



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ “ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: “Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των υπεροξειδασών γλουταθειόνης GRxs (Glutathione Peroxidases) των σεληνοπρωτεϊνών και των πολυμορφισμών των γονιδίων τους στον καρκίνο του παχέος εντέρου”.

Σοφία Παπαηλία

#### Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία
- Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας
- Χαριτίνη Νέπκα, Ιατρός - Κυτταροπαθολόγος

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Τοξικολογία

Λάρισα, 2018

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, του τμήματος Ιατρικής της σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Υπεύθυνη και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας ήταν η κα. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία. Δε θα μπορούσα να μην αναφέρω την κα. Λιάκου Ζωή, βιοχημικό και συνεργάτη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε και την άριστη συνεργασία, τις κυρίες Μαρία Παπαθανασίου και Κατερίνα Χατζούλη, υποψήφιος διδάκτορες του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, καθώς και τις κυρίες Κωνσταντίνα Παπαχαλαράμπους, Ιατρό Παθολογοανατόμο και Χρυσούλα Γαλάνη τεχνολόγο του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας και ομαδικότητας που αναπτύχθηκε μεταξύ μας. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κύριο Ιωάννη Λέτσιο για τη σημαντική βοήθεια που παρείχε στη συλλογή και αρχική επεξεργασία των δειγμάτων. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω όλους τους, αλλά και τον κάθε έναν ξεχωριστά, αρχικά για την ευκαιρία που μου δόθηκε να γίνω μέλος μιας λειτουργικής ερευνητικής ομάδας, με πολλαπλά αντικείμενα μελέτης και πολύ υγιές περιβάλλον εργασίας, έπειτα για την διαθεσιμότητά τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου, όσον αφορά στην καθοδήγησή μου για την κατανόηση του θέματος αλλά και την τεχνική κατάρτισή μου, καθώς και για το επιστημονικό υλικό στο οποίο μου παρείχαν πρόσβαση. Η βοήθεια ερχόταν ποικιλοτρόπως και εγκαίρως, κάτι το οποίο θεωρείται σημαντικότερο στον επιστημονικό κλάδο.

Σημαντικό θεωρώ επίσης να ευχαριστήσω όλο το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό του εργαστηρίου και κυρίως το Διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, κύριο Γεώργιο Κουκούλη, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής για τη φιλοξενία του στο εργαστήριο. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης στον κο. Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών και Τοξικολογίας, και Διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος, που μου επέτρεψε να επιλέξω το θέμα και το συνεργαζόμενο εργαστήριο για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ σε οικογένεια και φίλους, για την κατανόηση και υποστήριξή τους, όλο αυτό το διάστημα, υλική και ηθική. Οι ώρες που αφιερώνει κανείς μέσα σε ένα εργαστήριο, πάντα στερούν χρόνο με όσους βρίσκονται έξω από αυτό. Ευχαριστώ που ο λίγος χρόνος που απέμενε μαζί τους, ήταν ποιοτικός και ουσιαστικός...

Χωρίς όλους τους παραπάνω, η συγκεκριμένη εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί ποτέ. Ευχαριστώ...

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Summary	5
1. Γενικό μέρος	6
1.1 Καρκίνος του παχέος εντέρου - Επιδημιολογικά στοιχεία	6
1.2 Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου παχέος εντέρου	7
1.3 Παράγοντες καρκινογένεσης του παχέος εντέρου	9
1.3.1 Εξωγενείς παράγοντες	9
1.3.2 Ενδογενείς παράγοντες	10
1.4 Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια καρκινογένεσης παχέος εντέρου	10
1.4.1 Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN)	10
1.4.2 Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Instability, MSI)	11
1.4.3 Το μονοπάτι των RAS/RAF/MAP κινασών	12
1.5 Μηχανισμοί καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες	13
1.5.1 Ελεύθερες ρίζες	14
1.5.2 Εξωγενείς πηγές	16
1.5.3 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών και οξειδωτικό στρες	18
1.5.4 Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	19
1.5.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	20
1.6 Σεληνοπρωτεΐνες	21
1.6.1 Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 (GPx1)	25
1.6.2 Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 3 (GPx3)	25
1.6.3 Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 4 (GPx4)	26
1.6.4 Η σεληνοπρωτεΐνη P (SEPP1)	26
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
2.1 Υλικά μελέτης	28
2.2 Μεθοδολογία	28
2.2.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction) από FFPE ιστό	28
2.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος DNA	30
2.2.2.1 Φωτομέτρηση	30
2.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	30
2.2.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης	30
2.2.4 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης	31
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction, PCR)	32
2.4 Καθαρισμός και αλληλούχιση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο SEPP1	34
2.4.1 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης (QIAquick Gel extraction)	34
2.4.2 Αλληλούχιση του PCR προϊόντος του SEPP1 γονιδίου σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού rs7579	35
2.5 Πέψη με περιοριστικό ένζυμο	35
2.6 Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των GPx1, GPx3 και GPx4 πρωτεϊνών	36
2.6.1 Γενικό πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
3.1 Έκφραση των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης GPx1, GPx3 και GPx4	39
3.2 Μελέτη των πολυμορφισμών rs713041 και rs7579 των γονιδίων GPx4 και SEPP1 αντίστοιχα.	44
3.3 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-ΑΝΑΦΟΡΕΣ	69

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ορθοκολικός καρκίνος (colorectal cancer- CRC) είναι μία ετερογενής νόσος με υπότυπους που φέρουν διακριτά μοριακά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων, οι οποίες έχουν αλλάξει ριζικά το μέσο όρο επιβίωσης (OS) αυτών των ασθενών. Ωστόσο, παρά τη δραματική βελτίωση στα επίπεδα επιβίωσης, μετά από μερικούς μήνες θεραπείας με αντισώματα κατά του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και με αντισώματα κατά του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR), οι ασθενείς με μεταστατικό CRC σταματούν να ανταποκρίνονται στη θεραπεία καθώς αποκτούν αντίσταση στους στοχευμένους θεραπευτικούς παράγοντες. Έτσι, η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, σε συνδυασμό με την κατανόηση της περίπλοκης βιολογίας της νόσου, είναι ουσιαστικής σημασίας για τον εντοπισμό/την αναγνώριση των ασθενών οι οποίοι πιθανότατα θα επωφεληθούν από την εξατομικευμένη θεραπεία. Πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στο μικροπεριβάλλον και στη μικροχλωρίδα του όγκου, προκειμένου να προσδιοριστούν οι συνθήκες που οδηγούν σε καρκινογένεση. Εστιάζοντας στο πεδίο της πρόληψης του καρκίνου, η μελέτη των αντιοξειδωτικών μηχανισμών έναντι των ελεύθερων ριζών φαίνεται πολύ ελπιδοφόρα. Μέχρι στιγμής, λίγες μελέτες έχουν ερευνήσει το ρόλο των σεληνοπρωτεϊνών ως αντιοξειδωτικών ενζύμων, κυρίως σε κυτταρικές σειρές και *in vitro* πειράματα. Δεδομένου ότι η φλεγμονή και η διατροφή αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση CRC, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των υπεροξειδάσεων της γλουταθειόνης GPx1, GPx3, GPx4, μελών της οικογένειας των σεληνοπρωτεϊνών. Επίσης, διερευνήσαμε τους πολυμορφισμούς (SNPs) rs713041 και rs7579 των GPx4 και SEPP1 αντίστοιχα, καθώς και την πιθανή συσχέτιση τους με την καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Μελετήθηκαν 45 δείγματα για την έκφραση των πρωτεϊνών GPx με ανοσοϊστοχημεία. Επίσης απομονώθηκε DNA και εκτελέσθηκε ενίσχυση PCR για τους δύο πολυμορφισμούς. Η αξιολόγηση του πολυμορφισμού rs713041 πραγματοποιήθηκε με ανάλυση περιοριστικού ενζύμου, και χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού Sty1, ενώ για τον πολυμορφισμό rs7579 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλληλούχισης. Έγινε συλλογή των κλινικοϊστολογικών δεδομένων και όλες οι παράμετροι αναλύθηκαν με το πρόγραμμα SPSS v.23. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών GPx1, GPx3 και GPx4 συσχετίστηκαν με το στάδιο διαφοροποίησης του όγκου ( $p = 1.1099 \times 10^{-8}$ ,  $p = 0.000053$  και  $p = 0.002$ , για τα GPx1, GPx3 και GPx4, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, διαπιστώσαμε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ήπιας έκφρασης της GPx1 και της παρουσίας μετάλλαξης KRAS ( $p = 0,029$ ), της συσχέτισης της εντόπισης του καρκίνου και των επιπέδων έκφρασης της GPx3 ( $p = 0,028$ ), καθώς και της ισχυρής συσχέτισης της παρουσίας μετάλλαξης BRAF V600E με το SEPP1 rs7579 πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομο- ή ετεροζυγωτία ( $p = 0,039$ ). Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι οι σεληνοπρωτεΐνες μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω του αντιοξειδωτικού τους ρόλου. Ωστόσο, δεδομένου ότι η έρευνα περιορίζεται σε μικρό αριθμό μελετών στον τομέα αυτό, χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών προκειμένου να ανακαλυφθούν δείκτες για την πρόληψη του ορθοκολικού καρκίνου.

## SUMMARY

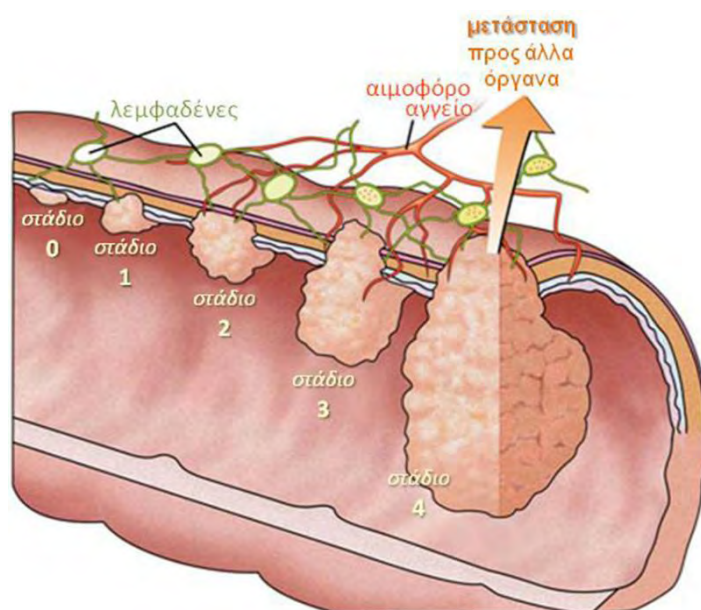
Colorectal cancer (CRC) is a heterogeneous disease with molecular subtypes harboring distinct molecular, pathologic and clinical characteristics. In past decades, a significant progress has been made in the development of new treatment options, which have radically changed the median overall survival (OS) of these patients. However, despite the dramatic improvement in survival, after few months of therapy with anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) and anti-vascular endothelial growth factor (VEGFR) antibodies, patients with metastatic CRC stop responding to treatment due to intrinsic and acquired resistance to the targeted agents. Thus, the discovery of novel biomarkers, together with better understanding of the complex biology of the disease, is essential to identify patients who will most likely benefit from personalized treatment. Recent research has focused on tumor microenvironment and microbiota in order to specify the conditions which lead to carcinogenesis. Focusing on the field of cancer prevention study of antioxidant mechanisms against free radicals seems very promising. So far, few studies have searched the role of selenoproteins as antioxidant enzymes, mostly in cell lines and in vitro experiments. As inflammation and diet are CRC risk factors we studied protein expression levels of glutathione peroxidases GPx1, GPx3, GPx4, members of selenoproteins' family. We also investigated two polymorphisms (SNPs), rs713041 and rs7579 of GPx4 and SEPP1 respectively, as well as their possible correlation to colorectal carcinogenesis. 45 specimens were studied for GPx protein expression by immunohistochemistry. Genomic DNA was also extracted and PCR amplification for the two SNPs was performed. Evaluation of rs713041 SNP was performed by restriction fragment analysis method using StyI restriction enzyme, while for rs7579 SNP direct sequence analysis was done. Clinico-pathological data were collected and all parameters were analyzed by SPSS v.23 program. Statistical analysis revealed that protein expression levels of GPx1, GPx3 and GPx4 was correlated to tumor grade ( $p = 1.1099 \times 10^{-8}$ ,  $p = 0.000053$  and  $p = 0.002$ , for GPx1, GPx3 and GPx4, respectively). Additionally, we found a strong correlation between mild expression of GPx1 and the presence of a KRAS mutation ( $p = 0.029$ ), association of cancer localization and GPx3 expression levels ( $p = 0.028$ ), as well as strong correlation of BRAF V600E mutation presence with SEPP1 rs7579 polymorphic allele in homo- or heterozygosity ( $p = 0.039$ ). Our findings suggest that selenoproteins might play important role in colon cancer prevention through their antioxidant role. However, since research is poor in this field, further studies in a larger number of subjects need to be done in order to discover markers for prevention.

# 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Καρκίνος του παχέος εντέρου – Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Colorectal Cancer, CRC) αποτελεί μία από τις πιο συχνές κακοήθειες παγκοσμίως (Miller KD et al., 2016; Torre Lindsey A et al., 2016). Λαμβάνοντας υπόψη τα υπάρχοντα δημογραφικά στοιχεία, αναμένεται αύξηση του CRC κατά 60%, σε περισσότερα από 2,2 εκατομμύρια νέα περιστατικά και 1,1 εκατομμύρια θανάτους από καρκίνο, έως το 2030 (Arnold M. et al., 2016). Η συχνότητα εμφάνισης του CRC παρουσιάζει γεωγραφική ετερογένεια και επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Περίπου τα 2/3 των περιπτώσεων με CRC εντοπίζονται σε αναπτυγμένες χώρες και σχετίζονται με την υιοθέτηση του δυτικού τρόπου διατροφής και διαβίωσης (Melina Arnold, et al., 2016; Brody, 2015). Δεν είναι τυχαίο το γεγονός, ότι η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης παρατηρείται στην Ευρώπη και στην Ωκεανία, και η χαμηλότερη στην Αφρική και στην Ασία. Στα έθνη με υψηλό βιοτικό επίπεδο, ο κίνδυνος εμφάνισης CRC κατά τη διάρκεια της ζωής είναι περίπου 5%, ενώ ο αντίστοιχος κίνδυνος για την ανάπτυξη αδενώματος είναι περίπου 20%.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος σε συχνότητα καρκίνος στους άντρες και ο δεύτερος στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών (World Cancer Research Fund International). Κατέχει τη δεύτερη θέση αιτίας θανάτου από καρκίνο στην Ευρώπη και παρουσιάζει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (J. Ferlay et al. 2012). Σήμερα η εφαρμογή βελτιωμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων, τόσο στη χειρουργική επέμβαση όσο και σε επίπεδο χημειο- και ακτινοθεραπείας, έχουν συμβάλει στη σημαντική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών με CRC που διαγνώστηκαν στα αρχικά στάδια της νόσου. Ωστόσο, η υποτροπή της νόσου είναι συχνή, ειδικά σε ασθενείς που έχουν θετικούς λεμφαδένες. Περίπου το 1/3 των ασθενών με CRC αναπτύσσουν επίσης σύγχρονες ή μετάγχρονες μεταστάσεις στο ήπαρ. Όταν η νόσος είναι τοπική ή εντοπισμένη, το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης προσεγγίζει περίπου το 80%-90%. Ωστόσο, το ποσοστό αυτό μειώνεται δραματικά στο 40%-60% σε προχωρημένους μη μεταστατικούς καρκίνους και φτάνει σε ποσοστό περίπου 5%-10% στον μεταστατικό CRC (Pizzini S et al., 2013; Fritzmann J. et al., 2009).

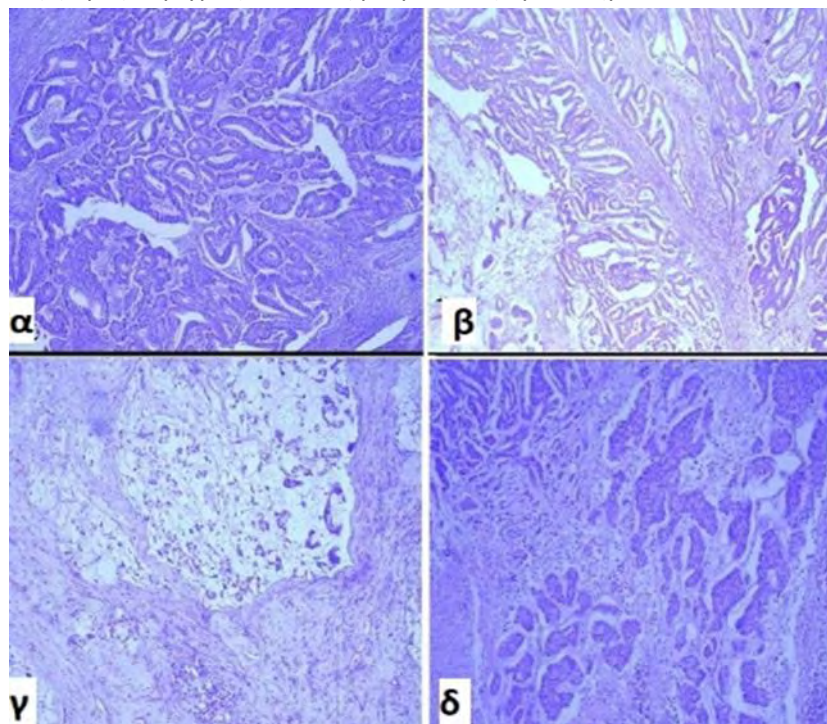


Εικόνα 1: Στάδια καρκινογένεσης στο παχύ έντερο.

## 1.2 Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου παχέος εντέρου

Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου διακρίνονται ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο σε κλασικό αδενοκαρκίνωμα (>85%), βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα (ποσοστό βλεννώδους στοιχείου >50% του συνόλου του όγκου), καρκίνωμα με κύτταρα δακτυλίου δίκην σφραγιστήρος (signet ring >50%), αδενοπλακώδες, μυελοειδές και αδιαφοροποίητο μικροκυτταρικό καρκίνωμα.

Η μικροσκοπική περιγραφή περιλαμβάνει το βαθμό διαφοροποίησης του αδενοκαρκινώματος, που ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες: βαθμού 1 (χαμηλής κακοήθειας-υψηλής διαφοροποίησης), βαθμού 2 (ενδιάμεσης κακοήθειας-μέτριας διαφοροποίησης) και βαθμού 3 (υψηλής κακοήθειας-χαμηλής διαφοροποίησης) (εικόνα 2). Σύμφωνα με το ευρωπαϊκό πρωτόκολλο (8<sup>η</sup> έκδοση του TNM), προτείνεται η διαφοροποίηση κατά τον επικρατούντα χαρακτήρα, και κατά τον WHO ο χαμηλότερος βαθμός χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η παρυφή του όγκου, στην οποία το καρκίνωμα είναι καλά διαφοροποιημένο. Ο βαθμός διαφοροποίησης (tumor grade) είναι ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, το οποίο επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση, ακόμα και ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου. Η χαμηλού βαθμού κακοήθεια – υψηλής διαφοροποίησης, σημαίνει ότι τα καρκινικά κύτταρα μοιάζουν με τα φυσιολογικά κύτταρα του εντέρου. Στους υψηλού βαθμού κακοήθειας – χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνους τα κύτταρα παρουσιάζονται με διαφορετική αρχιτεκτονική και μορφολογία από εκείνα του φυσιολογικού ιστού. Οι μέτριου βαθμού καρκίνοι έχουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των προηγούμενων ως προς τη μορφολογία των καρκινικών κυττάρων. Μερικές φορές περιγράφονται ως μέτρια διαφοροποιημένα.



**Εικόνα 2:** Φωτομικρογραφίες καρκινικών ιστών παχέος εντέρου με χρώση H&E (αιματοξυλίνη/ηωσίνη): α) αδενοκαρκίνωμα καλής διαφοροποίησης, β) αδενοκαρκίνωμα μέσης διαφοροποίησης, γ) βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα δ) αδενοκαρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης (Kwabena Owusu Danquah et al., 2017)

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γενετικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των όγκων διαφέρουν αναλόγως την εντόπισή τους. Έτσι, κλινικά οι καρκίνοι με δεξιά εντόπιση (RSCCs) είναι ογκώδεις,

εξωφυτικές και πολυποδικές βλάβες που εκτείνονται στον αυλό, ενώ οι καρκίνοι με αριστερή εντόπιση (LSCCs) είναι διεισδυτικές βλάβες που περιβάλλουν τον αυλό, οδηγώντας συχνά σε παρεμπόδιση και διάτρηση (Mudassar Hussain et al., 2016). Οι δεξιές εντόπισης όγκοι (RSCC) παρουσιάζουν συνήθως υψηλό ιστολογικό βαθμό, παθολογικό στάδιο (pT) και κακούς προγνωστικούς χαρακτήρες, όπως είναι η βλενώδης διαφοροποίηση και κύτταρα δακτυλίου δίκην σφραγιστήρος. Επιπλέον, είναι περισσότερο ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία σε σύγκριση με τους αριστερές εντόπισης καρκίνους (LSCC) (Mudassar Hussain et al., 2016).

### Σταδιοποίηση κατά TNM

Το σύστημα σταδιοποίησης, που χρησιμοποιείται ευρέως στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι το TNM (Πίνακας 1). Το σύστημα σταδιοποίησης TNM είναι ακρωνύμιο από τα αρχικά των λέξεων Tumor, Node, Metastasis, που σημαίνουν αντίστοιχα όγκος, λεμφαδένες και μετάσταση. Οι ογκολόγοι συνδυάζοντας τις πληροφορίες σχετικά με την έκταση του όγκου, τους λεμφαδένες και την εξάπλωση του καρκίνου σε άλλα όργανα του σώματος δημιουργούν τα στάδια της νόσου. Το κάθε στάδιο περιλαμβάνει καρκίνους με διαφορετικά χαρακτηριστικά (T, N, M), οι οποίοι όμως έχουν παρόμοιο τρόπο αντιμετώπισης και παρόμοια πρόγνωση.

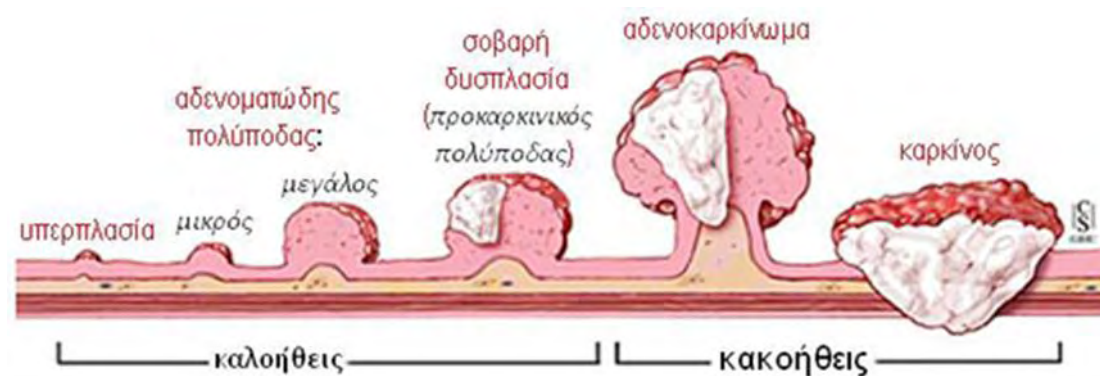
Πρωτοπαθής όγκος (T)	
TX	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να προσδιοριστεί.
T0	Χωρίς στοιχεία πρωτοπαθούς όγκου.
Tis	Καρκίνωμα in situ.
T1	Ο όγκος διηθεί μέχρι τον υποβλεννογόνο χιτώνα.
T2	Ο όγκος διηθεί μέχρι το μυϊκό χιτώνα.
T3	Ο όγκος διηθεί έως τον ορογόνο ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος η διήθηση εκτείνεται προς τους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς.
T4a	Ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο.
T4b	Ο όγκος διηθεί και επεκτείνεται σε άλλα όργανα ή δομές.
Λεμφαδένες (N)	
NX	Λεμφαδένες δεν μπορούν να προσδιοριστούν.
N0	Δεν υπάρχει μετάσταση σε επιχώριους (τοπικούς) λεμφαδένες.
N1	Μετάσταση 1-3 επιχώριους λεμφαδένες.
N1a	Μετάσταση σε έναν επιχώριο λεμφαδένα.
N1b	Μετάσταση σε 2-3 επιχώριους λεμφαδένες.
N1c	Ο όγκος εναποτίθεται στον υποορογόνο, μεσεντέριο ή σε μη περιτοναϊκό περικολικό ή περιορθικό ιστό χωρίς επιχώριους λεμφαδένες.
N2	Μετάσταση σε τέσσερις ή περισσότερους λεμφαδένες.
N2a	Μετάσταση σε 4-6 επιχώριους λεμφαδένες.
N2b	Μετάσταση σε επτά ή περισσότερους λεμφαδένες.



Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)	
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις.
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων.
M1a	Μεταστάσεις σε ένα όργανο ή θέση (πχ ήπαρ, πνεύμονα, ωθήκες, μη επιχώριους λεμφαδένες).
M1b	Μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανα ή θέσεις.

**Πίνακας 1.** Σύστημα σταδιοποίησης καρκίνου παχέος εντέρου.

Οι Fearon και Vogelstein πρότειναν ένα μοντέλο για την καρκινογένεση του παχέος εντέρου και την μετάπτωση του αδενώματος σε καρκίνωμα. Με βάση αυτό το πρότυπο επέρχεται αρχικά μετάλλαξη στο πρωτο-ογκογονίδιο APC, που παρατηρείται και στο σποραδικό καρκίνο. Η διαταραχή αυτή προκαλεί υπέρμετρο πολλαπλασιασμό του επιθηλίου. Ακολούθως, προκαλείται υπομεθυλίωση του DNA που αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, ενώ δεν παρατηρείται στα φυσιολογικά κύτταρα του βλεννογόνου.



**Εικόνα 3.** Εικονική παράσταση του μοντέλου καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

### 1.3 Παράγοντες καρκινογένεσης του παχέος εντέρου

#### 1.3.1 Εξωγενείς παράγοντες

Οι υποκείμενες αιτίες του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι σύνθετες και ετερογενείς. Τόσο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όσο και το γενετικό υπόβαθρο συμβάλλουν στον κίνδυνο εμφάνισης και ανάπτυξης CRC. Οι γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν μικρότερο ρόλο (έως και το 20% των περιπτώσεων) (Carini F. et al., 2017). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφερθεί στην επίπτωση παραγόντων, όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η φυσική δραστηριότητα, το βάρος του εξεταζόμενου, στην εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο CRC (Ordóñez-Me JM et al., 2017; Yoon Jin Choi et al., 2017). Οι ίδιοι παράγοντες φαίνεται να ενοχοποιούνται για την πορεία της νόσου και την ανταπόκριση του ασθενή στην εκάστοτε θεραπεία (Moniek van Zutphen et al., 2017; Harindra Jayasekara et al., 2017). Η έκθεση σε τοξίνες, η τακτική κατανάλωση αλκοόλ, η διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε κόκκινο κρέας και κορεσμένα λιπαρά και η χαμηλή

περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες και λαχανικά, το φύλο, η αυξημένη ηλικία, η παχυσαρκία, η έλλειψη σωματικής άσκησης και το κάπνισμα αποτελούν εξωγενείς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης CRC (Carini F. et al., 2017). Προκειμένου, λοιπόν, να αναπτυχθούν αποτελεσματικές στρατηγικές πρόληψης, διάγνωσης και αποτελεσματικής θεραπείας του CRC, είναι απαραίτητη η κατανόηση των οδών και των μοριακών συμβάντων που προκαλούν την καρκινογένεση.

### **1.3.2 Ενδογενείς παράγοντες**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου έχει πλέον χαρακτηριστεί ως μια ετερογενής νόσος και περιλαμβάνει ένα σύνολο υποτύπων με χαρακτηριστικές μοριακές (γενετικές-επιγενετικές) και μορφολογικές αλλαγές (Setaffy L. et al., 2015). Η πλειοψηφία των περιπτώσεων CRC (70%-80%) είναι σποραδικού τύπου, ενώ περίπου 20%-30% φέρουν κάποιο κληρονομούμενο χαρακτήρα που οφείλεται τόσο σε σπάνια, υψηλού κινδύνου σύνδρομα γενετικής προδιάθεσης, όπως είναι το σύνδρομο Lynch (3-4%) ή η οικογενής αδενωμάτωση πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP) (1%), όσο και σε συχνότερα, χαμηλής διεισδυτικότητας γονίδια. Μια μικρή υποομάδα της τάξης του 1-2% των CRC περιπτώσεων φαίνεται να είναι αποτέλεσμα φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (Virchows Arch, 2016, 469:125-134). Ο σποραδικού τύπου CRC δε συνδέεται με το οικογενειακό ιστορικό, αλλά προέρχεται από γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα (Müller et al., 2016).

### **1.4 Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια καρκινογένεσης παχέος εντέρου**

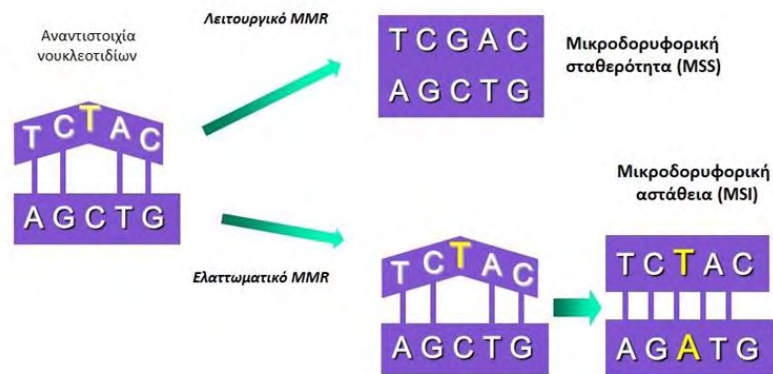
Πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, μεταξύ των οποίων τα μονοπάτια της χρωμοσωμικής και μικροδορυφορικής αστάθειας, και μονοπάτια όπως εκείνο των MAPK κινασών, που περιλαμβάνει τα γνωστά ογκογονίδια KRAS και BRAF.

#### **1.4.1 Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN)**

Ο κατακερματισμός των χρωμοσωμάτων λόγω λαθών κατά τη μίτωση, μπορεί να οδηγήσει σε ανευπλοειδία. Η ανευπλοειδία συνδέεται με πλεόνασμα ή απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων τους και οδηγεί σε γενομική αστάθεια που επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμόζονται σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, όπως είναι η διακύμανση θρεπτικών ουσιών και η υποξία προσδίδοντας ενδεχομένως πλεονέκτημα στα κύτταρα αυτά. Οι όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια φέρουν έναν συνδυασμό γενετικών αλλαγών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως τα KRAS, PI3KCA και την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως είναι τα APC, SMAD4 και p53, μέσω μεταλλάξεων και απώλειας αλληλομόρφων που συμβαδίζουν με μορφολογικές αλλαγές του όγκου κατά την αλληλουχία “αδένωμα-καρκίνωμα”, όπως έχει περιγραφεί από τους Fearon και Vogelstein το 1990. Στο μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας παρατηρείται νωρίς κατά την καρκινογένεση η ενεργοποίηση του WNT σηματοδοτικού μονοπατιού, που ξεκινά συνήθως με μεταλλάξεις του APC γονιδίου. Διαταραχές στο WNT μονοπάτι παρατηρούνται τόσο στους σποραδικούς CRC όσο και στους ασθενείς με FAP (Maloy S, Hughes K, 2013). Σχεδόν το 80% των αδενωμάτων και των CRC καρκίνων φέρουν μεταλλάξεις στο APC γονίδιο και περίπου 5-10% φέρουν και περαιτέρω μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλαγές σε άλλα συστατικά του WNT μονοπατιού, όπως η β-κατενίνη. Η μετάβαση από το αδένωμα στο διηθητικό καρκίνωμα σχετίζεται συνήθως με μεταλλάξεις και/ή απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53.

### 1.4.2 Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Instability, MSI)

Οι μικροδορυφόροι είναι μικρές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες νουκλεοτιδίων DNA, που συμμετέχουν στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, και είναι επιρρεπείς σε μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου και υποκαταστάσεις ζεύγους βάσεων κατά την αντιγραφή DNA (Sideris m. & Paragrigoriadis S., 2014). Το MSI μονοπάτι αποτελεί μια εναλλακτική οδό καρκινογένεσης, που αντιπροσωπεύει το 15-20% των σποραδικών καρκίνων, και προέρχεται από λάθη στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (MMR) (Εικόνα 4). Η ανάπτυξη πολλών νεοπλασμάτων, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του παχέος εντέρου, περιλαμβάνει κληρονομούμενες και επίκτητες βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA στα νεοπλασματικά κύτταρα. Συνήθως υπάρχει η κληρονόμηση ενός μεταλλαγμένου MMR γονιδίου (συνήθως MSH2 ή MLH1), ώστε όλα τα σωματικά κύτταρα φέρουν ένα μεταλλαγμένο και ένα αγρίου τύπου (wild-type) αλληλόμορφο του MMR συστήματος. Στη συνέχεια, κατά τον σχηματισμό του όγκου αδρανοποιείται και το δεύτερο MMR αλληλόμορφο γονίδιο, ως αποτέλεσμα μετάλλαξης, έλλειψης ή μεθυλίωσης του υποκινητή του (στην περίπτωση του MLH1 γονιδίου). Στις περιπτώσεις με σποραδικού τύπου CRC οι βλάβες του MMR συστήματος είναι σε ποσοστό >95% αποτέλεσμα υπερμεθυλίωσης του υποκινητή και των δύο MLH1 αλληλομόρφων, οδηγώντας σε αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου και καταστροφή του MMR μονοπατιού.



Εικόνα 4: Συσχέτιση επιδιορθωτικού συστήματος MMR και έκφρασης MSI (Carol Burke, 2015)

Οι CRCs που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch είναι αδενοκαρκινώματα, κατά κανόνα φτωχά διαφοροποιημένα ή αδιαφοροποίητα και φέρουν διακριτά λεμφοκύτταρα και αθροίσεις λεμφοκυττάρων περιφερικά του όγκου. Επιπλέον εμφανίζονται συχνότερα στο εγγύς κόλον. Ο έλεγχος για την παρουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας επιτυγχάνεται τόσο με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας, όπου εξετάζεται η έκφραση των πρωτεϊνών MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2, που συγκροτούν τα κύρια επιδιορθωτικά σύμπλοκα, όσο και έμμεσα μελετώντας αλλαγές σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες σε πέντε συγκεκριμένους μονο- και δινουκλεοτιδικούς δείκτες σύμφωνα με το Bethesda panel.

Με βάση τη γενετική ανάλυση των μονο- και δινουκλεοτιδικών δεικτών η ταξινόμηση των όγκων περιλαμβάνει την απουσία ή παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, ενώ η παρουσία MSI διαιρείται περαιτέρω σε χαμηλού και υψηλού βαθμού συγκριτικά με το φυσιολογικό ιστό. Πιο συγκεκριμένα οι

όγκοι χαρακτηρίζονται ως MSI-high (MSI-H) όταν εντοπίζονται μεταξύ νεοπλασματικού και φυσιολογικού ιστού διαφορές σε  $\geq 2$  (40%) εκ των πέντε δεικτών ανάλυσης, MSI-low (MSI-L) όταν εντοπίζεται διαφορά σε μία θέση (MSI Low:  $>20\%$ ,  $<40\%$ ), και με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSS: stable) όταν δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ νεοπλασματικού και φυσιολογικού ιστού (Hamzehzadeh L. et al., 2017).

Οι όγκοι με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) συνυπάρχουν συχνά με μεταλλάξεις του BRAF ογκογονιδίου και κυρίως την V600E μετάλλαξη, φέρουν όμως, λιγότερες μεταλλάξεις του KRAS ογκογονιδίου. Η παρουσία υψηλού βαθμού μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-high) παρατηρείται σε ποσοστό περίπου 15% των περιπτώσεων με καρκίνο παχέος εντέρου και σχετίζεται με αύξηση της επιβίωσης (Lochhead P. et al., 2013). Οι CRC όγκοι του παχέος εντέρου με MSI φαινότυπο φέρουν συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όπως δεξιά εντόπιση του όγκου, κακή διαφοροποίηση, συχνά βλεννώδη χαρακτηριστικά, χαμηλότερο στάδιο του όγκου και σπάνια φέρουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Η πρόγνωση είναι γενικά καλή και τα ποσοστά μακροχρόνιας επιβίωσης χωρίς υποτροπή είναι υψηλότερα (Corso G. et al., 2013).

Υπάρχουν πολλές κλινικοπαθολογικές μεταβλητές που σχετίζονται με το status της μικροδορυφορικής αστάθειας. Οι ασθενείς με όγκους MSI-H έχουν μεγαλύτερη συνολικά πενταετή επιβίωση ανεξάρτητα από το στάδιο του όγκου συγκριτικά με εκείνους που φέρουν όγκους MSI-L και MSS. Η υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη για την ελεύθερη υποτροπής και συνολική επιβίωση σε ασθενείς σταδίων II και III CRC.

#### 1.4.3 Το μονοπάτι των RAS/RAF/MAP κινασών

Το μονοπάτι RAS/RAF/MAPK κινασών έχει μελετηθεί εκτενώς στα πλαίσια της ογκογένεσης του παχέος εντέρου και όχι μόνο, καθώς δυσλειτουργίες αυτού του μονοπατιού θεωρούνται κύριες αιτίες καρκινογένεσης. Τα γονίδια RAS φέρουν μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα περίπου στο 20% των νεοπλασιών. Οι πρωτεΐνες RAS είναι μικρές GTPάσες δεσμευμένες με νουκλεοτίδιο γουανωσίνης, και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες καθοδικά των υποδοχέων διαφόρων αυξητικών παραγόντων, όπως ο EGFR. Τα RAS ανήκουν σε μια πολυγονιδιακή οικογένεια που περιλαμβάνει τα HRAS, NRAS και KRAS ογκογονίδια. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες εναλλάσσονται μεταξύ μιας ενεργοποιημένης/δραστικής μορφής η οποία είναι δεσμευμένη με GTP, και μιας αδρανούς, δεσμευμένης με GDP μορφής. Ενεργοποιούνται, δε, μέσω αυξητικών παραγόντων που συνδέονται με υποδοχείς κινασών τυροσίνης (RTK), G-συνδεδεμένους υποδοχείς, υποδοχείς κυτοκινών και υποδοχείς εξωκυττάριας ουσίας (Tidyman W. E., & Rauen, K. A., 2009). Το γονίδιο KRAS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον CRC καθώς είναι μεταλλαγμένο περίπου στο 40% των περιπτώσεων (Sideris M. & Papaigrigoriadis S., 2014). Το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου εντοπίζονται μόλις στο 10% των αδενωμάτων μικρότερων του 1cm και σε ποσοστό 40%-50% εκείνων με μέγεθος  $>1\text{cm}$ , μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του ορθοκολικού αδενώματος (J. Roper and K.E. Hung). Σημειακές μεταλλάξεις ενός μόνο νουκλεοτιδίου στα κωδικόνια 12 και 13 του εξονίου 2, στο κωδικόνιο 146 του εξονίου 4, και σπανιότερα στο κωδικόνιο 61 του εξονίου 3, προκαλούν τη σταθεροποίηση του ενζύμου στην ενεργοποιημένη μορφή (σύνδεση με GTP), και οδηγούν σε υπερέκφρασή του. Οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 του εξονίου 2 συνδέονται με κακή πρόγνωση καθώς και μικρότερη επιβίωση, ενώ οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του εξονίου 2 σχετίζονται με προχωρημένους όγκους και μεταστάσεις (Mártnol I. Et al., 2017).

**Πίνακας 2.** Συχνές μεταλλάξεις στον καρκίνου του παχέος εντέρου.

Γονίδιο	Χρωμοσωμική θέση	Τύπος μετάλλαξης	Πλειοψηφία των μεταλλάξεων	Συχνότητα μεταλλαγμένου γονιδίου στον CRC (%)	Λειτουργία γονιδίων
<b>KRAS</b>	12p12	Σημειακή	Κωδικόνια 12, 13 του εξονίου 2	40	πολλαπλασιασμός των κυττάρων και επιβίωση
<b>BRAF</b>	7q34	Σημειακή	του εξονίου 15	5–10	πολλαπλασιασμός των κυττάρων και επιβίωση

Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος τελεστής του KRAS είναι ο καταρράκτης MAPK με τη μεσολάβηση των Raf. Η οικογένεια Raf περιλαμβάνει τρεις κινάσες σερίνης-θρεονίνης, τις A-RAF, B-RAF και C-RAF, οι οποίες ενεργοποιούνται από τις δραστικές GTP-RAS πρωτεΐνες (Tidyman W. E., & Rauen, K. A., 2009). Συγκεκριμένα, η BRAF, η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο στο χρωμόσωμα 7 (7q34) (Hussain M. R. M., 2015), δύναται να επεκταθεί στις δύο άλλες ισομορφές. Η ίδια, όχι μόνο ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK το οποίο σχετίζεται άμεσα με την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση, αλλά επιπρόσθετα, επηρεάζει βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση και η επιβίωση (Barras D., 2015). Μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου εντοπίζονται στο 15% όλων των υπάρχοντων καρκίνων και στο 12% των περιστατικών με CRC (Clancy C., 2013). Η συχνότερη σήμερα μετάλλαξη είναι η p.V600E (νουκλεοτιδική αλλαγή c.1799T>A), σε ποσοστό >80%. Η νουκλεοτιδική αλλαγή οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από το γλουταμινικό οξύ και προκαλεί αυξημένη ενεργότητα κινάσης. Οι μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο σχετίζονται με κακή πρόγνωση και χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης (ειδικά στους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια). Ωστόσο, αν και η μετάλλαξη p.V600E αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για τον μεταστατικό καρκίνο, αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για την εξατομικευμένη θεραπεία (Mármol I. et al., 2017).

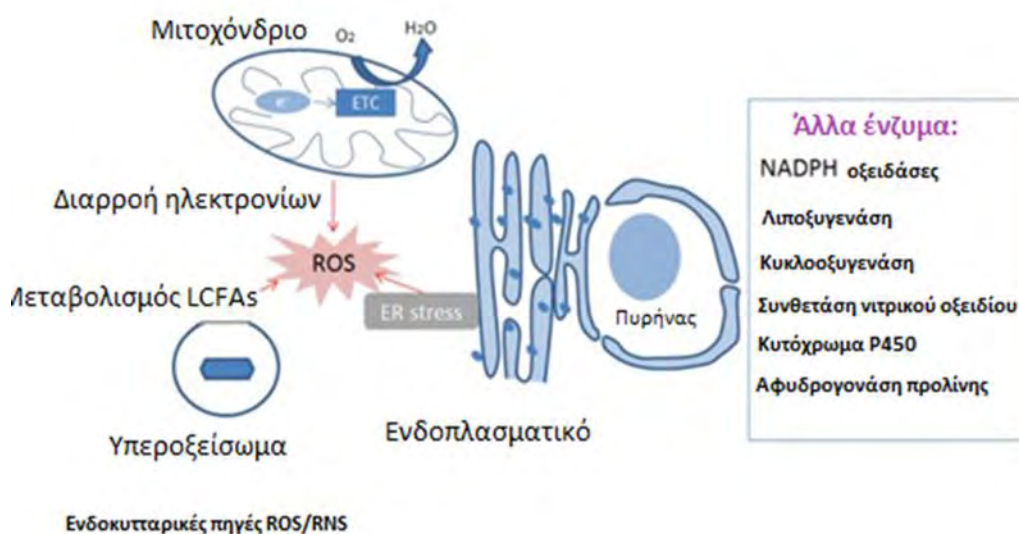
### 1.5 Μηχανισμοί καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται στην έρευνα των μηχανισμών καταπολέμησης των ελεύθερων ριζών του οργανισμού, καθώς η οξειδωτική καταστροφή που προκαλούν στο DNA, οδηγεί σε μεταλλάξεις και πιθανά σε καρκινογένεση.

### 1.5.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί ως ένα άτομο ή ένα μόριο που περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους ή εξωτερική τροχιά και είναι ικανό ανεξάρτητης ύπαρξης. Ο περίεργος αριθμός ηλεκτρονίων μιας ελεύθερης ρίζας την καθιστά ασταθές, βραχύβιο και εξαιρετικά δραστικό μόριο. Λόγω της υψηλής δραστικότητάς τους, μπορούν να αφαιρέσουν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις. Οξειδώνοντας τα διάφορα βιομόρια επιτυγχάνουν τη δική τους σταθερότητα. Έτσι το επιτιθέμενο μόριο χάνει το ηλεκτρόνιο του και γίνεται το ίδιο ελεύθερη ρίζα, ξεκινώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση που καταστρέφει τελικά το ζωντανό κύτταρο (Phaniendra A. et al., 2015).

Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μορίων και ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο διακρίνονται σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), αζώτου (RNS), θείου (RSS) και χλωρίου (RCIS). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, με ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια των μεταβολικών αντιδράσεων είναι οι ρίζες που ως κεντρικό τους άτομο έχουν το οξυγόνο, οι ROS. Το ίδιο το μόριο οξυγόνου είναι μια ρίζα και λόγω της παρουσίας δύο μη συζευγμένων ηλεκτρονίων είναι που αναφέρεται ως δισθενές. Οι πηγές των ελευθέρων ριζών μπορεί να είναι ενδογενείς αλλά και εξωγενείς. Στις ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνονται διάφορα κυτταρικά οργανίδια, στα οποία η κατανάλωση οξυγόνου είναι υψηλή, όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα 5)

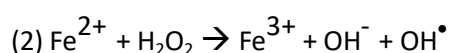
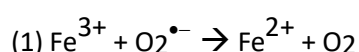


Εικόνα 5: Οργανίδια που λειτουργούν ως πηγές ROS/RNS.

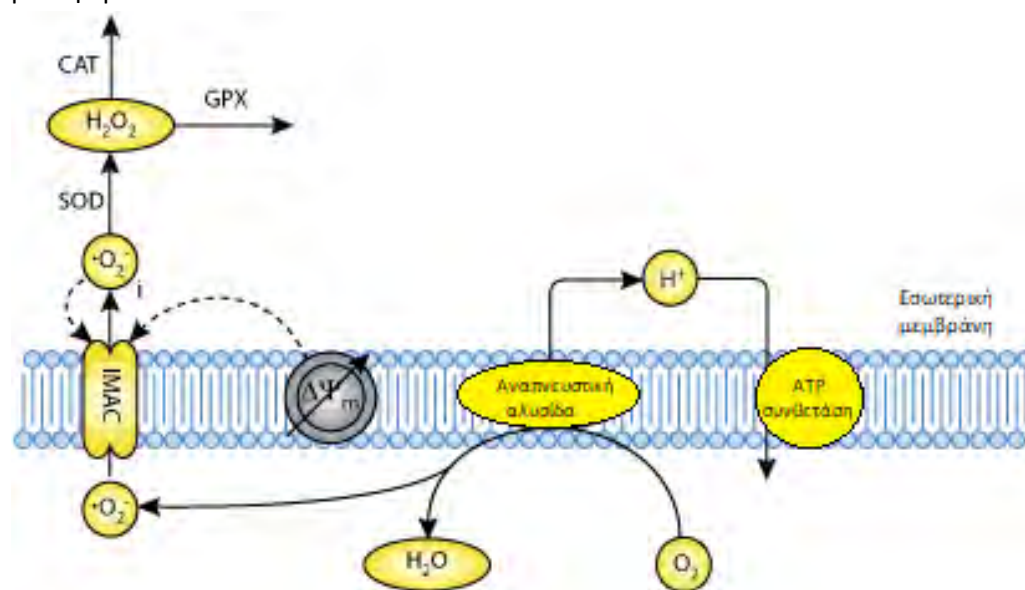
**Μιτοχόνδρια:** Στα μιτοχόνδρια παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών. Κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (διαδικασία παραγωγής του ATP), που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα αντιδρούν με το καταναλισκόμενο  $O_2$ , δημιουργώντας  $O_2^{\cdot-}$  ως παραπροϊόν

(Zuo L. et al., 2015). Η αναγωγή της NADH (σύμπλοκο I) και η ουβικινόνη-αναγωγή του κυτοχρώματος (σύμπλοκο III) είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$  και  $H_2O_2$ . Η δημιουργία υπεροξειδίου είναι μη ενζυματική και επομένως η υψηλότερη μεταβολική ταχύτητα, οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή του ROS. Τέλος, η  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται σε  $H_2O_2$  από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD) (Phaniendra A. et al., 2015). Μέσω μιας αντίδρασης Fenton, το  $H_2O_2$  μπορεί να καταλυθεί και να σχηματίσει ένα εξαιρετικά δραστικό ROS, υδροξύλιο ( $\bullet OH$ ) (Lingying Tong et al., 2015).

Οι αντιδράσεις Haber-Weiss (1) και Fenton (2) μέσω των οποίων παράγεται OH από  $O_2^{\cdot-}$  και  $H_2O_2$  δίνονται παρακάτω:



Στην εικόνα 6 φαίνονται οι μιτοχονδριακές λειτουργίες που σχετίζονται με την παραγωγή και μεταφορά των ROS.



**Εικόνα 6:** Σχηματικό διάγραμμα των μιτοχονδριακών ενεργειών σε συνδυασμό με την παραγωγή, μεταφορά και απενεργοποίηση των ROS (Cortassa et al., 2004).

**Υπεροξεισώματα:** είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια, που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση βλαβερών για το κύτταρο ουσιών. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας είναι η κύρια μεταβολική διαδικασία που παράγει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα υπεροξεισώματα (Gào X., & Schöttker B.,2017; Holmström KM, Finkel T.,2014). Σε αυτά τα οργανίδια, η αναπνευστική οδός περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες στο οξυγόνο, ενέργεια που οδηγεί σε σχηματισμό H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, αλλά δεν συζεύγνυται με οξειδωτική φωσφορυλίωση ώστε να παραχθεί ATP. Ωστόσο, απελευθερώνεται ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Τα επιπλέον ένζυμα που εντοπίζονται στα υπεροξεισώματα, παράγουν διαφορετικές ROS. Άλλες ελεύθερες ρίζες που παράγονται εδώ, είναι τα O<sub>2</sub> • - OH • και NO • (Phaniendra A. et al., 2015; Lingying Tong et al., 2015).

**Ενδοπλασματικό δίκτυο (ER):** το ER είναι ένα καλώς ενορχηστρωμένο οργανίδιο στο οποίο γίνεται η αναδίπλωση της πρωτεΐνης και μπορεί να παράγει ROS ως παραπροϊόντα. Η παραγωγή ROS αυξάνεται κατά τη διάρκεια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου σε απόκριση στη συσσώρευση λανθασμένων και μη πτυχωμένων πρωτεϊνών, ενώ τα ένζυμα που συμμετέχουν είναι το κυτόχρωμα p-450, τα ένζυμα b5 και η οξειδάση του NADPH (NOX) (Gào X., & Schöttker B.,2017; Holmström KM, Finkel T.,2014; Phaniendra A. et al., 2015; Zuo L. et al., 2015).

Εκτός από τα παραπάνω, υπάρχουν κι άλλα οργανίδια και κυτταρικοί τύποι που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ROS και περιλαμβάνουν την πλασματική μεμβράνη, την πυρηνική μεμβράνη, τα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και τα ουδετερόφιλα (φλεγμονώδεις αντιδράσεις) (Samoylenko et al., 2013). Για παράδειγμα, η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό το τελευταίο να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Thomas, 2000) και συγκεκριμένα O<sub>2</sub>• (Cooper et al., 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brandley et al., 1993). Εναλλακτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (AA), του νιτρικού οξειδίου (NO•) και της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) (Zuo et al., 2015). Τέλος, άλλες ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν τη σύνθεση προσταγλανδίνης, την αυτο-οξείδωση της αδρεναλίνης, φαγοκυτταρικά κύτταρα, μειωμένη ριβοφλαβίνη, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων, φλεγμονή, ψυχικό στρες, υπερβολική άσκηση, λοίμωξη, καρκίνο, γήρανση, ισχαιμία κλπ (Phaniendra A. et al., 2015).

### 1.5.2 Εξωγενείς πηγές

Η υπεριώδης ακτινοβολία, η ακτινοβολία (UVR), η ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) και η υποξία, συγκαταλέγονται στις περιβαλλοντικές πιέσεις (Lingying Tong et al., 2015), ενώ ο καπνός του τσιγάρου, τα βιομηχανικά απόβλητα, η διατροφή και το αλκοόλ, σχετίζονται με τον τρόπο ζωής (Carini F. et al., 2017).



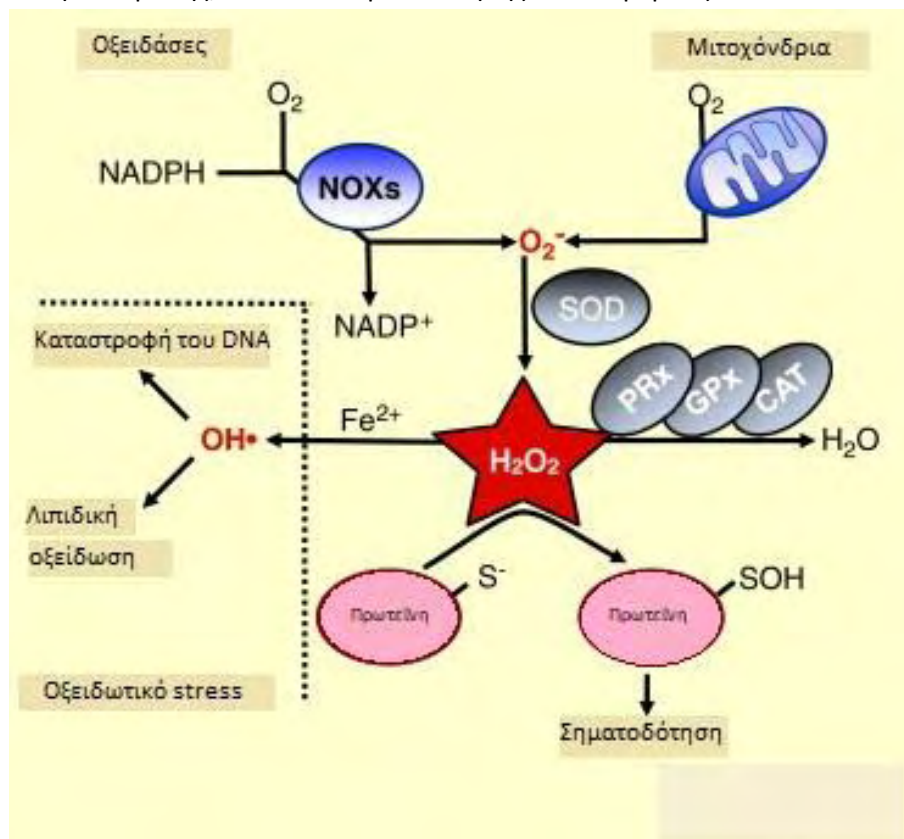
### Εξωγενείς πηγές των ROS

Ατμοσφαιρική ρύπανση  
Ρύπανση των υδάτων  
Αλκοόλ  
Καπνός τσιγάρου  
Μεταβατικά μέταλλα (Cd, Hg, Pb, As)  
Βαρέα μέταλλα (Fe, Cu, Co, Cr)  
Βιομηχανικοί διαλύτες  
Παρασιτοκτόνα

Υψηλές θερμοκρασίες  
Υπεριώδης ακτινοβολία  
Μαγείρεμα (καπνιστό κρέας, χρησιμοποιημένο λάδι, λίπος)  
Φάρμακα όπως αλοθάνη, παρακεταμόλη, μπλεομυκίνη, δοξορουβικίνη, μετρονιδαζόλη, αιθανόλη και CCl<sub>4</sub>

Πίνακας 3: Εξωγενείς πηγές ROS (Phaniendra A. et al., 2015)

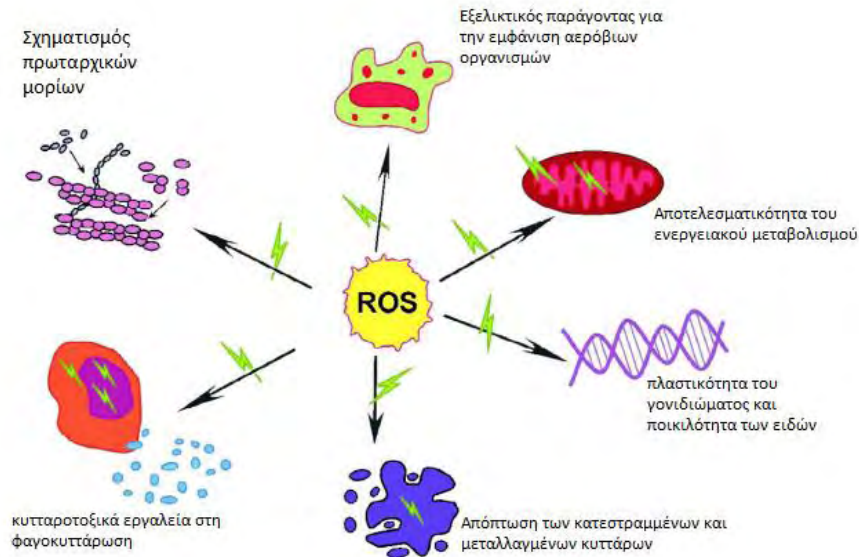
Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 7), περιγράφονται σχηματικά τα διάφορα μονοπάτια παραγωγής, αλληλεπίδρασης, αλλά και αδρανοποίησης των επιμέρους ROS.



**Εικόνα 7:** Βασικά στοιχεία των ROS: Το ενδοκυτταρικό υπεροξείδιο (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) παράγεται κατά κύριο λόγο με την οξείδωση του NADPH από NAPH οξειδωτικά ένζυμα (NOx) ή με διαρροή ηλεκτρονίων από την αερόβια αναπνοή που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Το υπεροξείδιο μετατρέπεται ταχέως σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) μέσω ειδικών δισμουτασών υπεροξειδίου (SODs). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ικανό να οξειδώνει υπολείμματα κυστεΐνης σε πρωτεΐνες για να ενεργοποιήσει τον κύκλο της οξειδοαναγωγής. Εναλλακτικά, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να μετατραπεί σε H<sub>2</sub>O με την ενεργότητα κυτταρικών αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι υπεροξυρεδοξίνες (PRx), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η καταλάση (CAT). Όταν τα επίπεδα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αυξάνονται ανεξέλεγκτα, σχηματίζονται ρίζες υδροξυλίου (OH) μέσω αντιδράσεων με μεταλλικά κατιόντα (Fe<sup>2+</sup>) και βλάπτουν μη αναστρέψιμα τα κυτταρικά μακρομόρια. (Michael Schieber και Navdeep S. Chandel, 2014)

### 1.5.3 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών και οξειδωτικό στρες

Σύμφωνα με τους Juránek I., et al., 2013, οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών ήταν κρίσιμες για τη δημιουργία της ζωής στη Γη, αφού το οξυγόνο και οι ROS διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών, στη μετάβαση της ζωής από το νερό στις χερσαίες μορφές, στην πλαστικότητα του γονιδιώματος, στη μεταβλητότητα των ειδών, στη βιοποικιλότητα, αλλά και στην άμυνα των ζώντων οργανισμών (εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Βιολογικά παράδοξα που αποδεικνύουν τους ωφέλιμους ρόλους των ROS κατά την εμφάνιση και εξέλιξη της ζωής καθώς και στην ομοίωση του ιστού: (i) σύνθεση δομικών στοιχείων πρωταρχικής ζωής, (ii) εξέλιξη των μορφών ζωής, (iii) διευκόλυνση του αποτελεσματικού μεταβολισμού της οξειδωτικής ενέργειας, (iv) επιρροή στην πλαστικότητα του γονιδιώματος και στη μεταβλητότητα των ειδών, v) συμμετοχή στους αποπτωτικούς μηχανισμούς κατεστραμμένων και μετασχηματιζόμενων κυττάρων και (vi) κύρια κυτταροτοξικά εργαλεία στη φαγοκυττάρωση (Juránek I., et al., 2013).

Σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις, οι ROS και RNS είναι απαραίτητες για τη διαδικασία ωρίμανσης των κυτταρικών δομών και μπορούν να λειτουργήσουν ως όπλα για το αμυντικό σύστημα του ξενιστή. Τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μονοκύτταρα) απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες για να καταστρέψουν τα εισβάλλοντα παθογόνα μικρόβια ως μέρος του αμυντικού μηχανισμού του σώματος ενάντια στη νόσο (Pham Huy et al., 2008). Εμπλέκονται σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως η μεταγωγή σήματος ως απάντηση σε αλλαγές του ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου περιβάλλοντος (Paramita Mandal, 2017). Είναι επίσης σημαντικό για τη θανάτωση ενδοκυττάρων παθογόνων και όγκων (Pham Huy et al., 2008). Σημαντική είναι επίσης η προσφορά των ελεύθερων ριζών σε προσαρμογές κατά τη διάρκεια της άσκησης (Veskoukis Aristidis S. et al., 2012) και μάλιστα, κυρίως όταν η τελευταία είναι έντονη και προκαλεί μυϊκό τραυματισμό. Αναστολή της παραγωγής τους οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής. Τέλος, ενεργούν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι και ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και η απόπτωση (Perše M., 2013).

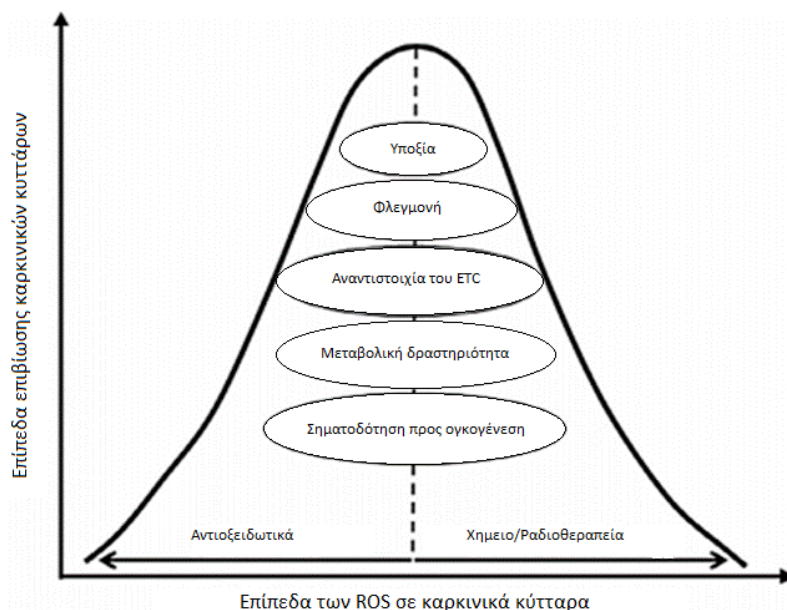
Ωστόσο, όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε υπερβολικές και ανεξέλεγκτες ποσότητες, οι ίδιες και τα παράγωγά τους μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα μακρομόρια, όπως τα λιπίδια, οι

πρωτεΐνες και το DNA και να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση (Perše M., 2013). Σε υπέρμετρες ποσότητες οδηγούν σε μυϊκές βλάβες και κόπωση (Veskoukis A. S. et al., 2012), ενώ σημαντική επίπτωση αποτελεί και η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και η έκφραση διαφόρων ασθενειών (καρκίνος, κατάθλιψη, γήρανση, Parkinson, Alzheimer). Επιπλέον, οι ROS συμβάλλουν επιγενετικά στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, ενεργώντας ως σηματοδοτικά ενδιάμεσα που έπονται των υποδοχέων μιτογόνων και μορίων προσκόλλησης και ως επαγωγείς γενετικών προγραμμάτων που οδηγούν σε κυτταρική εισβολή και κακοήθεια (Fiaschi T., & Chiarugi P., 2012).

Παρόλο που το DNA είναι ένα σταθερό μόριο, οι ROS προκαλούν την οξειδωτική καταστροφή του μέσω διάφορων οδών. Η οξείδωση του DNA μπορεί να επηρεάσει τη μεθυλίωσή του λόγω της οξείδωσης είτε στις μεθυλιωμένες κυτοσίνες είτε στις γουανίνες σε CpG αλληλουχίες. Συγκεκριμένα η οξείδωση στη γουανίνη των CpG αλληλουχιών αναστέλλει τη δέσμευση της DNA μεθυλοτρανσφεράσης στο γειτονικό κατάλοιπο κυτοσίνης οδηγώντας σε υπομεθυλίωση του DNA. Γνωρίζοντας πως η μεθυλίωση του DNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων (υπερέκφραση ή σίγαση), γίνεται κατανοητό γιατί η υπομεθυλίωση του DNA οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια, ανευπλοειδία, και σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου (Perše M., 2013). Η πιο συνηθισμένη οξειδωτική βλάβη που προκαλείται στο DNA από τις ROS είναι η τροποποίηση του ζεύγους των βάσεων GC, με επακόλουθες αντικαταστάσεις βάσεων, ελλείψεις και ενθέσεις. Τέλος, η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), η οποία συμβάλλει σε λανθασμένους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες. Μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες αδρανοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA, προκαλώντας MSI-L και ανάπτυξη CRC (Carini F. et al., 2017).

#### **1.5.4 Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

Το οξειδωτικό στρες οφείλεται σε ανισορροπία της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου/αζώτου (ROS / RNS) και του αμυντικού συστήματος των οξειδωτικών. Ο όρος "οξειδωτικό στρες" αναφέρεται σε μία ανισορροπία στην οποία τα προ-οξειδωτικά κατακλύζουν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων (Gào X., & Schöttker B., 2017). Στη βιολογία του καρκίνου, το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι υποκρύπτει τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου (Fiaschi T. & Chiarugi P., 2012) (εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Αυτό το σχήμα δείχνει τον κρίσιμο ρόλο των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS στη ρύθμιση της τύχης των καρκινικών κυττάρων. Τα υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα ROS μειώνουν τα ποσοστά επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να μειώσουν τις επιπτώσεις των χημειοθεραπευτικών /ραδιοθεραπείας μειώνοντας τη σχετική παραγωγή ROS. Συνομογραφίες: μεταφορά ηλεκτρονίων (ETC), δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) (Lingying Tong et al., 2015).

### 1.5.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 2015). Τα αντιοξειδωτικά είναι μια ομάδα ουσιών που εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών, αδρανοποιώντας τις και μετατρέποντάς τις σε λιγότερο δραστικά μόρια, προστατεύουν τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών (Pham Huy et al., 2008). Επίσης, συμμετέχουν σε αρκετές μεταβολικές και μοριακές διεργασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διεύθυνση των καρκινικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια αυξάνεται το ενδιαφέρον της για την πηγή, τη δράση και τα πιθανά οφέλη των αντιοξειδωτικών που λαμβάνονται μέσω διατροφής (Carini F. et al., 2017).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς μηχανισμούς ή πρωτεύοντες, περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR) (Perše M., 2013). Στους μη ενζυμικούς ή δευτερεύοντες μηχανισμούς ανήκουν μόρια με αντιοξειδωτικές ικανότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, το β-καροτένιο, το σουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10, η αλβουμίνη και το σελήνιο. Τα τελευταία χρόνια, πληθαίνουν οι μελέτες που ενοχοποιούν την φλεγμονή και το μικροπεριβάλλον του όγκου στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σε ασθενείς με CRC για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ουσιών στην καρκινογένεση του κόλον. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια αυτής της εργασίας επιλέξαμε να ασχοληθούμε με τη μελέτη τεσσάρων σεληνοπρωτεϊνών και τον πιθανό τους ρόλο στην καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου.

## 1.6 Σεληνοπρωτεΐνες

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υποδηλώνει ότι το βασικό ιχνοστοιχείο σελήνιο αποτελεί παράγοντα πρόληψης για την καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Για τις σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες του σεληνίου, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τα σεληνοενζύμα με τη λειτουργία τους. Το σελήνιο ενσωματώνεται στο ενεργό κέντρο των σεληνοενζύμων ως σεληνοκυστεΐνη (Sec), η οποία ανακαλύφθηκε πρόσφατα ως το 21ο φυσικό αμινοξύ (Leinfelder W. et al., 1988). Η δομή της είναι παρόμοια με αυτή της κυστεΐνης, με τη διαφορά πως τη θέση του θείου, καταλαμβάνει το σελήνιο (Bellinger Frederick P. et al., 2009). Σε σύγκριση με άλλα αμινοξέα, η σεληνοκυστεΐνη εμφανίζεται σπάνια και σε μικρό αριθμό πρωτεϊνών, αφού στον γενετικό κώδικα, η τριπλέτα UGA που κωδικοποιεί το αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη αποτελεί και κωδικόνιο λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Kryukov Gregory V. et al., 2003). Συνεπώς, η ενσωμάτωση της Sec στην πεπτιδική αλυσίδα απαιτεί την επανακωδικοποίηση των UGA κωδικονίων. Αυτή η επανακωδικοποίηση επιτυγχάνεται με την παρουσία (i) μίας δομής θηλειάς (αλληλουχία εισαγωγής Sec: SECIS) εντός της 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR) του αγγελιοφόρου RNA (mRNA), (ii) πρωτεΐνες που συνδέονται με τη δομή SECIS και (iii) ένα ειδικό tRNA-Sec που φέρει το Sec αμινοξύ και συντίθεται από σελενίδιο, ATP και seryl-tRNA. Όλες οι σεληνοπρωτεΐνες περιέχουν ένα Sec που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, εκτός από τη σεληνοπρωτεΐνη P, η οποία περιέχει πολλαπλά Sec (Catherine Mérlan & John Hesketh, 2012). Τα μοναδικά οξειδοαναγωγικά χαρακτηριστικά της σεληνοκυστεΐνης προσδίδουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε αυτά τα σεληνοένζυμα, τα οποία μπορούν να μειώσουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου και έτσι να αποτρέψουν τη βλάβη σημαντικών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των DNA, RNA, λιπιδίων, πρωτεϊνών και μεμβρανών (Ulrike Peters et al., 2008).

Έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα είκοσι πέντε ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν για σεληνοπρωτεΐνες (Shchedrina VA et al., 2009), με τις περισσότερες έρευνες να επικεντρώνονται στις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs) και στη σεληνοπρωτεΐνη P (SePP1) (Slattery ML et al., 2012) (Πίνακας 4).

Σεληνοπρωτεΐνες	Αρχικά	Κύρια λειτουργία	Υποκυτταρική εντοπιση
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1	GPx1/cGPx	Αντιοξειδωτικό (αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου)	Κυτταρόπλασμα
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 2	GPx2/GI (γαστροεντερική) -GPx2	Αντιοξειδωτικό (αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου)	Κυτταρόπλασμα

Σεληνοπρωτεΐνες	Αρχικά	Κύρια λειτουργία	Υποκυτταρική εντοπισση
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 3	GPx3	Αντιοξειδωτικό (αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου)	Εκκριτική
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 4	GPx4/PH (Φωσφολιπίδιο-υδροϋπεροξειδίου)-GPx	Αντιοξειδωτικό, προστατεύει ενάντια στη λιπιδική υπεροξειδωση	Κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδρια, πυρήνας και μεμβράνες
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 6	GPx6	Αντιοξειδωτικό (αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου)	Εκκριτική
Αναγωγάση της θειορεδοξίνης 1	TR1	Μείωση θειορεδοξίνης και άλλων υποστρωμάτων	Κυτταρόπλασμα, πυρήνας
Αναγωγάση της θειορεδοξίνης 2	TR2	Αναγωγή του δεσμού ισομερισμού θειορεδοξίνης δισουλφιδίου, θειορεδοξίνης / γλουταρεδοξίνης / αναγωγάσης γλουταθειόνης	Μιτοχόνδρια
Αναγωγάση της θειορεδοξίνης 3	TR3		Μιτοχόνδρια, πυρήνας, κυτταρόπλασμα?

Σεληνοπρωτεΐνες	Αρχικά	Κύρια λειτουργία	Υποκυτταρική εντοπισση
Διωδάση τύπου 1	Dio1	Μεταβολισμός των θυρεοειδικών ορμονών	Μεμβράνες ΕΔ
Διωδάση τύπου 2	Dio2	Μεταβολισμός των θυρεοειδικών ορμονών	Μεμβράνη?
Διωδάση τύπου 3	Dio3	Καταβολισμός των θυρεοειδικών ορμονών	Μεμβράνη κυττάρων και ενδοσωμάτων
Συνθετάση σεληνοφωσφορικών 2	SPS2	Μετατροπή σεληνίου σε σεληνοφωσφορικό	Άγνωστη
Σεληνοπρωτεΐνη P	SePP	Μεταφορά και παράδοση σεληνίου / αντιοξειδωτικό	Εκκριτική
Σεληνοπρωτεΐνη W	SeIW	Αντιοξειδωτικό?	Κυτταρόπλασμα
Σεληνοπρωτεΐνη K	SeIK	Αντιοξειδωτικό?, ρυθμίζει τη ροή Ca <sup>2+</sup>	ΕΔ
Σεληνοπρωτεΐνη 15 kDa	SeP15	Αναδίπλωση πρωτεϊνών	ΕΔ
Σεληνοπρωτεΐνη S	SePS/SeIS	Φλεγμονώδης απόκριση, ρύθμιση παραγωγής κυτοκίνης,	ΕΔ

Σεληνοπρωτεΐνες	Αρχικά	Κύρια λειτουργία	Υποκυτταρική εντοπισση
		προστασία από την επαγόμενη από stress του ΕΔ απόπτωση	
Σεληνοπρωτεΐνη Μ	SelM	Αντιοξειδωτικό?, ομοιόσταση ασβεστίου	ΕΔ
Σεληνοπρωτεΐνη Ν	SelN	Αντιοξειδωτικό?, ομοιόσταση ασβεστίου?, ρόλος στη λειτουργία των μυών	Μεμβράνες ΕΔ
Σεληνοπρωτεΐνη Τ	SelT	Άγνωστη	Golgi/ΕΔ
Σεληνοπρωτεΐνη Η	SelH	Πυρηνική οξειδοαναγωγή, πρωτεΐνη δέσμευσης του DNA?	Πυρήνας?
Σεληνοπρωτεΐνη Ι	SelI	Άγνωστη	Άγνωστη
Σεληνοπρωτεΐνη Ο	SelO	Άγνωστη	Άγνωστη
Σεληνοπρωτεΐνη V	SelV	Άγνωστη	Άγνωστη

**Πίνακας 4:** Οι 25 σεληνοπρωτεΐνες (Catherine Méplan & John Hesketh, 2012)



Τα μέλη της οικογένειας GPx δεν τροφοδοτούνται ισοδύναμα με σελήνιο. Αντ' αυτού, παράγονται σύμφωνα με μια ορισμένη ιεραρχία, πράγμα που σημαίνει ότι η παραγωγή μερικών από αυτά παύει όταν το σελήνιο περιορίζεται, υποδεικνύοντας μια χαμηλή κατάταξη στην ιεραρχία, ενώ παράγονται υψηλής κατάταξης μορφές ακόμη και κάτω από περιορισμένη παροχή σεληνίου. Η σχετική θέση των σεληνοπρωτεϊνών εντός αυτής της ιεραρχίας πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζει τη σχετική βιολογική τους σημασία. Στην οικογένεια των GPx, τα δύο άκρα αντιπροσωπεύονται από τις cGPx (GPx1) και pGPx (GPx3), οι οποίες εξαφανίζονται ταχέως ακόμη και σε περιορισμένη διαθεσιμότητα σεληνίου, και από τις PHGPx (GPx4) και GI-GPx (GPx2), οι οποίες είναι οι πιο σταθερές σεληνοπρωτεΐνες (Regina Brigelius-Flohé, 2006). Είναι ενδιαφέρον ότι στη γαστρεντερική οδό εκφράζονται και οι τρεις GPx (GPx1, GPx3, GPx4), υποδηλώνοντας ενδεχομένως ένα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του εντέρου (π.χ. ως φραγμός για τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) (Ulrike Peters et al., 2008). Πληροφορίες για τις GPx1, GPx3, GPx4 και SEPP1 πρωτεΐνες αναζητήθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία και στη σελίδα του κάθε ενζύμου στην ιστοσελίδα PubMed του NCBI.

### **1.6.1 Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1 (GPx1)**

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-1 (GPx1) είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο σεληνοπρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης (GPx) και εκφράζεται στο σύνολο των κυττάρων. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 και συγκεκριμένα στη θέση 3p21.31 (Gresner Peter et al., 2008). Λόγω της συμμετοχής της στο μεταβολισμό του υδρογόνου και των οργανικών υπεροξειδίων, χρησιμοποιείται σαφώς για την εξισορρόπηση του οξειδωτικού στρες (Regina Brigelius-Flohé, 2006) και εμπλέκεται, πιθανά, στην ανάπτυξη καρκίνου. Συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) περιέχει σελήνιο σε καταλυτική θέση και χρησιμοποιεί την GSH ως δότη ηλεκτρονίων για τη μείωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O, μετατρέποντας την ίδια στην οξειδωμένη μορφή της, τη δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG). Έτσι, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών και καρκινογόνων παραγόντων (Bruna Victorasso Jardim et al., 2013). Προηγούμενες μελέτες έχουν καταγράψει τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα διάφορα καρκινικά στάδια του παχέος εντέρου (Yagublu V. et al., 2011), γεγονός που πιστοποιεί την άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες και μπορεί να υποστηρίξει τη λειτουργικότητα ως μηχανισμού επιβίωσης, που καταστέλλει την απόπτωση στα κύτταρα του όγκου.

### **1.6.2 Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 3 (GPx3)**

Αναφέρεται ως πρωτεΐνη του πλάσματος και είναι εκκριτική. Ως η μοναδική εξωκυτταρική πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας, έχει πιθανά, την ικανότητα να υπερασπιστεί στο εξωκυτταρικό περιβάλλον τα κύτταρα έναντι των ROS (Barrett C. W. et al., 2012). Κωδικοποιείται από γονίδιο το οποίο καταλαμβάνει τη θέση 5q33.1 του χρωμοσώματος 5 (Chu FF, 1994). Το GPx3 μεταφέρεται μέσω κυκλοφορίας όπου δεσμεύεται με τις βασικές μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων, όπως αυτών της γαστρεντερικής οδού (Burk RF et al., 2011). Μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε τμήματα ανθρώπινου παχέος εντέρου κατέδειξαν την παρουσία της πρωτεΐνης GPx3 εντός ώριμων επιθηλιακών κυττάρων (Tham DM. et al., 1998). Ειδικότερα, η υπερμεθυλίωση και η υποέκφραση της GPx3 συμβαίνουν συνήθως στους καρκίνους του προστάτη, του γαστρικού, του τραχήλου της μήτρας, του θυρεοειδούς

και του παχέος εντέρου, ενώ έχει καταδειχτεί πως περιορίζει την ανάπτυξη του καρκινώματος που σχετίζεται με την κολίτιδα (Barrett C. W. et al., 2012).

### 1.6.3 Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 4 (GPx4)

Η GPx4 κωδικοποιείται από γονίδιο το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19, και συγκεκριμένα στη θέση 19p13.3 (Kelner MJ & Montoya MA, 1998). Είναι μια απανταχού παρατηρούμενη πρωτεΐνη, και σε σύγκριση με άλλες GPxs, έχει τη μοναδική ικανότητα να δρα σε συνδυασμό με την α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) για την αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (M. Maiorino et al., 1991), μειώνοντας άμεσα το καταστρεπτικό υδροϋπεροξειδίου των φωσφολιπιδίων εντός του κυττάρου και της μεμβράνης, προωθώντας έτσι την ακεραιότητα της τελευταίας (Peters U. et al., 2008). Εκτός από τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, η GPX4 συμμετέχει στη ρύθμιση των φλεγμονωδών διεργασιών (Sneddon A. A. et al., 2003) και μειώνει τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, τα οποία ενεργοποιούν τη λιποξυγενάση και την κυκλοοξυγενάση (Hirotaka Imai & Yasuhito Nakagawa, 2003). Επίσης προστατεύει τα μιτοχόνδρια από οξειδωτική βλάβη και διατηρεί τα σύμπλοκα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Cole-Ezea et al., 2012). Σε σύγκριση με τα άλλα ισόένζυμα της οικογένειας GPx, η αντίσταση της GPX4 στην έλλειψη σεληνίου, μπορεί να υποδηλώνει το ζωτικό της ρόλο. Έχει καταγραφεί σημαντική συσχέτιση πολυμορφισμών της GPx4 με την επιβίωση (αλλά όχι με τον κίνδυνο εμφάνισης) καρκίνου του μαστού (Peters U. et al., 2008), την ωρίμανση του σπέρματος, αλλά και την εμβρυογένεση (Regina Brigelius-Flohé, 2006). Ο πολυμορφισμός rs713041, SNP 2573 C>T. (Haug U. et al., 2012) αναφέρεται πολλές φορές στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο C αυτού του SNP έχει υψηλότερη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (Bermano G. et al., 2007), γεγονός που υποδηλώνει μια σύνδεση μεταξύ του συγκεκριμένου SNP και της νόσου. Αυτός ο πολυμορφισμός (rs713041) μπορεί να ρυθμίσει τη σύνθεση της GPx4 μεταβάλλοντας τη συνάφεια του μηχανισμού εισαγωγής σεληνοκυστεϊνών για το στοιχείο SECIS του (Catherine Mérlan et al., 2008).

Ένας μηχανισμός με τον οποίο οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο καρκίνου, είναι με την αμβλύνση των επιδράσεων του οξειδωτικού στρες που προάγουν τον όγκο (Regina Brigelius-Flohé, 2006).

### 1.6.4 Η σεληνοπρωτεΐνη P (SEPP1)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σεληνοπρωτεΐνη P (SEPP1) εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 5p12 του χρωμοσώματος 5 και ανιχνεύεται κυρίως στο πλάσμα του αίματος. Περιέχει >50% του συνολικού σεληνίου στο πλάσμα. Λόγω της αυξημένης παρουσίας της στο πλάσμα (**plasma**), ονομάστηκε σεληνοπρωτεΐνη P (Gladysheva VN. et al., 2016). Το ήπαρ εμφανίζεται να είναι η κύρια πηγή της δεξαμενής της στο πλάσμα του αίματος, εκφράζεται, όμως, και σε ποικιλία ιστών συμπεριλαμβανομένου του παχέος εντέρου (Gresner Peter et al., 2008). Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές ισομορφές της SEPP1 πρωτεΐνης, που διαφέρουν στον αριθμό των ατόμων σεληνίου μέσα στα μόρια τους, ανάλογα με το είδος του ζώου που μελετάται.

Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη SEPP1 περιέχει έως και 10 άτομα σεληνίου. Η SEPP1 πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη μεταφορά σεληνίου (Burk RF. et al., 2003), ενώ φαίνεται να έχει και αντιοξειδωτικές λειτουργίες (Catherine Mérlan & John Hesketh, 2012) καθώς διαθέτει στο N-τερματικό άκρο μία περιοχή θειορεδοξίνης παρόμοια με εκείνη που εντοπίζεται στις περισσότερες σεληνοπρωτεΐνες με

γνωστές λειτουργίες, πράγμα που δείχνει μια πιθανή λειτουργία οξειδοαναγωγής (Gladysheva VN. et al., 2016). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης SEPP1 στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο προστάτη και ορθού (Al-Taie OH et al., 2004; Peters U. et al., 2008). Ο πολυμορφισμός rs7579 φαίνεται να επηρεάζει την ποσότητα της SEPP1 στο αίμα (Merplan C et al., 2009) και να αυξάνει τα επίπεδα επικινδυνότητας για την έκφραση καρκίνου του παχέος εντέρου (Catherine Mérlan et al., 2010).

Είναι γνωστό ότι το σελήνιο, μέσω των σεληνοπρωτεϊνών, εκτός από τη ρύθμιση της ομοιοστασίας οξειδοαναγωγής στα κύτταρα ρυθμίζει και τις φλεγμονώδεις οδούς. Επομένως, έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων όγκου και ανοσοκυττάρων (Bastihalli T. Diwakar et al., 2017), γι'αυτό και επιλέξαμε να συσχετίσουμε τις πρωτεΐνες του, με γνωστούς καρκινικούς δείκτες και επιδημιολογικά στοιχεία.

## 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Υλικά μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 45 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. 28/45 (62.22%) ήταν άνδρες και 17/45 (37.78%) ήταν γυναίκες ηλικίας 40 - 85 (μέση τιμή: 67 έτη). Η πλειοψηφία των ασθενών είχαν χειρουργηθεί στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και προσήλθαν στο εργαστήριο για εξετάσεις των βιοδεικτών KRAS, BRAF και MSI προκειμένου να λάβουν κατάλληλη θεραπεία. Έγινε συλλογή των κλινικο-ϊστολογικών παραμέτρων και επιλογή των κατάλληλων κύβων παραφίνης για περαιτέρω μελέτη.

### 2.2 Μεθοδολογία

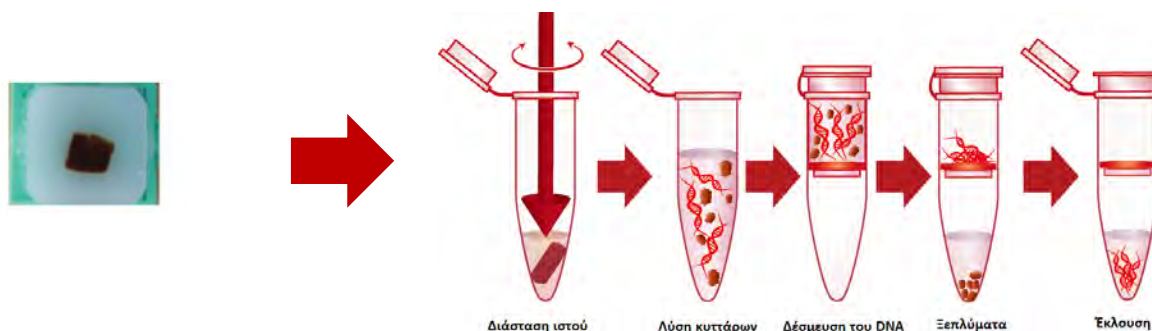
Το ένα μέρος των πειραμάτων μας περιλαμβάνει τη μελέτη συγκεκριμένων πολυμορφισμών που με βάση προηγούμενες μελέτες φαίνεται να εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό έγινε απομόνωση DNA από μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εμπεδωμένο σε παραφίνη ιστό (Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissue, FFPET), αφού προηγουμένως έγινε με τη βοήθεια χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης από τον Παθολογοανατόμο η επιλογή του κατάλληλου κύβου παραφίνης, ώστε να εξασφαλίσουμε >70% νεοπλασματικά κύτταρα στο υλικό της μελέτης μας. Η απομόνωση έγινε με τη βοήθεια του PureLink™ Genomic DNA Kit (Thermo Fisher) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (εικόνα 10).

#### 2.2.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction) από FFPET ιστό

Αρχικά προετοιμάζουμε δύο υδατόλουτρα στους 37°C και στους 56 °C.

- 1). Τοποθέτηση 10 τομών πάχους 10μm σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 2ml και προσθήκη 1ml ξυλόλης. Περιδίνηση των δειγμάτων και επώαση για 30 λεπτά με ενδιάμεσες περιδινήσεις ανά 10 λεπτά.
- 2). Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις 15000 στροφές (rpm). Απομάκρυνση του υπερκείμενου, χωρίς να αλλοιωθεί το ίζημα που δημιουργήθηκε.
- 3). Επανάληψη των βημάτων 1 και 2.
- 4). Προσθήκη 1ml 100% αιθανόλης (EtOH), περιδίνηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15000 στροφές.
- 5). Αφαίρεση του υπερκείμενου χωρίς τη διατάραξη του ιζήματος.
- 6). Επανάληψη των βημάτων 4 και 5.
- 7). Επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C, με ανοιχτά τα καπάκια των eppendorf, για εξάτμιση της εναπομείνουσας αιθανόλης.

- 8). Προσθήκη 200μl-400μl PureLink™ Genomic Digestion Buffer, αναλόγως με το μέγεθος του ιζήματος που δημιουργήθηκε, και 20μl-40μl πρωτεϊνάσης K (Proteinase K), σε αντιστοιχία με την χρησιμοποιούμενη ποσότητα του Buffer. Ακολουθεί περιδίνηση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα.
- 9). Επώαση σε υδατόλουτρο των 56°C για τουλάχιστον 16 ώρες ή μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- 10). Περιδίνηση και έλεγχος των δειγμάτων για καλή λύση του ιστού.
- 11). Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 15000 στροφές. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf των 2ml.
- 12). Σύντομη φυγοκέντρηση (spin) για την απομάκρυνση σταγόνων από τα τοιχώματα και το καπάκι του erpendorf.
- 13). Προσθήκη 20μl-40μl RNase A, περιδίνηση, και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- 14). Προσθήκη 200-400μl PureLink™ Genomic Lysis /Binding Buffer και περιδίνηση.
- 15). Προσθήκη 200μl-400μl αιθανόλης (96-100 %) στο σωληνάριο και καλή περιδίνηση για 5 δευτερόλεπτα.
- 16). Μεταφορά του δείγματος (από βήμα 15) σε στήλη παρεχόμενη από το kit και φυγοκέντρηση στις 10000rpm (9830xg) για 10min.
- 17). Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής και απόρριψη του προηγούμενου. Προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης 1 (Wash Buffer 1) στη στήλη και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες.
- 18). Αντικατάσταση του σωληναρίου συλλογής και προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης 2 (Wash Buffer 2) στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15000 στροφές.
- 19). Αντικατάσταση του σωληναρίου συλλογής και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 1 λεπτό (στέγνωμα).
- 20). Τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Erpendorf 1,5 ml, και προσθήκη 30-50μl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).
- 21). Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις αρχικές συνθήκες για 10 λεπτά.
- 22). Επανάληψη του βήματος 20 άλλη μια φορά, χωρίς αλλαγή του σωληναρίου συλλογής, αλλά μεταφέροντας το δείγμα ξανά μέσα στη στήλη.
- 23). Φύλαξη του περιεχόμενου του σωληναρίου συλλογής (DNA) στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση.



Εικόνα 10: Στάδια απομόνωσης DNA από FFPE

## 2.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος DNA

### 2.2.2.1 Φωτομέτρηση

Ακολούθησε φωτομέτρηση του DNA των δειγμάτων μας για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά του. Για να προσδιοριστεί η καθαρότητα του δείγματος, υπολογίζεται ο λόγος  $OD_{260}/OD_{280}$ . Για τιμές στα όρια 1,7-1,9, το DNA χαρακτηρίζεται ως επαρκώς καθαρό. Τιμές μικρότερες του 1,7 υποδηλώνουν πρόσμιξη με φαινόλη ή πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9, πρόσμιξη με άλλα μακρομόρια. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:  $C_{DNA}(\mu\text{g/ml}) = OD_{260}/OD_{280} \times 50 \times \text{αραίωση}$ .

### 2.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων μας σε πήκτωμα αγαρόζης 1% προκειμένου να εξετάσουμε την ακεραιότητα του δείγματός μας. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα της αγαρόζης τοποθετείται κάτω από υπεριώδες φως (UV) και παρατηρούνται οι ζώνες του DNA.

### 2.2.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Τα βήματα που ακολουθούνται για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης παρατίθενται παρακάτω:

- 1). Μέτρηση σε ζυγό της επιθυμητής ποσότητας σκόνης αγαρόζης και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη. Προσθήκη αντίστοιχου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (TBE ή TAE) 1x και ανάδευση.
- 2). Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος έως ότου γίνει διαυγές. (Η θέρμανση διακόπτεται σε τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να ελεγχθεί το ποσοστό διαύγειας του μίγματος αλλά και η πιθανή εξάτμιση του ρυθμιστικού διαλύματος.)
- 3). Ψύξη του μίγματος (~70°C) και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο μείγμα (0,5μg/ml). Η προσθήκη γίνεται σε ανοιχτό απαγωγό, καθώς το αιθίδιο είναι γνωστός μεταλλαξογόνος παράγοντας.

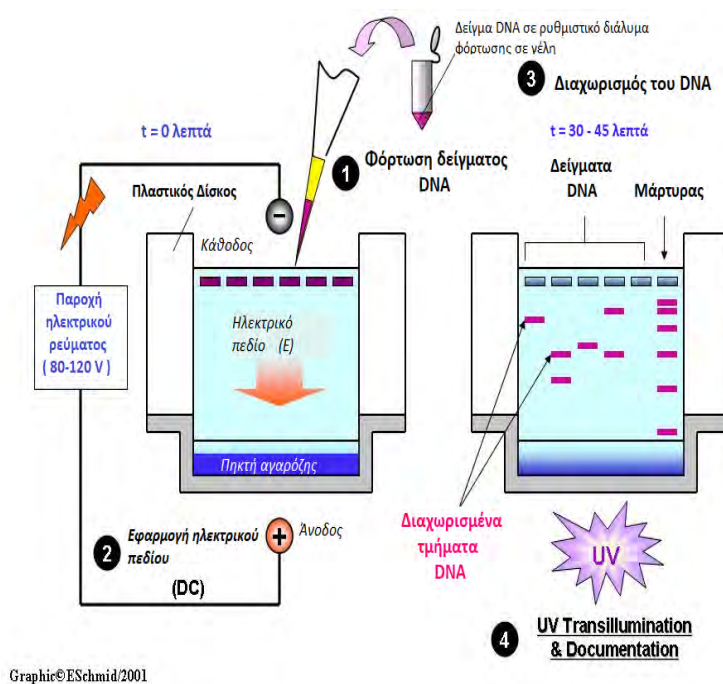
(Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και το καθιστά ορατό, όταν αυτό υποστεί την επίδραση υπεριώδους φωτός).

4). Καλή ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου της ογκομετρικής φιάλης στο εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης. (Στο εκμαγείο έχουμε προσαρμόσει νωρίτερα ειδικά χτένια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την δημιουργία των φρεατίων μέσα στα οποία φορτώνονται τα δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση). Παραμονή του συστήματος στον ανοιχτό απαγωγό μέχρις ότου πολυμεριστεί η αгарόζη και δημιουργηθεί πήκτωμα.

5). Αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευσή του στο ψυγείο έτσι ώστε να αποφεύγεται η επαφή με το φως. (Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο και εξασθενεί όταν εκτίθεται σε φως).

## 2.2.4 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Πριν το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγαδάκια, γίνεται καλή ανάμειξή τους με μικρή ποσότητα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Η χρωστική αυτή είναι απαραίτητη για δυο λόγους. Αρχικά, καθώς περιέχει γλυκερόλη, βοηθάει το δείγμα να τοποθετηθεί στο φρεάτιο. Επίσης, είναι ορατή στο φυσικό φως, οπότε παράλληλα με τον έλεγχο του σωστού φορτώματος του δείγματος, είναι δυνατή και η παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης και άρα αποφεύγεται η συχνή χρήση της UV. Τέλος, παράλληλα με τα δείγματα, φορτώνεται και ένας μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους, για την εκτίμηση του μήκους των προϊόντων μας. Τελευταίο στάδιο, είναι η απομάκρυνση του πηκτώματος από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και η παρατήρησή του υπό υπεριώδες φως (UV) (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων μας.

## 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την ενίσχυση (amplification) συγκεκριμένης, κάθε φορά, αλληλουχίας των γονιδίων *SEPP1*, *GPX1*, *GPX4* από το ολικό DNA των ασθενών της μελέτης μας, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Οι PCR αντιδράσεις μας διεξήχθησαν σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler) Eppendorf (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Eppendorf.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί rs713041 και rs7579 των γονιδίων *GPX4* και *SEPP1* αντίστοιχα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των αλληλουχιών στις οποίες εντοπίζονται οι μελετούμενοι πολυμορφισμοί σχεδιάστηκαν με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία (Catherine Mérlan et al., 2013; Bermano G. et al., 2007). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, η θέση των πολυμορφισμών και τα μεγέθη των PCR προϊόντων που προκύπτουν απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πολυμορφισμός	Αλληλουχία εκκινητών	Εξόνιο	PCR product
rs713041	F: 5'-GACCTGCCCACTATTCTAG-3'	3' UTR	220bp
	R: 5'-GTCTGTTTATTCCCACAAGG-3'		
rs7579	F: 5'-CAAAAAAGTGAGAATGACCTTCAAAC-3'	3' UTR	86bp
	R: 5'-ATGCTGGAAATGAAATTGTGTCTAGA-3'		

Πίνακας 5: Αλληλουχίες των εκκινητών, θέση των SNPs και μεγέθη των PCR προϊόντων.



Όλες οι αλληλουχίες των εκκινητών ελέγχθηκαν μέσω του προγράμματος BLAST του NCBI, για την εξακρίβωση της αντιστοιχίας τους με το επιθυμητό τμήμα του εκάστοτε γονιδίου προς μελέτη. Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται τα πρωτόκολλα PCR για τα τμήματα των GPx4 και SEPP1 που μελετήθηκαν, και οι συνθήκες διεξαγωγής των αντίστοιχων πειραμάτων.

### **GPx4 (221bp)**

10x buffer → 5μl

MgCl<sub>2</sub> (50mM) → 2μl

dNTPs (40mM) → 2μl

εκκινητές (10pmol/μl) → 2μl

Taq πολυμεράση → 0,5μl

DNA → 5μl, TV → 50μl

94oC → 02:00

53.5oC → 01:00

72oC → 01:00

94oC → 01:00

53.5oC → 01:00

72oC → 01:00

72oC → 07:00

18oC → for ever

} 1 cycle

} 30 cycles

### **SEPP1 (86bp)**

10x buffer → 5μl

MgCl<sub>2</sub> (50mM) → 2μl

dNTPs (40mM) → 2μl

εκκινητές (10pmol/μl) → 1.5μl

Taq πολυμεράση → 0,5μl

DNA → 5μl, TV → 50μl

94oC → 02:00

53.5oC → 01:00

72oC → 01:00

94oC → 01:00

53.5oC → 01:00

72oC → 01:00

72oC → 07:00

18oC → for ever

} 1 cycle

} 30 cycles

## 2.4 Καθαρισμός και αλληλούχιση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο SEPP1

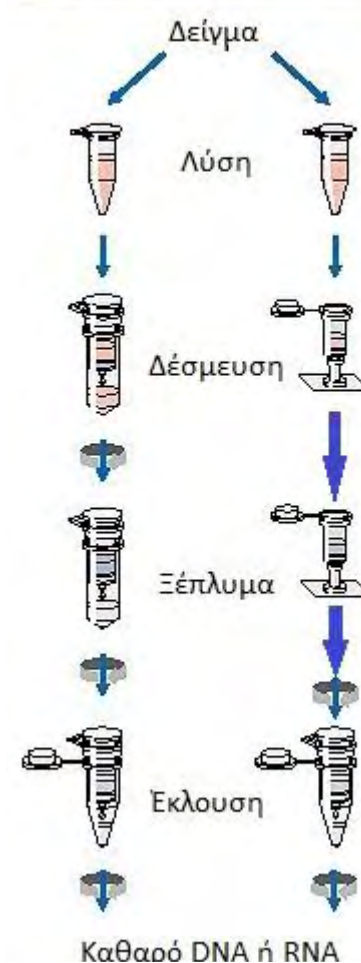
### 2.4.1 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης (QIAquick Gel extraction)

Ο καθαρισμός του PCR προϊόντος προκειμένου να ακολουθήσει η ανάλυση της αλληλουχίας του έγινε με το QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας, όπως φαίνεται παρακάτω (εικόνα 13):

- 1). Κόβεται και αφαιρείται από το πήκτωμα το τμήμα με τη ζώνη που μας ενδιαφέρει και προστίθεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5-2ml. (Στα στάδια που ακολουθούν, οι ποσότητες των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται, αναφέρονται σε κομμάτια πηκτώματος που ζυγίζουν κατά προσέγγιση 100mg).
- 2). Προσθήκη 600μl QG Buffer στο σωληνάριο και επώαση σε υδατόλουτρο των 50°C για 12 λεπτά, με καλή ανακίνηση του σωληναρίου στο vortex κάθε 3 λεπτά.
- 3). Προσθήκη 200μl ισοπροπανόλης και πολύ καλή ανάδευση.
- 4). Μεταφορά του μείγματος στη στήλη QIAquick spin column.
- 5). Φυγοκέντρηση της στήλης στις 13000 στροφές για 1λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διαλύματος που απομένει στο σωληνάριο συλλογής (collection tube).
- 6). Προσθήκη 735μl PE-διαλύματος στη στήλη και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- 7). Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση καθαρού κάτω από τη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 15000rpm για 1min (στέγνωμα της στήλης).
- 8). Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση αποστειρωμένου σωληναρίου τύπου Eppendorf 1,5ml κάτω από τη στήλη.
- 9). Έκλουση του DNA με προσθήκη 40μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης και αναμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- 10). Φυγοκέντρηση της στήλης για 1min στις 13000rpm.

Η ποιότητα του DNA που ανακτήθηκε με την παραπάνω μέθοδο, ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης και παρατηρείται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός.

#### Διαδικασία QIAamp Spin Column σε φυγόκεντρο υπό κενό



Εικόνα 13: Βήματα καθαρισμού DNA

Η ύπαρξη του πολυμορφισμού rs7579 του ενζύμου SEPP1, ελέγχθηκε μέσω αλληλούχισης του τμήματος που προέκυψε από την αντίστοιχη PCR.

#### 2.4.2 Αλληλούχιση του PCR προϊόντος του SEPP1 γονιδίου σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού rs7579

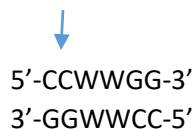
Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των καθαρισμένων PCR προϊόντων του SEPP1 γονιδίου σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems) με τη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger. Στην μέθοδο αυτή κάθε ένα από τα τέσσερα διδεόξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) χρωματίζονται με διαφορετικές χρωστικές (fluorescent dyes), καθεμία από τις οποίες εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος φθορισμού. Με τη μέθοδο αυτή, εντοπίστηκε η ύπαρξη του μελετούμενου πολυμορφισμού. Η αλληλουχία που μας δόθηκε από το αποτέλεσμα της αλληλούχισης, συγκρίθηκε με τη γνωστή αλληλουχία του γονιδίου μέσω του ειδικού προγράμματος για ταυτοποίηση Blast της NCBI που διατίθεται στο διαδίκτυο. Η ιστοσελίδα για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών είναι η:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

### 2.5 Πέψη με περιοριστικό ένζυμο

Ο πολυμορφισμός rs713041 που εντοπίζεται στο γονίδιο GPx4 μελετήθηκε με τη χρήση ειδικού περιοριστικού ενζύμου που αναγνωρίζει και κόβει σε συγκεκριμένες θέσεις στο DNA. Η επιλογή του ενζύμου έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε η αλληλουχία που περιέχει τον πολυμορφισμό να αναγνωρίζεται και να πέπτεται από το ένζυμο περιορισμού.

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sty1 για τον πολυμορφισμό της GPx4 (Bermano G. et al., 2007). Αναγνωρίζει την αλληλουχία



(όπου W: A/T), και η επώαση μαζί του δίνει 3 τμήματα των 97bp, 62bp και 62bp για το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, ενώ το προγονικό σε ομοζυγωτία αποδίδει δύο τμήματα των 159bp και 62bp.

Περιοριστικό ένζυμο	Αλληλουχία που αναγνωρίζει	Πολυμορφισμός	Προϊόντα πέψης
Sty1	↓ 5'-CCWWGG-3' 3'-GGWWCC-5'	rs713041 του γονιδίου της GPx4	WT: 159bp, 62bp pol.: 97bp, 62bp, 62bp

Το αποτέλεσμα της πέψης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 4% και με μάρτυρα ladder 25bp (Thermo Fisher).

## 2.6 Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των GPx1, GPx3 και GPx4 πρωτεϊνών

Για τον έλεγχο της έκφρασης των επιμέρους ενζύμων στους καρκινικούς ιστούς, στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης, έγινε χρώση των τελευταίων με κατάλληλα αντισώματα. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

### 2.6.1 Γενικό πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας

- Λήψη τομών παραφίνης πάχους 4 μm με τη βοήθεια μικροτόμου Leica για κάθε δείγμα της μελέτης μας
- Τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρες πλάκες θετικά φορτισμένες (Superfrost, Menzel, Wiesbaden, Germany) και επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 65°C για 1 ώρα.
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 20 λεπτά
- Ενυδάτωση σε κατιούσα σειρά αλκοολών (100o, 96o, 80o). Πιο συγκεκριμένα, οι τομές παραμένουν για 10 λεπτά σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (100o) (x2 φορές), 2 λεπτά στα υπόλοιπα διαλύματα της αιθυλικής αλκοόλης και 5 λεπτά σε απεσταγμένο νερό.
- Οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα κιτρικού pH 6 (HIER Buffer L, Thermo Scientific) και η ανάκτηση του αντιγόνου έγινε με θερμική επεξεργασία του ιστού με τη χρήση χύτρας, (Decloaking chamber, Biocare) στους 110o C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές παραμένουν στο διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
- Κατανάλωση ενδογενούς υπεροξειδάσης σε υδατικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 10 λεπτά
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό (x3 φορές) και τοποθέτησή τους σε διάλυμα TBST για 5 λεπτά.
- Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ή overnight στους 4oC
- Έκπλυση των τομών με TBST (x3 φορές)
- Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με το αντιδραστήριο Super Enhancer (RTU, Biogenex)
- Έκπλυση των τομών με TBST (x3 φορές)
- Επώαση για 30 λεπτά με το αντιδραστήριο SS LABEL- Polymer HRP (RTU-Biogenex)
- Έκπλυση των τομών με TBST (x3 φορές)

- Επώαση των τομών για 10 λεπτά με χρωμογόνο υποστρώματος 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB+), που έχει ως αποτέλεσμα καφέ καθίζηση στη θέση του αντιγόνου. Το DAB δίνει ένα καφέ παράγωγο ανθεκτικό στην αλκοόλη και την ξυλόλη.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό (x3 φορές) και χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 2 λεπτά.
- Έκπλυση με απεσταγμένο νερό (x3 φορές).
- Αφυδάτωση του ιστού σε ανιούσα σειρά αλκοολών (80ο, 96ο, 100ο). Σε κάθε διάλυμα ο ιστός παραμένει για 2 λεπτά.
- Διαύγαση των τομών σε ξυλόλη για 10 min και επικόλληση καλυπτρίδων με χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan Merch, Germany).

Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται τα τεχνικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (εταιρεία, κωδικός, κλώνος, ξενιστής) καθώς και οι συνθήκες επώασης (αραίωση, θερμοκρασία, χρόνος επώασης, θετικός μάρτυρας) οι οποίες προτυπώθηκαν μέσα από πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της εργασίας αυτής:

### GPx-1

Κλώνος	Πολυκλωνικό
Εταιρεία	Acris
Κωδικός	AP51937PU-N
Θετικός Μάρτυρας	Ηπατοκυτταρικό
Αραίωση	1/250
Χρόνος επώασης/ Θερμοκρασία	30'/ Θερμοκρασία δωματίου

### GPx-3

Κλώνος	Πολυκλωνικό
Εταιρεία	NOVUS (NBP1-06398)
Ξενιστής	Κουνέλι
Θετικός Μάρτυρας	Νεφρός
Αραίωση	1/650
Χρόνος επώασης/ Θερμοκρασία	30'/ Θερμοκρασία δωματίου

#### GPx-4

Κλώνος	Πολυκλωνικό
Εταιρεία	NOVUS (NBP2-54979)
Ξενιστής	Κουνέλι
Θετικός Μάρτυρας	Όρχις
Αραίωση	1/1000
Χρόνος επώασης/ Θερμοκρασία	Overnight/4°C

Στην παρούσα μελέτη ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστοί που δείχνουν θετική ανοσοχρώση για το κάθε αντίσωμα, σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτών των αντισωμάτων μας, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες παραλήφθηκε η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα. Στόχος, κατά την προτύπωση των συνθηκών, ήταν η χρώση του κυτταροπλάσματος και όχι των πυρήνων. Έτσι, δείγματα των οποίων οι πυρήνες δεν διατηρούσαν το μπλε-μωβ που αποκτούν από την αιματοξυλίνη (H&E), απορρίπτονταν προς καταγραφή.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 45 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. 28/45 (62.22%) ήταν άνδρες και 17/45 (37.78%) ήταν γυναίκες ηλικίας 40-85 (μέση τιμή: 67 έτη). Η πλειοψηφία των ασθενών χειρουργήθηκε στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και προσήλθαν στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής για έλεγχο των βιοδεικτών KRAS, BRAF και MSI, η αξιολόγηση των οποίων θα συμβάλλει στην επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος. Έγινε συλλογή των κλινικο-ιστολογικών παραμέτρων και επιλέχθηκαν οι σεληνοπρωτεΐνες Grx1, Grx3, Grx4 και SEPP1 για περαιτέρω ανάλυση, ώστε να εκτιμηθεί ο πιθανός τους ρόλος ως αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Παράλληλα, μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς rs713041 και rs7579 των γονιδίων Grx4 και SEPP1 αντίστοιχα, προκειμένου να δούμε αν παίζουν ρόλο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου στα πλαίσια γενετικής προδιάθεσης.

#### 3.1 Έκφραση των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης Grx1, Grx3 και Grx4

Σε τομές παραφίνης που λήφθηκαν από δείγματα των υπό μελέτη ασθενών μας, έγινε ανοσοϊστοχημική διερεύνηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Grx1, Grx3 και Grx4. Σε κάθε δείγμα η εκτίμηση της χρώσης έγινε σε σύγκριση με την έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό και σε σύγκριση πάντα με τον θετικό μάρτυρα που επιλέχθηκε με βάση τις συστάσεις της εταιρίας του αντισώματος. Ορίσαμε τρία επίπεδα έκφρασης: χαμηλή (υποέκφραση), έκφραση και υπερέκφραση.

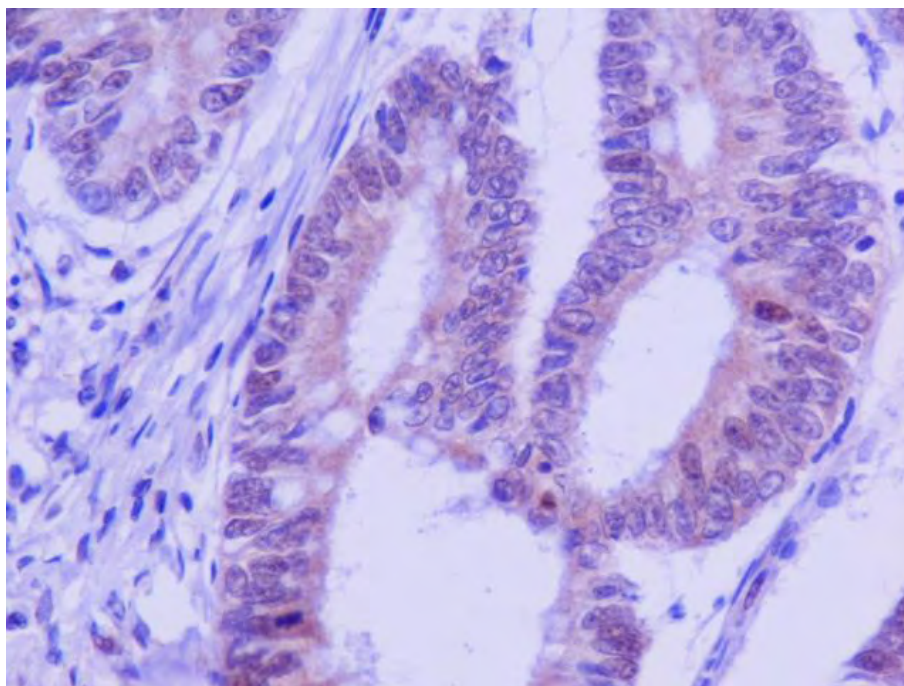
Όσον αφορά στην έκφραση της Grx1 πρωτεΐνης, 8/45 ασθενείς (17.8%) έδειξαν υποέκφραση της Grx1 πρωτεΐνης στον καρκινικό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. 26/45 (57.8%) ασθενείς έδειξαν ανάλογη έκφραση στο φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό, ενώ 11/45 (24.4%) ασθενείς έδειξαν υπερέκφραση στο νεοπλασματικό ιστό έναντι του φυσιολογικού ιστού.

Σχετικά με την ανοσοέκφραση της Grx3 πρωτεΐνης 7/43 (16.3%) ασθενείς παρουσίαζαν υποέκφραση της Grx3 πρωτεΐνης στον καρκινικό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. 32/43 (74.4%) ασθενείς είχαν ανάλογη έκφραση στο φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό, ενώ 4/43 (9.3%) ασθενείς έδειξαν υπερέκφραση στο νεοπλασματικό ιστό έναντι του φυσιολογικού ιστού.

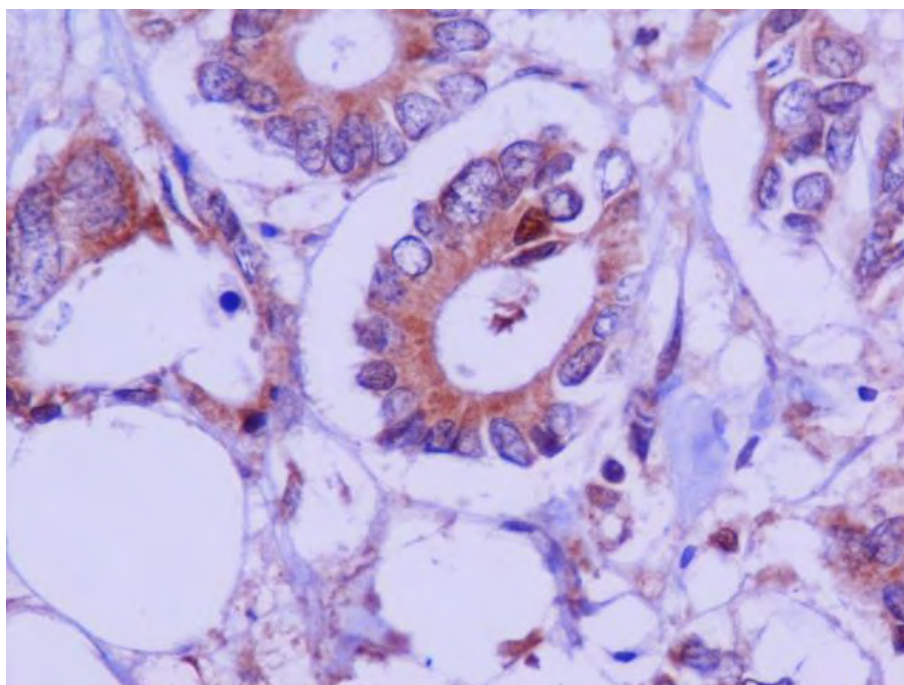
Ελέγχοντας την έκφραση της Grx4 πρωτεΐνης, σε 12/45 (26.7%) ασθενείς παρατηρήθηκε υποέκφραση της Grx4 πρωτεΐνης στον καρκινικό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. 26/45 (57.8%) ασθενείς έδειξαν ανάλογη έκφραση σε φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό, ενώ σε 7/45 (15.5%) ασθενείς καταγράφηκε υπερέκφραση στο νεοπλασματικό ιστό έναντι του φυσιολογικού ιστού. Η κατανομή της ανοσοχρώσης και των τριών πρωτεϊνών δεν παρουσίαζε διαφορές στα δύο φύλα.

Η εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια με τη βοήθεια φωτογραφικής κάμερας ενσωματωμένης στο οπτικό μικροσκόπιο έγινε λήψη εικόνων που απεικονίζουν τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης για κάθε πρωτεΐνη. Οι εν λόγω εικόνες παρατίθενται παρακάτω:

• **GPx1 πρωτεΐνη**



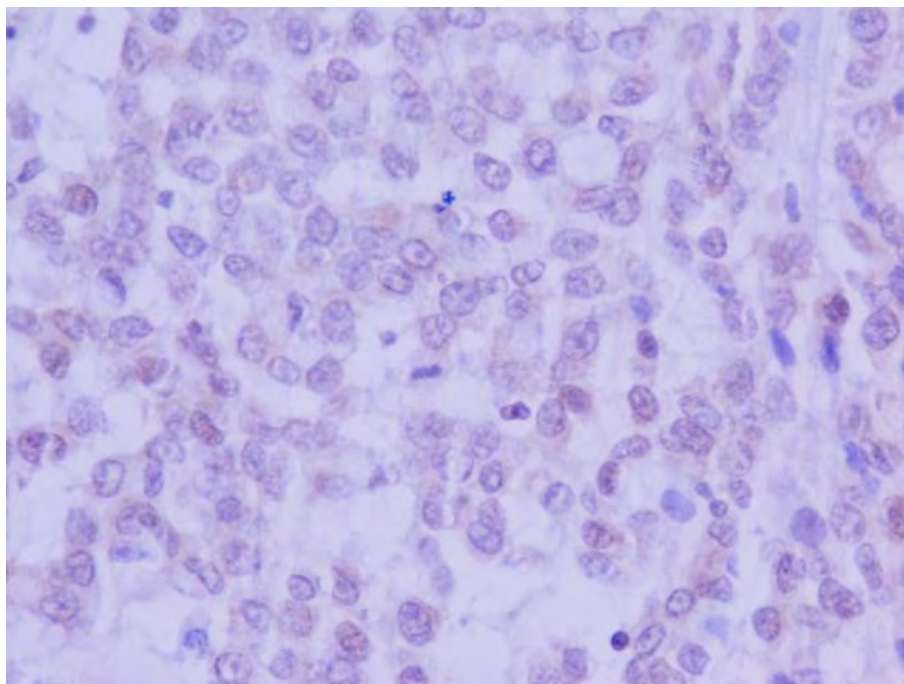
**Εικόνα 14:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx1 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 67 ετών, με CRC δεξιάς εντόπισης και μέτριας διαφοροποίησης. Παρατηρείται θετική ανοσοχρώση. Επίπεδο έκφρασης: απλή/ήπια έκφραση (Μεγέθυνση: x40).



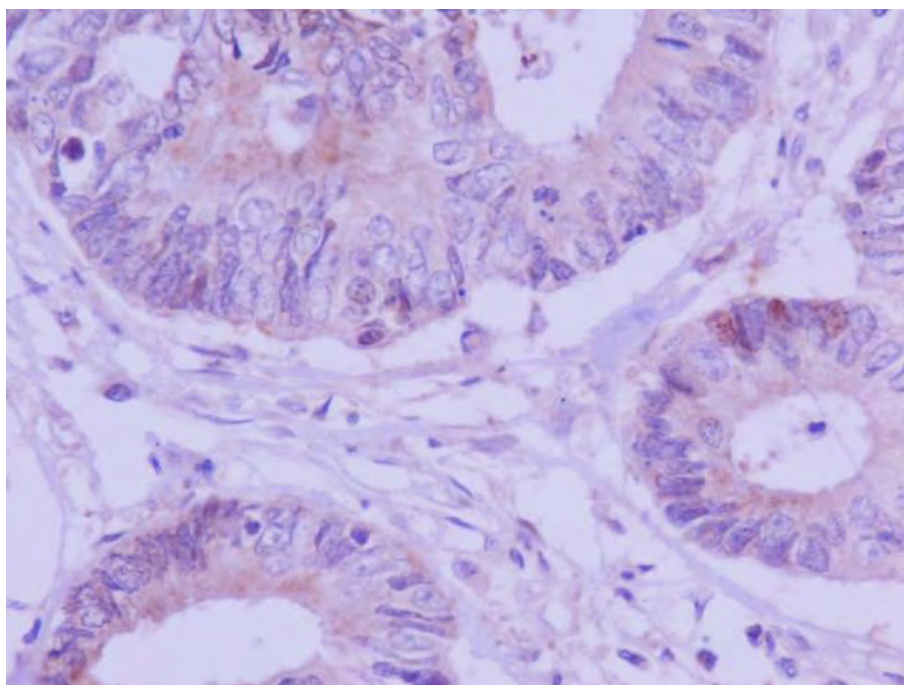
**Εικόνα 15:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx1 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 65 ετών, με CRC αριστερής εντόπισης και υψηλής διαφοροποίησης. Παρατηρείται υπερέκφραση της GPx1 πρωτεΐνης (Μεγέθυνση: x40).



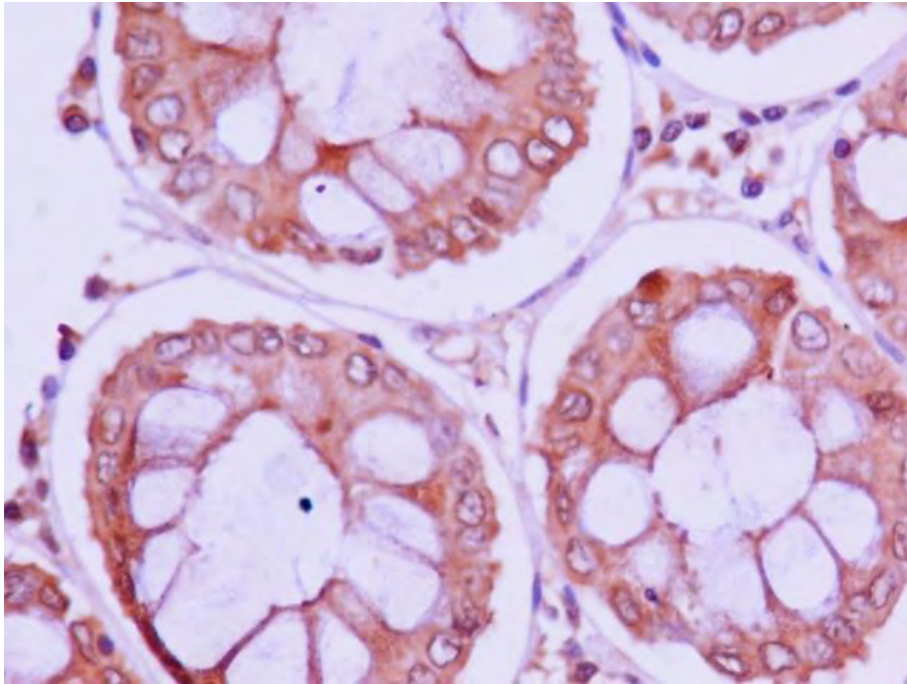
## · GPx3 πρωτεΐνη



**Εικόνα 16:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx3 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 55 ετών, με CRC αριστερής εντόπισης και χαμηλής διαφοροποίησης. Παρατηρείται υποέκφραση της GPx3 πρωτεΐνης (Μεγέθυνση: x40).

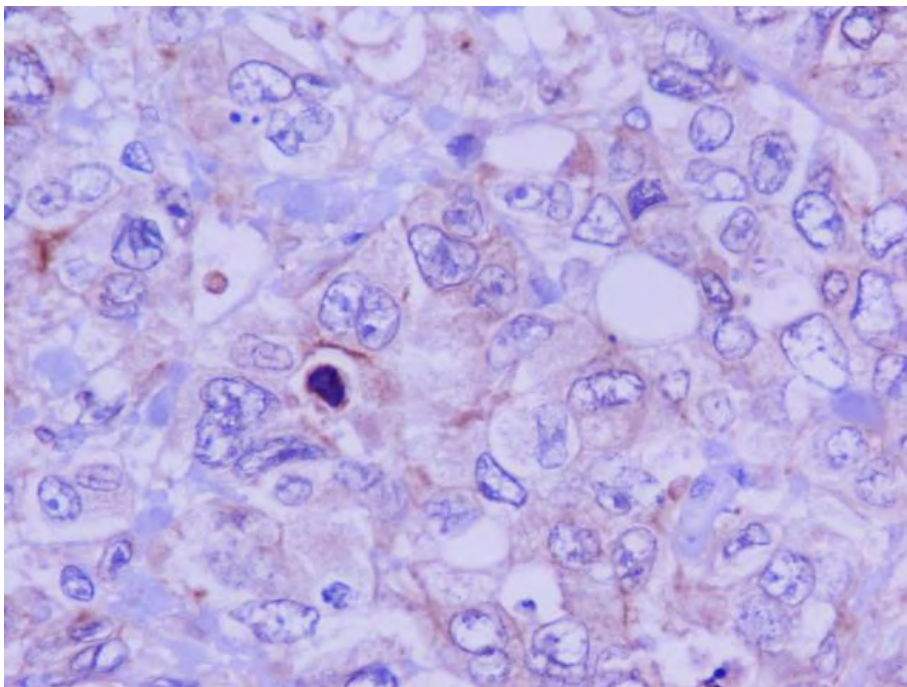


**Εικόνα 17:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx3 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 78 ετών, με CRC δεξιάς εντόπισης και μέτριας διαφοροποίησης. Παρατηρείται θετική ανοσοχρώση. Επίπεδο έκφρασης: απλή/ήπια έκφραση (Μεγέθυνση: x40).

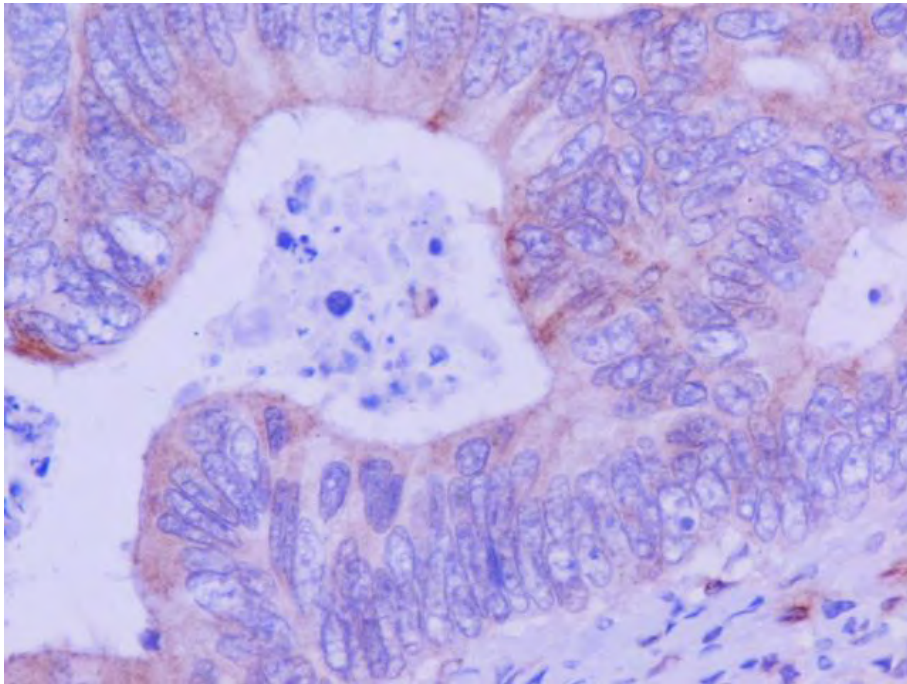


**Εικόνα 18:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx3 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς (γυναίκα) ηλικίας 67 ετών, με CRC δεξιάς εντόπισης και καλής διαφοροποίησης. Παρατηρείται υπερέκφραση της GPx3 πρωτεΐνης (Μεγέθυνση: x40).

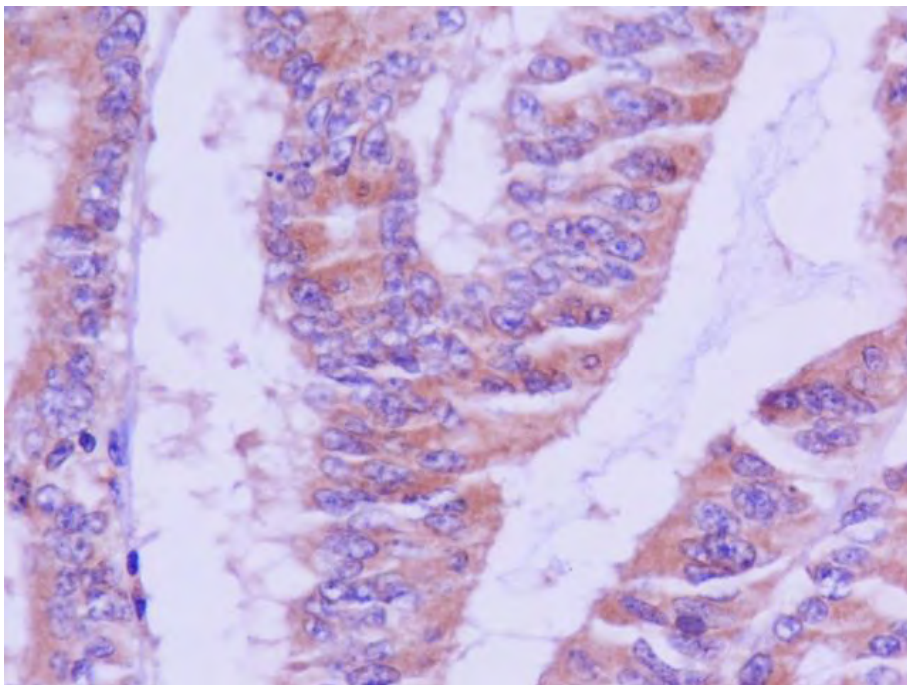
#### • GPx4 πρωτεΐνη



**Εικόνα 19:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx4 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 74 ετών, με CRC αριστερής εντόπισης και χαμηλής διαφοροποίησης. Παρατηρείται υποέκφραση της GPx4 πρωτεΐνης. (Μεγέθυνση: x40).



**Εικόνα 20:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx4 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 80 ετών, με CRC δεξιάς εντόπισης και μέτριας διαφοροποίησης. Παρατηρείται θετική ανοσοχρώση, απλής/ήπιας έκφρασης (Μεγέθυνση: x40).



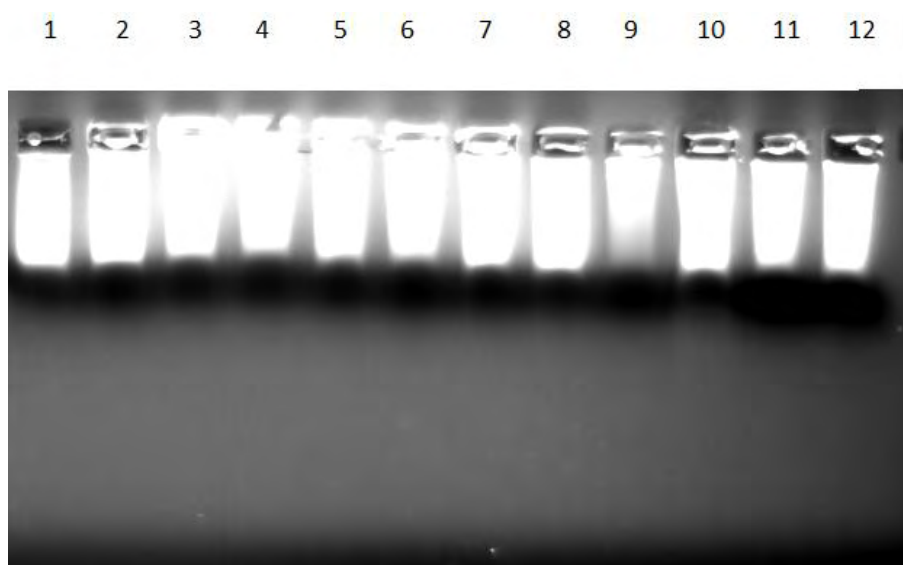
**Εικόνα 21:** Ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι της GPx4 πρωτεΐνης, σε δείγμα ασθενούς ηλικίας 70 ετών, με CRC δεξιάς εντόπισης και καλής διαφοροποίησης. Παρατηρείται υπερέκφραση της GPx3 πρωτεΐνης (Μεγέθυνση: x40).

### 3. 2 Μελέτη των πολυμορφισμών rs713041 και rs7579 των γονιδίων GPx4 και SEPP1 αντίστοιχα.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs713041 της GPx4, μελετήθηκαν 37 ασθενείς, εκ των οποίων οι 12 ήταν γυναίκες και οι 25 άντρες. Από αυτούς, 8 ασθενείς (21.6%) έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (TT), 11 (29.7%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (CC) και 18 ασθενείς (48.6%) σε ετεροζυγωτία (TC). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σχετιζόμενες με την ηλικία ή το φύλο.

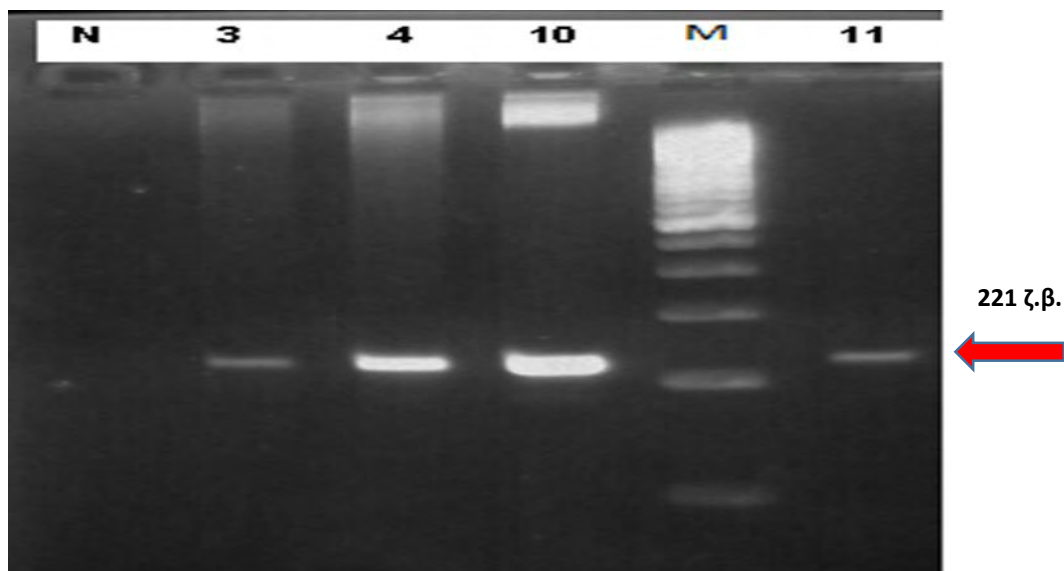
Σχετικά με τον πολυμορφισμό rs7579 της SEPP1, μελετήθηκαν 45 ασθενείς, αποτελούμενοι από 16 γυναίκες, 26 άντρες και 3 ασθενείς αγνώστων στοιχείων. Καταγράφηκαν 25 ασθενείς (55.6%) που έφεραν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου (wild type) σε ομοζυγωτία (GG), 4 (8.9%) οι οποίοι έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (AA) και 16 ασθενείς (35.6%) σε ετεροζυγωτία (GA). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σχετιζόμενες με την ηλικία ή το φύλο.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρατηρείται ο ποιοτικός έλεγχος των DNA των ασθενών που απομονώθηκαν (εικόνα 22).

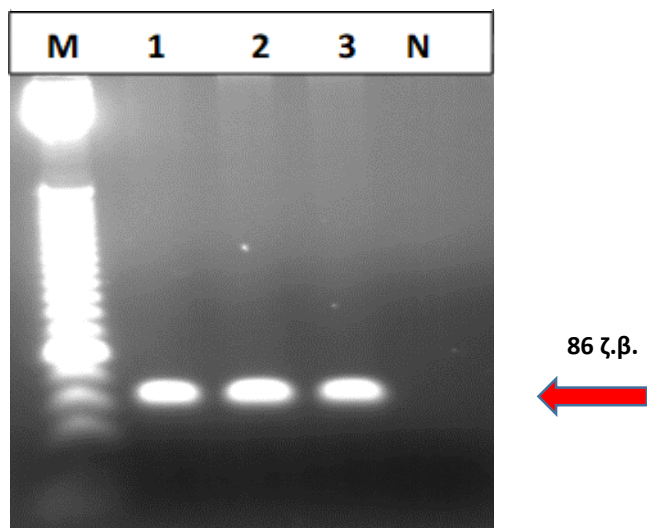


**Εικόνα 22:** Δείγματα 1-12: Δείγματα απομονωμένου DNA από ασθενείς με CRC. Έγινε απομόνωση DNA από ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPET).

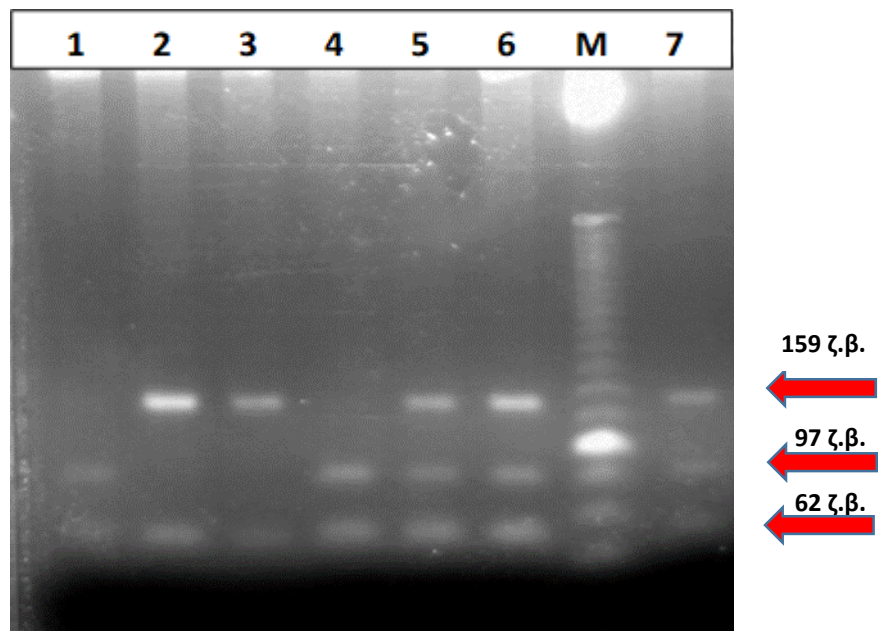
Οι εικόνες από τις επιμέρους PCR αντιδράσεις, τις πέψεις και την αλληλούχιση, παρατίθενται παρακάτω.



**Εικόνα 23:** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων τμήματος του γονιδίου GPx4 σε 3% πήκτωμα αγαρόζης. 1-4: δείγματα ασθενών με CRC μήκους 221 ζ.β, M: 100 bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fisher), N: αρνητικός μάρτυρας.



**Εικόνα 24:** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων τμήματος του γονιδίου SEPP1 σε 4% πήκτωμα αγαρόζης. 1-4: δείγματα ασθενών με CRC μήκους 86 ζ.β, M: 25 bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fisher), N: αρνητικός μάρτυρας.



**Εικόνα 25:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης τμήματος του γονιδίου GPx4 με το περιοριστικό ένζυμο StyI σε πήκτωμα αγαρόζης 4%. 1,4: δείγματα που φέρουν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, 2, 3: δείγματα που φέρουν το προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, 5-7: δείγματα που φέρουν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία, M: 25 bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fisher), N: αρνητικός μάρτυρας.

### Αποτελέσματα αλληλούχισης (sequencing)

Ακολούθησε η ανάλυση της γενετικής αλληλουχίας του τμήματος του γονιδίου SEPP1 που φέρει τον πολυμορφισμό rs7579 σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 με τη μέθοδο Sanger. Ο πολυμορφισμός βρίσκεται στην 3' UTR περιοχή στη θέση g.1414 (T/C 718 SNP). Στην εικόνα φαίνεται η αλληλουχία του γονιδίου της SEPP1. Έχει υπογραμμιστεί η αλληλουχία του προϊόντος που λήφθηκε μέσω PCR, ενώ το βέλος δείχνει το σημείο στο οποίο παρατηρείται η σημειακή μετάλλαξη.

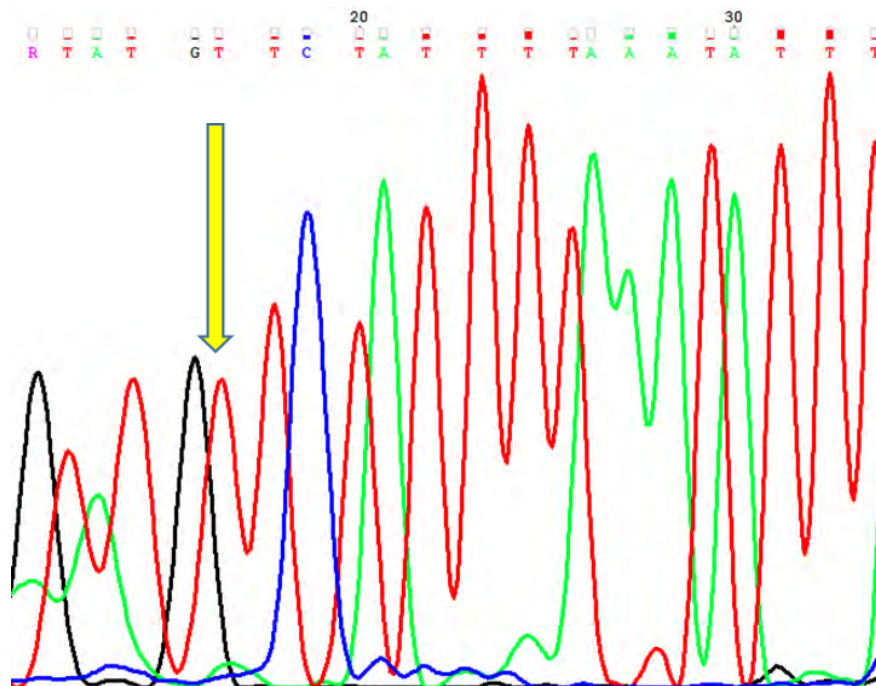
```

1  aaaatgtttt ccccatatta tgcattggcag cacttgctac tttcttttaa gttgataaca
61  atcagctcag ggggttgctc tgcttgcaag gtcactgcaa gaatgaacat tgaactttgg
121 actatacctg aggggtgagg taacaacag gactataaat atcagagtgt gctgctgtgg
181 ctttgtggag ctgccagagt aaagcaaaa gaaaggaagc aggcccgctg gaagtgtgtg
241 tgacaacccc agcaatgtgg agaagcctgg ggcttgcctt ggctctctgt ctctcccat
301 cgggagggaac agagagccag gccaaaagct ccttatgtaa gcaacccccca gcctggagca
361 taagagatca agatccaatg ctaaacctca atggttcagt gactgtgtgtt gctcttcttc
421 aagccagctg ataccctgtc atactgcagg catctaaatt agaagacctg cgagtaaaac
481 tgaagaaga aggatattct aatatttctt atattgtgtt taatcatcaa ggaatctctt
541 ctcgattaaa atacacacat cttaaagaata aggtttcaga gcatattcct gtttatcaac
601 aagaagaaaa ccaaacagat gtctggactc ttttaaatgg aagcaaaagt gacttctca
661 tatatgatag atgtggccgt cttgtatata atcttggttt gcctttttcc ttcctaactt
721 tcccatatgt agaagaagcc attaagattg cttttgtgga aaagaatgtt ggaactgtct
781 ctctcacgac tctcaaatga gaagactttt gtaactgtgt atctttggct actgtggata
841 aaacagttga aactccatcg cctcattacc atctgagca tcatcacaat catggacatc
901 agcaccttgg cagcagtgag ctttcagaga atctcaacc aggagcacca aatgctccta
961 ctcatcctgc tcctccaggc cttcatcacc acccaagca caagggtcag cataggcagg
1021 gtcaccacga gaaccgagat atgccagcaa gtaactgatt acaagattta caaaaagac
1081 tctgtcgaaa gagatgtata aatcaattac tctcaaat gcccacagat tcagagtgtg
1141 ctcttaggag ctgatgctgc cattgtcgac atctatatt tgaaaaaaca gggctctgcaa
1201 tcacctgaca gtgtaaaaga aacctccccat cttttgttag ctgacaggga cttcgggag
1261 aggagaacat aactgaatct tgtcagtgac gtttcctcc agctgcctga caaataatgc
1321 agcagcttat acccacagaa gccagtgcca gtttcagctg aaagaatcag gcaaaaaagt
1381 gagaatgacc ttcaaacata atatttaaaa taggcacata tccccaattt agctagaca
1441 caatttcatt tccagcatt ttataaacta ccaaatagtg gaaccaaaaa tgaaaattag
1501 atttgtgcaa acatggagaa atctactgaa ttggcttcca gattttaaat tttatgtcat
1561 agaataatgg actcaaacca tattttttat gatggagcaa ctgaaaggtg attcagctt
1621 ttggttaata tgtctttttt tttctttttc cagtgttcta tttgctttaa tgaagaataga
1681 aacgtaaact atgacctagg ggtttctgtt ggataattag cagtttagaa tggggaaga
1741 acaacaaga catgctttcc attttttct ttacttatct ctcaaaaaca tattactttg
1801 tcttttcaat cttctacttt taactaataa aataagtgga tttgtattt taagatccag
1861 aaatacttaa cacgtgaata ttttgctaaa aaagcatata taactattt aaatattcat
1921 ttatctttg tatatctaag actcatcctg attttacta tcacacatga ataaagcctt
1981 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

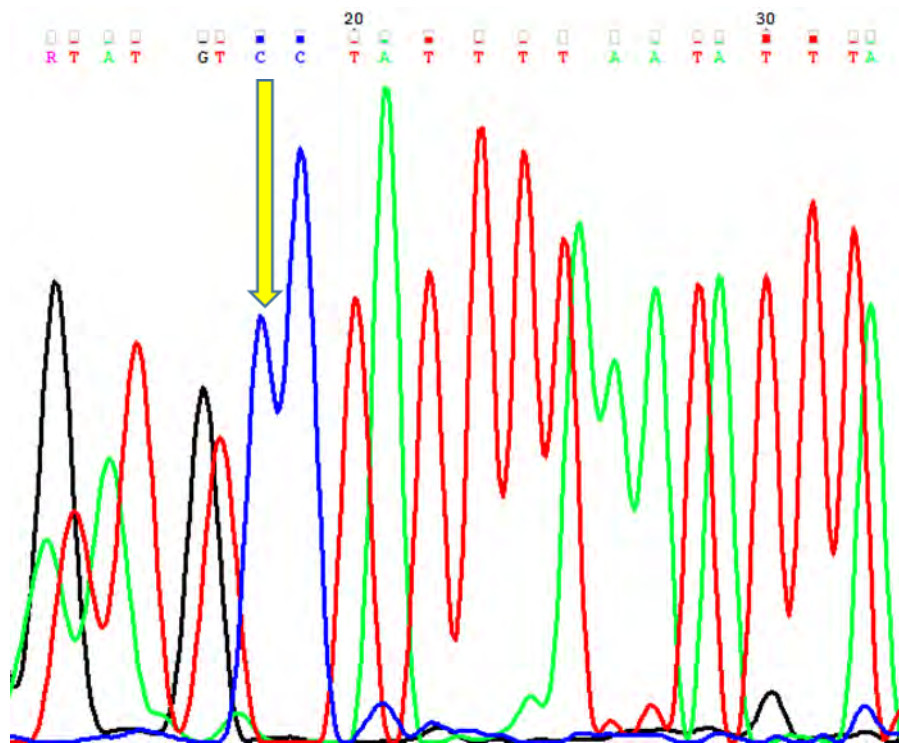
```

Εικόνα 26: Αλληλουχία του rs7579 (NCBI NM\_005410.3). Το βέλος καταδεικνύει τη θέση του πολυμορφισμού.

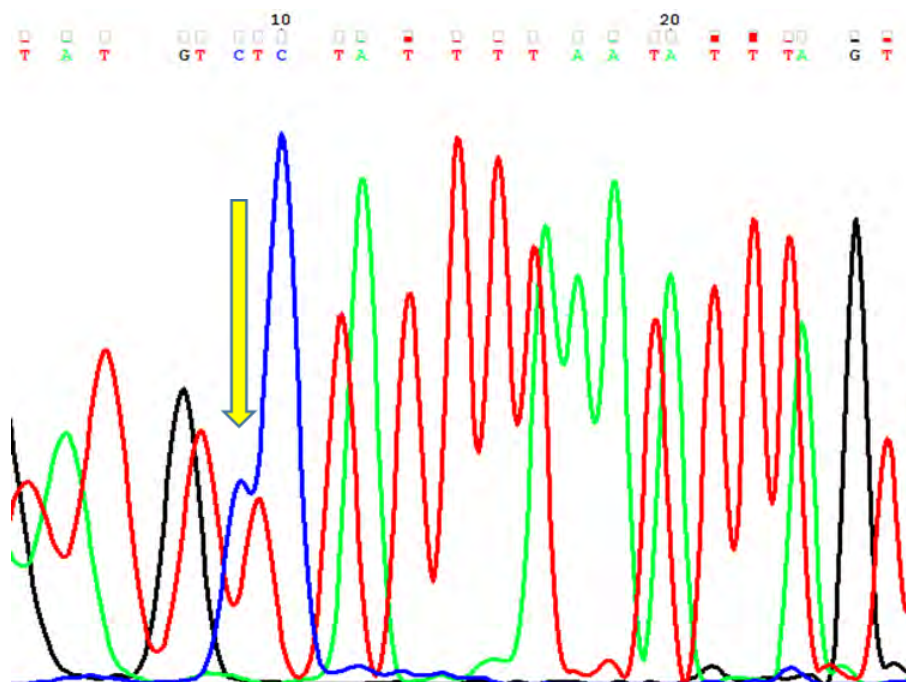
Στα γραφήματα που ακολουθούν απεικονίζεται με βέλος η θέση του πολυμορφισμού. Κατά την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε ο ανάστροφος εκκινητής.



Εικόνα 27: Απεικονίζεται γράφημα από την αλληλούχιση δείγματος που φέρει το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (A/A) για τον πολυμορφισμό rs7579 του γονιδίου SEPP1.



**Εικόνα 28:** Απεικονίζεται γράφημα από την αλληλούχιση δείγματος που φέρει το προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (G/G) για τον πολυμορφισμό rs7579 του γονιδίου SEPP1.



**Εικόνα 29:** Απεικονίζεται γράφημα από την αλληλούχιση δείγματος που φέρει το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία (G/A) για τον πολυμορφισμό rs7579 του γονιδίου SEPP1.

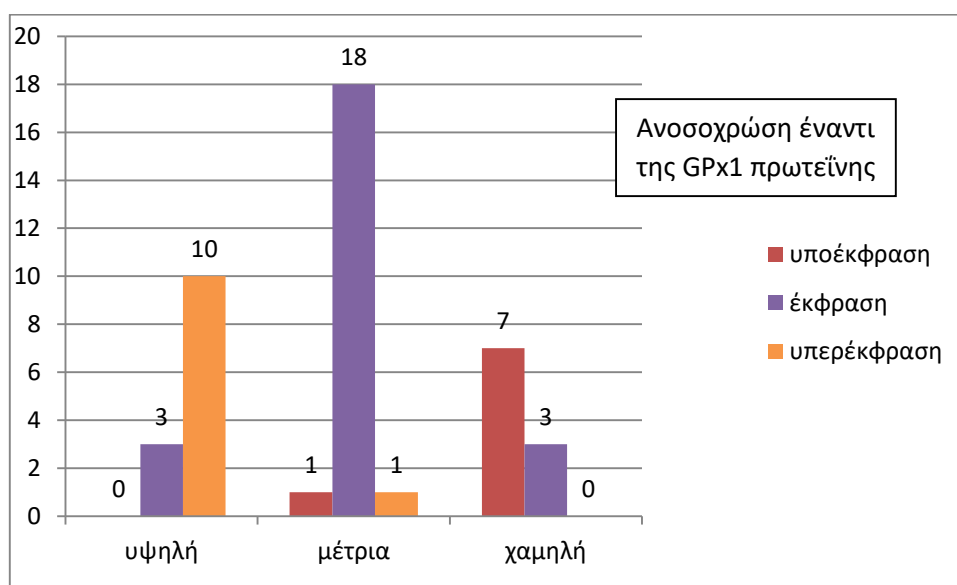


### 3.3 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων μας, ακολούθησε η καταγραφή των αποτελεσμάτων της μελέτης μας, στατιστική συσχέτιση και ανάλυση των επιμέρους μεταβλητών, μέσω του προγράμματος SPSS23. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των τριών υπεροξειδασών της γλουταθειόνης (GPx1, GPx3, GPx4) συσχετίστηκε με το φύλο και την ηλικία των ασθενών, το στάδιο της διαφοροποίησης, την εντόπιση του καρκίνου, την ύπαρξη ή μη μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS και BRAF, την παρουσία ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς και με την ύπαρξη πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις GPx4 και SEPP1. Αντίστοιχα, έγινε συσχέτιση των τελευταίων πολυμορφισμών με τις ίδιες παραμέτρους.

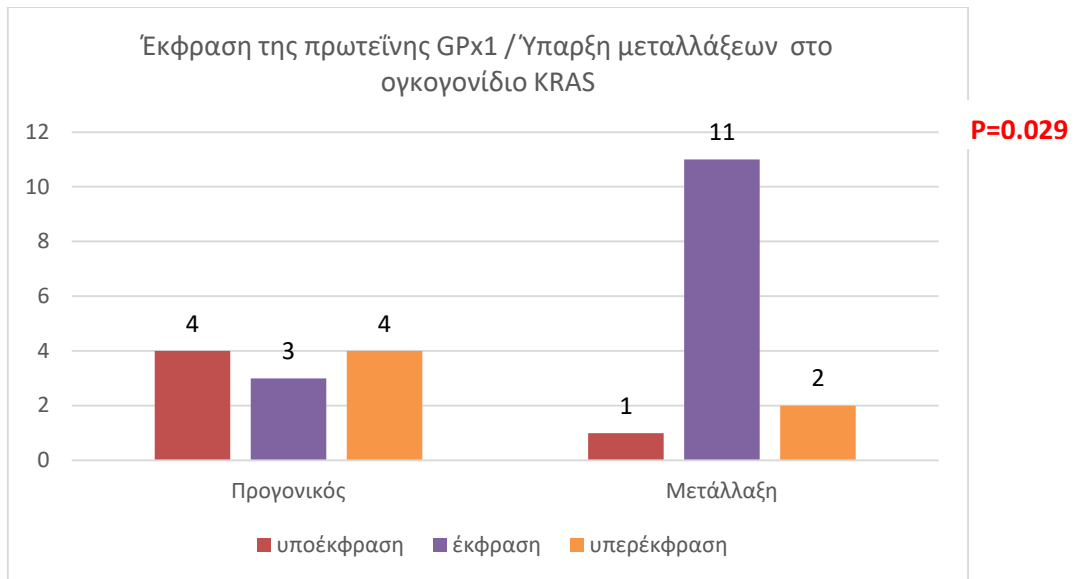
Όσον αφορά στην έκφραση της GPx1 πρωτεΐνης δεν αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με παραμέτρους όπως το φύλο ( $p=0.351$ ), η ηλικία ( $p=0.131$ ) ή η εντόπιση του όγκου ( $p=0.434$ ), η παρουσία ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας ( $0.328$ ) και η παρουσία μετάλλαξης στο ογκογονίδιο BRAF ( $p=0.438$ ). Ο πολυμορφισμός του γονιδίου, που κωδικοποιεί τη SEPP1 πρωτεΐνη, ελέγχθηκε για τους διαφορετικούς γονότυπους ( $p=0.576$ ), την παρουσία ( $p=0.691$ ) και την απουσία πολυμορφικού αλληλομόρφου ( $p=0.326$ ), χωρίς κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

Η κατανομή της ανοσοχρώσης στους ασθενείς με CRC απεικονίζεται στο διάγραμμα 1, όπου φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου ( $p=1,1099 \times 10^{-8}$ ).



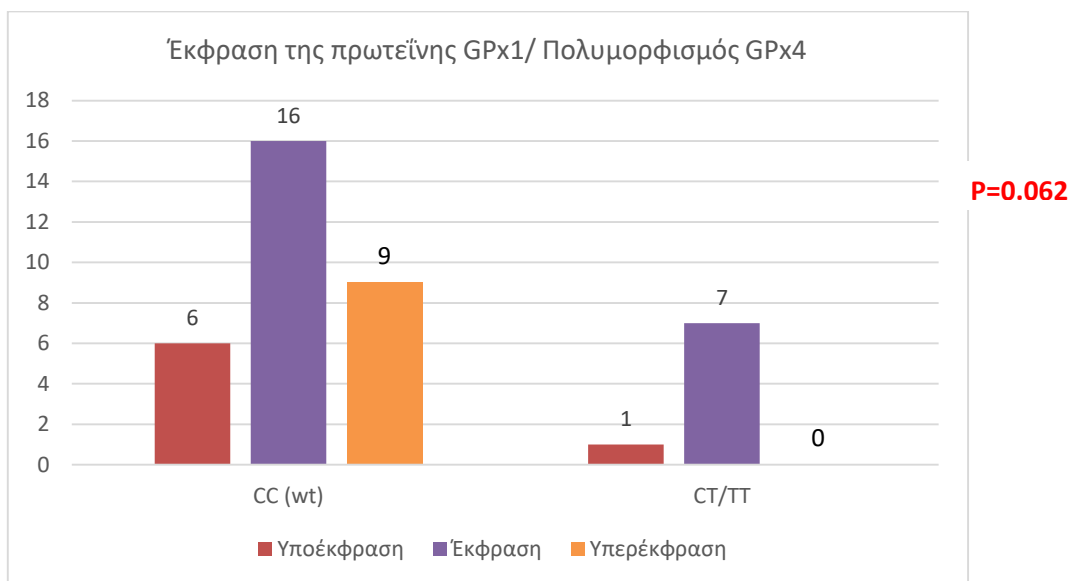
**Διάγραμμα 3.1:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx1 με τα στάδια διαφοροποίησης του CRC.

Όπως βλέπουμε, η πλειοψηφία των δειγμάτων ασθενών με υψηλής διαφοροποίησης όγκους παρουσιάζει υπερέκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Στα δείγματα των όγκων μέσης διαφοροποίησης, παρατηρήσαμε τόσο απουσία όσο και παρουσία θετικής ανοσοχρώσης, ωστόσο στην πλειοψηφία των δειγμάτων καταγράφεται θετική ανοσοχρώση, απλής έκφρασης. Τέλος, στους ασθενείς με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, δεν καταγράφηκε υπερέκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Αντιθέτως, στην πλειοψηφία των δειγμάτων είχαμε ήπια έως απουσία έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης.



**Διάγραμμα 3.2:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης με την ύπαρξη μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο KRAS.

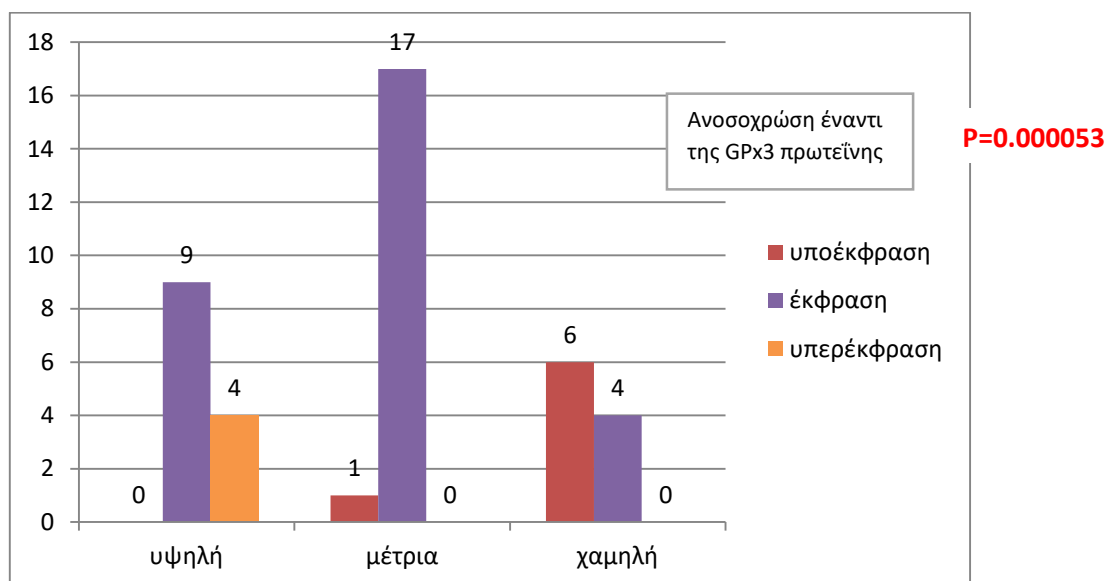
Από το διάγραμμα 2 παρατηρούμε πως η ύπαρξη μετάλλαξης στο KRAS ογκογονίδιο σχετίζεται με απλή έκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Ασθενείς με τον προγονικό γονότυπο παρουσίασαν ποικιλία επιπέδων έκφρασης με παρόμοια συχνότητα ( $p= 0.029$ ).



**Διάγραμμα 3.3:** Συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης GPx1 με την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου του GPx4 γονιδίου (σε ομο- ή ετεροζυγωτία).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3, στα δείγματα που καταγράφηκε η ύπαρξη του πολυμορφικού αλληλομόρφου του GPx4 γονιδίου, ακόμη και σε ετεροζυγωτία, δεν ανιχνεύτηκε υπερέκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Ωστόσο, και στις δύο ομάδες υπερέχουν οι περιπτώσεις με ήπια έκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Στους ασθενείς που έφεραν το φυσιολογικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, εντοπίστηκαν και οι τρεις τύποι έκφρασης. Η συσχέτιση τείνει να γίνει στατιστικά σημαντική ( $p= 0.062$ ).

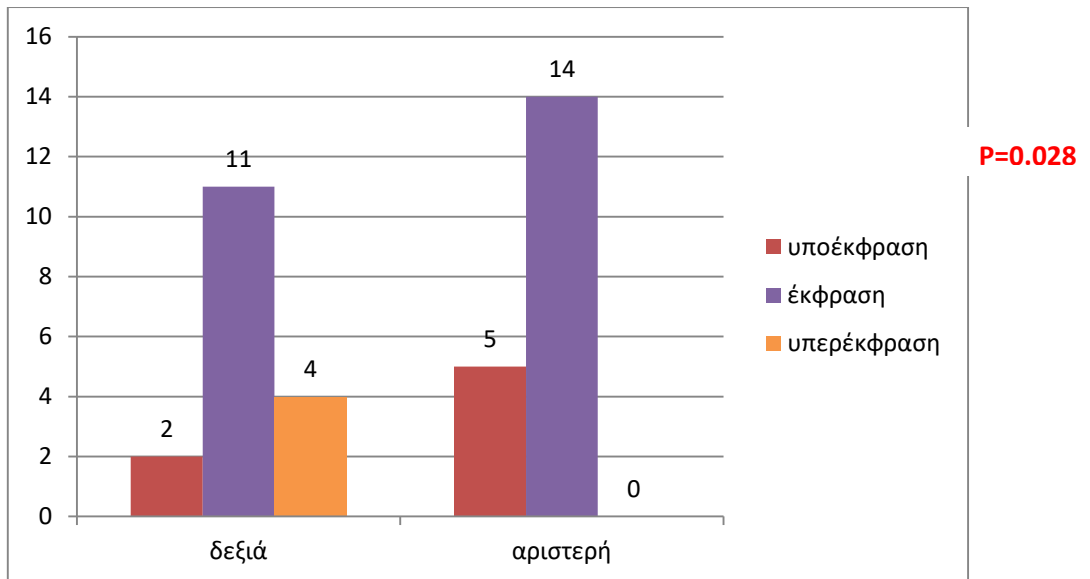
Όσον αφορά στην έκφραση της GPx3 πρωτεΐνης, δεν αναδείχθηκε συσχέτιση με παραμέτρους όπως το φύλο ( $p= 0.449$ ), η ύπαρξη μεταλλάξεων των KRAS ( $p= 0.442$ ) και BRAF ογκογονιδίων ( $p= 0.147$ ). Ομοίως ισχύει και για τους πολυμορφισμούς των GPx4 και SEPP1, για τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους ( $p= 0.592$  και  $0,547$ , αντίστοιχα), για την ύπαρξη τουλάχιστον ενός πολυμορφικού τους αλληλομόρφου ( $p= 0,405$  και  $0,531$  αντίστοιχα), και για την απουσία του ( $p= 0,608$  και  $0,618$  αντίστοιχα). Η κατανομή της ανοσοχρώσης στους ασθενείς με CRC απεικονίζεται στο διάγραμμα 4, όπου φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου ( $p= 0,000053$ ).



**Διάγραμμα 4:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx3 πρωτεΐνης με τα στάδια διαφοροποίησης του CRC.

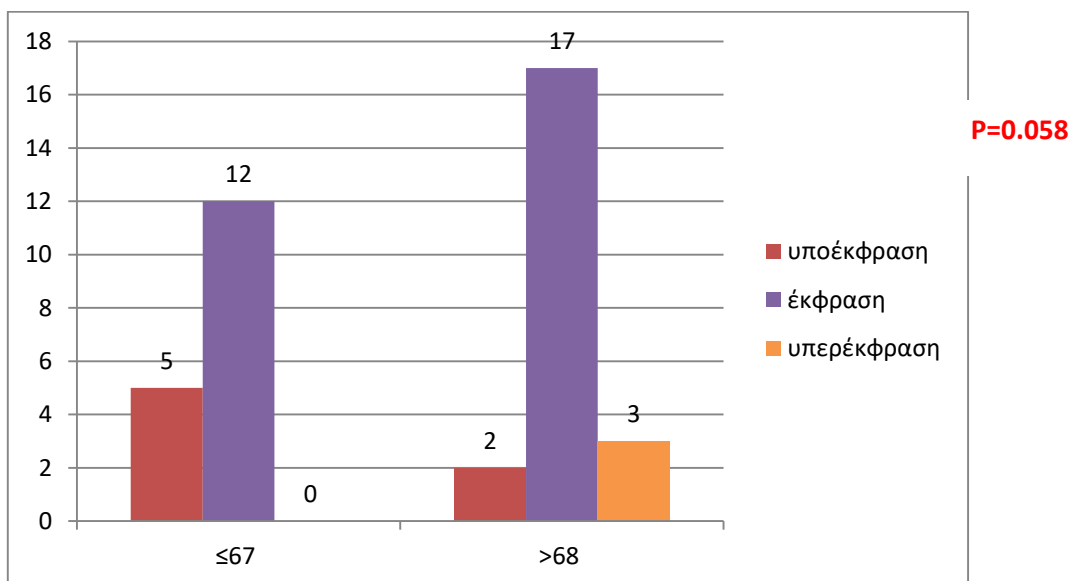
Στο διάγραμμα 4, είναι εμφανής η μείωση των επιπέδων της έκφρασης της GPx3, όσο δυσχεραίνει το στάδιο διαφοροποίησης. Ειδικότερα, δείγματα υψηλής διαφοροποίησης εμφανίζουν ήπια έκφραση και υπερέκφραση της GPx3. Τα περιστατικά μέσης διαφοροποίησης παρουσιάζουν σχεδόν εξ ολοκλήρου ήπια έκφραση της GPx3, ενώ στα πλακίδια ασθενών με καρκίνο χαμηλής διαφοροποίησης, υπερισχύουν εκείνα με υποέκφραση, ενώ, παράλληλα δεν παρατηρείται υπερέκφραση σε κάποιο δείγμα.

Ακολούθως συσχέτισαμε την έκφραση των τριών ενζύμων με την εντόπιση του όγκου των ασθενών. Η μοναδική πρωτεΐνη που παρουσίασε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ( $p= 0,028$ ), είναι η GPx3 πρωτεΐνη, όπως φαίνεται στο επόμενο διάγραμμα (διάγραμμα 5). Σύμφωνα με το διάγραμμα, προκύπτει πως η δεξιά εντόπιση του καρκίνου συνοδεύεται από ποικιλία τύπων έκφρασης, με τον τύπο της υποέκφρασης να παρουσιάζεται σπανιότερα. Αντιθέτως, στους όγκους αριστερής εντόπισης κανένα δείγμα δεν εμφάνισε υπερέκφραση της GPx3 πρωτεΐνης και το ποσοστό εκείνων με υποέκφραση, ήταν αισθητά αυξημένο, συγκρινόμενο με εκείνο που καταγράφηκε στους καρκίνους δεξιάς εντόπισης.



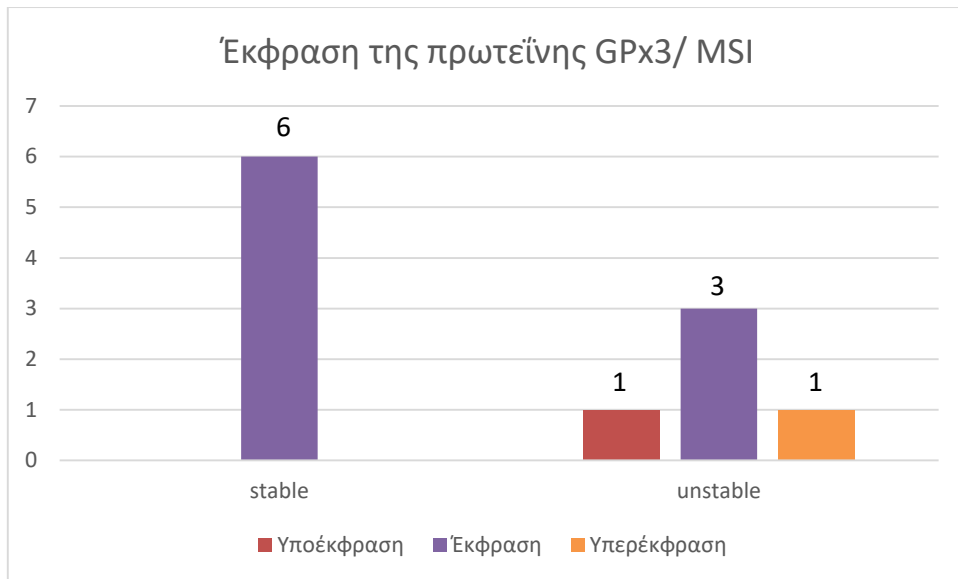
**Διάγραμμα 3.5:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx3 με την εντόπιση του καρκίνου.

Στη συνέχεια ελέγξαμε αν υπάρχει κάποια συσχέτιση των παραμέτρων που εξετάζαμε με την ηλικία των ασθενών της μελέτης μας. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6, στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της GPx3 πρωτεΐνης, συσχέτιση που τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p=0.058$ ).



**Διάγραμμα 3.6:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx3 με την ηλικία.

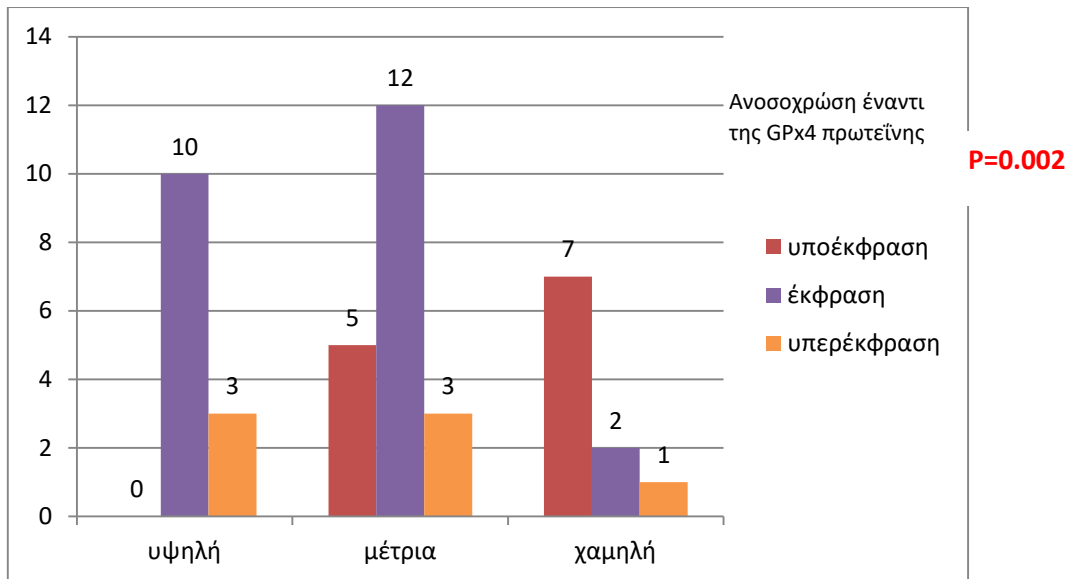
Στο διάγραμμα 7 φαίνεται ότι στους ασθενείς με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας η GPx3 πρωτεΐνη είχε ήπια έκφραση, ενώ στα δείγματα με μικροδορυφορική αστάθεια είχαμε τόσο απουσία όσο και υπερέκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Ωστόσο, η ανάλυση μικρού αριθμού δειγμάτων παρέχει κάποιες πρώτες ενδείξεις και δεν επιτρέπει ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα ( $p=0.157$ ).



**Διάγραμμα 3.7:** Συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης GPx3 και της μικροδορυφορικής αστάθειας MSI.

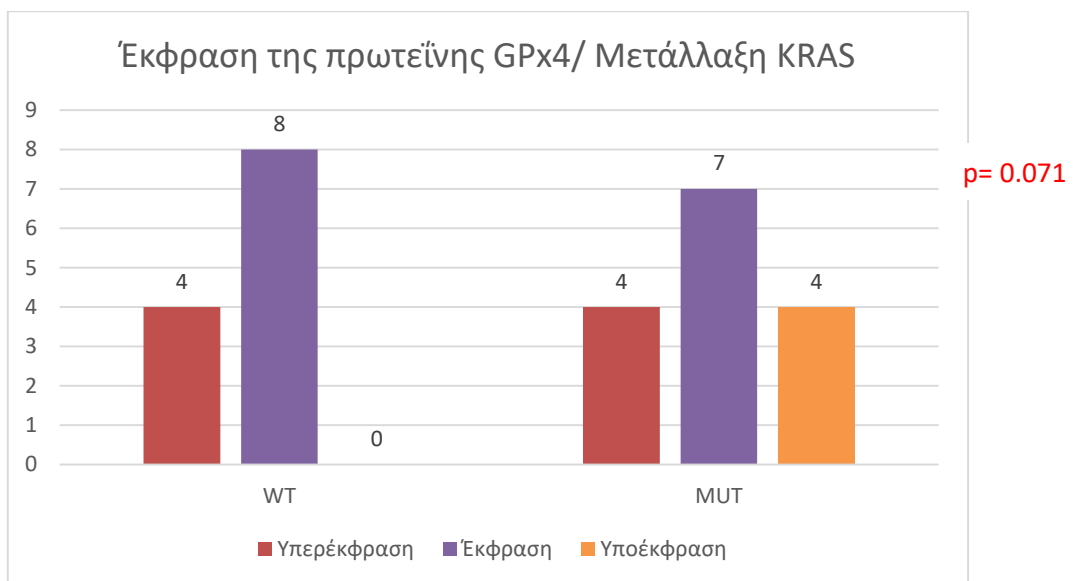
Η μελέτη της έκφρασης της Grx4 πρωτεΐνης σε συνάρτηση με τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους που εξετάσαμε δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με παραμέτρους όπως το φύλο ( $p=0.618$ ), η ηλικία ( $p=0.283$ ), η εντόπιση του όγκου ( $p=0.423$ ), καθώς επίσης, η παρουσία ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας ( $p=0.312$ ). Επίσης δεν αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της Grx4 πρωτεΐνης με τους διαφορετικούς γονότυπους της GPx4 ( $p=0.124$ ) και με την ομοζυγωτία του πολυμορφικού αλληλομόρφου ( $p=0.646$ ).

Ωστόσο, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 8 παρατηρείται εμφανής συσχέτιση μεταξύ των σταδίων διαφοροποίησης και των επιπέδων έκφρασης της Grx4 πρωτεΐνης ( $p=0.002$ ). Αναλύοντας το διάγραμμα, διαπιστώθηκε πως ασθενείς με υψηλής διαφοροποίησης όγκους του παχέος εντέρου παρουσίαζαν ήπια κυρίως και σε μικρότερο βαθμό υπερέκφραση του GPx4 ενζύμου. Στα δείγματα με μέσης διαφοροποίησης όγκους παρατηρήσαμε τόσο απουσία έως και υπερέκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, ενώ στους χαμηλής διαφοροποίησης όγκους, η έκφραση της GPx4 πρωτεΐνης τείνει να μηδενιστεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη πρωτεΐνη που δείχνει υπερέκφραση στους χαμηλής διαφοροποίησης όγκους.

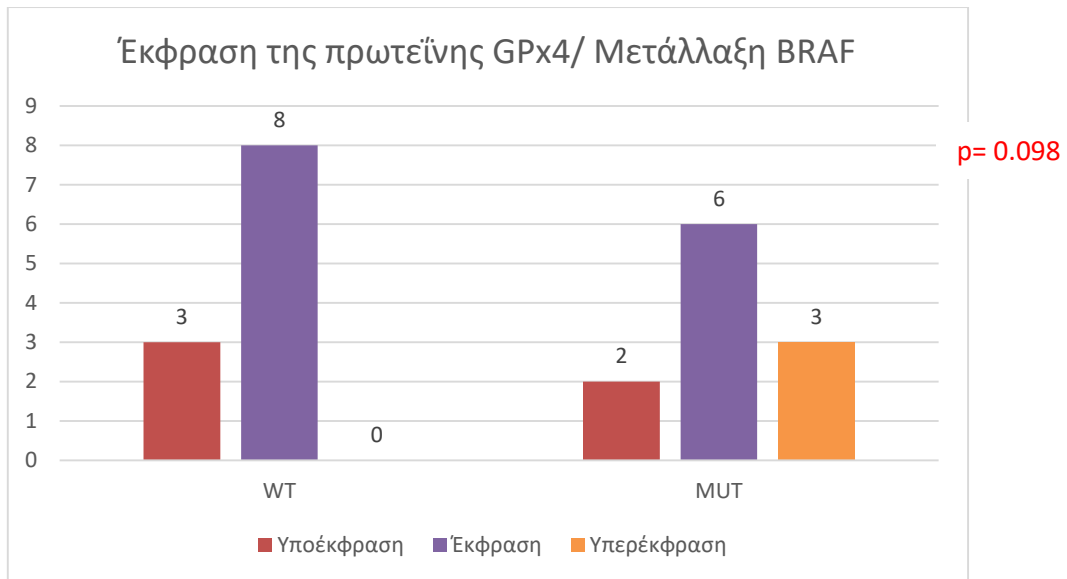


**Διάγραμμα 3.8:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx4 με τα στάδια διαφοροποίησης του καρκίνου.

Μελετώντας πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της Grx4 πρωτεΐνης με την παρουσία μεταλλάξεων τόσο στο KRAS όσο και στο BRAF ογκογονίδιο, προέκυψε ότι οι ασθενείς που έφεραν κάποια μετάλλαξη είτε στο ένα είτε στο άλλο ογκογονίδιο παρουσίαζαν και τα τρία επίπεδα έκφρασης της Grx4 πρωτεΐνης. Ωστόσο, στους ασθενείς με το προγονικό αλληλόμορφο δεν υπήρξε υπερέκφραση της Grx4 πρωτεΐνης ( $p=0.071$ ) (Διάγραμμα 9). Ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο παρουσίασαν ήπια έκφραση της χρώσης χωρίς ωστόσο υπερέκφραση ( $p=0.098$ ) (Διάγραμμα 10).

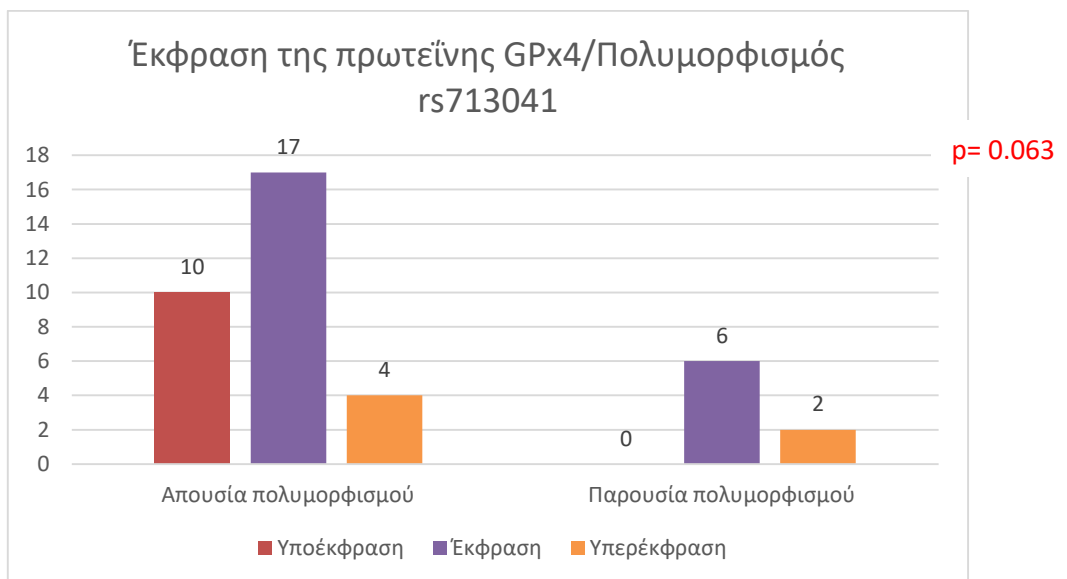


**Διάγραμμα 3.9:** Συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης GPx4 με την ύπαρξη μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο KRAS.



**Διάγραμμα 3.10:** Συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης GPx4 με την ύπαρξη μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο BRAF.

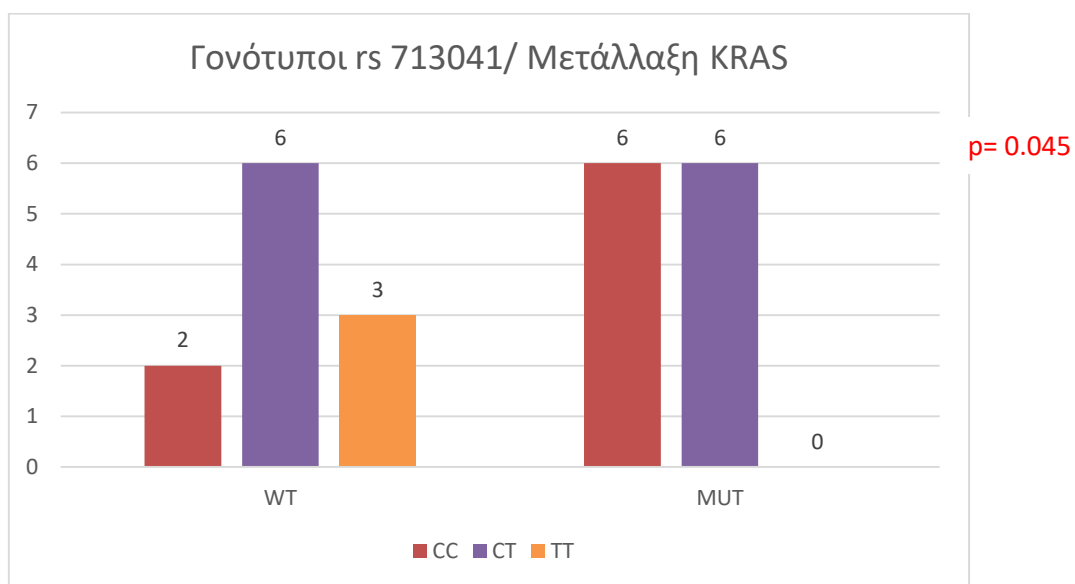
Στη συνέχεια εξετάσαμε εάν υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ της έκφρασης της GPx4 πρωτεΐνης και της παρουσίας του πολυμορφισμού rs713041 του αντίστοιχου γονιδίου.



**Διάγραμμα 3.11:** Συσχέτιση της έκφρασης της GPx4 πρωτεΐνης με την παρουσία τουλάχιστον ενός πολυμορφικού αλληλομόρφου της GPx4.

Στους ασθενείς που αναλύθηκαν και έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία ανιχνεύσαμε και τα τρία επίπεδα έκφρασης της GPx4 πρωτεΐνης, με υπεροχή των επιπέδων ήπιας έκφρασης και υποέκφρασης. Αντίθετα, στους ασθενείς που έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομο- ή ετεροζυγωτία δεν υπήρξε υποέκφραση της GPx4 πρωτεΐνης. Η συσχέτιση τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p= 0.063$ ) μετά από ανάλυση σε 38 περιστατικά.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό της GPx4 πρωτεΐνης, δεν αναδείχθηκε συσχέτιση των γονότυπων με τις ακόλουθες παραμέτρους: [φύλο ( $p=0.187$ ), ηλικία ( $p=0.253$ ), εντόπιση ( $p=0.859$ ), διαφοροποίηση ( $p=0.113$ ), έκφραση των GPx1 ( $p=0.171$ ), GPx3 ( $p=0.592$ ), GPx4 ( $p=0.124$ ), πολυμορφισμός της SEPP1 ( $p=0.851$  για τους τρεις γονότυπους,  $p=0.551$  για την παρουσία αλληλομόρφου και  $p=0.586$  για την ομοζυγωτία του), και BRAF ( $p=0.485$ )]. Ο έλεγχος 23 δειγμάτων για την αλληλεπίδραση της παρουσίας μετάλλαξης στο KRAS ογκογονίδιο με τους τρεις γονότυπους για τον rs713041 πολυμορφισμό, ανέδειξε στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα ( $p=0,045$ ).

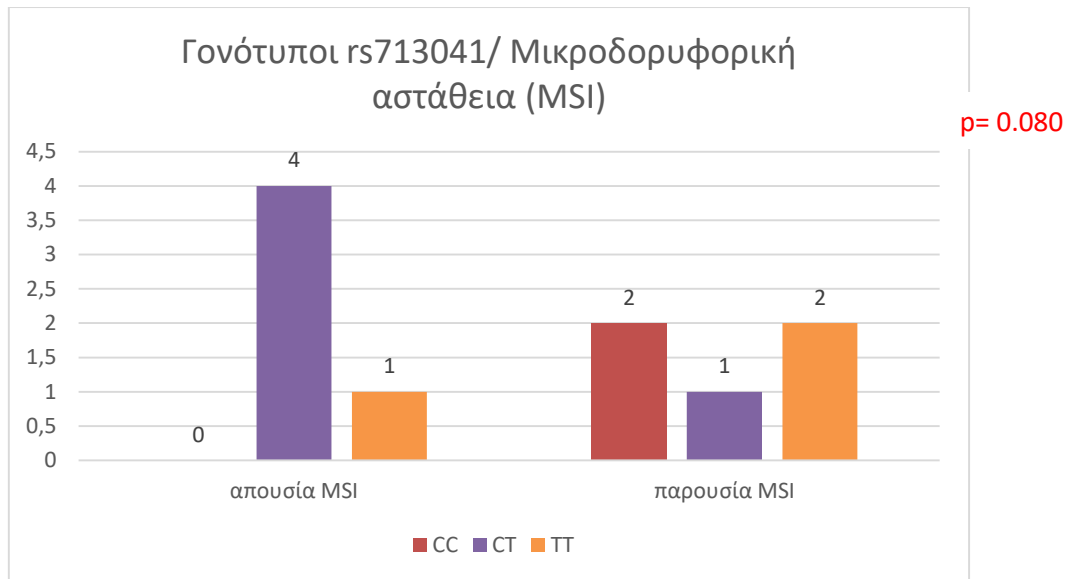


**Διάγραμμα 3.12:** Συσχέτιση του πολυμορφισμού του GPx4 γονιδίου με την παρουσία μετάλλαξης στο ογκογονίδιο KRAS.

Στο ίδιο διάγραμμα, αξίζει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη στο ογκογονίδιο KRAS, δεν παρατηρείται σε ομοζυγωτία το πολυμορφικό αλληλόμορφο. Ωστόσο, πρόκειται για μικρό αριθμό δειγμάτων ώστε να αξιολογηθεί στατιστικώς.

Η συσχέτιση που τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική, αφορά ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση σε πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων (10 περιστατικά), είναι εκείνη με την απουσία ή παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας ( $p=0.080$ ).

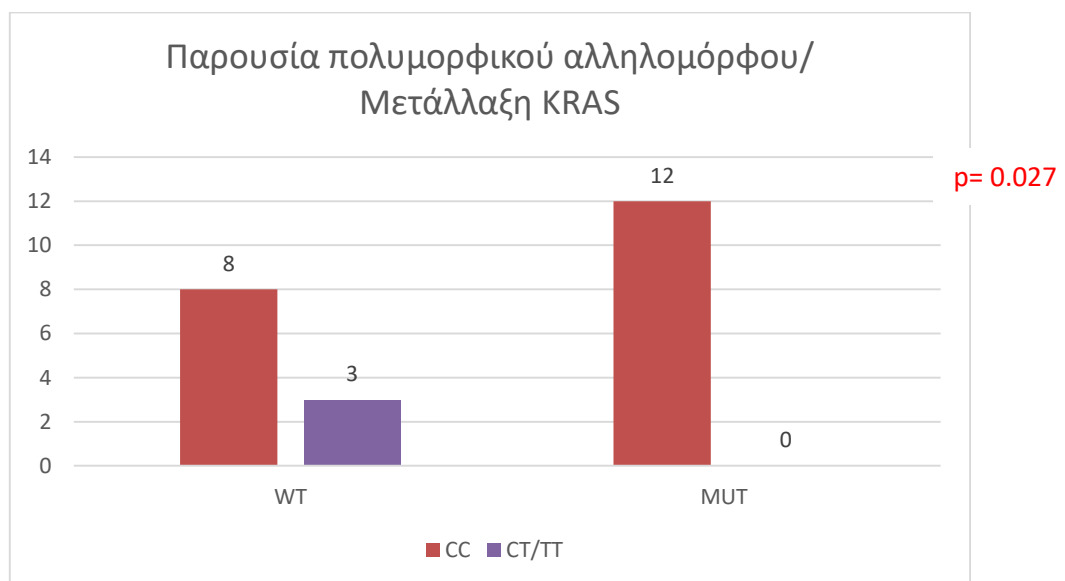




**Διάγραμμα 3.13:** Συσχέτιση του πολυμορφισμού του GPx4 γονιδίου με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).

Παρατηρούμε, στο παραπάνω διάγραμμα, ότι κανένας ασθενής με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας δε φέρει το προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, ενώ η ετεροζυγωτία για το πολυμορφικό αλληλόμορφο παρατηρείται κυρίως σε δείγματα με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας.

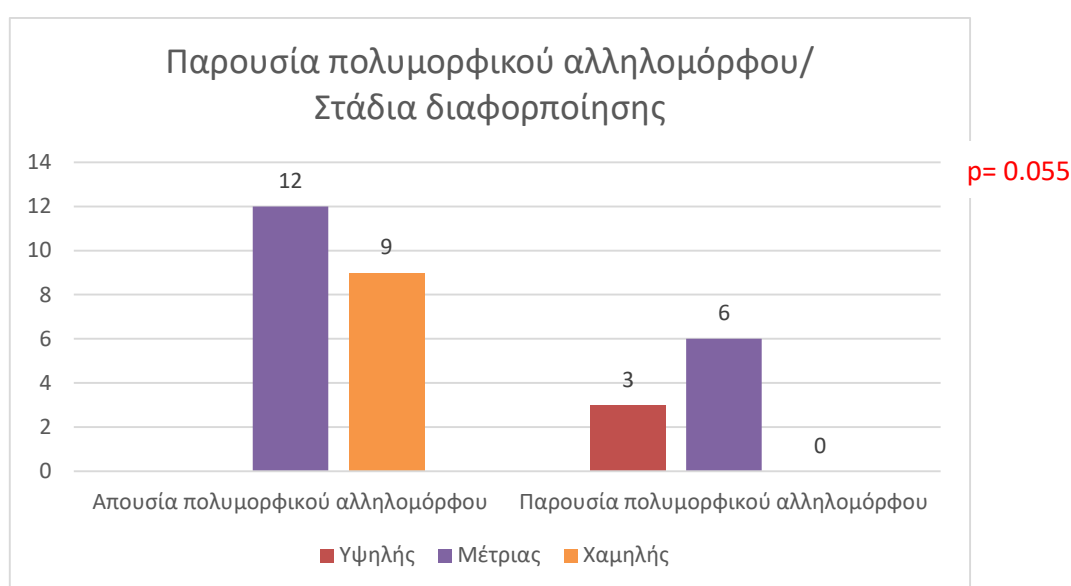
Όταν η GPx4 μελετήθηκε ως προς την παρουσία τουλάχιστον ενός πολυμορφικού αλληλομόρφου της, στο γονιδίωμα των ασθενών, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ως προς το φύλο ( $p= 0,386$ ), την ηλικία ( $p= 0,153$ ), την εντόπιση ( $p= 0,702$ ), την παρουσία μετάλλαξης BRAF ( $p= 0,255$ ), την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας ( $p= 0.487$ ), την έκφραση της GPx3 ( $p= 0.405$ ), και τον πολυμορφισμό της SEPP1 ( $p= 0.975$ ,  $p= 0.867$  και  $p= 0.841$ ). Όμως, έτεινε να δώσει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ως προς την έκφραση της GPx1 ( $p= 0.062$  και GPx4 ( $p= 0.063$ ) πρωτεϊνών.



**Διάγραμμα 3.14:** Συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου του GPx4 γονιδίου σε ομο- ή ετεροζυγωτία με την ύπαρξη μετάλλαξης στο KRAS ογκογονίδιο.

Ανάλυση σε 23 ασθενείς με CRC, έδειξε πως άτομα που έφεραν κάποια μετάλλαξη στο KRAS ογκογονίδιο δεν εμφάνιζαν το πολυμορφικό αλληλόμορφο του rs713041 πολυμορφισμού και η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική ( $p= 0.027$ ).

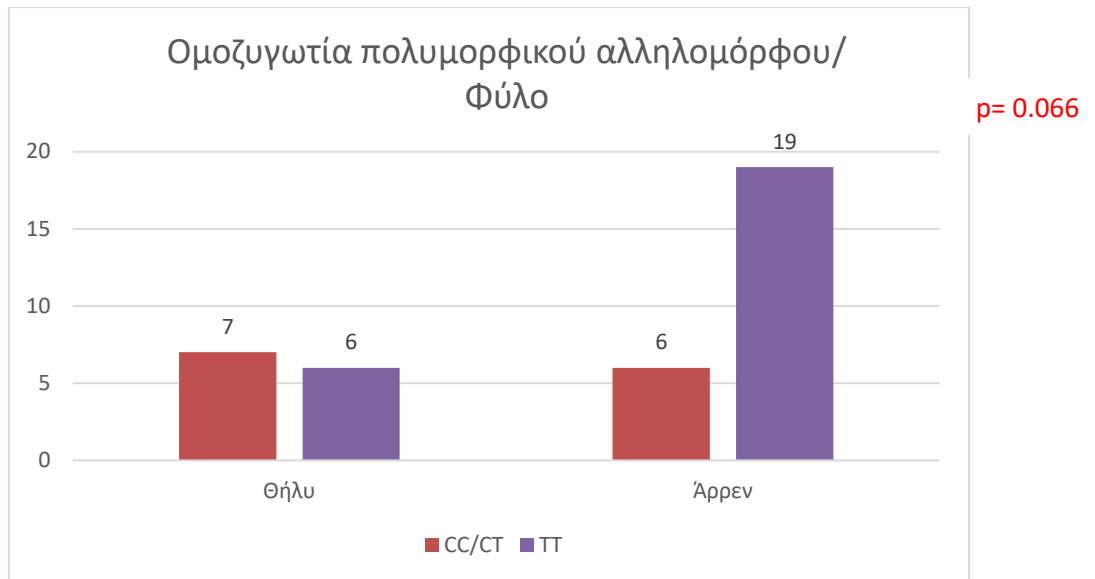
Παράλληλα, συσχετίσαμε την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου με τα στάδια διαφοροποίησης του όγκου. Όπως προκύπτει από το παρακάτω διάγραμμα, τα άτομα που έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία δεν έφεραν όγκους υψηλής διαφοροποίησης. Αντιθέτως, η παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομο- ή ετεροζυγωτία, δεν ανιχνεύθηκε σε όγκους ασθενών χαμηλής διαφοροποίησης. Η συσχέτιση αυτή τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p= 0.055$ ).



**Διάγραμμα 3.15:** Συσχέτιση της παρουσίας πολυμορφικού αλληλομόρφου του GPx4 γονιδίου με τα στάδια διαφοροποίησης.

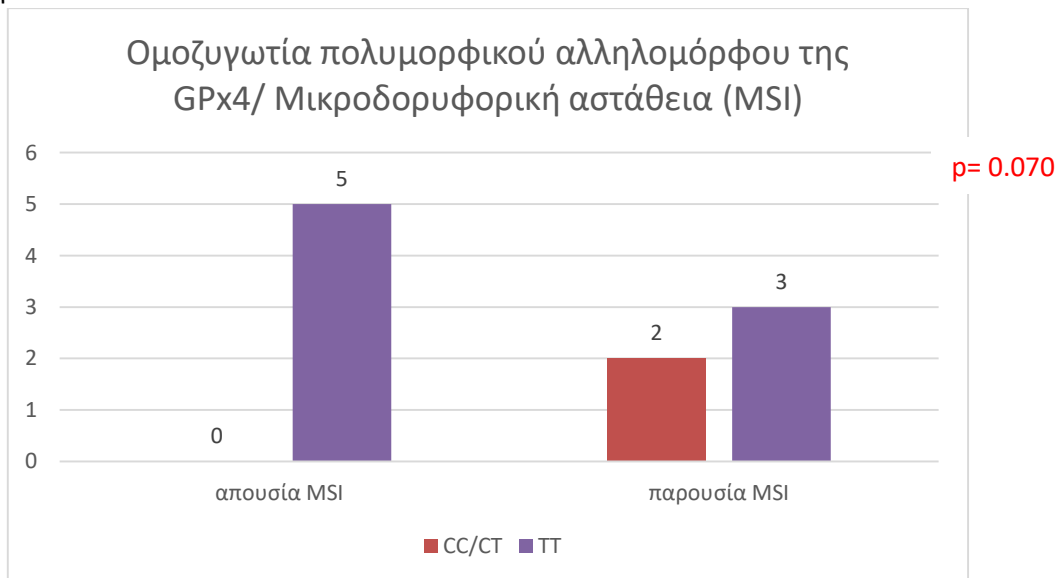
Τέλος, ελέγχοντας την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομοζυγωτία, δεν οδηγηθήκαμε σε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις με την ηλικία ( $p= 0.195$ ), την εντόπιση ( $p= 0.851$ ), τη διαφοροποίηση ( $p= 0.335$ ), την ύπαρξη μεταλλάξεων στα ογκογονίδια KRAS ( $p= 0.110$ ) και BRAF ( $p= 1.000$ ), την έκφραση των GPx1 ( $p= 0.274$ ), GPx3 ( $p= 0.608$ ), GPx4 ( $p= 0.646$ ), και τον πολυμορφισμό της SEPP1 για τους τρεις διακριτούς τρόπους ανάλυσης ( $p= 0.633$ ,  $p= 0.356$ ,  $p= 0.570$ ).

Έτεινε, όμως, να δώσει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με το φύλο ( $p= 0.066$ ). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε πως η πιθανότητα ένας άντρας να έχει σε ομοζυγωτία το πολυμορφικό αλληλόμορφο είναι τριπλάσια, απ' ό,τι να έχει οποιοδήποτε άλλο γονότυπο, αλλά και σε σύγκριση με την αντίστοιχη έκφραση στις γυναίκες. Επίσης, υπάρχουν ελάχιστες διαφορές στην πιθανότητα ύπαρξης ομοζυγωτίας για το πολυμορφικό αλληλόμορφο στις γυναίκες, σε σύγκριση με την ύπαρξη των υπόλοιπων δύο γονοτύπων.



**Διάγραμμα 3.16:** Συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό της GPx4 με το φύλο.

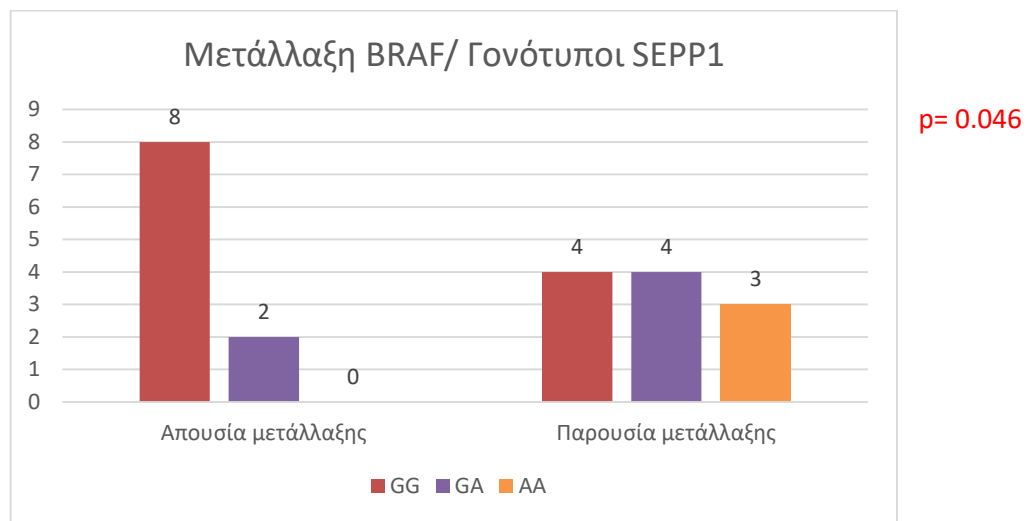
Ολοκληρώνοντας, η αλληλεπίδραση με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) τείνει να δώσει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, αν και το μέγεθος του δείγματος ήταν πολύ μικρό (10 περιστατικά). Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 3.17) στους ασθενείς που δεν παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια εκφράζεται το πολυμορφικό αλληλόμορφο (ομοζυγωτία) του GPx4 γονιδίου.



**Διάγραμμα 3.17:** Συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομοζυγωτία με την παρουσία/απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).

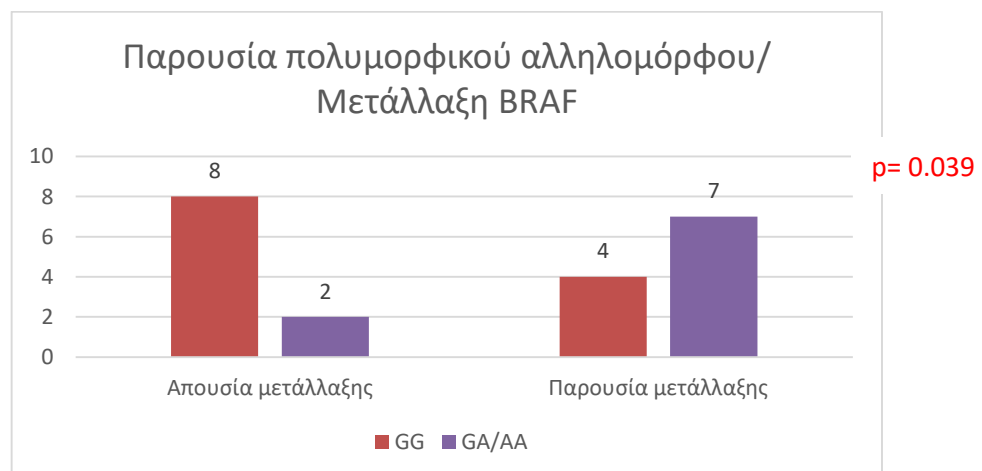
Όσον αφορά στον πολυμορφισμό της SEPP1 πρωτεΐνης δεν αναδείχθηκε συσχέτιση με παραμέτρους όπως το φύλο, η ηλικία, η διαφοροποίηση ή η εντόπιση του καρκίνου, η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, η έκφραση των GPx1, GPx3 και GPx4, και η μετάλλαξη KRAS, είτε μελετήθηκε από άποψη γονοτύπων ( $p = 0.823$ ,  $p = 0.680$ ,  $p = 0.312$ ,  $p = 0.804$ ,  $p = 0.387$ ,  $p = 0.576$ ,

$p=0.547, p=0.724$  και  $p=0.289$ ), είτε ως παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου ( $p=0.879, p=0.385, p=0.858, p=0.886, p=0.680, p=0.691, p=0.318, p=0.903$  και  $p=0.598$ , αντίστοιχα), είτε ως ύπαρξη ομοζυγωτίας για το πολυμορφικό αλληλομόρφο ( $p=0.611, p=0.833, p=0.182, p=0.576, p=0.285, p=0.326, p=0.519, p=0.375$  και  $p=0.185$ , αντίστοιχα). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, όταν ελέγχθηκαν συνδυαστικά οι δύο πολυμορφισμοί ( $rs713041/rs7579$ ), για κανένα από τα εννέα συστήματα αλληλεπίδρασης ( $p=0.851, p=0.633, p=0.975$  ως προς τους διαφορετικούς γονότυπους της SEPP1,  $p=0.748, p=0.356, p=0.867$  για την ύπαρξη ομοζυγωτίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου, και  $p=0.551, p=0.570, p=0.841$  για την ύπαρξη τουλάχιστον ενός πολυμορφικού αλληλομόρφου). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία της μετάλλαξης p.V600E του BRAF γονιδίου, με όλες τις διαφορετικές παραμέτρους για τον πολυμορφισμό της SEPP1 (διαγράμματα 3.18-3.20).



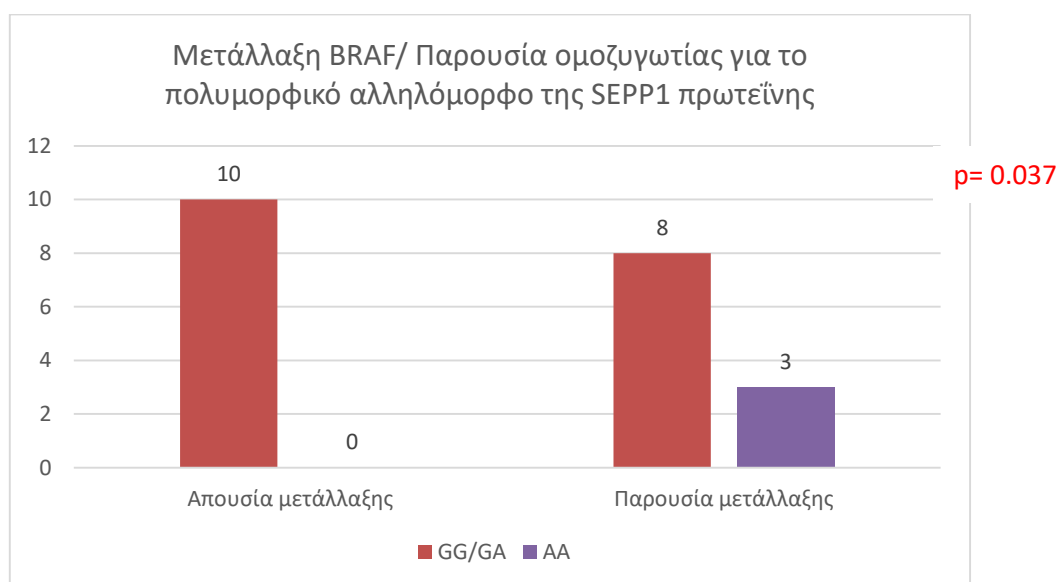
**Διάγραμμα 3.18:** Συσχέτιση των τριών γονοτύπων της SEPP1 με την ύπαρξη μετάλλαξης στο ογκογονίδιο BRAF.

Ο ομόζυγος γονότυπος AA για τον πολυμορφισμό  $rs7579$  της σεληνοπρωτεΐνης SEPP1, φαίνεται να καταγράφεται μόνο σε περιστατικά με τη μετάλλαξη BRAF V600, καθώς δεν παρατηρήθηκε κανένα ομόζυγο πολυμορφικό δείγμα σε περιστατικά με απουσία της ( $p=0,046$ ).



**Διάγραμμα 3.19:** Συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου του  $rs7579$  πολυμορφισμού του SEPP1 γονιδίου και της παρουσίας μετάλλαξης στο BRAF ογκογονίδιο.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, οι ασθενείς που δε φέρουν μεταλλάξεις στο BRAF ογκογονίδιο φέρουν στην πλειοψηφία τους το προγονικό αλληλόμορφο για το γονίδιο SEPP1 σε ομοζυγωτία. Αντιθέτως, η παρουσία μετάλλαξης στο BRAF εμφανίζει συσχέτιση με την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου του SEPP1 γονιδίου. Η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική ( $p= 0.039$ ).



**Διάγραμμα 3.20:** Συσχέτιση της ύπαρξης ομοζυγωτίας για το πολυμορφικό αλληλόμορφο της SEPP1 με τη μετάλλαξη BRAF.

Τέλος, στο διάγραμμα 3.20, που απεικονίζεται η πιθανή σύνδεση μεταξύ των μεταλλάξεων του BRAF γονιδίου και του πολυμορφισμού του SEPP1 γονιδίου, προκύπτει πως οι ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις του BRAF ογκογονιδίου δεν έφεραν επίσης το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία. Η συσχέτιση που αναδείχτηκε είναι στατιστικώς σημαντική ( $p= 0.037$ ).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Colorectal Cancer, CRC) αποτελεί μία από τις πιο συχνές κακοήθειες παγκοσμίως (Miller KD et al., 2016; Lindsey A Torre et al., 2016). Η συχνότητα εμφάνισης παρουσιάζει ποικίλη γεωγραφική ετερογένεια. Περίπου τα 2/3 των περιπτώσεων με CRC εντοπίζονται σε αναπτυγμένες χώρες και σχετίζονται με την υιοθέτηση του δυτικού τρόπου διατροφής και διαβίωσης (Melina Arnold, et al., 2016; Brody, 2015). Ο συνδυασμός περιβαλλοντικών παραγόντων με ένα πλήθος γενετικών και επιγενετικών αλλαγών καθορίζουν τα στάδια και την εξέλιξη της νόσου. Η νόσος έχει μελετηθεί εκτεταμένα και έχουν αναπτυχθεί πολλές νέες θεραπείες, ωστόσο το ποσοστό επιβίωσης μειώνεται σημαντικά σε προχωρημένα στάδια της νόσου και φτάνει στο 5%-10% στον μεταστατικό καρκίνο (Pizzini S et al., 2013; Fritzmann J. et al., 2009). Η ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία καθιστά επιτακτική την ανάγκη για εύρεση νέων δεικτών που θα παρακάμψουν την οδό αυτή. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα στρέφεται στην ανοσοθεραπεία του όγκου, μια οδό πολλά υποσχόμενη που αναμένεται να εφαρμοστεί σε πολλούς διαφορετικούς καρκίνους.

Οι υποκείμενες αιτίες του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι σύνθετες και ετερογενείς. Χωρίζονται, δε, σε εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, με τους πρώτους να διαδραματίζουν τον πρωταρχικό ρόλο (Carini F. et al., 2017). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφερθεί στην επίπτωση παραγόντων, όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η φυσική δραστηριότητα, το βάρος του εξεταζόμενου, στην εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο CRC (Ordóñez-Me JM et al., 2017; Yoon Jin Choi et al., 2017). Οι ίδιοι παράγοντες φαίνεται να ενοχοποιούνται για την πορεία της νόσου και την ανταπόκριση του ασθενή στην εκάστοτε θεραπεία (Moniek van Zutphen et al., 2017; Harindra Jayasekara et al., 2017). Προκειμένου, λοιπόν, να αναπτυχθούν αποτελεσματικές στρατηγικές πρόληψης, διάγνωσης και αποτελεσματικής θεραπείας του CRC, είναι απαραίτητη η κατανόηση των οδών και των μοριακών συμβάντων που προκαλούν την καρκινογένεση.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μια ετερογενή νόσο και περιλαμβάνει ένα σύνολο υποτύπων με διακριτούς μορφολογικούς και γενετικούς χαρακτήρες. Κατανέμεται στον σποραδικού τύπου καρκίνο (70%-80%), στον κληρονομικού τύπου, όπου οι ασθενείς φέρουν κάποιον κληρονομούμενο χαρακτήρα (20%-30%) και σπανιότερα είναι αποτέλεσμα φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (1%-2%) (Müller Mike F. et al., 2016). Στα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, συγκαταλέγονται τα μονοπάτια της χρωμοσωμικής και μικροδορυφορικής αστάθειας, και το ενεργοποιητικό μονοπάτι των MAPK κινασών, στο οποίο συμμετέχουν τα γνωστά ογκογονίδια KRAS και BRAF.

Η γενετική αστάθεια του όγκου οφείλεται στην χρωμοσωμική ή μικροδορυφορική αστάθεια. Η τελευταία προέρχεται από λάθη στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (MMR), τα οποία οδηγούν στην ανάπτυξη πολλών νεοπλασμάτων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Οι CRC όγκοι του παχέος εντέρου με MSI φαινότυπο φέρουν συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όπως δεξιά εντόπιση του όγκου, κακή διαφοροποίηση, συχνά βλεννώδη χαρακτηριστικά, χαμηλότερο στάδιο του όγκου και σπάνια φέρουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Η πρόγνωση είναι γενικά καλή και τα ποσοστά μακροχρόνιας επιβίωσης χωρίς υποτροπή είναι υψηλότερα (Corso G. et al., 2013).

Παράλληλα, το μονοπάτι των RAS/RAF/MAP κινασών παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Το γονίδιο KRAS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον CRC καθώς είναι μεταλλαγμένο περίπου στο 40% των περιπτώσεων (Sideris M. & Papagrigoiriadis S., 2014), ενώ τα τελευταία χρόνια καταγράφονται μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια της οικογένειας RAS, όπως το NRAS γονίδιο. Το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου εντοπίζονται μόλις στο 10% των

αδενωμάτων μικρότερων του 1cm και σε ποσοστό 40%-50% εκείνων με μέγεθος >1cm, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως διαδραματίζει ρόλο στην πρόοδο του ορθοκολικού αδενώματος (J. Roper and K.E. Hung). Στο ίδιο μονοπάτι ακολουθεί το ογκογονίδιο BRAF που ενεργοποιεί την αντίστοιχη κίνηση. Μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου εντοπίζονται στο 15% όλων των υπαρχόντων καρκίνων και στο 12% των περιστατικών με CRC (Clancy C., 2013). Η συχνότερη σήμερα μετάλλαξη είναι η p.V600E (νουκλεοτιδική αλλαγή c.1799T>A), σε ποσοστό >80%. Μέσω της δράσης των κινασών επιτυγχάνεται με φωσφο- και αποφωσφορυλιώσεις των εμπλεκόμενων στο μονοπάτι γονιδίων ένας καταράκτης μεταγωγής σήματος που καταλήγει στον πυρήνα του κυττάρου και επιδρά όχι μόνο στην κυτταρική ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση αλλά επιπρόσθετα επηρεάζει βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση και η επιβίωση (Barras D., 2015). Σημαντικό είναι να σημειωθεί, πως οι όγκοι με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) συνυπάρχουν συχνά με μεταλλάξεις του BRAF ογκογονιδίου και κυρίως την V600E μετάλλαξη, φέρουν, όμως, λιγότερες μεταλλάξεις του KRAS ογκογονιδίου.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στο μικροπεριβάλλον του όγκου, καθώς διαφοροποιείται τόσο το μικροβίωμα όσο και τα παράγωγά του οδηγώντας σε ετερογένεια εντός του όγκου. Η ετερογένεια που αναπτύσσεται φαίνεται να οδηγεί σε ανάπτυξη μονοκλωνικών πληθυσμών κυττάρων. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των πληθυσμών των κυττάρων αυτών ενδεχομένως ευθύνεται για την ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία και γεννά την ανάγκη για νέους δείκτες και διαφορετική αντιμετώπιση του όγκου. Στα πλαίσια αυτά η έρευνα στρέφεται στη μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών καταπολέμησης των ελεύθερων ριζών του οργανισμού, που προκαλούν βλάβες στο DNA, οδηγούν σε μεταλλάξεις και σχετίζονται ενδεχομένως με την καρκινογένεση.

Με τον όρο ελεύθερες ρίζες, αναφερόμαστε σε ασταθή, βραχύβια και εξαιρετικά δραστικά μόρια, τα οποία δεν είναι, παρά άμεσα προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Οξειδώνουν βιομόρια με στόχο τη δική τους σταθερότητα, προκαλώντας σοβαρές βλάβες, με τελικό στάδιο την έκφραση καρκίνου (Phaniendra A. et al., 2015). Για την καταπολέμησή τους και την άμβλυση του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα, μέλος των οποίων είναι το σελήνιο και οι σεληνοπρωτεΐνες, καθώς μέσω των τελευταίων εκτελεί το σελήνιο τις λειτουργίες του, μετά από ενσωμάτωσή του στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών αυτών. Από τις 25 καταγεγραμμένες σεληνοπρωτεΐνες, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τρεις κοινές υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (οι GPx1, GPx3 και GPx4), όπως και η σεληνοπρωτεΐνη SEPP1, αφού στη γαστρεντερική οδό εκφράζονται και οι τρεις GPx, δεδομένο που μπορεί να υποδηλώνει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του εντέρου (π.χ. ως φραγμός για τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου)(Ulrike Peters et al., 2008).

Τα τελευταία χρόνια, πληθαίνουν οι μελέτες που ενοχοποιούν την φλεγμονή και το μικροπεριβάλλον του όγκου στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σε ασθενείς με CRC για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ουσιών στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια αυτής της εργασίας επιλέξαμε να ασχοληθούμε με τη μελέτη τεσσάρων σεληνοπρωτεϊνών και τον πιθανό τους ρόλο στην καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής έρευνας, μελετήθηκε η έκφραση τριών υπεροξειδάσων της γλουταθειόνης (GPx1, GPx3, GPx4) σε καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου ποικίλης διαφοροποίησης, καθώς και η ύπαρξη των πολυμορφισμών rs713041 και rs7579 για τα γονίδια που εκφράζουν τις σεληνοπρωτεΐνες, GPx4 και SEPP1, αντίστοιχα.

Μελετήσαμε 45 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, εκ των οποίων 28 ήταν άνδρες (62,22%) και 17 ήταν γυναίκες (37,78%), ηλικίας 40 – 85 ετών (μέση τιμή: 67 έτη). Η πλειοψηφία των ασθενών είχαν χειρουργηθεί στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και προσήλθαν

στο εργαστήριο για εξετάσεις των βιοδεικτών KRAS, BRAF και MSI προκειμένου να λάβουν κατάλληλη θεραπεία. Συλλέξαμε τις ιστολογικές εκθέσεις, καταγράψαμε τις κλινικοϊστολογικές παράμετρους και με τη βοήθεια Παθολογοανατόμου επιλέξαμε το κατάλληλο υλικό για την περαιτέρω πειραματική διαδικασία.

Αρχικά, λήφθηκαν τομές πάχους 4μm (τρεις ανά δείγμα) για ανοσοϊστοχημική χρώση με τα αντισώματα έναντι των GPx1, GPx3 και GPx4 πρωτεϊνών. Η εκτίμηση των χρώσεων έγινε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, όπου καταγράφηκαν τρία επίπεδα χρώσης, υποέκφραση, ήπια έκφραση και υπερέκφραση για την κάθε πρωτεΐνη. Παράλληλα, από τα ίδια περιστατικά και το ίδιο υλικό που χρησιμοποιήθηκε και για τις χρώσεις έγινε περαιτέρω λήψη 10 τομών πάχους 10μm και ακολούθησε απομόνωση γενομικού DNA για την περαιτέρω μελέτη των πολυμορφισμών rs713041 και rs7579 των γονιδίων GPx4 και SEPP1 αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός του πολυμορφισμού rs713041 του GPx4 γονιδίου έγινε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου Sty1. Ο πολυμορφισμός rs7579 του γονιδίου SEPP1 μελετήθηκε με απευθείας ανάλυση της γενετικής του αλληλουχίας και σύγκριση με την αντίστοιχη αλληλουχία του φυσιολογικού γονιδίου μέσω του προγράμματος BLAST του NCBI.

Στη συνέχεια, έγινε καταγραφή του συνόλου των αποτελεσμάτων και ακολούθησε στατιστική ανάλυση με το σύστημα SPSS23, όλων των αναφερθέντων μεταβλητών, μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, δεν αναδείχθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης με παραμέτρους όπως το φύλο ( $p= 0.351$ ), η ηλικία ( $p= 0.131$ ) και η εντόπιση του όγκου ( $p=0.434$ ). Επιπλέον η συσχέτιση με την παρουσία ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (0.328), την ύπαρξη μετάλλαξης στο ογκογονίδιο BRAF ( $p= 0.438$ ) και τους διαφορετικούς γονοτύπους του πολυμορφισμού του γονιδίου SEPP1 δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Ωστόσο, φαίνεται πως υπάρχει άμεση και ισχυρή στατιστικά συσχέτιση, μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης και των σταδίων διαφοροποίησης ( $p= 1,1099 \times 10^{-8}$ ), η οποία προέκυψε μέσα από 43 δείγματα. Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των δειγμάτων των ασθενών με υψηλής διαφοροποίησης όγκους παρουσιάζει υπερέκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Στα δείγματα όγκων μέσης διαφοροποίησης, παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων έκφρασης και στους ασθενείς με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, τα επίπεδα έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης είναι σχεδόν μηδενικά για την πλειοψηφία των ασθενών.

Παρατηρούμε λοιπόν πως στα αρχικά στάδια εξέλιξης του όγκου, καταγράφονται υψηλά επίπεδα έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης, στοιχείο το οποίο προϋποθέτει για ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού με σκοπό την καταπολέμηση των συσσωρευμένων ελεύθερων ριζών. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μειώνονται. Η GPx1 είναι μια υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που επηρεάζεται άμεσα από τα επίπεδα του διαθέσιμου σεληνίου. Η έλλειψη διαθεσιμότητας του τελευταίου, λόγω υπέρμετρης κατανάλωσής του κατά τη διάρκεια καταπολέμησης του έντονου οξειδωτικού στρες, οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα, ακόμη και έλλειψη της GPx1 (Regina Brigelius-Flohé, 2006). Τα ευρήματά μας αυτά συμφωνούν με κάποιες προηγούμενες μελέτες που έχουν καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι Yagublu V. et al. το 2011, κατέγραψαν συνολική αύξηση στην έκφραση της GPx1, ανεξάρτητα από το στάδιο διαφοροποίησης, εργαζόμενοι σε δείγματα παχέος εντέρου. Όλα τα επιμέρους καρκινικά στάδια, παρουσίαζαν αύξηση της έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης, σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Αντίθετα, οι Yoshiyuki Murawaki et al. το 2008, είχαν παρατηρήσει συνολική μείωση της έκφρασης της GPx1, χωρίς, όμως, να διαχωρίσουν τους όγκους με βάση το στάδιο διαφοροποίησης. Τέλος, σε μελέτη του 2009 σε καρκινώματα πνεύμονα, δεν ανέδειξε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της GPx1 πρωτεΐνης, μεταξύ φυσιολογικού και νεοπλασματικού ιστού (Peter Gresner et al., 2009).



Συσχετίζοντας την έκφραση της GPx1 πρωτεΐνης με την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκογονίδιο KRAS, παρατηρήσαμε πως στους ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη στο KRAS ογκογονίδιο, η έκφραση της GPx1 πρωτεΐνης ήταν ήπια και η παρατήρηση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.029$ ). Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες. Ωστόσο λόγω του μικρού αριθμού δείγματος της μελέτης μας (25 περιστατικά), λαμβάνουμε την προκύπτουσα αλληλεπίδραση μόνο ως ένδειξη και προτροπή για περαιτέρω έρευνα, αφού η πιθανή αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, ίσως σημαίνει πως η παρουσία μετάλλαξης στο KRAS ογκογονίδιο εμποδίζει ενδεχομένως την υπερέκφραση και συνεπώς τη δράση της GPx1 πρωτεΐνης.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της GPx1 πρωτεΐνης, τα επίπεδα της έκφρασής της συσχετίστηκαν με την παρουσία του πολυμορφισμού του GPx4 γονιδίου. Φάνηκε ότι η παρουσία του πολυμορφικού αλληλόμορφου σε ομο- ή ετεροζυγωτία δε συνδέεται με υπερέκφραση της GPx1 πρωτεΐνης. Στους ασθενείς με ομοζυγωτία του φυσιολογικού αλληλομόρφου, εντοπίστηκαν και οι τρεις τύποι έκφρασης, με την απλή να υπερισχύει. Επίσης, φαίνεται πως είναι πολύ μεγαλύτερη η συχνότητα του C αλληλομόρφου και του CC γονότυπου, δεδομένο που υποστηρίζεται και από τη βιβλιογραφία (Bergamo G. et al., 2007). Η συσχέτιση τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p=0.062$ ) μετά από έλεγχο σε 38 δείγματα. Η ερευνητική ομάδα της Catherine Mérlan et al. το 2008, έδειξε πως ο πολυμορφισμός GPx4 (C718T) μεταβάλλει αμφοτέρως την πρωτεϊνική σύνδεση με την 3'UTR in vitro και επηρεάζει τη συγκέντρωση της GPx1 και άλλων σεληνοπρωτεϊνών in vivo, κάτι το οποίο συμφωνεί με τον ανταγωνισμό για σελήνιο στη σύνθεση σεληνοπρωτεϊνών και, άρα σε χαμηλή πρόσληψη σεληνίου, ο πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία για την έκφραση της ασθένειας. Ειδικότερα η ποσότητα της GPx1 για τα άτομα με TT γονότυπο ήταν υψηλότερη από εκείνη των ατόμων με CC. Επίσης, η ερευνητική ομάδα της Gautrey Hannah το 2011, κατέγραψε μικρότερες ποσότητες GPx1 στα άτομα με CC φαινότυπο. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα αλληλόμορφα T και C της GPx4 3'UTR ανταγωνίζονται διαφορετικά στην ιεραρχία των σεληνοπρωτεϊνών με την παραλλαγή C να ανταγωνίζεται πιο έντονα.

Ανάλογες συσχετίσεις έγιναν σχετικά με την έκφραση της GPx3 πρωτεΐνης με τις άλλες κλινικοϊστολογικές παραμέτρους. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις με παραμέτρους όπως το φύλο ( $p=0.449$ ), η παρουσία μεταλλάξεων των KRAS ( $p=0.442$ ) και BRAF γονιδίων ( $p=0.147$ ) και τους πολυμορφισμούς των GPx4 και SEPP1 γονιδίων, με βάση τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους ( $p=0.413$  και  $0,547$ , αντίστοιχα), την παρουσία ( $p=0,318$  και  $0,531$  αντίστοιχα), ή την απουσία ( $p=0,519$  και  $0,618$  αντίστοιχα) του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομο- ή ετεροζυγωτία. Και στην προκειμένη περίπτωση αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της GPx3 πρωτεΐνης με το στάδιο διαφοροποίησης του όγκου ( $p=0.000053$ ). Συγκεκριμένα, σε όγκους υψηλής και μέσης διαφοροποίησης η πλειοψηφία των περιπτώσεων έδειξε ήπια έκφραση της GPx3 πρωτεΐνης, με λίγες περιπτώσεις υπερέκφρασης, ενώ στους χαμηλής διαφοροποίησης όγκους δεν παρατηρήσαμε υπερέκφραση και τα επίπεδα έκφρασης της GPx3 πρωτεΐνης τείνουν να μηδενιστούν. Ο αντιοξειδωτικός ρόλος των σεληνοπρωτεϊνών καθιστά αναμενόμενη τη μείωση των επιπέδων έκφρασης των σεληνοπρωτεϊνών GPx3 και GPx1, καθώς οι όγκοι αποδιαφοροποιούνται και γίνονται “χειρότεροι”. Οι σεληνοπρωτεΐνες αντιδρούν άμεσα στην έλλειψη διαθεσιμότητας σεληνίου (Regina Brigelius-Flohe, 2006). Μελέτη των Yoshiyuki Murawaki et al., 2008 κατέγραψε συνολική μείωση της έκφρασης της GPx3 πρωτεΐνης στους καρκινικούς ιστούς. Ωστόσο η καταγραφή έγινε συνολικά χωρίς να ληφθούν υπόψη τα στάδια διαφοροποίησης του όγκου. Παρομοίως οι Peng DF et al. το 2009, κατέγραψαν μείωση των επιπέδων της GPx3 πρωτεΐνης στους καρκινικούς ιστούς του οισοφάγου.

Παρατηρήσαμε επίσης πως σε όγκους με αριστερή εντόπιση δεν είχαμε υψηλά επίπεδα έκφρασης της GPx3 πρωτεΐνης και το εύρημα ήταν στατιστικώς σημαντικό ( $p= 0.028$ ). Αντιθέτως, η πλειοψηφία των όγκων παρουσίασε μειωμένη έκφραση της GPx3 πρωτεΐνης σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στους όγκους με δεξιά εντόπιση. Γνωρίζουμε ότι οι καρκίνοι του παχέος εντέρου αριστερής εντόπισης έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνους με δεξιά εντόπιση (Sebastian Stintzing et al., 2017), οπότε ενδεχομένως θα περίμενε κανείς υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη καθώς δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία.

Χωρίζοντας τους ασθενείς της μελέτης μας σε δύο ηλικιακές ομάδες,  $\leq 67$  ετών και  $> 68$  ετών, παρατηρήσαμε πως άτομα ηλικίας  $\leq 67$  ετών, δεν εμφάνιζαν υπερέκφραση της πρωτεΐνης, και το αποτέλεσμα αυτό, τείνει να γίνει στατιστικά σημαντικό ( $p= 0.058$ ). Η ομάδα των Ulrike Haug et al. το 2012, διαπίστωσε συσχέτιση πολλών μεταβλητών, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, για τον καρκίνο του ορθού, όχι όμως και για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε μελέτη σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή, η δραστηριότητα της GPx3 μειώθηκε σταδιακά ανά αύξηση ηλικιακής δεκαετίας ( $P < 0,001$ ), με προοδευτική μείωση στα άτομα ηλικίας  $\geq 70$  ετών (Daniele Pastori et al., 2016).

Κατά αντιστοιχία με τις προηγούμενες σεληνοπρωτεΐνες, ανάλογες συσχετίσεις έγιναν και για την έκφραση της GPx4 υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Δεν αναδείχθηκαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με παραμέτρους όπως το φύλο ( $p= 0.618$ ), η ηλικία ( $p= 0.283$ ) η εντόπιση του όγκου ( $p= 0.423$ ) και η παρουσία ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας ( $p=0.312$ ). Παρομοίως, ο πολυμορφισμός rs7579 δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του GPx4 ενζύμου. Όμως και εδώ υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της GPx4 πρωτεΐνης με το στάδιο διαφοροποίησης του όγκου ( $p= 0.002$ ). Ασθενείς με υψηλής διαφοροποίησης όγκους δεν εμφάνισαν υποέκφραση, ενώ, επίσης, εμφάνιζαν κυρίως ήπια/απλή έκφραση. Τα δείγματα μέσης διαφοροποίησης, παρουσίαζαν ποικιλία επιπέδων έκφρασης, με αυξημένο τον αριθμό εκείνων με απλή έκφραση, και έπειτα εκείνων με υποέκφραση. Τέλος, πλακίδια χαρακτηρισμένα ως χαμηλής διαφοροποίησης, καταγράφηκαν κυρίως ως υποεκφράζοντα του ενζύμου, ενώ είναι η πρώτη πρωτεΐνη για την οποία καταγράφονται και δείγματα υπερέκφρασης σε αυτόν τον πληθυσμό. Γενικότερα, οι τρεις πρωτεΐνες παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης, με αυξημένα επίπεδα σε υψηλό στάδιο διαφοροποίησης και μείωση αυτών καθώς ο όγκος εξελίσσεται. Η ύπαρξη ασθενών με υπερέκφραση της GPx4 πρωτεΐνης σε χαμηλής διαφοροποίησης όγκους, οφείλεται ενδεχομένως στη σταθερότητα αυτής της πρωτεΐνης, η οποία δεν επηρεάζεται άμεσα από τα επίπεδα σεληνίου (Regina Brigelius-Flohé, 2006). Η μελέτη των Yagublu V. et al. το 2011, συμφωνεί με τα ευρήματά μας, ωστόσο η μελέτη της έκφρασής τους σε επίπεδο mRNA μεταγράφων έδειξε αυξημένη έκφραση σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης, γεγονός που οδηγεί στην αναζήτηση των μηχανισμών εκείνων που καθορίζουν και επηρεάζουν τη σταθερότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Παράλληλα, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της GPx4 πρωτεΐνης συγκριτικά με το status των μεταλλάξεων στα KRAS και BRAF ογκογονίδια, καθώς είναι συχνά μεταλλαγμένα στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρατηρήσαμε ότι και στις δύο περιπτώσεις δεν είχαμε υπερέκφραση της GPx4 πρωτεΐνης στους ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις, ενώ σε όσους έφεραν μεταλλάξεις είτε στο KRAS είτε στο BRAF γονίδιο η GPx4 πρωτεΐνη είχε ποικίλα επίπεδα έκφρασης ( $p= 0.071$ ,  $p= 0,098$ ) αντίστοιχα. Ωστόσο, ο αριθμός του δείγματος είναι μικρός και δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία. Καθώς τα δύο ογκογονίδια είναι μέλη του ίδιου μονοπατιού, ίσως είναι σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα με περισσότερα περιστατικά.

Τέλος, συσχετίζοντας τον πολυμορφισμό rs731041 του GPx4 γονιδίου και τα επίπεδα έκφρασής της, είδαμε ότι η παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομο- ή ετεροζυγωτία δε συνδέονται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της GPx4 πρωτεΐνης ( $p= 0.063$ ). Προηγούμενη μελέτη καταδεικνύει

τη λειτουργικότητα του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην έκφραση της GPx4 πρωτεΐνης και υποδηλώνει πως ο T γονότυπος σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο CRC (Bergamo G et al., 2007). Άλλη ερευνητική ομάδα, η οποία εργάστηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος, κατέληξε πως υπήρξε μια σημαντική πτώση τόσο στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης GPx4 των λεμφοκυττάρων όσο και στην δραστηριότητα της GPx4 σε συμμετέχοντες με TT αλλά όχι CC γονότυπο (Catherine Mérlan et al., 2008).

Η στατιστική ανάλυση του πολυμορφισμού rs713041 του GPx4 γονιδίου, δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις με την πλειοψηφία των κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων που εξετάσαμε. Ωστόσο, η συσχέτιση των γονοτύπων του GPx4 γονιδίου για τον πολυμορφισμό rs713041, σε συνάρτηση με την παρουσία μετάλλαξης στο KRAS ογκογονίδιο ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0.045$ ). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι σε περιστατικά με τον προγονικό τύπο για τη μετάλλαξη KRAS, καταγράφηκαν και οι τρεις γονότυποι για τη μετάλλαξη της GPx4, με τον ετερόζυγο να υπερέχει, ενώ η ύπαρξη πολυμορφισμού KRAS, απέκλειε την ύπαρξη ομοζυγωτίας για το πολυμορφικό αλληλόμορφο. Επεκτείνοντας τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, στο ίδιο μέγεθος δείγματος, η συσχέτιση της παρουσίας τουλάχιστον ενός πολυμορφικού αλληλομόρφου της GPx4 με την ύπαρξη μετάλλαξης στο KRAS ογκογονίδιο, έδειξε πως η ύπαρξη μετάλλαξης στο ογκογονίδιο KRAS απέκλειε την παρουσία γονοτύπων του rs713041 με ένα τουλάχιστον πολυμορφικό αλληλόμορφο. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό ( $p=0.027$ ). Η διεθνής βιβλιογραφία δεν διαθέτει άρθρα που να στηρίζουν ή να αποκλείουν την παραπάνω αλληλεπίδραση, οπότε η διπλή αυτή, στατιστικά σημαντική ένδειξη, επιβάλλει περαιτέρω έρευνα, με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Όσον αφορά στην κατανομή του πολυμορφισμού rs713041 του GPx4 γονιδίου μεταξύ των δύο φύλων προκύπτει πως οι άρρενες έχουν τριπλάσια πιθανότητα να φέρουν σε ομοζυγωτία το πολυμορφικό αλληλόμορφο απ' ό,τι να έχουν οποιοδήποτε άλλο γονότυπο, αλλά και σε σχέση με τα θήλεα άτομα. Η αλληλεπίδραση αυτή, μελετήθηκε σε 38 περιστατικά και τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p=0.066$ ). Αντίστοιχες μελέτες δεν υπάρχουν.

Η σύγκριση του πολυμορφισμού της πρωτεΐνης GPx4 με την παρουσία, ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), οδήγησε στην παρατήρηση πως τα άτομα με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MS-Stable) δεν έφεραν τον γονότυπο CC (προγονικός). Η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομο- ή ετεροζυγωτία, χωρίς ωστόσο στατιστικώς σημαντική συσχέτιση λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων (10 περιστατικά) ( $p=0.080$ ). Ακολούθως, η συσχέτιση της παρουσίας ομοζυγωτίας για το πολυμορφικό αλληλόμορφο με την ύπαρξη δορυφορικής αστάθειας (MSI), αποκαλύπτει απόλυτη συσχέτιση της απουσίας μικροδορυφορικής αστάθειας και της ύπαρξης ομοζυγωτίας για το πολυμορφικό αλληλόμορφο της GPx4, αφού είναι ο μοναδικός γονότυπος που εκφράζεται, σε αυτήν την κατάσταση. Η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας δεν παρουσιάζει κάποια επιρροή στους διαφορετικούς γονότυπους. Και αυτή η σύγκριση τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p=0.070$ ). Σημειώνεται επίσης ότι δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία, και θεωρούμε σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα προς αυτήν την κατεύθυνση, αφού οι ενδείξεις είναι διπλές.

Επιπρόσθετα, είδαμε πως στους υψηλής διαφοροποίησης όγκους δεν υπήρξαν ασθενείς που έφεραν σε ομοζυγωτία το προγονικό αλληλόμορφο (CC). Αντιθέτως, η παρουσία ενός τουλάχιστον πολυμορφικού αλληλομόρφου φαίνεται να αποκλείει τη χαμηλή διαφοροποίηση. Θα έλεγε κανείς ότι η παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου για τον rs713041 πολυμορφισμό του GPx4 έχει ενδεχομένως έναν προστατευτικό ρόλο. Η αλληλεπίδραση ελέγχθηκε σε 38 δείγματα ασθενών, και τείνει να γίνει στατιστικώς σημαντική ( $p=0.055$ ). Το εύρημα αυτό ενισχύεται και από το προηγούμενο

εύρημα, όπου η παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σχετίζεται με μικροδορυφορική αστάθεια. Γνωρίζουμε ότι η υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη για την ελεύθερη υποτροπής και συνολική επιβίωση των ασθενών με σταδίου II και III CRC.

Τέλος, η συσχέτιση όλων των προαναφερθέντων παραμέτρων με τον πολυμορφισμό rs7579 του γονιδίου SEPP1 δεν ανέδειξε κάποιο στατιστικώς σημαντικό εύρημα. Καταγράφηκε, παρόλ' αυτά, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την παρουσία μετάλλαξης του BRAF γονιδίου. Συγκεκριμένα, η συσχέτιση της παρουσίας της V600E BRAF μετάλλαξης με τους τρεις διαφορετικούς γονοτύπους έδειξε πως ο γονότυπος AA (πολυμορφικός), παρατηρείται μόνο σε περιστατικά που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη BRAF V600E ( $p=0.046$ ). Η παρουσία της συγκεκριμένης μετάλλαξης φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου του rs7579 πολυμορφισμού σε ομο- ή ετεροζυγωτία ( $p=0.039$ ) στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Στα δείγματα που δεν έφεραν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη του BRAF γονιδίου δεν παρατηρείται η παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομοζυγωτία ( $p=0.037$ ). Θεωρούμε πως η τριπλή στατιστικώς σημαντική συσχέτιση είναι ισχυρή ένδειξη για την αλληλεπίδραση των δύο γονιδίων και των προϊόντων τους και κρίνουμε απαραίτητη την επέκταση της έρευνας με περισσότερα δείγματα.

Συνοψίζοντας, η μελέτη μας οδηγεί σε πολλά ευρήματα σχετικά με τον πιθανό αντιοξειδωτικό ρόλο των σεληνοπρωτεϊνών. Η διεθνής βιβλιογραφία είναι φτωχή ως προς το συγκεκριμένο πεδίο και η πλειοψηφία των μελετών αφορά σε κυτταρικές σειρές κυρίως και *in vitro* πειράματα. Δεδομένου ότι η φλεγμονή και η διατροφή συγκαταλέγονται μεταξύ των κύριων παραγόντων που ενοχοποιούνται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή στατιστικώς συμπεράσματα, που θα φωτίσουν το πεδίο των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και θα συμβάλλουν στην ανάπτυξη παραγόντων για την πρόληψη.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1) Al-Taie OH, Uceyler N, Eubner U, Jakob F, Mörk H, Scheurlen M, Brigelius-Flohe R, Schöttker K, Abel J, Thalheimer A, Katzenberger T, Illert B, Melcher R, Köhrle J, “Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis”. *Nutr Cancer*. 2004;48(1):6-14.
- 2) Arnold Melina, Mónica S Sierra, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray, “Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality”, published on January 27, 2016 as 10.1136/gutjnl-2015-310912
- 3) Barras D. (2015). “BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. Biomarkers in Cancer”, 7(Suppl 1), 9–12. <http://doi.org/10.4137/BIC.S25248>
- 4) Barrett Caitlyn W, Wei Ning, Xi Chen, J. Joshua Smith, Mary K Washington, Kristina E. Hill, Lori A. Coburn, Richard M. Peek, Rupesh Chaturvedi, Keith T. Wilson, Raymond F. Burk, and Christopher S. Williams, “Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase Gpx3 in colitis-associated carcinoma”, Published online 2012 Dec 5.
- 5) Bastihalli T., Diwakar Arvind M., Korwar Robert F., Paulson K., Sandeep Prabhu, “Chapter Six - The Regulation of Pathways of Inflammation and Resolution in Immune Cells and Cancer Stem Cells by Selenium”, *Advances in Cancer Research*, Volume 136, 2017, Pages 153-172.
- 6) BELLINGER Frederick P., Arjun V. RAMAN, Maricclair A. REEVES and Marla J. BERRY, “Regulation and function of selenoproteins in human disease” *Biochem. J.* (2009) 422, 11–22 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20090219 11
- 7) Bermanno G., Pagmantidis, V., Holloway, N., Kadri, S., Mowat, N. A. G., Shiel, R. S., ... Hesketh, J. E. (2007). “Evidence that a polymorphism within the 3’UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer”. *Genes & Nutrition*, 2(2), 225–232.
- 8) Brigelius-Flohé Regina, “Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors”, Published Online: 2006-11-02
- 9) Brody Herb, “Colorectal cancer”, 2015, *Nature*
- 10) Burk RF, Hill KE, Motley AK., “Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P”. *J Nutr*. 2003 May;133(5 Suppl 1):1517S-20S.
- 11) Burke Carol, “New Era of Genetic Testing in Colon Cancer”, Sanford R Weiss Center for Hereditary Colorectal Neoplasia Department of Gastroenterology and Hepatology, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, September 19, 2015
- 12) Clancy C, Burke JP, Kalady MF, Coffey JC., “BRAF mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis”. *Colorectal Dis*. 2013 Dec;15(12):e711-8. doi: 10.1111/codi.12427.
- 13) Chu FF., “The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively.”, *Cytogenet Cell Genet*. 1994;66(2):96-8
- 14) Cole-Ezea P, Swan D, Shanley D, Hesketh J., “Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells.”, *Free Radic Biol Med*. 2012 Aug 1;53(3):488-97. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.029. Epub 2012 May 25.
- 15) Corso G., Pascale, V., Flauti, G., Ferrara, F., Marrelli, D., & Roviello, F. (2013). “Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype predict specific anatomical subsite in colorectal cancer patients”. *European Journal of Human Genetics*, 21(12), 1383–1388. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2013.66>

- 16) Cortassa Sonia, Miguel A. Aon, Raimond L. Winslow, and Brian O'Rourke, "A Mitochondrial Oscillator Dependent on Reactive Oxygen Species", 2004, *Biophysical Journal*, 87, 2060-2073. PubMed ID: 15345581
- 17) FRANCESCO CARINI, MARGHERITA MAZZOLA1, , FRANCESCA RAPPÀ, ABDO JURJUS, ALICE GERGES GEAGEA, SAHAR AL KATTAR, TAREK BOU-ASSI, ROSALYN JURJUS, PROVVIDENZA DAMIANI, ANGELO LEONE and GIOVANNI TOMASELLO, "Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants", *Anticancer Research* September 2017 vol. 37 no. 9 4759-4766
- 18) Fearon ER, Vogelstein B (1990) "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* 61(5):759-767
- 19) Ferlay J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W. Coebergh, H. Comber, et al., "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012", *Eur J Cancer*, 49 (6) (2013), pp. 1374-1403
- 20) Fiaschi T., & Chiarugi, P. (2012). "Oxidative Stress, Tumor Microenvironment, and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison". *International Journal of Cell Biology*, 2012, 762825. <http://doi.org/10.1155/2012/762825>
- 21) Frayling I, Arends M (2013) "Adenomatous Polyposis Coli". In Maloy S, Hughes K (eds) *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, vol 1, 2nd edition edn. Academic, San Diego, pp 27–29, 9) rayling I, Arends M (2013)
- 22) Fritzmann J, Morkel M, Besser D, Budczies J, Kosel F, Brembeck FH, Stein U, Fichtner I, Schlag PM, Birchmeier W:" A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential.", *Gastroenterology* 2009, 137 (1):165 -175
- 23) Gào X., & Schöttker, B. (2017). "Reduction–oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews". *Oncotarget*, 8(31), 51888–51906. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.17128>
- 24) Gautrey Hannah, Fergus Nicol, Alan A. Sneddon, Judith Hall, and John Hesketha, "A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells", *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun; 1810(6): 284–291. ,doi: 10.1016/j.bbagen.2011.03.016, PMID: PMC3793862
- 25) Gladysheva Vadim N.,b1, Elias S. Arnérc, Marla J. Berryrd, Regina Brigelius-Flohée, Elspeth A. Brufordf, Raymond F. Burkg, Bradley A. Carlsonh, Sergi Castellanoi, Laurent Chavattej, Marcus Conradk, Paul R. Copelandl, Alan M. Diamondm, Donna M. Driscolln, Ana Ferreiroo,p, Leopold Flohéq,r, Fiona R. Greens, Roderi Guigót,u, Diane E. Handyv, Dolph L. Hatfieldh, John Heskethw,x,y, Peter R. Hoffmannnd, Arne Holmgrenc, Robert J. Hondalz, Michael T. Howardaa, Kaixun Huangbb, Hwa-Young Kimcc, Ick Young Kimdd, Josef Köhrleee, Alain Krolff, Gregory V. Kryukovgg, Byeong Jae Lee hh, Byung Cheon Leedd, Xin Gen Leiii, Qiong Liu jj, Alain Lescureff, kk, Alexei V. Lobanova, Joseph Loscalzoll, Matilde Maiorinor, Marco Mariottia, K. Sandeep Prabhum, Margaret P. Raymannn, Sharon Rozovskyoo, Gustavo Salinaspp, Edward E. Schmidtqq, Lutz Schomburgee, Ulrich Schweizerrr, Miljan Simonovićss, Roger A. Sundett, Petra A. Tsujiuu, Susan Tweedief, Fulvio Ursinir, Philip D. Whangerv and Yan Zhangjj, "Selenoprotein Gene Nomenclature\*", doi: 10.1074/jbc.M116.756155 November 11, 2016, *The Journal of Biological Chemistry*, 291, 24036-24040.
- 26) Gresner Peter, Jolanta Gromadzinska, Ewa Jablonska, Jacek Kaczmariski, Wojciech Wasowicz, "Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer", *Lung Cancer*, Volume 65, Issue 1, July 2009, Pages 34-40
- 27) Halliwell Barry & Gutteridge John M. C., 2015, "Free Radicals in Biology and Medicine", Oxford Publications, Fifth Edition

- 28) Harindra Jayasekara , Dallas R. English , Andrew Haydon , Allison M. Hodge , Brigid M. Lynch, Christophe Rosty, Elizabeth J. Williamson, Mark Clendenning, Melissa C. Southey, Mark A. Jenkins, Robin Room, John L. Hopper, Roger L. Milne, Daniel D. Buchanan, Graham G. Giles Robert J. , MacInnis, “Associations of alcohol intake, smoking, physical activity and obesity with survival following colorectal cancer diagnosis by stage, anatomic site and tumor molecular subtype”, 2017
- 29) Haug Ulrike, Elizabeth M. Poole, Liren Xiao, Karen Curtin, David Duggan, Li Hsu, Karen W Makar, Ulrike Peters, Richard J Kulmacz, John D Potter, Lisel Koepl, Bette J Caan, Martha L Slattery, and Cornelia M Ulrich, “Glutathione Peroxidase (GPX) tagSNPs: Associations with Rectal Cancer but not with Colon Cancer”, *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Jun; 51(6): 598–605.
- 30) Hirota Imai, Yasuhito Nakagawa, “Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells”, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 34, Issue 2, 15 January 2003, Pages 145-169, Elsevier
- 31) Holmström KM, Finkel T., “Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling”, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jun;15(6):411-21. doi: 10.1038/nrm3801
- 32) Hussain M. R. M., Baig, M., Mohamoud, H. S. A., Ulhaq, Z., Hoessli, D. C., Khogeer, G. S., ... Al-Aama, J. Y. (2015). “BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes”. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 359–373. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002>
- 33) Juránek I, Nikitovic D, Kouretas D, Hayes AW, Tsatsakis AM., “Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants”. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:240-7. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.074. Epub 2013 Sep 8.
- 34) Kelner MJ, Montoya MA., “Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3.”, *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Aug 10;249(1):53-5.
- 35) Kryukov Gregory V., Sergi Castellano, Sergey V. Novoselov, Alexey V. Lobanov, Omid Zehtab, Roderic Guigó, Vadim N. Gladyshev,\*
- 36) “Characterization of Mammalian Selenoproteomes”, *Science* 30 May 2003: Vol. 300, Issue 5624, pp. 1439-1443
- 37) Kwabena Owusu Danquah, & Ernest Adjei, Solomon Quayson, Ernest Adankwah, Daniel Gyamfi, Paul Poku Sampene Ossei, Gideon Dzikunu, Portia Mensah, and Cecilia Lepkor, “Mucin expression patterns in histological grades of colonic cancers in Ghanaian population”, *Pan Afr Med J*. 2017; 27: 267. Published online 2017 Aug 10. doi: 10.11604/pamj.2017.27.267.9793
- 38) Leinfelder W, Zehelein E, Mandrand-Berthelot MA, Böck A., “Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine”, *Nature*. 1988 Feb 25;331(6158):723-5
- 39) Lingying Tong, Chia-Chen Chuang, Shiyong Wu, Li Zuo, “Reactive oxygen species in redox cancer therapy”, *Cancer Letters* 2015 Elsevier Ireland Ltd. Accepted 10 July 2015
- 40) Lochhead P., Kuchiba, A., Imamura, Y., Liao, X., Yamauchi, M., Nishihara, R., Ogino, S. (2013). “Microsatellite Instability and BRAF Mutation Testing in Colorectal Cancer Prognostication.”, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 105(15), 1151–1156. <http://doi.org/10.1093/jnci/djt173>
- 41) Maiorino M., J.P. Thomas, A.W. Girotti, F. Ursini, “Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides”, *Free Radic. Res. Commun.*, 12–13 (Pt 1) (1991), pp. 131-135

- 42) Mármol I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer". *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197.  
<http://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- 43) Méplan Catherine, Lars Ove Dragsted, Gitte Ravn-Haren, Anne Tjønneland, Ulla Vogel, and John Hesketh, William B. Coleman, "Association between Polymorphisms in Glutathione Peroxidase and Selenoprotein P Genes, Glutathione Peroxidase Activity, HRT Use and Breast Cancer Risk"  
Editor PLoS One. 2013; 8(9): e73316. Published online 2013 September 10. doi: 10.1371/journal.pone.0073316
- 44) Méplan Catherine & John Hesketh, "The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk", *Mutagenesis*, Volume 27, Issue 2, 1 March 2012, Pages 177–186,
- 45) Miller Kimberly D., MPH ; Rebecca L. Siegel, MPH ; Chun Chieh Lin, PhD, MBA ; Angela B. Mariotto, PhD ; Joan L. Kramer, MD ; Julia H. Rowland, PhD ; Kevin D. Stein, PhD ; Rick Alteri, MD ; Ahmedin Jemal, DVM, PhD, "Cancer Treatment and Survivorship Statistics", 2016 *CA CANCER J CLIN* 2016;66:271–289
- 46) Moniek van Zutphen, corresponding author Ellen Kampman, Edward L. Giovannucci, and Fränzel J. B. van Duijnhoven, "Lifestyle after Colorectal Cancer Diagnosis in Relation to Survival and Recurrence: A Review of the Literature", 2017
- 47) Mudassar Hussain<sup>1</sup> , Omer Waqas<sup>1</sup> , Usman Hassan<sup>1</sup> \*, Asif Loya<sup>1</sup> , Noreen Akhtar<sup>1</sup> , Sajid Mushtaq<sup>1</sup> , Muhammad Aasim Yusuf<sup>2</sup> , Aamir Ali Syed, "Right-Sided and Left-Sided Colon Cancers are Two Distinct Disease Entities: an Analysis of 200 Cases in Pakistan", DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.4.2545>
- 48) Müller Mike F., Ashraf E. K. Ibrahim, and Mark J. Arends, "Molecular pathological classification of colorectal cancer", Published online 2016 Jun 20. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3
- 49) Ordóñez-Me JM, Walter V, Schöttker B], Jenab M, O'Doherty MG, Kee F], Bueno-de-Mesquita B, Peeters PHM, Stricker BH, Ruiter R, Hofman A, Söderberg S, Jousilahti P, Kuulasmaa K, Freedman ND, Wilsgaard T], Wolk A, Nilsson LM, Tjønneland A], Quirós JR, van Duijnhoven FJB, Siersema PD, Boffetta P, Trichopoulou A, Brenner H, "Impact of prediagnostic smoking and smoking cessation on colorectal cancer prognosis: a meta-analysis of individual patient data from cohorts within the CHANCES consortium.", *Ann Oncol*. 2017 Dec 13.
- 50) Paramita Mandal, Naunyn Schmiedebergs, 2017, "Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer", *Arch Pharmacol*, 2017
- 51) Pastori Daniele, Pasquale Pignatelli, Alessio Farcomeni, Danilo Menichelli, Cristina Nocella, Roberto Carnevale, and Francesco Violi, "Aging-Related Decline of Glutathione Peroxidase 3 and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Atrial Fibrillation", *J Am Heart Assoc*. 2016 Sep; 5(9): e003682. Published online 2016 Sep 8.
- 52) Peng DF, Razvi M, Chen H, Washington K, Roessner A, Schneider-Stock R, El-Rifai W., "DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma.", *Gut*. 2009 Jan;58(1):5-15. doi: 10.1136/gut.2007.146290. Epub 2008 Jul 29.
- 53) Perše M. (2013). "Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence?" *BioMed Research International*, 2013, 725710.  
<http://doi.org/10.1155/2013/725710>
- 54) Peters Ulrike, Nilanjan Chatterjee, Richard B. Hayes, Robert E. Schoen, Yinghui Wang, Stephen J. Chanock and Charles B. Foster, "Variation in the Selenoenzyme Genes and Risk of Advanced



- Distal Colorectal Adenoma” AACR Publications, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2947 Published May 2008
- 55) Pham-Huy L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). “Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health”. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96.
  - 56) Phaniendra A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). “Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases”. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <http://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
  - 57) Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S, Biasiolo M, Faccioli A, Perilli L, Rossi E, Esposito G, Rugge M, Pilati P, Mocellin S, Nitti D, Bortoluzzi S, Zanovello P., “Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis.”, *BMC Genomics*. 2013 Aug 29
  - 58) Roper J. and K.E. Hung, “Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer”, επεξεργασία από Kevin M. Haigis, Ph.D., εκδόσεις Springer, σελίδα 26-32.
  - 59) Samoylenko A., Hossain, J.A., Mennerich, D., Kellokumpu, S., Hiltunen, J.K. & Kietzmann, T. 2013. “Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence”. *Antioxid Redox Signal* 19, 2157–2196
  - 60) Schieber Michael, Navdeep S. Chandel, “ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress”, *Current Biology* Volume 24, Issue 10, pR453–R462, 19 May 2014
  - 61) Setaffy L, Langner C., Pol J, “Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance”, *Pathol*. 2015 Sep;66(3):203-18.
  - 62) Sideris M, Papagrigroriadis S., “Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer.”, *Sideris M1, Papagrigroriadis S., Anticancer Res*. 2014 May;34(5):2061-8.
  - 63) Sneddon A., Hsin-Chieh Wu, Andrew Farquharson, Ian Grant, John R. Arthur, Dino Rotondo, Sun-Nam Choe, Klaus W.J.Wahle, “Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants”, *Volume 171, Issue 1, November 2003, Pages 57-65, Atherosclerosis, Elsevier*
  - 64) Slattery ML, Lundgreen A, Welbourn B, Corcoran C, Wolff RK. “Genetic Variation in Selenoprotein Genes, Lifestyle, and Risk of Colon and Rectal Cancer”. *Hold GL, ed. PLoS ONE*. 2012;7(5):e37312. doi:10.1371/journal.pone.0037312.
  - 65) Stintzing Sebastian, Sabine Tejpar, Peter Gibbs, Lar Thiebach, Heinz-Josef Lenz, “Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes”, *European Journal of Cancer*, Volume 84, October 2017, Pages 69-80
  - 66) Tham DM, Whitin JC, Kim KK, Zhu SX, Cohen HJ. “Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract.”, *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):G1463-71.
  - 67) Tidyman W. E., & Rauen, K. A. (2009). “The RASopathies: Developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current Opinion in Genetics & Development*”, 19(3), 230–236. <http://doi.org/10.1016/j.gde.2009.04.001>
  - 68) Torre Lindsey A., Rebecca L. Siegel, Elizabeth M. Ward and Ahmedin Jemal , “Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update”, DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578 Published January 2016
  - 69) Veskoukis Aristidis S., Antonios Kyparos, Michalis G. Nikolaidis, Dimitrios Stagos, Nektarios Aligiannis, Maria Halabalaki, Konstantinos Chronis, Nikolaos Goutzourelas, Leandros Skaltsounis, and Dimitrios Kouretas, “The Antioxidant Effects of a Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract In Vitro Do Not Correspond In Vivo Using Exercise as an Oxidant Stimulus”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2012 (2012), Article ID 185867, 14 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/185867>

- 70) Victorasso Jardim Bruna, Marina Gobbe Moschetta Camila Leonel Gabriela Bottaro Gelaleti Vitor Rafael Regiani Livia Carvalho Ferreira Juliana Ramos Lopes Debora Ap. Pires de Campos Zuccari, "Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study", Published online on: June 13, 2013
- 71) YAGUBLU V., J.R. ARTHUR, S.N. BABAYEVA, F. NICOL, S. POST and M. KEESE, "Expression of Selenium-containing Proteins in Human Colon Carcinoma Tissue" 2011
- 72) Yoon Jin Choi, Dong Ho Lee , Kyung-Do Han, Hyun Soo Kim, Hyuk Yoon, Cheol Min Shin, Young Soo Park, Nayoung Kim, "The relationship between drinking alcohol and esophageal, gastric or colorectal cancer: A nationwide population-based cohort study of South Korea", Published online 2017 Oct 3
- 73) Yoshiyuki Murawaki Hiroyuki Tsuchiy Takamasa Kanbe Kenichi Harada Kazuo Yashima Kimiyasu Nozaka Osamu Tanida Michimori Kohno Tomoyuki Mukoyama Eiji Nishimuki Haruhiko Kojo Tatsuya Matsura Kazuhiko Takahashi Mitsuhiko Osaki Hisao Ito Junji Yodoi Yoshikazu Murawaki Goshi Shiot, "Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer", Cancer Letters, Volume 259, Issue 2, 8 February 2008, Pages 218-230
- 74) Zuo L., T. Zhou, B. K. Pannell, A. C. Ziegler, T. M. Best, "Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly", Acta Physiologica Volume 214, Issue 3 July 2015 Pages 329–348

Ιστοσελίδες:

- 75) World Cancer Research Fund International: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics>
- 76) για την GPx1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876>
- 77) για την GPx3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2878>
- 78) για την GPx4: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2879>
- 79) για την SEPP1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6414>