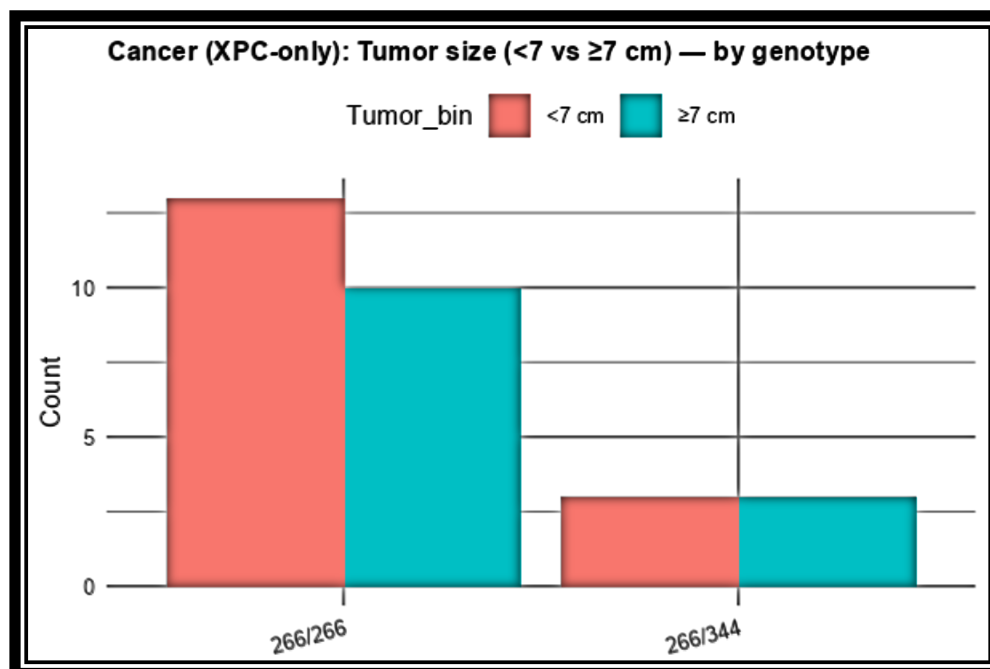
Διάγραμμα 9. Κατανομή των ηλικιακών ομάδων (<62 έναντι ≥62 ετών) σε ασθενείς και υγιή άτομα.

Η κατανομή του φύλου στις δύο ομάδες που εξετάσαμε είναι παρόμοια. Τα άρρενα άτομα αποτελούν την πλειονότητα και στις δύο ομάδες και υπερέρχουν ελαφρά στην ομάδα των ασθενών (Διάγραμμα 10).



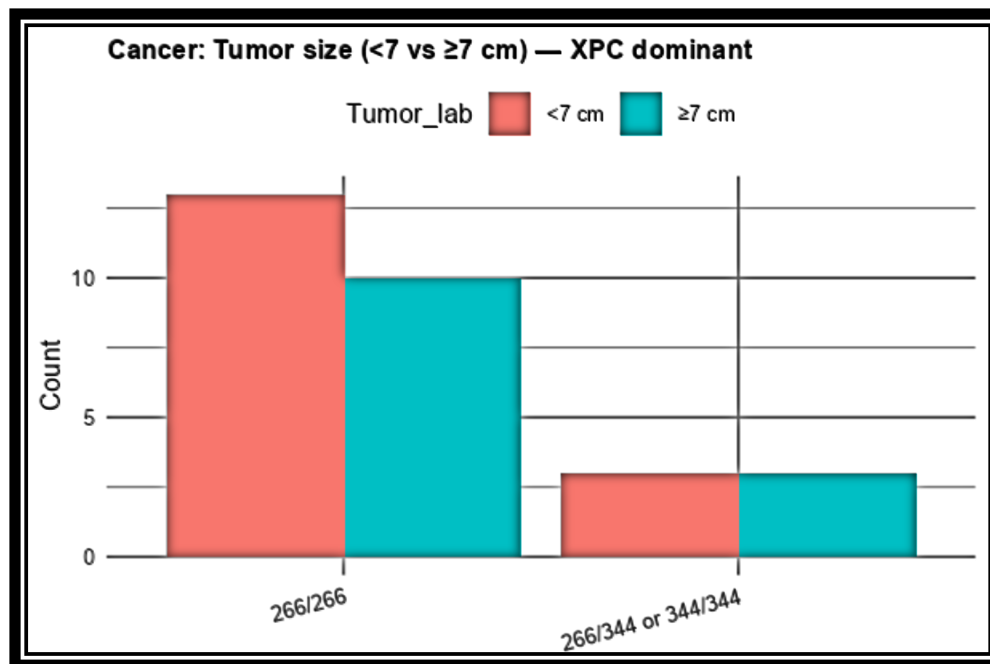
Διάγραμμα 10. Κατανομή του φύλου στις ομάδες των ασθενών και των υγιών ατόμων.

Όσον αφορά το μέγεθος του όγκου, οι όγκοι κατηγοριοποιήθηκαν σε ≥ 7 εκατοστά και < 7 εκατοστά. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με άλλες παραμέτρους όπως το φύλο και η ηλικία ή τους γονοτύπους του πολυμορφισμού XPC PAT (Διαγράμματα 11, 12, 13).

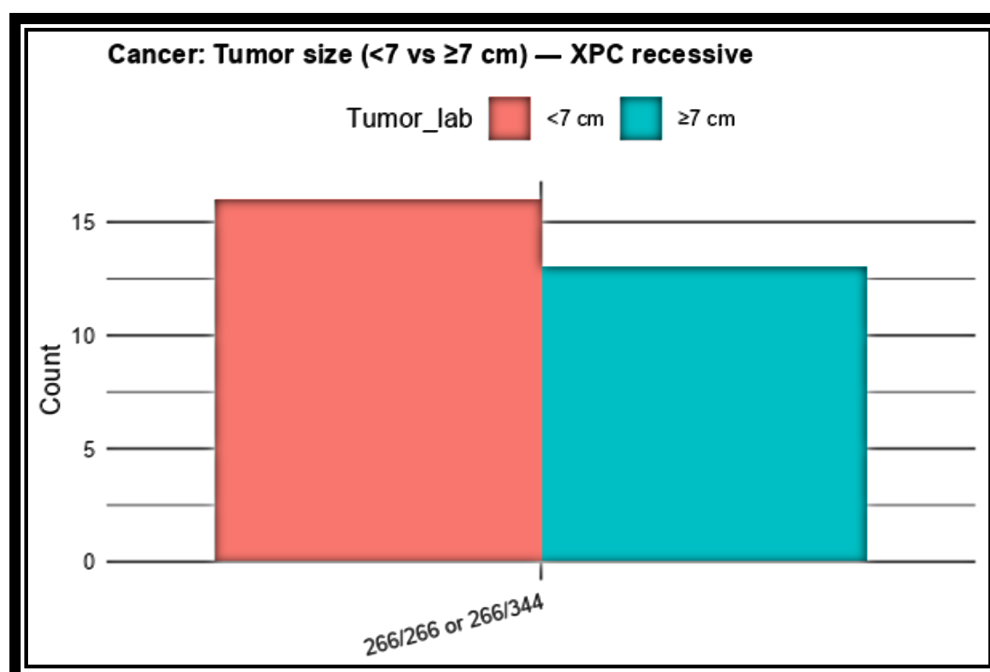


Διάγραμμα 11. Κατανομή του μεγέθους όγκου (≥ 7 εκατοστά έναντι < 7 εκατοστά) σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό XPC PAT στους ασθενείς. Παρατηρείται ισορροπημένη κατανομή μικρού και μεγάλου μεγέθους όγκων σε όλους τους γονότυπους, χωρίς εμφανείς διαφορές.

Η ανάλυση τόσο του επικρατούς όσο και του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας δεν αναδεικνύουν διαφορές ως προς τη συσχέτιση του μεγέθους του όγκου με το γονότυπο. Στην περίπτωση του επικρατούς μοντέλου η αναλογία των μικρού και μεγάλου μεγέθους όγκων στις γονοτυπικές κατηγορίες είναι παρόμοια (Διάγραμμα 12). Κατά την ανάλυση του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας στην συντριπτική πλειονότητα των ασθενών, ανεξαρτήτως του μεγέθους του όγκου, ο πολυμορφισμός απουσιάζει (γονότυπος -/-) ή υπάρχει σε ετεροζυγωτία (γονότυπος +/-) (Διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 12. Κατανομή του μεγέθους του όγκου σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό XPC PAT στους ασθενείς.

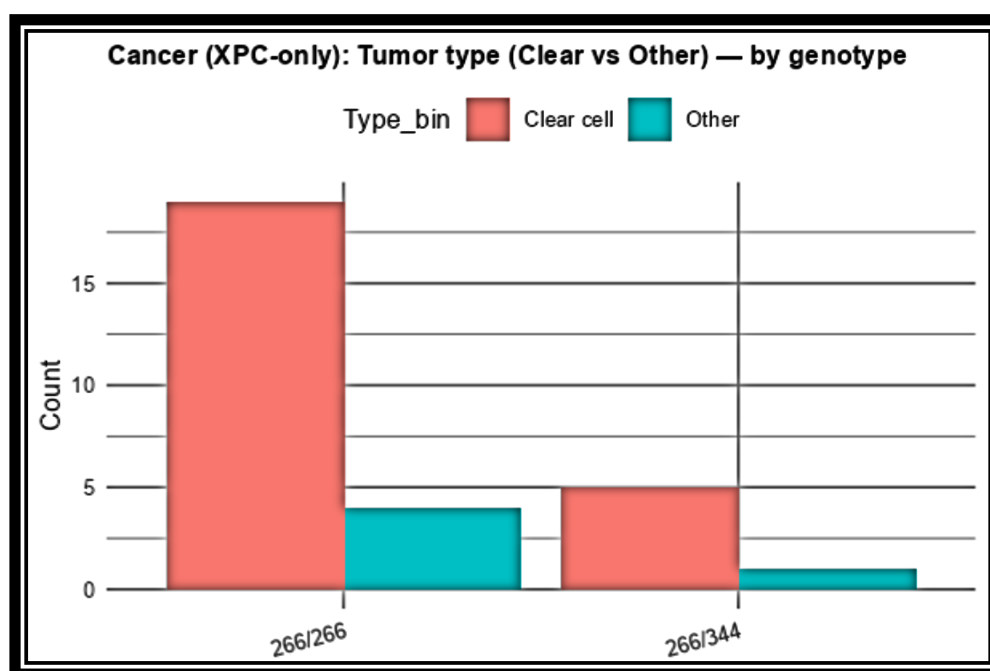


Διάγραμμα 13. Κατανομή του μεγέθους του όγκου σύμφωνα με το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό XPC PAT στους ασθενείς.

Αναφορικά με τον ιστολογικό υπότυπο, η πλειοψηφία των ασθενών φέρουν διαυγοκυτταρικό καρκίνο νεφρού. Η διάκριση του διαυγοκυτταρικού έναντι οποιουδήποτε άλλου υποτύπου σε συνάρτηση με την κατανομή του πολυμορφισμού XPC-PAT δεν ανέδειξε κάποιο στατιστικώς σημαντικό εύρημα.

Ο διαυγοκυτταρικός τύπος φαίνεται ότι κυριαρχεί σε όλους τους γονότυπους. Ο γονότυπος 266/266 (-/-) εμφανίζει την τάση να εντοπίζεται σε ασθενείς με άλλους ιστολογικούς υποτύπους πλην του διαυγοκυτταρικού υποτύπου. Ωστόσο, το εύρημα αυτό χρήζει ελέγχου σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Αναφορικά με το φύλο, αξίζει να σημειωθεί ότι το θηλυκό φύλο παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά αυξημένες πιθανότητες να φέρει άλλον ιστολογικό τύπο πέραν του διαυγοκυτταρικού υποτύπου ($OR=25,482$, $p=0,025$). Ωστόσο, το εύρημα αυτό συνοδεύεται από ευρεία διαστήματα εμπιστοσύνης λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων και χρήζει προσοχής για περαιτέρω αξιολόγηση.



Διάγραμμα 14. Κατανομή του ιστολογικού υποτύπου των ασθενών (διαυγοκυτταρικός έναντι υπολοίπων) σε συνάρτηση με τους γονότυπους του πολυμορφισμού XPC PAT στους ασθενείς.

Η στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό rs13181 του *XPB* γονιδίου (εξώνιο 23) δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, τόσο για το επικρατές όσο και για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας, καθώς ο αριθμός των ασθενών που τα δείγματά τους ενισχύθηκαν επιτυχώς ήταν μικρός. Ομοίως, δεν αναδείχθηκαν ευρήματα στατιστικώς σημαντικά για παραμέτρους όπως το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοηθείας κατά και ο ιστολογικός υπότυπος των όγκων που έφεραν οι ασθενείς. Τα ευρεία διαστήματα εμπιστοσύνης που παρατηρήθηκαν αντικατοπτρίζουν την αβεβαιότητα λόγω του περιορισμένου μεγέθους δείγματος.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν εμφανώς την προστατευτική δράση του πολυμορφισμού XPC PAT. Ο γονότυπος 344/344 (+/+) παρουσιάζεται σπανιότερα στους ασθενείς και συνδέεται με στατιστικώς σημαντική μείωση της πιθανότητας εμφάνισης νόσου. Οι πολυμορφισμοί rs1799793 και rs13181 του γονιδίου *XPB*, που απαντούν στα εξώνια 10 και 23 αντίστοιχα, δεν φάνηκε να έχουν συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του νεφρού. Για κανέναν από τους πολυμορφισμούς που εξετάσαμε δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις με

παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοηθείας κατά Fuhrman και ο ιστολογικός υπότυπος του όγκου. Παρατηρήσαμε ωστόσο μία τάση σχετικά με τη συσχέτιση της ηλικίας με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας κατά Fuhrman, αλλά και του θηλυκού φύλου με τον μη διαυγοκυτταρικό ιστολογικό υπότυπο.

5.Συζήτηση

Ο νεφροκυτταρικός καρκίνος (RCC) αποτελεί έναν από τους συχνότερους καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος με αυξανόμενη επίπτωση παγκοσμίως (16,17). Παρά τις σημαντικές πρόόδους στη θεραπεία με τη χρήση ανοσοθεραπείας και στοχευμένων θεραπειών, η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση παραμένουν κρίσιμες για τη βελτίωση της πρόγνωσης των ασθενών (18, 37). Στο πλαίσιο αυτό, η κατανόηση των γενετικών παραγόντων και μηχανισμών που επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου αποκτά ιδιαίτερη σημασία.

Η παρούσα μελέτη εξέτασε τη συσχέτιση των πολυμορφισμών XPC-PAT και rs1799793 (εξώνιο 10), rs13181 (εξώνιο 23) που εντοπίζονται στα γονίδια *XPC* και *XPB* του μηχανισμού επιδιόρθωσης NER με τον κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος στον ελληνικό πληθυσμό. Συλλέξαμε δείγματα από 67 ασθενείς και 40 υγιή άτομα, από τα οποία απομονώσαμε γενωμικό DNA. Ακολούθησε επιλεκτική ενίσχυση των τμημάτων που εμπεριείχαν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς και προσδιορισμός των γονοτύπων των ασθενών και των υγιών ατόμων, είτε έμμεσα, μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, είτε άμεσα με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου που αναγνωρίζει και τέμνει συγκεκριμένη αλληλουχία στο γενωμικό DNA. Τα ευρήματά μας αποκαλύπτουν μια σημαντική προστατευτική επίδραση του πολυμορφισμού XPC-PAT, ενώ οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου *XPB* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου.

Το κύριο εύρημα της μελέτης μας αφορά στην ισχυρή προστατευτική επίδραση του πολυμορφισμού XPC-PAT. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος 344/344 (+/+) συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκινώματος ($OR=0,034$, 95% CI: 0,00024-0,344, $p=0,0015$). Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτο καθώς ο γονότυπος 344/344 παρατηρήθηκε σχεδόν αποκλειστικά στα υγιή άτομα, υποδεικνύοντας έναν ισχυρό μηχανισμό γενετικής προστασίας. Η βιολογική βάση αυτού του ευρήματος χρειάζεται προσεκτική ερμηνεία. Ο πολυμορφισμός XPC-PAT αφορά σε μια εισαγωγή ακολουθίας poly (AT) στο ιντρόνιο 9 του γονιδίου *XPC* όπου το αλληλόμορφο 344 φέρει μεγαλύτερη ακολουθία AT σε σχέση με το 266 (49). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτός συγκεκριμένος πολυμορφισμός βρίσκεται σε ιντρόνιο και όχι σε κωδική περιοχή, επομένως δεν βλάπτει απαραίτητα την αμινοξική ακολουθία της *XPC* πρωτεΐνης.

Ωστόσο, η εισαγωγή της μεγαλύτερης ακολουθίας AT στο ιντρόνιο μπορεί να επηρεάζει τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου μέσω διαφόρων μηχανισμών. Παραδείγματος χάριν, οι poly(AT) ακολουθίες μπορούν να λειτουργήσουν ως ρυθμιστικά στοιχεία που επηρεάζουν την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, οδηγώντας σε αλλαγές στο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου (48). Δεύτερον, η παρουσία της μεγαλύτερης ακολουθίας μπορεί να επηρεάζει την επεξεργασία του pre-mRNA και την αποδοτικότητα του ματίσματος. Τρίτον, οι διαφορές στο μήκος της ακολουθίας AT ενδέχεται να μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης και την προσβασιμότητα του γονιδίου σε μεταγραφικούς παράγοντες.

Η ερμηνεία των ευρημάτων μας είναι ότι το αλληλόμορφο 344 (+) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση ή βελτιωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης *XPC*, προσφέροντας καλύτερη προστασία από τις βλάβες DNA και συνεπώς

μειωμένο κίνδυνο καρκίνου. Αυτό συνδέεται και με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη XPC αποτελεί βασικό "αισθητήρα" βλαβών DNA στο μονοπάτι Global Genome-Nucleotide Excision Repair (GG-NER) και ευθύνεται για την αναγνώριση των βλαβών που προκαλούνται από περιβαλλοντικούς καρκινογόνους παράγοντες (44).

Η ανάλυσή μας σε επικρατή και υπολειπόμενα μοντέλα επιβεβαίωσε την προστατευτική επίδραση. Στο επικρατές μοντέλο, η παρουσία του πολυμορφισμού σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος ($OR=0,261$, $p=0,025$), ενώ στο υπολειπόμενο μοντέλο η ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο 344 (+) έδειξε ακόμη ισχυρότερη προστασία ($OR=0,0396$, $p=0,00223$). Φαίνεται να υπάρχει ενδεχομένως μία δόσοεξαρτώμενη επίδραση και η αυξημένη παρουσία του "προστατευτικού" αλληλομόρφου (ομοζυγωτία) προσφέρει αυξημένη προστασία.

Στη βιβλιογραφία έχουν παρατηρηθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα για τον XPC-PAT πολυμορφισμό σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Κάποιες μελέτες έδειξαν αυξημένο κίνδυνο, άλλες μειωμένο, και άλλες καμία επίδραση. Συγκεκριμένα σε αναλύσεις που αφορούσαν πολλά διαφορετικά είδη καρκίνων, ο πολυμορφισμός PAT δεν φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας, αλλά τα δεδομένα για τον καρκίνο του νεφρού είναι ελάχιστα (50). Αντιθέτως, σε άλλους καρκίνους έχουν παρατηρηθεί μικρές αλλά υπαρκτές επιδράσεις του XPC-PAT πολυμορφισμού. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μετα-ανάλυση του καρκίνου του πνεύμονα βρέθηκε ότι οι ομόζυγοι φορείς του PAT- φυσιολογικού γονότυπου είχαν σημαντικά μειωμένο κίνδυνο σε σύγκριση με τους φορείς του πολυμορφισμού PAT+ σε Καυκάσιους πληθυσμούς (51). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ένθεση των νουκλεοτιδίων αυξάνει ελαφρώς την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Παρόμοιες ενδείξεις έχουν αναφερθεί και για άλλες μορφές καρκίνου (π.χ. κεφαλής και τραχήλου) σε συγκεκριμένες ομάδες, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι ομοιογενή (50). Αυτή η φαινομενική αντίφαση μπορεί να επιλυθεί μέσω της κατανόησης των πολλαπλών βιολογικών μηχανισμών που μπορούν να εμπλέκονται.

Η ετερογένεια που καταγράφεται μεταξύ των διαφόρων μελετών ενδέχεται να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες. Οι διαφορές στους πληθυσμούς είναι κρίσιμες και το γενετικό προφίλ των διαφορετικών εθνοτήτων μπορεί να επηρεάζει την έκφραση του φαινότυπου μέσω διαφορετικών συνδυασμών και άλλων γενετικών παραλλαγών. Επιπρόσθετα, οι αλληλεπιδράσεις με περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορούν να είναι καθοριστικές και ο ίδιος πολυμορφισμός να έχει διαφορετική επίδραση αναλόγως με την έκθεση σε διαφορετικούς καρκινογόνους παράγοντες. Αξίζει άλλωστε να σημειωθεί ότι ενδέχεται να υπάρχουν ειδικές ανά όργανο επιδράσεις (organ-specific effects), η ίδια δηλαδή γενετική παραλλαγή ενδέχεται να επιδρά διαφορετικά στους διαφορετικούς ιστούς. Τέλος, ο πολυμορφισμός XPC-PAT μπορεί να βρίσκεται σε δηλαδή ανισορροπία σύνδεσης με άλλες γενετικές παραλλαγές που έχουν τη πραγματική λειτουργική επίδραση.

Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει αντίστοιχη μελέτη του RCC σε ελληνικό πληθυσμό καθιστώντας την δικιά μας ως την πρώτη. Στον ελληνικό πληθυσμό, με βάση τη δική μας μελέτη και για τον καρκίνο νεφρού συγκεκριμένα, φαίνεται ότι το αλληλόμορφο 344 (+) ασκεί ισχυρή προστατευτική δράση, πιθανότατα μέσω της βελτιωμένης λειτουργίας του συστήματος επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι ο νεφρός, ως όργανο

αποτοξίνωσης, είναι συνεχώς εκτεθειμένος σε τοξικές ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA (42,46).

Σε αντίθεση με τα ευρήματα για τον XPC PAT πολυμορφισμό, οι πολυμορφισμοί rs1799793 και rs13181, στα εξώνια 10 και 23 αντίστοιχα του XPD γονιδίου, του δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τον κίνδυνο καρκίνου νεφρού. Για τον πολυμορφισμό rs13181 του γονιδίου, παρατηρήθηκε μία μη στατιστικώς σημαντική τάση αυξημένου κινδύνου στο επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (OR=3,642, $p=0,079$), ενώ στην περίπτωση του πολυμορφισμού rs1799793, όλα τα άτομα των δύο ομάδων (ασθενείς- υγιή άτομα) είχαν τον ίδιο γονότυπο, γεγονός που δεν επέτρεψε περαιτέρω ανάλυση και στατιστική επεξεργασία.

Οι μελέτες σχετικά με τη σύνδεση των προαναφερθέντων πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος παρουσιάζουν αντικρουόμενα ευρήματα υποδεικνύοντας την μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται γεωγραφικά. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που έγινε σε πληθυσμό Καυκάσιων -325 ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο και 335 υγιή άτομα, ως ομάδα ελέγχου- διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του αλληλόμορφου ασπαραγίνης στη θέση 312 συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Οι φορείς του πολυμορφισμού (γονότυπος Asp/Asn) είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου συγκριτικά με τα άτομα που έφεραν σε ομοζυγωτία το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ (γονότυπος Asp/Asp) (55). Σε ανάλογη μελέτη στην Ιαπωνία (215 περιπτώσεις RCC, 215 υγιή άτομα) δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την κατανομή των γονοτύπων Asp312Asn ή Lys751Gln στις δύο ομάδες. Ωστόσο σημειώθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν περισσότερα από 3 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα λόγω πολυμορφισμών σε γονίδια επιδιόρθωσης είχαν μικρότερη εξάπλωση του όγκου τοπικά και βελτιωμένη επιβίωση ιδιαίτερα των καπνιστών. Μία πιθανή ερμηνεία του ανωτέρω ευρήματος είναι ότι κάπνισμα, σε συνδυασμό με ταυτόχρονες μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς συσσωρεύει βλάβες και ενεργοποιεί ταχύτερα τον μηχανισμό της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό την εξάπλωση του όγκου (57). Από όσο γνωρίζουμε και για αυτούς τους πολυμορφισμούς, δεν υπάρχει αντίστοιχη έρευνα σε ελληνικό πληθυσμό για τον RCC, ωστόσο η δικιά μας απουσία στατιστικής σημαντικότητας απαιτεί μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Η απουσία στατιστικής σημαντικότητας για τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο XPD θα μπορούσε να ερμηνευτεί από διάφορες οπτικές. Η XPD πρωτεΐνη, παρότι αποτελεί βασικό συστατικό του TFIIH συμπλόκου και συμμετέχει στη διαδικασία του μηχανισμού επιδιόρθωσης NER, όσο και στη μεταγραφή, εμφανίζει διαφορετικούς ρόλους σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Είναι πιθανόν οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί να μην έχουν σημαντική λειτουργική επίδραση στην εμφάνιση καρκίνου του νεφρού, τουλάχιστον στον ελληνικό πληθυσμό. Επιπρόσθετα, σημαντικό μειονέκτημα της δικής μας μελέτης είναι το μικρό μέγεθος του δείγματός μας. Αυτό βέβαια ισχύει και για άλλες ανάλογες μελέτες που έχουν διεξαχθεί, καθώς απαιτείται ένας εξαιρετικά μεγάλος αριθμός δειγμάτων, που να μπορεί ενδεχομένως να υπερκεράσει τη γεωγραφική ετερογένεια και να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τον ρόλο των εν λόγω πολυμορφισμών.

Η ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ των γονότυπων και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών παρείχε σημαντικές πρόσθετες πληροφορίες. Αν και δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών και παραμέτρων, όπως ο βαθμός κακοηθείας κατά Fuhrman, το μέγεθος του όγκου ή ο ιστολογικός υπότυπος, εντούτοις διαφαίνονται ενδιαφέρουσες τάσεις που ενδεχομένως αποδειχτούν στατιστικώς σημαντικές σε μεγαλύτερο εύρος δειγμάτων.

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το εύρημα ότι η ηλικία ≥ 62 ετών συσχετίστηκε ισχυρά με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας κατά Fuhrman ($OR=16,936$, $p=0,017$). Το εύρημα αυτό είναι απολύτως λογικό και σε πλήρη συμφωνία με την επιδημιολογική βιβλιογραφία που δείχνει ότι η ηλικία αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο νεφρού (32,33). Επιπρόσθετα, η παρατήρηση ότι τα θήλεα άτομα που νοσούσαν είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν άλλον ιστολογικό υπότυπο πέραν του διαυγοκυτταρικού υποτύπου ($OR=25,482$, $p=0,025$), είναι συμβατή με τις γνωστές διαφορές ως προς την κατανομή των ιστολογικών υποτύπων μεταξύ των φύλων (26, 27).

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρουμε τους περιορισμούς της μελέτης μας. Αρχικά, το μέγεθος του δείγματός μας (67 ασθενείς και 40 υγιή άτομα) είναι σχετικά μικρό για μια μελέτη γενετικής συσχέτισης. Αυτός ο περιορισμός φαίνεται ιδιαίτερα στις αναλύσεις των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών, όπου ο μικρός αριθμός δειγμάτων στις επιμέρους υποομάδες οδήγησε σε ευρεία διασπέρση εμπιστοσύνης. Επιπρόσθετα, η μελέτη περιορίστηκε σε συγκεκριμένους πολυμορφισμούς και δεν εξέτασε άλλες γενετικές παραλλαγές στο σύνολο των γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό επιδιόρθωσης NER. Ένα ακόμη κρίσιμο μειονέκτημα ήταν η απουσία πληροφοριών σχετικά με περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η διατροφή ή η επαγγελματική έκθεση, που θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με τους γενετικούς πολυμορφισμούς.

Τα ευρήματά μας έχουν σημαντικές κλινικές και ερευνητικές προεκτάσεις. Από κλινική άποψη, ο προσδιορισμός του γονότυπου του XPC PAT πολυμορφισμού θα μπορούσε θεωρητικά να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του κινδύνου και την προσαρμογή προγραμμάτων screening σε άτομα υψηλού κινδύνου. Ωστόσο, πριν από κάθε κλινική εφαρμογή, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μεγαλύτερες μελέτες επικύρωσης σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Στα πλαίσια της έρευνας, τα αποτελέσματα που προκύπτουν στην παρούσα μελέτη υπογραμμίζουν τη σημασία της περαιτέρω διερεύνησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA στον καρκίνο νεφρού. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εξετάσουν τους λειτουργικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων ο XPC PAT πολυμορφισμός επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου, να διερευνήσουν επιπλέον πολυμορφισμούς στο μονοπάτι NER, ή να αξιολογήσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να γίνουν φαρμακογονιδιωματικές μελέτες και να εξετασθεί εάν οι συγκεκριμένοι γονότυποι ενδέχεται να επηρεάζουν την απόκριση στη θεραπεία ή την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο νεφρού. Δεδομένου ότι οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, η ανάλυση των γονοτύπων που αφορούν σε πολυμορφισμούς εμπλεκόμενων γονιδίων θα

μπορούσε να έχει θεραπευτικές επιπτώσεις, ιδιαίτερα στη σύγχρονη εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής (18,37).

Βιβλιογραφία

- (1) Πισίδης, Αλ. *Ανατομική: Βασικές γνώσεις*, Λύχνος
- (2) Danijel Tosovic ,”*Anatomy-Histology of the urinary system*” ,kenhub.com
- (3) Knapp, Sarah. “*Urinary System – Definition, Function and Organs.*” ,Biology Dictionary, 28 Oct. 2020, <https://biologydictionary.net/urinary-system/>.
- (4) Sherwood, Lauralee. *Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου: Από τα κύτταρα στα συστήματα*. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2016.
- (5) Boron, Walter F., and Emile L. Boulpaep. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. 2nd ed., Saunders, 2012.
- (6) Yale. “*Systems Cell Biology @ Yale: Urinary System Lab.*” *medcell.org*.
- (7) Cenveo. *Renal Circulation*. AnatomyTOOL.org, Public Domain, licensed under CC BY 4.0 International
- (8) Ιωαννίδης, Ηρακλής. *Επίτομη Κλινική Νεφρολογία*, Ροτόντα, 2007.
- (9) Murray IV, Paolini MA. *Histology, Kidney and Glomerulus*. StatPearls
- (10) Lennon R , Randles M. , Humphries M. *The Importance of Podocyte Adhesion for a Healthy Glomerulus*. Frontiers in Endocrinology, 2014
- (11) Team PhysiologyWeb, P. (n.d.). Physiology image: Renal corpuscle. https://www.physiologyweb.com/figures/physiology_image_TvKclccyvFuilvXAWDRXu5GuzkBK8RHt_renal_corpuscle.html
- (12) Ogobuiro, Ifeanyichukwu. and Faiz Tuma. “Physiology, Renal.” *StatPearls*, StatPearls Publishing, 24 July 2023.
- (13) LibreTexts.,41.12: *Human Osmoregulatory and Excretory Systems - Kidney Function and Physiology. Biology LibreTexts*, Libretexts, [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/General_Biology_\(Boundless\)/41%3A_Osmotic_Regulation_and_the_Excretory_System/41.12%3A__Human_Osmoregulatory_and_Excretory_Systems_-_Kidney_Function_and_Physiology](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/General_Biology_(Boundless)/41%3A_Osmotic_Regulation_and_the_Excretory_System/41.12%3A__Human_Osmoregulatory_and_Excretory_Systems_-_Kidney_Function_and_Physiology).
- (14) Joseph S. Meltzer, *40-Renal Physiology, Pharmacology and Physiology for Anesthesia (Second Edition)*,2019
- (15) Rinschen, Markus M., et al. *Overview. Metabolism of Human Diseases*, edited by Eckhard Lammert and Martin Zeeb, Springer, 2014
- (16) Sung, Hyuna, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, vol. 71, no. 3, 2021, pp. 209–249
- (17) International Agency for Research on Cancer. *Kidney Fact Sheet, GLOBOCAN 2022*. Global Cancer Observatory, World Health Organization,

2023. <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/29-kidney-fact-sheet.pdf>.

(18) Kim, Hyeong, et al. "Loss of Von Hippel–Lindau (VHL) Tumor Suppressor Gene Function: VHL–HIF Pathway and Advances in Treatments for Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC)." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 18, 2021, p. 9795. <https://doi.org/10.3390/ijms22189795>.

(19) Casuscelli, Jozefina et al. "Molecular Classification of Renal Cell Carcinoma and Its Implication in Future Clinical Practice." *Kidney cancer (Clifton, Va.)* vol. 1,1 3-13. 26 Jul. 2017, doi:10.3233/KCA-170008

(20) Fior, Rita, and Rita Zilhão, editors. *Molecular and Cell Biology of Cancer: When Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet*. Springer, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9>.

(21) Singh, Harmanjot, et al. "Hereditary Renal Cell Tumors: Clinicopathologic Importance." *Annals of Urologic Oncology*, vol. 4, no. 1, 2021, pp. 18–30. <https://doi.org/10.32948/auo.2021.10.15>.

(22) Cote, Michele L et al. "Cigarette smoking and renal cell carcinoma risk among black and white Americans: effect modification by hypertension and obesity." *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* vol. 21,5 (2012): 770-9. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-1109

(23) Zhang, Shaojin, et al. "Body Mass Index, Weight Change, and Risk and Survival in Renal Cell Carcinoma: A Prospective Study." *European Urology*, vol. 81, no. 5, 2022, pp. 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.10.031>

(24) Sá, Isabel et al. "Kidney cancer. Heavy metals as a risk factor." *Porto biomedical journal* vol. 1,1 (2016): 25-28. doi:10.1016/j.pbj.2016.03.006

(25) Karami, Sara et al. "Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer risk: a meta-analysis." *Occupational and environmental medicine* vol. 69,12 (2012): 858-67. doi:10.1136/oemed-2012-100932

(26) Mubarak, Muhammed, and Rahma Rashid. "Updates from the 2022 WHO Classification of Kidney Epithelial Tumors." *Journal of Clinical and Translational Pathology*, vol. 4, no. 2, 2024, pp. 70–75.

(27) Raghavan, A. A., Gibson, I. W., Wightman, R., Czaykowski, P., and Graham, J. "Redefining Renal Cell Carcinoma: A Molecular Perspective on Classification and Clinical Implications." *European Medical Journal*, vol. 8, no. 1, 2023, pp. 116–123. <https://doi.org/10.33590/emj/10301071>

(28) American Cancer Society. Kidney Cancer, Available at: <https://www.cancer.org/cancer/kidney-cancer.html>.

- (29) Amin, Mahul B et al. "The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging." *CA: a cancer journal for clinicians* vol. 67,2 (2017): 93-99. doi:10.3322/caac.21388
- (30) "Καρκίνος Νεφρού – Επιδημιολογία, Διάγνωση και Παράγοντες Κινδύνου." *MyUrology.eu*, Ιατρείο Ουρολογίας, <https://myurology.eu/καρκίνος-νεφρού/>
- (31) Seker, N. S., et al. "A New Grading for Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Combined WHO/ISUP Grading System." *International Journal of Pediatric Research*, vol. 6, 2020, p. 116, doi:10.23937/2469-5807/1510116.
- (32) Patel, Hiren V et al. "Strengthening the foundation of kidney cancer treatment and research: revising the AJCC staging system." *Annals of translational medicine* vol. 7, Suppl 1 (2019): S33. doi:10.21037/atm.2019.02.19
- (33) Gallardo, E et al. "SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2017)." *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* vol. 20,1 (2018): 47-56. doi:10.1007/s12094-017-1765-4
- (34) *EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Congress, Madrid 2025. ISBN 978-94-92671-29-5.*
- (35) Rizkalla C, Tretiakova M. Grading. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantnucleargrading.html>.
- (36) Klatte, Tobias, et al. "Prognostic Factors and Prognostic Models for Renal Cell Carcinoma: A Literature Review." *World Journal of Urology*, vol. 36, no. 12, 2018, pp. 1943–1952. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2309-4>.
- (37) Chen, Yu-Wei et al. "Treatment Landscape of Renal Cell Carcinoma." *Current treatment options in oncology* vol. 24,12 (2023): 1889-1916. doi:10.1007/s11864-023-01161-5
- (38) Clinician Summary: Management of Renal Masses and Localized Renal Cell Carcinoma: Current State of the Evidence. Content last reviewed December 2019. Effective Health Care Program, Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. <https://effectivehealthcare.ahrq.gov/products/renal-cancer/clinician>
- (39) American College of Radiology. *ACR Appropriateness Criteria®: Post-Treatment Follow-Up and Active Surveillance of Clinically Localized Renal Cell Carcinoma*. 2021.
- (40) Ray, Shagnik et al. "Active Surveillance for Small Renal Masses." *Reviews in urology* vol. 22,1 (2020): 9-16.

- (41) Basudan, Abdullah M. "The Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy." *Clinics and Practice*, vol. 13, no. 1, 2023, pp. 22–40. <https://doi.org/10.3390/clinpract13010003>.
- (42) Watson, James D., et al. *Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου*, Εκδόσεις Utopia, 2017.
- (43) Hartwell, Leland H., et al. *Γενετική: Από τα Γονίδια στα Γονιδιώματα*. Μετάφραση στα ελληνικά, επιμέλεια Χρ. Δελάκης, Γεωρ. Γαρίνης, Αικ. Κομπόπουλου, Εμ. Λαδουκάκης. Εκδόσεις Utopia, 2014.
- (44) Puumalainen, Marjo-Riitta et al. "Xeroderma pigmentosum group C sensor: unprecedented recognition strategy and tight spatiotemporal regulation." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 73,3 (2016): 547-66. doi:10.1007/s00018-015-2075-z
- (45) Chatterjee, Nimrat, and Graham C Walker. "Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis." *Environmental and molecular mutagenesis* vol. 58,5 (2017): 235-263. doi:10.1002/em.22087
- (46) Kaur, Simarna, et al. "Regulation of DNA Repair Process by the Pro-Inflammatory NF-κB Pathway." *New Research Directions in DNA Repair*, edited by Clark Chen, IntechOpen, 2013, chap. 8, <https://doi.org/10.5772/54341>
- (47) Zacharyus, Adrien, et al. "Nucleotide Excision Repair (NER): The Complex Crossroads of Transcription-Coupled Repair and Cancer." *Genes*, vol. 16, no. 2, 2025, article 231, <https://doi.org/10.3390/genes16020231>
- (48) Bidon, B et al. "XPC is an RNA polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1." *Nature communications* vol. 9,1 2610. 4 Jul. 2018, doi:10.1038/s41467-018-05010-0
- (49) The polyAT, intronic IVS11-6 and Lys939Gln XPC polymorphisms are not associated with transitional cell carcinoma of the bladder -British Journal of Cancer
https://www.nature.com/articles/6602616?error=cookies_not_supported&code=c1cee26c-297d-44ba-a7be-f80073c6fa57
- (50) Zhang, D., Chen, C., Fu, X. et al. A meta-analysis of DNA repair gene XPC polymorphisms and cancer risk. *J Hum Genet* **53**, 18–33 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0215-5>
- (51) Jin, Bo et al. "Association of XPC polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis." *PloS one* vol. 9,4 e93937. 15 Apr. 2014, doi:10.1371/journal.pone.0093937
- (52) Sameer, Aga Syed, and Saniya Nissar. "XPD—The Lynchpin of NER: Molecule, Gene, Polymorphisms, and Role in Colorectal Carcinogenesis." *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 5, 2018, p. 23. Frontiers, <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2018.00023>

- (53) Peng, Qiliu et al. "Association between XPD Lys751Gln and Asp312Asn polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk: a systematic review and meta-analysis." *Medicine* vol. 93,29 (2014): e330. doi:10.1097/MD.0000000000000330
- (54) Baccarelli, A., Calista, D., Minghetti, P. et al. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. *Br J Cancer* 90, 497–502 (2004). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601385>
- (55) Lin, Jie et al. "Case-control analysis of nucleotide excision repair pathway and the risk of renal cell carcinoma." *Carcinogenesis* vol. 29,11 (2008): 2112-9. doi:10.1093/carcin/bgn189
- (56) Loghin, Andrada et al. "XRCC3 Thr241Met and XPD Lys751Gln gene polymorphisms and risk of clear cell renal cell carcinoma." *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* vol. 16,2 (2016): 211-7. doi:10.3233/CBM-150558
- (57) Sakano, S et al. "The association of DNA repair gene polymorphisms with the development and progression of renal cell carcinoma." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 18,11 (2007): 1817-27. doi:10.1093/annonc/mdm337