



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Τεπετές

Διδακτορική Διατριβή

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΩΝ, GA733-1/-2 ΚΑΙ CEA
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ"**

υπό

ΙΩΑΝΝΗ Α. ΜΑΜΑΛΟΥΔΗ

Ειδικευόμενο Γενικής Χειρουργικής 2016

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Ιωάννης Μαμαλούδης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1^η/30-09-2016 ΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Κωνσταντίνος **Χατζηθεοφίλου**
Ομότιμος Καθηγητής, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Παναγούλα **Κόλλια**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήματος Βιολογίας,
Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Δημήτριος **Ζαχαρούλης**
Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος Κουκούλης
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωσταντίνος **Τεπετές**
Καθηγητής Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Τζοβάρας**
Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Μαρία **Σαμαρά**
Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήματος
Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ομότιμο Καθηγητή, του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Χατζηθεοφίλου, Υπεύθυνο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Επίσης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών κα. Παναγούλα Κόλλια που βοήθησε καθοριστικά στη δημιουργία, την πρόοδο και την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να απευθύνω στον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Δημήτριο Ζαχαρούλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και που με τις εύστοχες και ουσιώδεις παρατηρήσεις συνέβαλε αποφασιστικά στην παρούσα διατριβή.

Ιδιαίτερα πρέπει να αναφερθώ στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Κουκούλη και να τον ευχαριστήσω γιατί η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο που διευθύνει και συνέβαλε σημαντικά στην αξιολόγηση του υλικού μέσω των ιστολογικών εκθέσεων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να απευθύνω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Μαρία Σαμαρά που με εκπαίδευσε στις διάφορες τεχνικές του εργαστηρίου και την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή Χειρουργικής του Π.Γ.Ν.Α. κ. Κωνσταντίνο Τεπετέ και τον Καθηγητή Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Τζοβάρα, ως μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, συνέβαλαν με τον τρόπο τους ηθικά και πνευματικά στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Στους γονείς μου, Αντώνιο και Αναστασία,
με αγάπη και ευγνωμοσύνη για όλα όσα μου έχουν
απλόχερα προσφέρει μέχρι σήμερα, υλικά, ηθικά και
συναισθηματικά.

Στην Έβα μου,
με αγάπη και με την ελπίδα να με ανεχθεί και να
μου συμπαραστέκεται, όπως τώρα, στην αναζήτηση και κατάκτηση της
Γνώσης αλλά και της Ζωής.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΟΝΟΜΑ: ΙΩΑΝΝΗΣ
ΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΑΜΑΛΟΥΔΗΣ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ: ΑΝΤΩΝΙΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΡΟΣ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΗΜ/ΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: 28-02-1980
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ: ΙΑΤΡΟΣ-ΕΙΔ/ΝΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΕΑΡΧΟΥ ΠΑΤΕΡΑ 10-12-ΛΑΡΙΣΑΣ
Τ.Κ.: 41334
ΤΗΛ: 2410530006-6977787592
EMAIL: imamaloudis@yahoo.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

1999-2006 Απόφοιτος του τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα) με βαθμό "Καλώς"

2006-2013 Υποψήφιος Διδάκτωρ Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με Θέμα διδακτορικής διατριβής «*Μελέτη των γονιδίων των Αγγειοποιητινών, EGFR και GA733-2 σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου*».

ΤΡΙΜΗΝΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΥΠΟΧΡΕΩΣΗ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

07 Φεβρουάριο 08- 06 Μάιο 08 : Τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στα εξωτερικά ιατρεία και αντίστοιχα τμήματα επειγόντων περιστατικών του Παθολογικού και χειρουργικού τμημάτων του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας « Κουτλιμπάνειο και Τριανταφύλλειο».

07 Μάιο 2008- 10 Φεβρουάριο 2009: Εκπλήρωση υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ. Γόννων , πραγματοποίηση πρωινού τακτικού ιατρείου , κατοίκων επισκέψεων , εφημεριών και διακομιδών.

Αποσπασμένος ιατρός στην Παιδιατρική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΓΕΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ

11 Φεβρουάριο 2009- 12 Αυγούστου 2010 : Πανεπιστημιακή Χειρουργική κλινική, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισα.

(Διευθυντής: καθηγητής Κ. Χατζηθεοφίλλου)

06 Ιουλίου 2012 έως σήμερα: Πανεπιστημιακή Χειρουργική κλινική, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισα.

(Διευθυντής: αν. καθηγητής Ε. Αθανασίου)

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

13 Αυγούστου 2010- 06 Φεβρουαρίου 2011: σε θέση Υπεράριθμου Ειδικευομένου Ιατρού Χειρουργικής στη Πανεπιστημιακή Χειρουργική κλινική, του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισα.

04 Μαρτίου 2011- 08 Νοεμβρίου 2011: σε θέση Ιατρού Μονάδας για 8 μήνες κ 4 μέρες.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά

Η/Υ

Χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών σε περιβάλλον Windows , Office κτλ.

ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 13^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Χειρουργικών Λοιμώξεων

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ COURSES

Ως εκπαιδευόμενος

Διεθνή

Postgraduate Courses on HPB surgery

Οργανώθηκε από τη Ευρωπαϊκή Εταιρία Χειρουργικής Ήπατος - Χοληφόρων – Παγκρέατος (EAHPB)

2013

Ελληνικά

1. STUDENT ATLS (Advanced Trauma Life Support) COURSE

Οργανώθηκε από το Ελληνικό τμήμα του Αμερικανικού κολεγίου Χειρουργών και την Πανεπιστημιακή Χειρουργική κλινική του Π.Γ.Ν.Λάρισας

22-23 Μαΐου 2009, Λάρισα

2. 1^ο Σεμινάριο Επείγουσας Χειρουργικής

Οργανώθηκε από την ελληνική εταιρία τραύματος και την Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

17-18 Μαΐου, 2013, Λάρισα

3. Εκπαιδευτικό σεμινάριο χειρουργικής «Colorectal Diseases – Minimally Invasive Course»

Οργανώθηκε από την Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την Ελληνική εταιρία Λαπαροσκοπικής Χειρουργικής.

7-8 Ιουνίου, 2013, Λάρισα

Μετεκπαιδευτικά μαθήματα Χειρουργικού τομέα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

1. Α΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Λοιμώξεις στην Χειρουργική»

Ακαδημαϊκό έτος 2009-2010

2. Β΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Γενικές αρχές στην αντιμετώπιση του τραύματος»

Ακαδημαϊκό έτος 2010-2011

3. Α΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Εισαγωγή στις βασικές αρχές εκπαίδευσης και έρευνας στην Χειρουργική»

Ακαδημαϊκό έτος 2011-2012

4. Β΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Φλεβική Θρομβοεμβολική νόσος»

Ακαδημαϊκό έτος 2011-2012

5. Γ΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Χειρουργική Ογκολογία»

Ακαδημαϊκό έτος 2011-2012

6. Δ΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Λοιμώξεις στην Χειρουργική»

Ακαδημαϊκό έτος 2011-2012

7. Ε΄ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Γενικές αρχές στην αντιμετώπιση του τραύματος»

Ακαδημαϊκό έτος 2011-2012

8. 1^{ος} Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Ηθική δεοντολογία, εκπαίδευση και έρευνα στη Χειρουργική»

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013

9. 2^{ος} Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Χειρουργικά προβλήματα της τρίτης ηλικίας»

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013

10. 3^{ος} Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Χειρουργική Ογκολογία»

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013

11. 4^{ος} Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική»

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013

12. 5^{ος} Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «γενικές αρχές στην αντιμετώπιση του τραύματος»

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013

13. 6^{ος} Κύκλος Μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Χειρουργικού Τομέα Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Πρόληψη και αποκατάσταση στην χειρουργική»

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013

Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Χειρουργικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παρακολούθηση των μετεκπαιδευτικών μαθημάτων της Χειρουργικής Κλινικής κατά την διάρκεια της ειδικότητας ως συμμετέχων και ως ομιλητής. Τα μετεκπαιδευτικά μαθήματα περιελάμβαναν βιβλιογραφικές ενημερώσεις, research meetings, ομιλίες από Καθηγητές χειρουργικών ειδικοτήτων, επιστημονικές συναντήσεις με άλλες κλινικές κτλ.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΔΙΕΘΝΗ

1. European colorectal congress. Complications and liver metastases

November 30-December 3, 2010 St Gallen, Switzerland

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

1. 4^ο Χειρουργικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας

26 -28 Ιουνίου 2009, Λάρισα

2. 9^ο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρείας Βορείου Ελλάδος

29 Οκτωβρίου -1 Νοεμβρίου 2009 , Θεσσαλονίκη

3. 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής .Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ

24-27 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα

8. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής

17-19 Φεβρουαρίου 2011, Θεσσαλονίκη

9. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Παχέος Εντέρου –Πρωκτού

19-22 Μαΐου 2011, Θεσσαλονίκη

10. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής

26-28 Μαΐου 2011, Αθήνα

11. 8^η Επιστημονική συνάντηση προχωρημένης λαπαροσκοπικής χειρουργικής

4-6 Νοεμβρίου, Ιωάννινα

12. 10^ο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρείας Βορείου Ελλάδος

8-10 Δεκεμβρίου 2011, Θεσσαλονίκη

14. Εαρινή πολυθεματική διημερίδα στη Χειρουργική

27-28 Απριλίου, 2012, Λάρισα

15. 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ

21-24 Νοέμβριου, 2012, Αθήνα

16. Ημερίδα, « Νεοπλάσματα ενδοκρινών αδένων»

2 Φεβρουαρίου, 2013, Λάρισα

17. 5^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργική Παχέος εντέρου

11-13 Απριλίου, 2013, Αλεξανδρούπολη

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΔΙΕΘΝΗ

1. Blood transfusion and colorectal cancer surgery: An adverse relationship

Symeonidis D, Koukoulis G, Christodoulidis G, **Mamaloudis I**, Tepetes K

Αναρτημένη ανακοίνωση στο European colorectal congress. Complications and liver metastases

November 30-December 3, 2010 St Gallen, Switzerland

2. Laparoscopic ventral hernia repair in obese and morbidly obese patients under spinal anesthesia

D. Symeonidis, I. Baloyiannis, G. Koukoulis, I. Chatzinikolaou, **I. Mamaloudis**, G. Tzouvaras

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 20th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES)

20–23 June, 2012, Brussels, Belgium

Δημοσιεύτηκε στο Surgical Endoscopy 2013

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

1. Λαπαροσκοπική σπληνεκτομή , η εμπειρία μας

Τζοβάρας Γ., Ζαχαρούλης Δ., Σιώκα Ε., Μπαλογιάννης Ι., Συμεωνίδης Δ., Κουκούλης Γ., **Μαμαλούδης Ι.**, Χατζηθεοφίλλου Κ.

Ανακοίνωση στο 4^ο Χειρουργικό Συμπόσιο κεντρικής Ελλάδας

26-28 Ιουνίου, 2009, Λάρισα

2. Habib tm Vescoag : Πειραματική μελέτη μιας νέας συσκευής ενδοαγγειακού αποκλεισμού με ενέργεια ραδιοσυχνότητας.

Ζαχαρούλης Δ., Τζοβάρας Γ., Σιώκα Ε., Ζαχαρή Ε., Κουκούλης Γ., **Μαμαλούδης Ι.**, Χατζηθεοφίλλου Κ.

Ανακοίνωση στη 10^η Πανελλήνια συνάντηση Χειρουργικής Ήπατος-Χοληφόρων-Παγκρέατος 14-15 Μαΐου 2010, Αλεξανδρούπολη

3. Ενδείξεις και περιορισμοί της χειρουργικής θεραπείας του καρκίνου παχέος εντέρου στην Τρίτη ηλικία

Συμεωνίδης Δ, Κουκούλης Γ, Χατζηνικολάου Ι, Χριστοδουλίδης Γ, **Μαμαλούδης Ι**, Τεπετές Κ

Ανακοίνωση στο 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής .Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ

24-27 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα

4. Ο ρόλος του λεμφαδένα φρουρού στον πρώιμο καρκίνο του μαστού : Αξιολόγηση της υποθηλαίας έγχυσης χρωστικής

Συμεωνίδης Δ, Κουκούλης Γ, **Μαμαλούδης Ι**, Λαχανάς Α, Τζοβάρas Γ, Αθανασίου Ε

Ανακοίνωση στο 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής .Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ

24-27 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα

5. Λαπαροσκοπική ανάκτηση παροχέτευσης μετά από λαπαροσκοπική επιμήκης γαστρεκτομή

Σιώκα Ε, Τζοβάρas Γ, Λαχανάς Α, **Μαμαλούδης Ι**, Κουκούλης Γ, Αθανασίου Ε, Ζαχαρούλης Δ

Βίντεο παρουσίαση στο 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής .Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ

24-27 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα

6. Μακροπρόθεσμα αποτελέσματα μετά από λαπαροσκοπική διακοιλιακή προπεριτοναϊκή αποκατάσταση βουβωνοκήλης (TAPP) υπό περιοχική αναισθησία

Τζοβάρas Γ. , Συμεωνίδης Δ. , Κουκούλης Γ. , Μπαλογιάννης Ι. , **Μαμαλούδης Ι. , Ζαχαρούλης Δ.**

Ανακοίνωση στο 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής

26-28 Μαΐου 2011, Αθήνα

7. Η επίδραση των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στα χαρακτηριστικά του καρκίνου του παχέος εντέρου

Συμεωνίδης Δ., Κουκούλης Γ., **Μαμαλούδης Ι.**, Χατζηνικολάου Ι., Χριστοδουλίδης Γ., Τεπετές Κ.

Ανακοίνωση στο 10^ο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος
8-10 Δεκεμβρίου 2011, Θεσσαλονίκη

8. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων ga733-1 και ga733-2 στον καρκίνο του παχέος έντερου

Μαμαλούδης Ι., Σαμαρά Μ, Κουκούλης Γ, Συμεωνίδης Δ, Σιώκα Ε, Χατζηθεοφίλου Κ, Κόλλια Π, Ζαχαρούλης Δ

Ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ
21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

9. Ανοικτή πλαστική αποκατάσταση βουβωνοκήλης με τη χρήση πλήρως απορροφήσιμοι πλέγματα: μακροπρόθεσμα αποτελέσματα

Συμεωνίδης Δ, Ευθυμίου Μ, Κουκούλης Γ, Αθανασίου Ε, **Μαμαλούδης Ι.**, Τζοβάρας Γ

Ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ
21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

10. Προοπτική αξιολόγηση των διαθέσιμων αναισθητικών και χειρουργικών τεχνικών για την πλαστική αποκατάσταση βουβωνοκήλης

Συμεωνίδης Δ, Κουκούλης Γ, Μπαλογιάννης Ι, Αθανασίου Ε, Ευθυμίου Μ, **Μαμαλούδης Ι.**, Τζοβάρας Γ

Ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ
21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

11. Σημείο κλειδί: μια παραπλανητική οντότητα για τον χειρουργό

Συμεωνίδης Δ, **Μαμαλούδης Ι.**, Μπαλογιάννης Ι, Κουκούλης Γ, Σπυριδάκης Μ, Αθανασίου Ε, Τεπετές Κ

Ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ
21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

12. Λαπαροσκοπική αποκατάσταση κοιλιοκήλης σε παχύσαρκους ασθενείς υπό περιοχική αναισθησία

Συμεωνίδης Δ, Μπαλογιάννης Ι, Κουκούλης Γ, **Μαμαλούδης Ι**, Χατζηνικολάου Ι, Τζοβάρας Γ

Ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ 21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

13. Κατάποση ξένου σώματος: ένας ασυνήθιστος μηχανισμός διάτρησης δωδεκαδακτύλου και παγκρεατικού τραύματος

Συμεωνίδης Δ, Κουκούλης Γ, Μπαλογιάννης Ι, **Μαμαλούδης Ι**, Χατζηνικολάου Ι, Τεπετές Κ

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ 21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

14. Στρωματικοί όγκοι του γαστρεντερικού: στρατηγική αντιμετώπισης

Συμεωνίδης Δ, Ευθυμίου Μ, Αθανασίου Ε, Κουκούλης Γ, **Μαμαλούδης Ι**, Χατζηνικολάου Ι, Τεπετές Κ

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ 21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

15. Συνδυασμένη κάκωση κεφαλής και ρήξη διαφράγματος: παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

Συμεωνίδης Δ, Κουκούλης Γ, Χριστοδουλίδης Γ, Σπυριδάκης Μ, **Μαμαλούδης Ι**, Αθανασίου Ε, Τεπετές Κ

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 28^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές φόρουμ 21-24 Νοεμβρίου, 2012, Αθήνα

16. Περιοχική αναισθησία στη χειρουργική του παχέος εντέρου σε ασθενείς τρίτης ηλικίας: μια εναλλακτική επιλογή για ασθενείς υψηλού διεγχειρητικού κινδύνου

Μαμαλούδης Ι., Κουκούλης Γ., Συμεωνίδης Δ., Μπούλιαρης Κ., Σημαιοφορίδου Μ., Τεπετές Κ.

Ανακοίνωση στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρίας Χειρουργικής Παχέος Εντέρου και Πρωκτού

11-13 Απριλίου, 2013, Αλεξανδρούπολη

17. Επίδραση της μετάγγισης αίματος στην νοσηρότητα σε επεμβάσεις ορθοκολικού καρκίνου

Συμεωνίδης Δ., Κουκούλης Γ., **Μαμαλούδης Ι.**, Μπούλιαρης Κ., Χριστοδουλίδης Γ., Τεπετές Κ.

Ανακοίνωση στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρίας Χειρουργικής Παχέος Εντέρου και Πρωκτού

11-13 Απριλίου, 2013, Αλεξανδρούπολη

18. Κακοήθες νευροληπτικό σύνδρομο και καρκίνος σιγμοειδούς: ένας εξαιρετικά σπάνιος συνδυασμός με απρόβλεπτες συνέπειες

Μαμαλούδης Ι., Συμεωνίδης Δ., Κουκούλης Γ., Χριστοδουλίδης Γ., Ντόλια Α., Τεπετές Κ.

Ανακοίνωση στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρίας Χειρουργικής Παχέος Εντέρου και Πρωκτού

11-13 Απριλίου, 2013, Αλεξανδρούπολη

19. Λαπαροσκοπική χειρουργική του παχέος έντερου: αναγνωρίζοντας τα οφέλη της ελάχιστα επεμβατικής χειρουργικής

Συμεωνίδης Δ., Κουκούλης Γ., Μπαλογιάννης Ι., **Μαμαλούδης Ι.**, Μπούλιαρης Κ., Τζοβάρας Γ.

Ανακοίνωση στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρίας Χειρουργικής Παχέος Εντέρου και Πρωκτού

11-13 Απριλίου, 2013, Αλεξανδρούπολη

ΑΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. The revised international autoimmune hepatitis score in chronic liver diseases including autoimmune hepatitis/overlap syndromes and autoimmune hepatitis with concurrent other liver disorders.

Papamichalis PA, Zachou K, Koukoulis GK, Veloni A, Karacosta EG, Kypri L, **Mamaloudis I**, Gabeta S, Rigopoulou EI, Lohse AW, Dalekos GN.

J Autoimmune Dis. 2007 Jun 29;4:3.

2. Spontaneous expulsion from rectum: a rare presentation of intestinal lipomas.

Kouritas VK, Baloyiannis I, **Koukoulis G**, Mamaloudis I, Zacharoulis D, Efthimiou M.

World Journal of Emergency Surgery 2011 Jun

3. Mesocaval shunt for portal hypertensive small bowel bleeding documented with intraoperative enteroscopy.

Symeonidis D, Koukoulis G, Christodoulidis G, **Mamaloudis I**, Chatzinikolaou I, Tepetes K.

Int J Surg Case Rep. 2012

4. Diaphragmatic rupture causing repeated vomiting in a combined abdominal and head injury patient: a case report and review of the literature.

Symeonidis D, Spyridakis M, Koukoulis G, Christodoulidis G, **Mamaloudis I**, Tepetes K.

World J Emerg Surg. 2012 Jul

5. Ingested fish bone: an unusual mechanism of duodenal perforation and pancreatic trauma.

Symeonidis D, Koukoulis G, Baloyiannis I, Rizos A, **Mamaloudis I**, Tepetes K.

Case Rep Gastrointest Med. 2012

6. Impact of antiplatelet treatment on colorectal cancer staging characteristics.

Symeonidis D, Koukoulis G, Christodoulidis G, **Mamaloudis I**, Chatzinikolaou I, Tepetes K.

World J Gastrointest Endosc. 2012 Sep

7. Open inguinal hernia repair with the use of polyglycolic acid/trimethylene carbonate absorbable mesh: a critical update of the long-term results.

Symeonidis D, Efthimiou M, Koukoulis G, Athanasiou E, **Mamaloudis I**, Tzouvaras G.

Hernia. 2013 Feb

8. Adrenocortical carcinoma presenting with signs of acute abdomen.

Symeonidis D, Chatzinikolaou I, Koukoulis G, **Mamaloudis I**, Tepetes K.

Case Rep Surg. 2013

9. Open inguinal hernia repair with the use of polyglycolic acid/trimethylene carbonate mesh: gross and pathologic assessment of the inguinal area at reoperation for recurrence.

Symeonidis D, Efthimiou M, Koukoulis G, **Mamaloudis I**, Ioannou M, Tzouvaras G.

Hernia. 2013

10. Selective use of bioabsorbable Gore BIO-A plug and patch for groin hernia repair : comment to: open inguinal hernia repair with the use of polyglycolic acid/trimethylene carbonate absorbable mesh: a critical update of the long term results.

Symeonidis D, Efthimiou M, Koukoulis G, Athanasiou E, Mamaloudis I, Tzouvaras G.
Hernia 2013, 17:85-87.

Negro P, Campanelli G, Ipponi PL, Gossetti F, Dassatti MR, Manto O, D'Amore L.

Hernia. 2013

11. A primary hepatic lymphoma treated with liver resection and chemotherapy.

Bouliaris K, Christodoulidis G, Koukoulis G, Mamaloudis I, Ioannou M, Bouronikou E, Palassopoulou M, Tepetes K.

Case Rep Surg. 2014

12. Expression profile of the GA733 gene family in colorectal cancer: correlation with clinicopathological parameters.

Mamaloudis I, Zacharoulis D, Samara M, Papadopoulos G, Samara S, Koukoulis G, Chatzitheofilou C, Kollia P.

Genet Mol Res. 2015

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΩΝ, EGFR, GA733-1/-2
ΚΑΙ CEA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ"**

ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΜΑΜΑΛΟΥΔΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Κωσταντίνος Χατζηθεοφίλου**, Ομότιμο Καθηγητή, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων),
2. **Δρ. Παναγούλα Κόλλια**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών
3. **Δρ. Δημήτριος Ζαχαρούλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κολο-ορθικό καρκίνος είναι ένας από τους συχνότερα εμφανιζόμενους καρκίνους στο δυτικό κόσμο. Σε παγκόσμια κλίμακα περισσότεροι από ένα εκατομμύριο άνθρωποι ετησίως αναπτύσσουν κάποια μορφή κολο-ορθικό καρκίνου, ενώ περισσότεροι από τους μισούς θα καταλήξουν λόγω αυτής της παθολογίας.¹ Ο κολο-ορθικό καρκίνος είναι μία συστηματική νόσος, της οποίας η ενδεδειγμένη αντιμετώπιση είναι αποτέλεσμα μίας συντονισμένης προσπάθειας μίας ομάδας επιστημόνων. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει το γαστρεντερολόγο, το χειρουργό, τον ακτινολόγο, τον ογκολόγο, τον παθολογοανατόμο, τον μοριακό βιολόγο και τον ακτινοθεραπευτή, οι οποίοι θέτουν τη βάση και τη θεραπευτική στρατηγική που θα ακολουθήσουν σε κάθε ασθενή.

Η αντιμετώπιση της νόσου του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού ξεκινάει από τους γαστρεντερολόγους, όπου είτε μέσω του προληπτικού ελέγχου μπορούν να προλαμβάνουν τη νόσο σε αρχικά στάδια, όπως είναι η διάγνωση πολυπόδων και η αφαίρεσή τους, είτε είναι αυτοί που θέτουν πρώτοι τη διάγνωση της νόσου. Επόμενο βήμα είναι το καλό σύστημα σταδιοποίησης, που ομαδοποιεί τους ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο, ώστε αυτοί να έχουν παρόμοια πρόγνωση και αντιμετώπιση. Σε αυτό το στάδιο σημαίνουσα θέση έχουν οι ακτινολόγοι που συμβάλλουν στα μέγιστα. Με αυτόν τον τρόπο υπάρχει κοινός κώδικας επικοινωνίας μεταξύ των γιατρών, διευκολύνοντάς τους να πραγματοποιούν θεραπευτικά σχήματα και κλινικές δοκιμές παρέχοντας το βέλτιστο θεραπευτικό αλγόριθμο για τη θεραπεία του κολο-ορθικό καρκίνου. Ακολουθώντας, ακρογωνιαίο λίθο στο θεραπευτικό αλγόριθμο έχει ο χειρουργός, όπου μία χειρουργική επέμβαση, που διέπει τις αρχές της ολικής εκτομής του μεσο-κόλου και μεσο-ορθού (CME και TME, αντίστοιχα) και της υψηλής απολίνωσης των αγγείων, μπορεί να βελτιώσει το προσδόκιμο επιβίωσης περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη μορφή θεραπείας.²

Ο κολο-ορθικό καρκίνος είναι μία γενετικά ετερογενής νόσος, στον καθορισμό της οποίας βαρυσήμαντο ρόλο έχουν ο ογκολόγος, ο μοριακός βιολόγος και ο παθολογοανατόμος. Η χημειοθεραπεία, που χορηγείται επιπρόσθετα πριν ή μετά τη χειρουργική επέμβαση, έχει σκοπό είτε τον περιορισμό της νόσου είτε την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που πιθανόν να έχουν παραμείνει και που είναι αδύνατον να εντοπισθούν διεγχειρητικά ή με απεικονιστικές μεθόδους λόγω του

μικροσκοπικού μεγέθους που έχουν. Στην επιλογή των ασθενών για τη λήψη της χημειοθεραπείας και την ωφελιμότητά της καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η παρουσία ή όχι διαφόρων παραγόντων κινδύνου, τόσο ιστολογικών όσο και μοριακών, που καθορίζουν και την ετερογένεια της νόσου. Αν ο όγκος είναι χαμηλού κινδύνου, η νόσος είναι στα αρχικά στάδια και η χειρουργική εκτομή επαρκεί αρκετές φορές για την αντιμετώπιση της νόσου. Αν ο όγκος περιγράφεται ως υψηλού κινδύνου για επανεμφάνιση, τότε η χημειοθεραπεία θα συνδράμει στον περιορισμό του ενδεχομένου επανεμφάνισης της νόσου. Η αναγνώριση και ο προσδιορισμός των παραγόντων αυτών που μπορούν να καθορίσουν τη διαφορετική συμπεριφορά της νόσου, αποτελεί ένα κρίσιμης σημασίας θέμα που απασχολεί τη σύγχρονη επιστημονική κοινότητα. Ειδικότερα, η μοριακή βιολογία έχει συμβάλει μέχρι σήμερα προς αυτόν το σκοπό, και μας επιτρέπει να εντοπίζουμε μοριακές αλλαγές από άτομο σε άτομο, οι οποίες καθιστούν τη νόσο μοναδική σε κάθε ασθενή, επηρεάζοντας τόσο την ανταπόκριση στη θεραπεία όσο και την πρόγνωση. Τέτοιου είδους προγνωστικοί παράγοντες έχουν είδη καθιερωθεί, μεταξύ των οποίων είναι η ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο K-RAS ως προβλεπτικού δείκτη για τη θεραπεία με τους anti- EGFR βιολογικούς παράγοντες, καθώς και μοριακούς δείκτες, όπως για παράδειγμα τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Η εξατομίκευση της θεραπείας θα προσφέρει στους ασθενείς το βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα με τη μικρότερη τοξικότητα, ενώ θα αποφεύγεται η ανώφελη οικονομική επιβάρυνση του συστήματος υγείας.

Για το λόγο αυτό υπάρχει μία μεγάλη προσπάθεια να αποκωδικοποιηθεί η γενετική φύση του καρκίνου μελετώντας τις διάφορες γενετικές τροποποιήσεις των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και της ικανότητάς τους να διηθούν και να μεθίστανται. Μία τέτοια προσπάθεια έγινε στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετώντας τα γονίδια GA733-1, G1733-2, CEACAM5, Ang1 και Ang-2, που το καθένα από αυτά πιθανόν διαδραματίζει σημαίνων ρόλο στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Το κάθε ένα από τα μόρια αυτά πιθανολογείται ότι είτε μεταβάλλουν την κυτταρική λειτουργία κατά τη φάση της καρκινογένεσης, όπως του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μεταγωγής σημάτων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία παθολογικών κυτταρικών κλώνων, είτε συμβάλλουν στην ικανότητα των καρκινικών όγκων να διηθούν και να μεθίστανται σε παρακείμενες δομές.

Πίνακας Περιεχομένων

	Γενικό μέρος.....	26
Κεφάλαιο 1	Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	27
1.1.	Επιδημιολογικά στοιχεία.....	27
1.2.	Παράγοντες κινδύνου.....	27
1.3.	Σταδιοποίηση κατά TNM.....	28
1.4.	Παθολογο-ανατομία.....	36
1.4.1.	Μακροσκοπική εξέταση.....	37
1.4.2.	Μικροσκοπική εξέταση.....	37
1.5.	Μεταστατική νόσος του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	38
Κεφάλαιο 2	Χειρουργική ανατομία του παχέος εντέρου.....	40
2.1.	Τοπογραφική ανατομική του παχέος εντέρου.....	40
2.2.	Αγγείωση παχέος εντέρου.....	40
2.3.	Είδη χειρουργικών επεμβάσεων.....	42
Κεφάλαιο 3	Καρκίνος και καρκινογένεση.....	44
3.1.	Γενικά για τον καρκίνο.....	44
3.2.	Ογκογονίδια.....	44
3.3.	Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	46
3.4.	Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.....	47
3.5.	Μηχανισμοί ενεργοποίησης ογκογονιδίων.....	48
Κεφάλαιο 4	Γενετική του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	50
4.1.	Μοντέλο καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	50
4.2.	Η γενετική του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	52
4.2.1.	Ο ρόλος των MSI/K-RAS/N-RAS/B-RAF.....	56
Κεφάλαιο 5	Μόρια GA733-1/-2.....	59
5.1.	Η οικογένεια των πρωτεϊνών GA733-1/-2.....	59

5.2.	Ο ρόλος του GA733-1 στον καρκίνο.....	60
5.3.	GA733-2 και το σύνδρομο Lynch.....	63
5.4.	Ο ρόλος του GA733-2 στην προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων και της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.....	64
Κεφάλαιο 6	Μόριο CEA.....	66
6.1.	Εισαγωγή στα μόρια CEACAMs.....	66
6.2.	CEA.....	68
6.3.	CEACAM1.....	69
6.4.	CEACAM 5/6.....	69
Κεφάλαιο 7	Αγγειοποιητίνες -1/-2.....	72
7.1.	Αγγειογένεση.....	72
7.2.	Οι αγγειοποιητίνες και οι υποδοχείς τυροσίνης κινάσης (Tie-2)..	72
Κεφάλαιο 8	Σκοπός.....	76
8.1.	Σκοπός.....	77
Κεφαλαίο 9	Υλικά και μέθοδοι.....	79
9.1.	Υλικά.....	80
9.2.	Μέθοδοι.....	80
9.2.1.	Απομόνωση RNA από ιστό.....	80
9.2.2.	Καθαρισμός RNA.....	81
9.2.3.	Σύνθεση cDNA.....	82
9.2.3.1.	Συνθήκες αντίδρασης για την σύνθεση του cDNA.....	83
9.3.	Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του GA733-1, GA733-2, CEA, ANG-1, ANG-2 με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	84
9.3.1.	Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	84
9.3.1.1.	Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.....	87
9.3.1.2.	Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης.....	89

9.3.1.3.	Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.....	90
9.4.	Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του GA733-1, GA733-2, CEA, ANG-1, ANG-2 με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	96
9.4.1.	Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA.....	96
9.4.2.	Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR.....	97
9.4.2.1.	Διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο αναφοράς (h-HPRT).....	98
9.4.2.2.	Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο GA733-1.....	98
9.4.2.3.	Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης.....	99
Κεφάλαιο 10	Αποτελέσματα.....	101
10.1.	Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	102
10.2.	Η έκφραση των γονιδίων GA733-1 και GA733-2 σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.....	103
10.3.	Η έκφραση του CEACAM5 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.....	108
10.3.1.	Ποσοτική μέτρηση του καρκινο-εμβρυικού αντιγόνου στο περιφερικό αίμα.....	114
10.4.	Η έκφραση της Ang-1 και Ang-2 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.....	114
10.4.1.	Η έκφραση της Ang-1 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.	117
10.4.2.	Η έκφραση της Ang-2 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.	120
10.4.3.	Η έκφραση της Ang-1 σε σχέση με την Ang-2 σε καρκινικό ιστό.....	123
10.4.4.	Η έκφραση της Ang-1 σε σχέση με την Ang-2 σε μη καρκινικό ιστό..	126
Κεφάλαιο 11	Συζήτηση.....	128
11.1.	Εισαγωγή.....	129

11.2.	Τα γονίδια GA733-1 και GA733-2.....	133
11.3.	Το γονίδιο CEACAM5.....	136
11.4.	Τα γονίδια Ang-1 και Ang-2.....	137
	Σύνοψη διατριβής.....	141
	Περίληψη.....	142
	Summary.....	144
	Βιβλιογραφία.....	146

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

Καρκίνος του παχέος εντέρου.

1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο κολο-ορθικός καρκίνος αποτελεί τον τέταρτο πιο συχνό τύπο καρκίνου τόσο στον αντρικό όσο και στο γυναικείο πληθυσμό και τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις ΗΠΑ.³ Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία υπολογίζει ότι το 2013 υπήρξαν περίπου 96.830 νέα περιστατικά καρκίνου του παχέος εντέρου και περίπου 40.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του ορθού. Την ίδια χρονιά 50.310 άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από κολο-ορθικό καρκίνο στις ΗΠΑ.⁴ Παρόλο που ο αριθμός των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο, που προαναφέραμε είναι μεγάλος, παρατηρήθηκε μια πρωτοφανή μείωση της επίπτωσης της νόσου από 60,5 νέα περιστατικά ανα 100.000 πληθυσμό το 1976 σε 46,4 το 2005. Το 2010 η συχνότητα εμφάνισης είχε προσεγγίσει το 3,3% ανά χρόνο για τους άντρες και το 3,0% για τις γυναίκες.⁵ Την ίδια χρονική περίοδο η επίπτωση ήταν 40,4 ανά 100.000 άτομα.⁶ Η θνητότητα δε, από τον κολο-ορθικό καρκίνο μειώθηκε σε εντυπωσιακό βαθμό και δη σε ποσοστό 37% μεταξύ του 1990 και του 2007 και σε ποσοστό 46,5% το 2010.⁷ Αυτή η πρόοδος, που επήλθε στη μείωση της θνητότητας της νόσου, είναι απόρροια της προόδου στην πρόληψη και στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου μέσω των προληπτικών ελέγχων και της βελτίωσης των θεραπευτικών μέσων που διαθέτουν οι γιατροί με το πέρασμα των ετών. Οι προληπτικοί έλεγχοι είναι δυνατόν να προλάβουν τον κολο-ορθικό καρκίνο, διότι οι περισσότεροι έχουν ως πρώτο στάδιο ανάπτυξης τους αδενωματώδεις πολύποδες, που αποτελούν καλοήθεις οντότητες.⁸

1.2 Παράγοντες κινδύνου

Αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου εμφανίζουν ασθενείς με οικογενή σύνδρομα, συγγενείς πρώτου βαθμού με πρωτοεμφανιζόμενο κολο-ορθικό αδένωμα ή κολο-ορθικό καρκίνο.^{9,10,11} Αυτές οι ομάδες ανθρώπων αποτελούν το 20% των περιπτώσεων με κολο-ορθικό καρκίνο. Γενετική συσχέτιση με τον κολο-ορθικό καρκίνο παρουσιάζουν τα καλώς ορισμένα σύνδρομα, όπως είναι ο κληρονομικός μη πολυποσικός καρκίνος παχέος εντέρου (Lynch syndrome)¹² και το

σύνδρομο οικογενούς πολυποδίασης¹³. Επιπρόσθετα, άτομα τα οποία πάσχουν από φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, όπως ελκώδους κολίτιδας και Νόσο του Crohn, έχει τεκμηριωθεί ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου.¹⁴

Ένα αντικείμενο μεγάλης ερευνητικής προσπάθειας αποτελεί η επίδραση των διατροφικών συνηθειών ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη κολο-ορθικού καρκίνου. Η πρώτη σημαντική αναφορά ήταν μια βιβλιογραφική ανασκόπηση από την Εθνική Ακαδημία Επιστημών των ΗΠΑ το 1982, που υποστήριξε ότι η διατροφή διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στον ανθρώπινο καρκίνο και περιέλαβε μια σειρά συστάσεων που υπαγόρευε τη μείωση του λίπους στη διατροφή.^{15,16} Ακολούθησαν πολλές διαφορετικές ερευνητικές προσπάθειες, παρόλα αυτά η πρόοδος ήταν περισσότερο αργή από όσο αναμενόταν.¹⁷ Για παράδειγμα, διαφορετικές διατροφικές δοκιμές με ποικίλες θρεπτικές τροποποιήσεις (π.χ., αυξήσεις στην ίνα, τα φρούτα, και τα λαχανικά, μείωση λιπαρών, συμπλήρωση με μία ή περισσότερες βιταμίνες ή ανόργανα άλατα) έχουν παρουσιαστεί με περιορισμένα αποτελέσματα στην πρόληψη του κολο-ορθικού καρκίνου.¹⁸ Υπάρχουν μελέτες που προτείνουν την κατανάλωση λαχανικών, φρούτων και γενικά μία διατροφή υψηλή σε ίνες ως προστατευτικό μηχανισμό, ενώ η εισαγωγή στη διατροφή του οινοπνεύματος, του κόκκινου κρέατος (και ο τρόπος που είναι μαγειρεμένα και προετοιμασμένα) αποτελούν πιθανούς παράγοντες κινδύνου, όπως επίσης η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης.^{19,20} Διάφορες μελέτες σε ζώα επιβεβαίωσε, ότι οι αλλαγές στη διατροφή τους μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.^{21,22,23} Ωστόσο, πρόσφατες συστηματικές βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις από δεκαπέντε cohort μελέτες εντόπισαν μόνο συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης μη επεξεργασμένου γάλακτος και ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου στους άντρες.²⁴

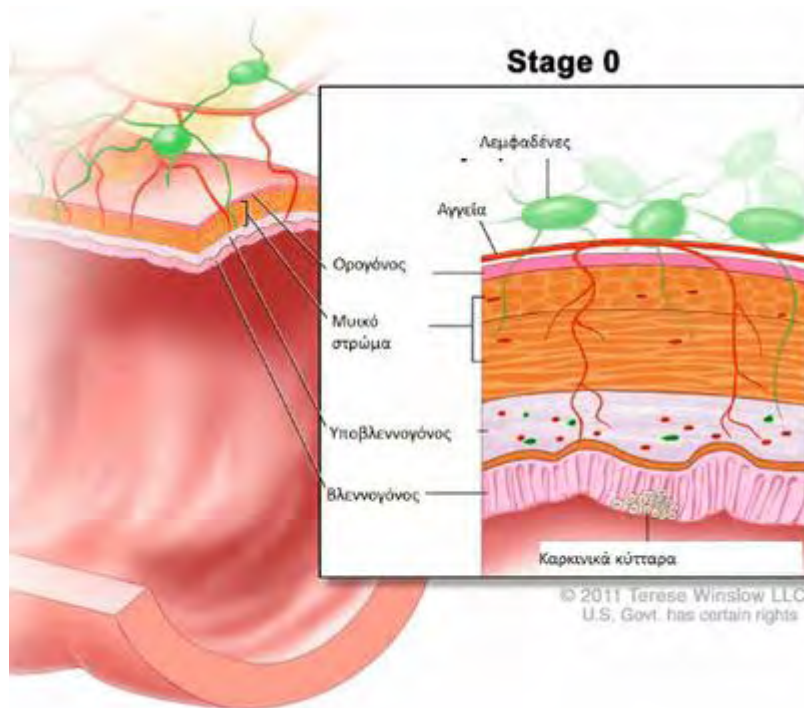
Κάποιες άλλες μελέτες συσχετίζουν τη φτωχή πρόγνωση του κολο-ορθικού καρκίνου με ασθενείς που ήταν είτε καπνιστές είτε παχύσαρκοι και που κατανάλωναν κόκκινο ή και επεξεργασμένο κρέας, αν και οι μελέτες αυτές είναι υπό αμφισβήτηση.²⁵

1.3 Σταδιοποίηση κατά TNM

Το σύστημα σταδιοποίησης, που χρησιμοποιείται ευρέως στον κολο-ορθικό καρκίνο, είναι το TNM (Πίνακας 1.1). Το σύστημα σταδιοποίησης TNM είναι ακρωνύμιο από τα αρχικά των τριών αγγλικών λέξεων Tumor, Node, Metastasis που

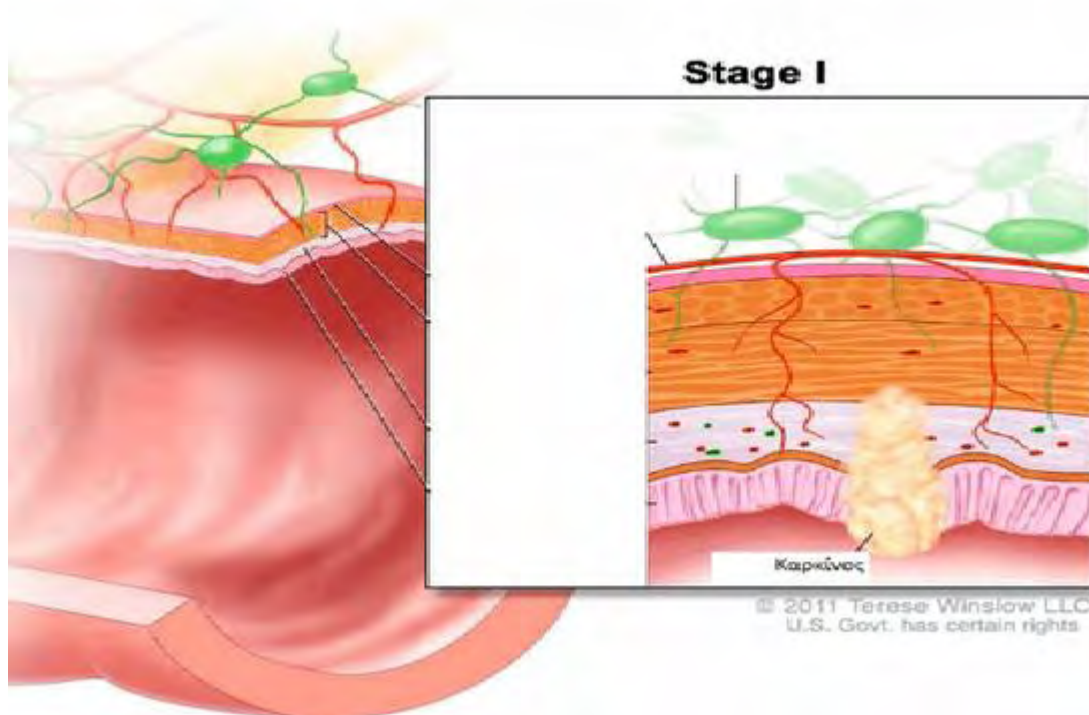
σημαίνουν αντίστοιχα όγκος, λεμφαδένες και μετάσταση. Οι ογκολόγοι συνδυάζοντας τις πληροφορίες σχετικά με την έκταση του όγκου, τους λεμφαδένες και την εξάπλωση του καρκίνου σε άλλα όργανα του σώματος δημιουργούν τα στάδια της νόσου. Το κάθε στάδιο περιλαμβάνει καρκίνους με διαφορετικά χαρακτηριστικά (T, N, M), οι οποίοι όμως έχουν παρόμοιο τρόπο αντιμετώπισης και παρόμοια πρόγνωση (Πίνακας 1.2).²⁶ Τόσο ο καρκίνος του παχέος εντέρου, όσο και του ορθού ακολουθούν το ίδιο σύστημα σταδιοποίησης, γιατί εκφράζει παρόμοια αποτελέσματα στην επιβίωση και για τις δύο οντότητες.²⁷

Στο στάδιο 0 ο καρκίνος είναι πρώιμος. Δεν έχει επεκταθεί πέραν του βλεννογόνου του εντέρου ή του ορθού. Αυτό το στάδιο είναι γνωστό, επίσης, ως καρκίνος *in situ* ή ενδοβλεννογόνιο καρκίνωμα. (Εικόνα 1.1)²⁸



Εικόνα 1.1. Γραφική αναπαράσταση του σταδίου 0 για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.²⁹

Στο στάδιο I έχουμε διήθηση του όγκου από τον υποβλεννογόνιο μέχρι τον μυϊκό δηλαδή είτε T1 είτε T2, αλλά δεν έχει επεκταθεί σε επιχώριους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένες περιοχές. (Εικόνα 1.2)³⁰



Εικόνα 1.2. Γραφική αναπαράσταση του σταδίου I για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.³¹

Το στάδιο II αποτελείται από τρεις υπο-ομάδες. Οι τρεις αυτές υπο-ομάδες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την απουσία επέκτασης της νόσου στους επιχώριους λεμφαδένες (N0) και σε απομακρυσμένες θέσεις (M0). Το στάδιο IIA χαρακτηρίζεται από τη διήθηση του καρκίνου στον ορογόνο χιτώνα (T3). Στο στάδιο IIB ο καρκίνος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο (T4a) και τέλος, στο στάδιο IIC ο καρκίνος διηθεί πέραν του τοιχώματος του εντέρου ή του ορθού, παρακείμενους ιστούς ή όργανα (T4b). (Εικόνα 3)

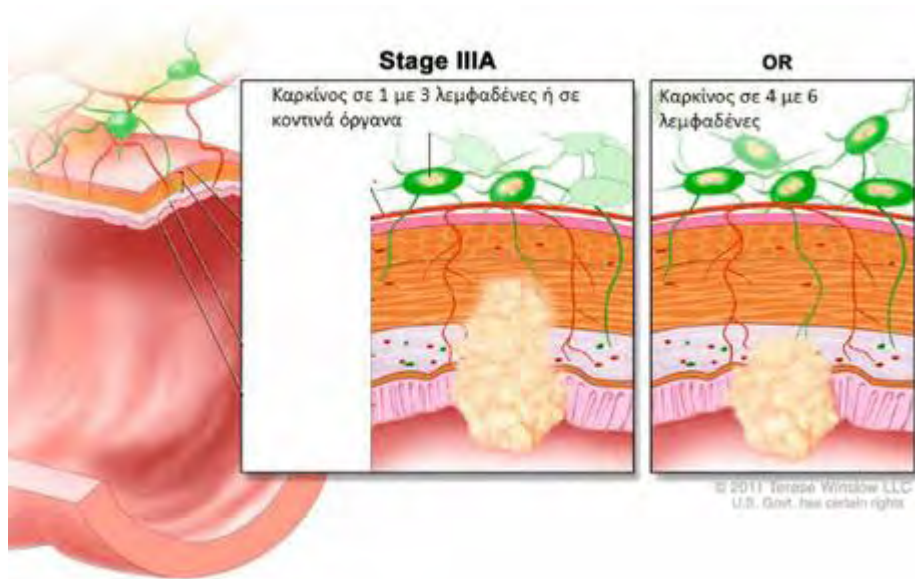
Αυτή η νέα διαίρεση για τα στάδια IIB και IIC, που ακολουθείται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του NCCN v 2.2015, προέκυψε από μία ανάλυση 109.953 ασθενών, που περιλαμβάνονταν στη βάση δεδομένων SEER για ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου μεταξύ του 1992 και 2004.³² Σύμφωνα με αυτή την ανάλυση οι ασθενείς με διήθηση του σπλαχνικού περιτοναίου (T4a) είχαν καλύτερη 5-ετή επιβίωση (79,6%) σε σχέση με αυτούς, που ο όγκος διηθούσε παρακείμενους ιστούς ή όργανα (T4b) (58,7%) (Εικόνα 1.3).³³



Εικόνα 1.3. Γραφική αναπαράσταση του σταδίου II (IIA, IIB, IIC) για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.³⁴

Μία άλλη αναθεώρηση, που εφαρμόστηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες του NCCN 2015 V 2.2015, υπήρξε στον ορισμό της νόσου N1 και N2 προκειμένου να αντανακλά τον προγνωστικό ρόλο του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων. Το στάδιο N1 (μετάσταση σε 1-3 επιχώριους λεμφαδένες) υποδιαιρέθηκε σε στάδιο N1a (μετάσταση σε έναν επιχώριο λεμφαδένα) και N1b (μετάσταση σε 2-3 επιχώριους λεμφαδένες). Ενώ το στάδιο N2 (μετάσταση σε τέσσερις ή περισσότεροι λεμφαδένες) διαιρέθηκε στο N2a (μετάσταση σε 4-6 επιχώριους λεμφαδένες) και N2b (μετάσταση σε επτά ή περισσότερους λεμφαδένες). Αντίθετα, ο όγκος όταν εναποτίθεται στον υποορογόννιο, μεσεντέριο ή σε μη περιτοναϊκό περικολικό ή περιόρθικό ιστό χωρίς επιχώριους λεμφαδένες σταδιοποιήθηκε ως N1c.³⁵

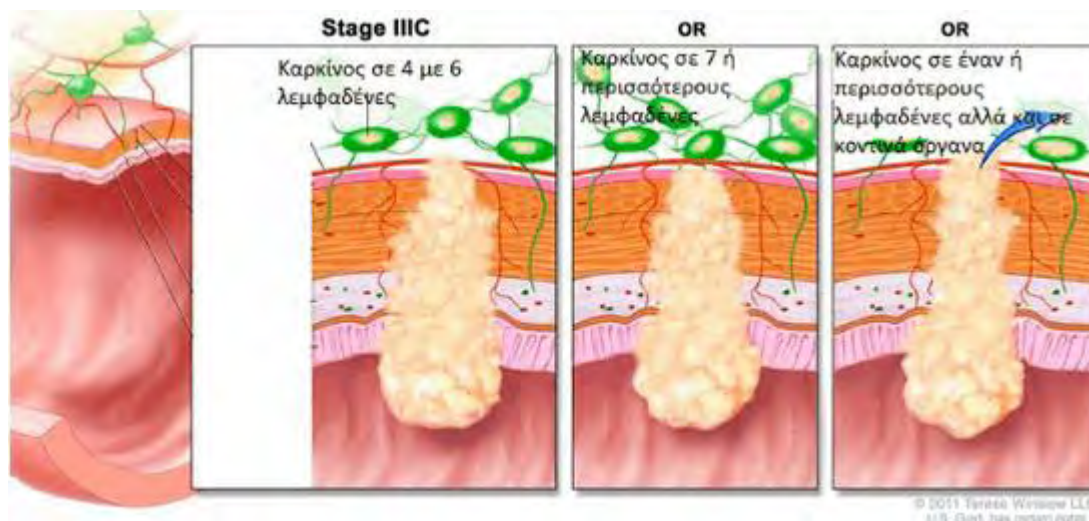
Στο στάδιο IIIA ο καρκίνος έχει επεκταθεί μέσω του βλεννογόνου στον υποβλεννογόνο ή και στο μυϊκό χιτώνα (στάδιο T1 ή T2 αντίστοιχα) και έχει διηθήσει 1-3 επιχώριους λεμφαδένες, αλλά δεν έχει επεκταθεί σε απομακρυσμένες περιοχές. Επιπλέον, στο ίδιο στάδιο ομαδοποιείται η διήθηση του υποβλεννογόνου και 4 έως 6 επιχώριους λεμφαδένες. (Εικόνα 1.4)³⁶



Εικόνα 1.4. Γραφική αναπαράσταση του σταδίου IIIA για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.³⁷

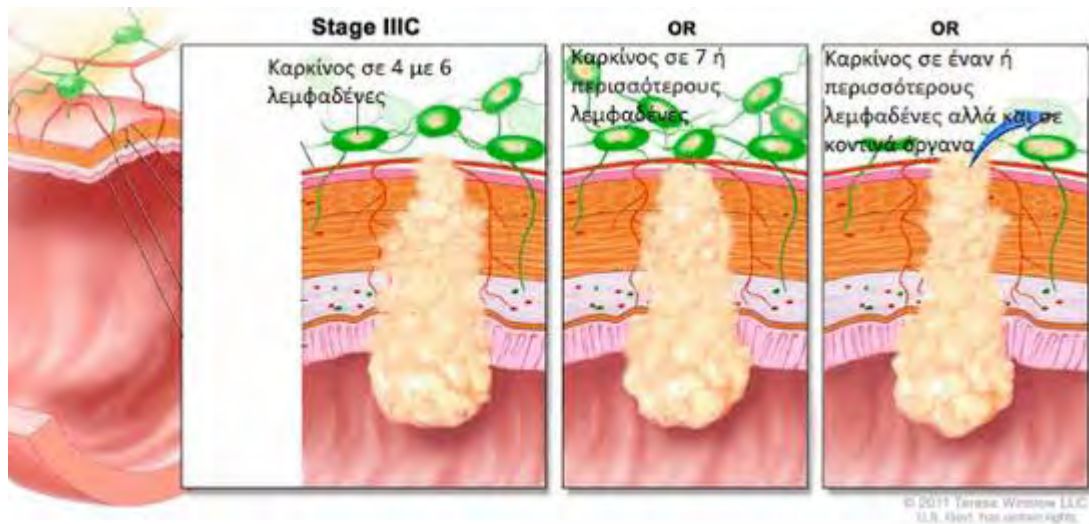
Στο στάδιο IIIB εντάσσεται η νόσος, στην οποία ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί έως τον ορογόνο ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος προς τους περικολικούς ή περιόρθικούς ιστούς ή όταν διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο αλλά όχι σε παρακείμενα όργανα. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τουλάχιστον ένα, αλλά όχι περισσότερους από 3 επιχώριους λεμφαδένες (στάδιο T3 ή T4a αντίστοιχα και N1 και M0). Επιπλέον, όταν ο όγκος διηθεί στο μυϊκό χιτώνα του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή του ορθού ή έως τον ορογόνο του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή όπου δεν υπάρχει ορογόνος προς τους περικολικούς ή περιόρθικούς ιστούς. Ο καρκίνος επιπλέον έχει εξαπλωθεί σε τουλάχιστον 4 λεμφαδένες, αλλά όχι περισσότερους από 6 επιχώριους λεμφαδένες (T2-T3, N2a, M0). Τέλος, περιλαμβάνει τη νόσο στην οποία ο καρκίνος

διηθεί τον βλεννογόνο του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή τον υποβλεννογόνο χιτώνα ή τον μυϊκό χιτώνα του τοιχώματος του παχέος εντέρου ή του ορθού. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε 7 ή περισσότερους κοντινούς λεμφαδένες (στάδιο T1 ή T2 αντίστοιχα, N2b, M0). (Εικόνα 1.5)³⁸



Εικόνα 1.5. Γραφική αναπαράσταση του σταδίου IIIB για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.³⁹

Το στάδιο III C αντιπροσωπεύει τη νόσο, στην οποία ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο του παχέος εντέρου αλλά δεν προσβάλλει παρακείμενα όργανα, και υπάρχουν 4-6 διηθημένοι λεμφαδένες (στάδιο T4a, N2a, M0). Ακόμα, όταν ο όγκος διηθεί έως τον ορογόνο ή όπου δεν υφίσταται προς τους περικολικούς ή περιόρθικούς ιστούς ή όταν διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο χωρίς τη διήθηση σε παρακείμενα όργανα, καθώς επίσης και 7 ή περισσότεροι επιχώριοι λεμφαδένες διηθημένοι (στάδιο T3 ή T4a αντίστοιχα, N2b, M0). Τέλος, στο στάδιο αυτό περιλαμβάνεται η νόσος στην οποία ο καρκίνος διηθεί κατ' επέκταση άλλα όργανα και υπάρχουν 1 ή περισσότεροι λεμφαδένες (T4b, N1-N2, M0). (Εικόνα 1.6)⁴⁰



Εικόνα 1.6. Γραφική αναπαράσταση του σταδίου III C για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.⁴¹

Το στάδιο IV περιλαμβάνει IVa και IVb όπου και οι δύο υπο-ομάδες περιλαμβάνουν κάθε T, κάθε N και διαφοροποιούνται ότι στην πρώτη υπάρχουν μεταστάσεις σε ένα όργανο ή σε μία θέση (π.χ. στο ήπαρ, τον πνεύμονα, τις ωοθήκες και σε μη επιχώριους λεμφαδένες), ενώ στο IVb οι μεταστάσεις είναι σε περισσότερα από ένα όργανα ή θέσεις.⁴²

Πίνακας 1.1. Ορισμός των T, N, M. ⁴³

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 υποβλεννογόνιο 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 υποορογόνιο, μεσεντέριο ή σε μη περιτοναϊκό περικολικό ή περιόρθικό ιστό χωρίς επιχώριους λεμφαδένες.
N2	Μετάσταση σε τέσσερεις 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, ωοθήκες, μη επιχώριους λεμφαδένες).
M1b	Μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανα ή θέσεις.

Πίνακας 1.2. Σταδιοποίηση του καρκίνου/Προγνωστικές ομάδες.⁴⁴

Στάδιο	Tα	N	M	Dukes	MAC
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
IIIC	T1-T2	N2b	M0	C	C1
	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
IVB	T4b	N1-N2	M0	C	C3
	Any T	Any N	M1a	-	-
IVB	Any T	Any N	M1b	-	-

1.4 Παθολογο-ανατομία.

Η σταδιοποίηση για τον κολο-ορθικό καρκίνο γίνεται μετά τη χειρουργική εκτομή του πάσχοντος τμήματος και την παθολογο-ανατομική εκτίμηση του παρασκευάσματος. Η ιστολογική έκθεση αφορά τη μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση του παρασκευάσματος που θα πρέπει να περιλαμβάνουν, εκτός των άλλων, τον ιστολογικό τύπο του νεοπλάσματος, την διαφοροποίησή του, την πλήρη ή μη εκτομή του όγκου, τα όρια εκτομής, το ιστολογικό στάδιο, τον αριθμό των λεμφαδένων (διηθημένων και μη), την περινευρική⁴⁵ και λεμφαγγειακή διήθηση⁴⁶, την αξιολόγηση της παρουσίας απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλα όργανα, το περιτόναιο ή άλλη ενδοκοιλιακή δομή⁴⁷. Το ακρωνύμιο ‘p’ και ‘yp’ χρησιμοποιούνται στην σταδιοποίηση TNM για να περιγράψουν το ‘παθολογο-

ανατομικό στάδιο' και το 'παθολογο-ανατομικό στάδιο μετά από νέο-επικουρική θεραπεία' αντίστοιχα.⁴⁸

1.4.1 Μακροσκοπική εξέταση.

Η μακροσκοπική εξέταση του παρασκευάσματος αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα της ορθής ιστολογικής διαγνωστικής προσέγγισης. Αρχικό στάδιο της μακροσκοπικής εξέτασης, που κρίνεται σημαντικό, είναι η φωτογράφιση του παρασκευάσματος προκειμένου να είναι δυνατόν η αρχειοθέτησή του.⁴⁹ Επιπρόσθετα η μακροσκοπική περιγραφή περιλαμβάνει στο νωπό παρασκεύασμα: το μήκος του εντέρου και την περιγραφή της ορθο-πρωκτικής συμβολής αν συμπεριλαμβάνεται, τις διαστάσεις του όγκου, την απόσταση του όγκου από το εγγύς όριο, και την παρουσία ή μη διατρήσεως, αναφορά της απόστασης του όγκου από την οδοντωτή γραμμή, αναφορά του όγκου ως προς την πρόσφυση του περιτοναίου, αναφορά στην όψη, σύσταση και χρώμα του όγκου και την παρουσία ή μη νεκρώσεων, τη μακροσκοπική επέκταση του όγκου δια του τοιχώματος, την πληρότητα και ακεραιότητα του συνοδού μεσόκολου.⁵⁰

Όσον αφορά την περίπτωση του καρκίνου του ορθού πρέπει να γίνεται μακροσκοπική περιγραφή της πληρότητας και ακεραιότητας του μεσο-ορθού (λεία, ομαλή, χωρίς ελλείματα ή ελλείματα που δεν υπερβαίνουν τα 5mm). Η εκτομή χαρακτηρίζεται πλήρης, μέτρια και ατελής. Πλήρης χαρακτηρίζεται όταν το μεσο-ορθό είναι ακέραιο όπως έχει περιγραφεί. Μέτρια χαρακτηρίζεται η εκτομή του μεσο-ορθού είτε όταν αναγνωρίζεται η κύρια μάζα του αλλά η επιφάνεια του μεσο-ορθού είναι ανώμαλη είτε όταν το μεσο-ορθό έχει τη μορφή κώνου με την κορυφή του προς το άπω χειρουργικό όριο, χωρίς να το υπερβαίνει. Ατελής χαρακτηρίζεται όταν υπάρχουν μεγάλα ελλείματα με αποτέλεσμα μεγάλα ανώμαλα περιμετρικά όρια εκτομής ή περιοχές με ορατό το μυϊκό τοίχωμα.⁵¹

1.4.2 Μικροσκοπική εξέταση.

Η μικροσκοπική περιγραφή περιλαμβάνει τον ιστολογικό τύπο, ο οποίος σχετίζεται με την πρόγνωση. Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου διακρίνονται ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο σε κλασικό αδενοκαρκίνωμα, βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα (ποσοστό βλεννώδους στοιχείου >50% του συνόλου του όγκου),

καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring >50%), αδеноπλακώδες, μυελοειδές και αδιαφοροποίητο μικροκυτταρικό καρκίνωμα.⁵²

Επιπλέον, η μικροσκοπική περιγραφή πρέπει να περιλαμβάνει τον βαθμό διαφοροποίησης του αδενοκαρκινώματος, η οποία ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες: βαθμού 1 (χαμηλής κακοήθειας-υψηλής διαφοροποίησης), βαθμού 2 (ενδιάμεσης κακοήθειας-μέτριας διαφοροποίησης) και βαθμού 3 (υψηλής κακοήθειας-χαμηλής διαφοροποίησης). Κατά το ευρωπαϊκό πρωτόκολλο, 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 κακοήθειας – 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. Είναι γνωστό ότι ο βαθμός διαφοροποίησης σχετίζεται με την πρόγνωση και την πενταετή επιβίωση που στην περίπτωση της καλής διαφοροποίησης είναι 80%, της μέσης είναι 60% και της χαμηλής διαφοροποίησης είναι 25%.⁵³

Τέλος, η επέκταση του όγκου πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής χαρακτηριστικά: α) την κατά ιστό συνέχεια σε pT1-4, β) την επινέμηση των επιχώριων και απομακρυσμένων λεμφαδένων, γ) τη διήθηση των πλάγιων χειρουργικών ορίων, δ) την απόσταση από το περιμετρικό όριο, ε) τη διήθηση εξωτοιχωματικών αγγείων και στ) την παρουσία περινευρικής διήθησης.⁵⁴

1.5 Μεταστατική νόσος του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Οι ασθενείς, που νοσούν από καρκίνο του παχέος εντέρου, αναπτύσσουν σε ένα ποσοστό 50-60% μεταστάσεις,⁵⁵ από τους οποίους ένα ποσοστό κοντά στο 80% αναπτύσσουν ανεγχείρητη μεταστατική νόσο ήπατος.⁵⁶ Η μετάχρονη μεταστατική νόσος είναι συχνότερη στους ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο και αναπτύσσεται συνήθως μετά την αντιμετώπιση της τοπικής νόσου και η μεταστατική νόσος του

ήπατος αποτελεί την πιο συχνή θέση μετάστασης του κολο-ορθικό καρκίνου.⁵⁷ Σε ποσοστό 20-34% των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο παρουσιάζουν σύγχρονες μεταστάσεις ήπατος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία σύγχρονων ηπατικών μεταστάσεων σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο παρουσιάζουν δυσμενέστερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς που παρουσιάζουν μετάχρονες μεταστάσεις.⁵⁸

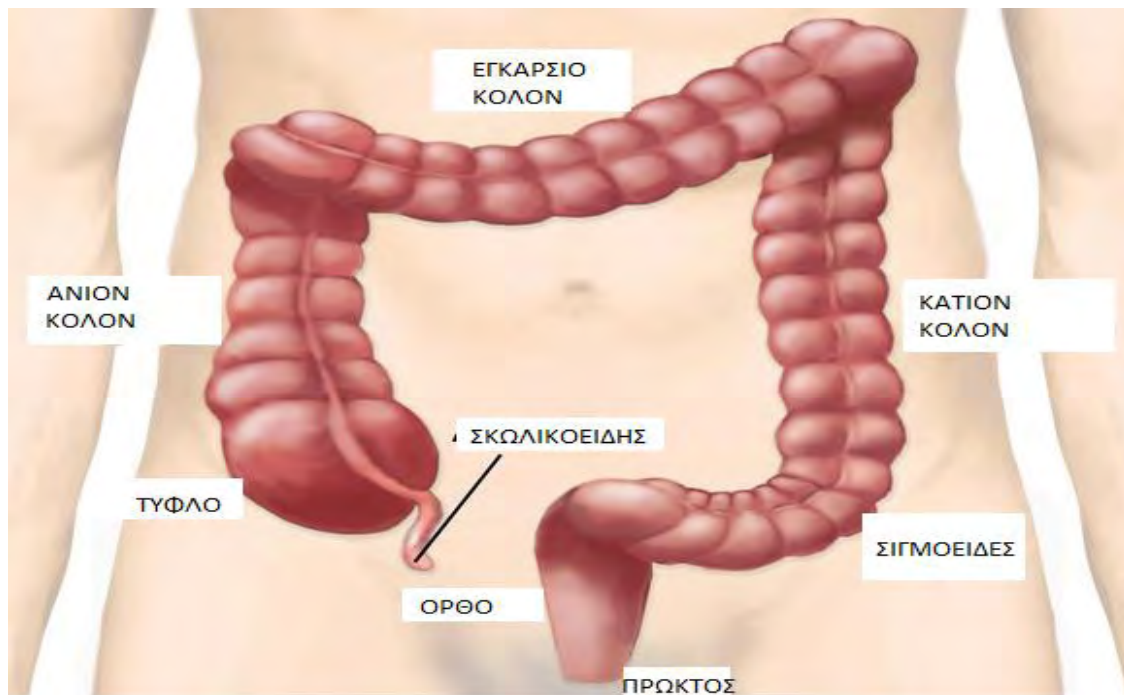
Έχει υπολογιστεί ότι πάνω από τους μισούς ασθενείς, οι οποίοι κατέληξαν λόγω του κολο-ορθικού καρκίνου, είχαν ηπατικές μεταστάσεις, και στις περισσότερες περιπτώσεις ως αιτία θανάτου αυτών των ασθενών αποτελούσαν οι μεταστάσεις αυτές.⁵⁹ Σε μία ανασκόπηση της βιβλιογραφίας από αυτοψίες ασθενών, που νοσούσαν και πέθαναν λόγω κολο-ορθικό καρκίνου, το ένα τρίτο των ασθενών είχαν ως μόνη εστία μεταστάσεων το ήπαρ. Παράλληλα, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις που δεν είναι δυνατόν να υποβληθούν σε χειρουργική παρέμβαση έχουν χαμηλό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης.⁶⁰ Διάφοροι κλινικοπαθολογικοί παράγοντες σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς που πάσχουν από κολο-ορθικό καρκίνο και έχουν ηπατικές μεταστάσεις, όπως είναι η ύπαρξη εξωηπατικών μεταστάσεων, η παρουσία περισσότερων από τριών ηπατικών μεταστάσεων και ο χρόνος ελεύθερου νόσου να είναι μικρότερος των δώδεκα μηνών.⁶¹

Η μέση επιβίωση των ασθενών με ηπατικές μεταστάσεις κειμένεται μεταξύ 3 και 21 μήνες με μηδενική πενταετή επιβίωση για όσους ασθενείς δεν είναι δυνατή η χειρουργική αντιμετώπιση της νόσου, η οποία έχει δυνητικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Τα νεότερα χημειο-θεραπευτικά σχήματα και οι στοχευμένες θεραπείες έχουν αυξήσει εντυπωσιακά τα τελευταία χρόνια τη μέση επιβίωση με την πενταετή επιβίωση να παραμένει στο μηδέν χωρίς τη χειρουργική παρέμβαση.⁶²

Κεφάλαιο 2. Χειρουργική ανατομία του παχέος εντέρου.

2.1 Τοπογραφική ανατομία του παχέος εντέρου.

Το παχύ έντερο αποτελεί την ανατομική δομή που εκτείνεται από την ειλεοτυφλική βαλβίδα έως τον πρωκτό, και αποτελείται από το κόλον (τυφλό, ανιόν, εγκάρσιο, κατίον και σιγμοειδές) και ορθό και ο πρωκτικός σωλήνας. Τα πρώτα 6cm υπό την ειλεοτυφλική βαλβίδα αποτελεί το τυφλό, το ανιόν και ηπατική καμπή αποτελούν μία ξεχωριστή χειρουργική μονάδα, το δεξιό κόλον. Το άνω εγκάρσιο κόλον, η σπληνική καμπή, το κατίον κόλον απαρτίζουν το αριστερό κόλον. (Εικόνα 2.1)



Εικόνα 2.1. Ανατομικά στοιχεία παχέος εντέρου.

2.2 Αγγείωση παχέος εντέρου.

Το παχύ έντερο αρδεύεται από την άνω και κάτω μεσεντέριο αρτηρία. Η άνω μεσεντέριος αρτηρία με τους δύο κλάδους της την ειλεοκολική και τη δεξιά κολική αιματώνουν το τυφλό και το ανιόν κόλον, ενώ με τον κλάδο της μέσης κολικής αγγειώνεται το εγκάρσιο κόλον και σε ένα ποσοστό 37% τροφοδοτείται και η σπληνική καμπή, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό τροφοδεύεται από την αριστερή κολική αρτηρία που είναι κλάδος της κάτω μεσεντερίου. Οι αρτηρίες αυτές κατά την πορεία τους σχηματίζουν τόξα, από τα οποία εκφύονται ευθεία αγγεία, που πορεύονται στο έσω χείλος του τοιχώματος του κόλου. Στην επιφάνεια του κόλου τα αγγεία αυτά διαχωρίζονται σε βραχείς και μακρούς κλάδους. Οι βραχείς κλάδοι τροφοδοτούν το μεσεντερικό τμήμα του κόλου και τα 2/3 της περιφέρειας και οι μακροί το αντιμεσεντερικό τμήμα του κόλου.⁶³

Η κάτω μεσεντέριος αρτηρία, η οποία εκφύεται από την αορτή στο ύψος του Ο3 και πλησίον του κατώτερου χείλους της τρίτης μοίρας του δωδεκαδακτύλου, αρδεύει το κατιόν κόλον με την αριστερή κολική αρτηρία, το σιγμοειδές κόλον με 1-9 σιγμοειδικές αρτηρίες και το ορθό με την άνω ορθική-αιμορροϊδική αρτηρία. Η αριστερή κολική ενώνεται με την επιχείλιο αρτηρία πλησίον της σπληνικής καμπής σε ένα ποσοστό 14% είτε εκτείνεται μέχρι την σπληνική σε ποσοστό 86%.⁶⁴ Επικουρική μέση κολική αρτηρία παρατηρείται σε ένα ποσοστό 38%. Πρωτεύον ρόλο στην αγγείωση του κόλου, σε ποσοστό 96%, έχει ο ανιόν κλάδος της αριστερής κολικής καμπής.⁶⁵

Ένα άλλο αγγείο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμάτωση του κόλου είναι η επιχείλιος αρτηρία (του Drummond). Αυτή σχηματίζεται από αναστομωτικά τόξα μεταξύ των κλάδων της ειλεοκολικής, της δεξιάς, μέσης και της αριστερής κολικής και των σιγμοειδικών και καταλήγει περιφερικά στην άνω ορθική αρτηρία. Η επιχείλιος πορεύεται παράλληλα με το μεσεντερικό χείλος του κόλου σε μια απόσταση που κειμένεται από 1-8cm. Η αγγειακή παροχή του αγγείου αυτού είναι επαρκής για την αιμάτωση του κόλου αν και οι διάφορες ανατομικές παραλλαγές πιθανόν να επιδρούν στο ρόλο της.⁶⁶

Η φλεβική παροχέτευση του παχέος εντέρου ακολουθεί την αρτηριακή παροχή. Οι φλέβες που εκφύονται από το τυφλό, το ανιόν και το δεξιό κόλον συμβάλλουν και σχηματίζουν την άνω μεσεντέριο φλέβα. Οι φλέβες της ηπατικής καμπής και του δεξιού εγκαρσίου κόλου αποχετεύουν προς την γαστροεπιπλοϊκή ή την πρόσθια άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική φλέβα. Σε ένα υψηλό ποσοστό (70%) απαντάται η γαστροκολική φλέβα που είναι μία βραχεία φλέβα και έρπει στην πρόσθια επιφάνεια

του παγκρέατος, κάτω από τη ρίζα του εγκαρσίου μεσόκολου.⁶⁷ Προς την άνω μεσεντέριο φλέβα παροχετεύει το αριστερό τμήμα του εγκαρσίου. Η κάτω μεσεντέριος φλέβα σχηματίζεται από την άνω ορθική που παροχετεύει το κατιόν κόλον και το σιγμοειδές. Το ορθό μέσω των άνω ορθικών φλεβών αποχετεύεται και μέσω της κάτω μεσεντερίου φλέβας εκβάλλουν στην πυλαία φλέβα. Το ορθό, επίσης, παροχετεύεται με τις μέσες και κάτω ορθικές που εκβάλλουν στην έσω λαγόνιο και μέσω αυτής στη συστηματική κυκλοφορία. Η κάτω ορθική είναι υπεύθυνη και για την παροχέτευση των κεντρικών 2cm του πρωκτού.⁶⁸

Το δίκτυο λεμφαδένων του παχέος εντέρου διακρίνεται ως εξής: α) στους επιπλοϊκούς, οι οποίοι είναι υπό τον ορογόνο του τοιχώματος του παχέος εντέρου, β) στους παρακολικούς, οι οποίοι είναι επί της επιχείλιου αρτηρίας, γ) στους ενδιάμεσους, οι οποίοι είναι επί των μεγάλων αγγείων και δ) στους κύριους, που τοπογραφικά ανευρίσκονται στη ρίζα των μεσεντερίων αγγείων.⁶⁹

2.3 Είδη χειρουργικών επεμβάσεων.

Οι ασθενείς που πάσχουν από νεοπλάσματα του παχέος εντέρου, εφόσον είναι δυνατόν να χειρουργηθούν και χωρίς την παρουσία σύγχρονων μεταστάσεων, οδηγούνται στην εκτομή του πάσχοντος τμήματος με ογκολογικά επαρκή όρια και συνοδά της αλύσου των λεμφαδένων μέσω των οποίων παροχετεύεται η λέμφος από την πάσχουσα περιοχή. Στη συνέχεια ακολουθεί η αποκατάσταση του πεπτικού με επάρκεια στην αιμάτωση και χωρίς τάση.⁷⁰ Με εξαίρεση των περιορισμένης έκτασης εκτομών που γίνεται σε επιλεγμένους ασθενείς και στερούνται ογκολογικής επάρκειας, η έκταση της εκτομής καθορίζεται από τη θέση του όγκου, προκειμένου να συμπεριληφθεί το τμήμα του παχέος εντέρου που πάσχει με τον αγγειακό μίσχο και το σύνολο, αν είναι δυνατόν, των λεμφαδένων. Οι λεμφαδένες που είναι ύποπτοι για μεταστάσεις, πρέπει, αν είναι δυνατόν, να εκτέμνονται. Οι βασικές χειρουργικές επεμβάσεις περιλαμβάνουν τη δεξιά (ημι)κολεκτομή, την εγκαρσιεκτομή, την αριστερή (ημι)κολεκτομή, τη σιγμοειδεκτομή, την εκτεταμένη δεξιά κολεκτομή, την υφολική κολεκτομή, τη χαμηλή πρόσθια εκτομή, την υψηλή πρόσθια εκτομή του ορθού, την ολική κολεκτομή, καθώς και την κοιλιοπερινεϊκή εκτομή του ορθού.⁷¹

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί στη χειρουργική του παχέος εντέρου η εφαρμογή της πλήρους εκτομής του μεσοκόλου (complete mesocolic excision-CME) ως πληρέστερη ογκολογικά επέμβαση, κατ' αντιστοιχία με την ολική εκτομή του

μεσο-ορθού (total mesorectal excision-TME).⁷² Η συγκεκριμένη τεχνική αποσκοπεί στην αποκόλληση από τους οπισθοπεριτοναϊκούς ιστούς του μεσοκολικού λίπους προκειμένου να γίνει απολίνωση των τροφοφόρων αγγείων εγγύς στην έκφυσή τους. Ένας σημαντικός στόχος αποτελεί η διατήρηση της ακεραιότητας των περιτονιών.⁷³

Ουσιώδη εφόδια για την ογκολογικώς ορθή διενέργεια μίας κολεκτομής για καρκίνο είναι ανατομικά στοιχεία που αφορούν στη δομή του μεσοκόλου και των περιτονιών που το περιβάλλουν. Ειδικότερα το μεσόκολο αποτελεί μία ανατομική δομή, η οποία εκτείνεται από την ειλεοτυφλική βαλβίδα έως και την ορθοσιγμοειδική συμβολή. Στα δύο άκρα του υπάρχει συνέχεια με τις ιστικές δομές του μεσεντερίου. Στην περιοχή από την ηπατική έως και τη σπληνική καμπή υπάρχει συνάφεια με το επίπλου χωρίς όμως να υπάρχει αγγειακή συσχέτιση των δύο δομών.⁷⁴ Το μεσόκολο καλύπτεται από σπλαχνική περιτονία (περιτονία του Toldt) σε όλη την έκτασή του που αποτελεί τη συνέχεια της σπλαχνικής περιτονίας του ορθού που το διαχωρίζει από την τοιχωματική περιτονία. Η μεσο-ορθική περιτονία στο ύψος της ορθοσιγμοειδικής καμπής διαχωρίζεται σε δύο τμήματα. Το αριστερό του τμήμα που φέρεται υπό το μεσόκολο του αριστερού κόλου έως το ύψος της ουράς του παγκρέατος και της πύλης του σπλήνα, ενώ το δεξιό του τμήμα φέρεται υπό το τυφλό και ανιόν κόλο, τερματίζοντας την πορεία του στην περιοχή της άνω μεσεντερίου αρτηρίας.⁷⁵

Η βασική ιδέα της ολικής εκτομής του μεσο-ορθού περιλαμβάνει την αμβλεία αποκόλληση της άθικτης σπλαχνικής περιτονίας του μεσοκόλου από το τοιχωματικό πέταλο του περιτοναίου, με σκοπό το μεσόκολο να κινητοποιηθεί ως μία δομή, επιτρέποντας την πρόσβαση στη ρίζα των μεγάλων αγγείων. Στην περίπτωση καρκίνου στο δεξιό κόλο έχει σημασία η κινητοποίηση του δωδεκαδακτύλου και της κεφαλής του παγκρέατος με χειρισμό Kocher, προκειμένου να υπάρξει πρόσβαση στην έκφυση της άνω μεσεντερίου αρτηρίας και φλέβας. Η ολική εκτομή του μεσοκόλου έχει αλλάξει τη φυσική ιστορία του καρκίνου του παχέος εντέρου με την αύξηση της πενταετούς επιβίωσης.⁷⁶

Κεφάλαιο 3

Καρκινογένεση.

3.1. Γενικά για τον καρκίνο.

Η νοσολογική οντότητα του καρκίνου είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια. Εντούτοις, τις τελευταίες δεκαετίες έχει επέλθει μία ραγδαία πρόοδος στη διάγνωση, στην πρόγνωση και θεραπεία αυτής της νόσου. Ο καρκίνος αποτελεί μία νόσο των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού τα κύτταρα του εκτίθενται σε πολλούς παράγοντες, που μπορούν να προκαλέσουν μετάλλαξη στο γενετικό του υλικό (DNA). Υπό φυσιολογικές συνθήκες όμως τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς μέσω των οποίων μπορούν είτε να διορθώσουν, είτε να αποτρέψουν αυτές τις μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, δεν είναι πάντα εφικτό να αποτραπούν οι μεταλλάξεις. Όταν συσσωρεύεται μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων το κύτταρο χάνει την φυσιολογική του λειτουργία και μεταπίπτει σε καρκινικό. Στον δυτικό κόσμο είναι ένα συχνό νόσημα, όπου ένας στους τρεις ανθρώπους θα νοσήσουν και ένας στους πέντε θα καταλήξει λόγω της νόσου.¹⁰⁸

Ο τύπος των κυττάρων που προσβάλλεται καθορίζει και τον τύπο του καρκίνου. Παράδειγμα αποτελεί η προσβολή επιθηλιακών κυττάρων, που σχετίζονται με καρκινώματα, των μεσεγχυματικών κυττάρων με σαρκώματα, των αιμοποιητικών κυττάρων με τη λευχαιμία και τα λεμφώματα. Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου καθορίζεται και η συμπτωματολογία, η αιτιολογία της νόσου και η πρόγνωσή του. Σε όλες όμως τις μορφές καρκίνου υπάρχουν κοινά γνωρίσματα, που είναι αναγκαία για την εξέλιξη της νόσου. Ειδικότερα, υπάρχει ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση, η επαγωγή της απόπτωσης, η διήθηση και η μετάσταση.¹⁰⁹

3.2 Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια εντοπίστηκαν αρχικά σε κάποιους ιούς, λόγω της ικανότητας που είχαν να τροποποιούν τη λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων και να τα μετατρέπουν σε καρκινικά.¹¹⁰ Τα αντίστοιχα γονίδια στον ανθρώπινο οργανισμό ονομάζονται πρωτοογκογονίδια. Τα πρωτοογκογονίδια είναι ομόλογα φυσιολογικών

κυτταρικών γονιδίων και λαμβάνουν μέρος σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης (κυτταρικός πολλαπλασιασμός), την κυτταρική εξειδίκευση (διαφοροποίηση) καθώς και τον κυτταρικό θάνατο.¹¹¹ Μία μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά τα γονίδια οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα πρωτοογκογονίδια, ανάλογα με τη φυσιολογική τους λειτουργία, μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες: (1) Παράγοντες πολλαπλασιασμού (growth factors) (2) Υποδοχείς παραγόντων πολλαπλασιασμού (growth factor receptors) (3) Μεταγωγείς σήματος (signal transducers) (4) Μεταγραφικούς παράγοντες (transcription factors) (5) Παράγοντες που επάγουν κυτταρικό θάνατο. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 100 πρωτοογκογονίδια και στον σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου συγκαταλέγονται τα *ras*, *c-myc* και *c-erbB-2*.¹¹²

Όπως έχουμε αναφέρει η μετάλλαξη στα πρωτοογκογονίδια μπορεί να οδηγήσει σε μία παθολογική λειτουργία τους, καθιστώντας τα γονίδια αυτά συνέχεια ενεργά σε σχέση με το φυσιολογικό γονίδιο, (wild-type), γεγονός που επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα στάδια καρκινογένεσης, αγγειογένεσης και μετάστασης. Τα ογκογονίδια αυτά συμπεριφέρονται ως επικρατή (dominant), δηλαδή αρκεί η ενεργοποίηση του ενός αλληλομόρφου για την επαγωγή της καρκινογένεσης. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων είναι δυνατόν να προκύψει με διάφορους τρόπους, με συνηθέστερους τη χρωμοσωμική μετατόπιση.¹¹³ Για παράδειγμα, η συνηθέστερη σωματική μετάλλαξη, που προκαλεί ενεργοποίηση του γονιδίου BRAF στον καρκίνο στον άνθρωπο, αποτελεί η αμινοξική αλλαγή βαλίνης από γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο 599 του γονιδίου BRAF. Η μετάλλαξη αυτή ενεργοποιεί την πρωτεΐνη BRAF ανεξάρτητα από το σήμα ενεργοποίησης, που κανονικά φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 598 και τη σερίνη 601.¹¹⁴

Τα πλέον σημαντικά πρωτοογκογονίδια είναι τα *ras*, που υφίστανται με την μορφή τριών μοριακών παραλλαγών το N-RAS, K-RAS και H-RAS. Πρόκειται για γονίδια που κωδικοποιούν μια οικογένεια πρωτεϊνών ομολόγων των G-πρωτεϊνών, που ρυθμίζουν τη μετάδοση εξωκυττάρων μηνυμάτων στον πυρήνα. Το συχνότερα μεταλλασσόμενο γονίδιο είναι το K-RAS και σε πειραματικές μελέτες σε ποντίκια έδειξε ότι η αφαίρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου *ras* σε καρκινικές σειρές σχετίζεται με αναστολή της ικανότητάς τους να αναπτύσσουν όγκους.¹¹⁵

3.3 Ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ασκούν δράση αντίθετη από τα ογκογονίδια. Αναλυτικότερα, τα γονίδια αυτά ασκούν υπό φυσιολογικές συνθήκες ανασταλτική δράση στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η αδρανοποίηση των ιολογικών τους δράσεων σε νεοπλάσματα του παχέος εντέρου, όπως οι ατελείς μεταθέσεις, η μεθυλίωση των γονιδιακών εκκινητών, η απώλεια ετεροζυγωτίας λόγω μεταλλάξεων προάγουν την καρκινογένεση.¹¹⁶

Η πρώτη μοριακή απόδειξη, που συσχέτισε τα ογκοκατασταλτικά γονίδια με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, προέκυψε από την μελέτη της απώλειας αλληλομόρφων. Όταν έγινε σύγκριση των αλληλομόρφων των γονιδίων των όγκων με αυτά από φυσιολογικούς ιστούς, εντοπίστηκαν ελλείψεις με την μορφή της απώλειας ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity-LOH). Σε μελέτες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου παρατηρήθηκε LOH στα χρωμοσώματα 5q, 8p, 17p και 18q. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που εντοπίστηκαν στα χρωμοσώματα αυτά ήταν το APC στο χρωμόσωμα 5q, το γονίδιο p53 στο χρωμόσωμα 17q και τα γονίδια DCC, SMAD4 και SMAD2 στο χρωμόσωμα 18q.¹¹⁷

Το γονίδιο APC είναι από τα πλέον σχετιζόμενα ογκοκατασταλτικά γονίδια με την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου εμφανίζονται στο 80% των σποραδικών περιπτώσεων και μία μοναδική γαμετική μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του συνδρόμου της οικογενούς αδενωματοδούς πολυποδιάσεως. Ο ρόλος του πρωτεϊνικού προϊόντος του APC είναι ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες παρεμποδίζει την συγκέντρωση κυτταροπλασματικής και πυρηνικής β-καρνίνης μεσολαβώντας στην φωσφορυλίωση της και την επερχόμενη αποδόμησή της. Απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας του προαναφερόμενου γονιδίου οδηγεί σε συγκέντρωση της β-καρνίνης, η οποία με την σειρά της προάγει την μεταγραφή.¹¹⁸

Αλλαγές στο γονίδιο p53, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q, απαντάται στο 75% περίπου των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο. Το φυσιολογικό γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, που δεσμεύει το DNA, δρώντας ως μεταγραφικός ενεργοποιητής των ανασταλτικών γονιδίων της αύξησης. Η απενεργοποίηση του γονιδίου είναι ένα καθυστερημένο γεγονός κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου αν και είναι πιθανό μερικές φορές να αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός. Η παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου p53 σχετίζεται με την πρόγνωση και

την θεραπεία. Ειδικότερα, ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς που δεν παρουσιάζουν την παραπάνω μετάλλαξη.¹¹⁹

Τέλος, το γονίδιο DCC (Delete in colon cancer) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q21 είναι ένα ακόμα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ο ρόλος του οποίου δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. Η έκφραση του γονιδίου αυτού σχετίζεται επίσης με την πρόγνωση της νόσου. Η απώλεια της έκφρασης του γονιδίου σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς σταδίου II. Η πρόγνωση αυτών των ασθενών προσεγγίζει την επιβίωση των ασθενών με υψηλότερο στάδιο, το στάδιο III.

3.4 Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.

Τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (Mismatch Repair Genes-MMR), που είναι υπεύθυνα για τη διόρθωση του αταίριαστου ζευγαρώματος των νουκλεοτιδικών βάσεων και των μικρών εισαγωγών ή διαγραφών, οι οποίες επισυμβαίνουν κατά τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού. Σε αυτήν την κατηγορία των γονιδίων συμπεριλαμβάνονται τα hMSH-2, το hMSH-1, το hPMS-1 και το hPMS-2, το hMSH-6 hMLH-1/-3.¹²⁰ Η αδρανοποίηση των γονιδίων της κατηγορίας αυτής οδηγεί σε μεταλλάξεις καρκινικών γονιδίων και ανάπτυξη νεοπλασμάτων.¹²¹ Οι μεταλλάξεις αυτού του τύπου προκαλούν χαρακτηριστικό φαινότυπο αποκαλούμενο μικροδορυφορική αστάθεια, που αποτελεί τη βασική γενετική διαταραχή που προσεγγίζει το 90% στους ασθενείς με HNPCC(τι σημαίνει, το έχουμε ξανά αναφέρει, αλλιώς το εξηγούμε) και σε μικρότερο ποσοστό σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο, που δεν ξεπερνάει το 10%. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αφορούν τα γονίδια hMSH-2 και hMLH-1. Στους ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου δεν παρουσιάζεται μετάλλαξη στα γονίδια αυτά αλλά φέρουν επιγενετικές αλλαγές, που προκαλούν αποσιώπηση των γονιδίων.¹²²

Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που μετέχουν στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA κατά τον διπλασιασμό του. Σε κύτταρα που παρουσιάζουν βλάβη σε αυτά τα γονίδια εμφανίζονται μεταλλάξεις λόγω της μειωμένης ικανότητας του κυττάρου να διορθώνει τα λανθασμένα ζευγάρια βάσεων κατά την φάση διπλασιασμού του DNA και κυρίως στα γονίδια που παρουσιάζουν βραχείες και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων. Επακόλουθο των μεταλλάξεων των

γονιδίων MMR είναι η απενεργοποίηση των γονιδίων, τα οποία μετέχουν σε λειτουργίες ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Σε αντίθεση με το σταθερό, ως προς τους μικροδορυφόρους, καρκίνο του παχέος εντέρου, οι σποραδικοί όγκοι που παρουσιάζουν MSI αποτελούν το 15% του συνόλου και έχουν κάποια ιδιαίτερα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζονται στο εγγύς τμήμα, έχουν περισσότερο βλεννώδη σύνθεση, περιέχουν λεμφοκυτταρική διήθηση και συνήθως είναι ανεπαρκώς διαφοροποιημένα. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν τέτοιου τύπου μεταλλάξεις παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με αυτούς που δεν έχουν MMR-σχετιζόμενους όγκους.¹²³

3.5. Μηχανισμοί ενεργοποίησης ογκογονιδίων.

Τα ογκογονίδια αποτελούν γονίδια απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία και ανάπτυξη του κυττάρου. Προκειμένου αυτά τα γονίδια να τροποποιήσουν την λειτουργία τους με επακόλουθο την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πρέπει να υποστούν διάφορες διεργασίες κάποιες από τις οποίες θα αναφέρουμε παρακάτω.

Ένας από τους μηχανισμούς που μπορούν να διαδραματίσουν τον παραπάνω ρόλο είναι η σημειακή μετάλλαξη (Point mutation). Το πρώτο ογκογονίδιο που τεκμηριώθηκε ότι ενεργοποιείται με σημειακή μετάλλαξη είναι το γονίδιο H-ras του ανθρώπου.¹²⁴ Η σημειακή μετάλλαξη των ογκογονιδίων ras με επακόλουθο την ενεργοποίησή τους έχει παρατηρηθεί σε ποικίλους όγκους, όπως του παγκρέατος, του μαστού, του εντέρου, σε μυελοδυσπλασία, σε οξεία λευχαιμία κλπ.¹²⁵

Άλλος πιθανός μηχανισμός, ο οποίος ονομάζεται ενίσχυση γονιδίου (Gene Amplification), για την ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων είναι η υπερέκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος, που κωδικοποιείται από τα αντίστοιχα γονίδια.¹²⁶ Στον καρκίνο του μαστού παρατηρείται ενίσχυση των c-myc και c-erbB-2, που σχετίζεται επίσης με κακή πρόγνωση και ανθεκτικότητα στην ορμονοθεραπεία. Ακόμη, η ενίσχυση του c-erb-2 έχει περιγράψει στον καρκίνο των σιελογόνων αδένων και στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.¹²⁷

Οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις (Chromosomal Translocation) μπορούν να ενεργοποιήσουν τα ογκογονίδια και παρατηρούνται σε έναν αριθμό κακώθων παθήσεων, κυρίως του αίματος στον άνθρωπο. Παραδείγματα αποτελούν η χρόνια

μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ)¹²⁸ και το λέμφωμα του Burkitt¹²⁹. Ακόμα, οι μεταλλάξεις προσθήκης (Insertional Mutagenesis) από ρετροϊούς, που προκαλούν κακοήγη εξαλλαγή έχουν περιγραφεί σε πτηνά και σε θηλαστικά, αλλά όχι σε κύτταρα ανθρώπου.¹³⁰ Το γενετικό υλικό των ρετροϊών που προκαλούν εξαλλαγή, ενσωματώνονται τυχαία στο κυτταρικό DNA σε πολλά σημεία.¹³¹

Τέλος ένας άλλος μηχανισμός είναι η μεταγωγή (Transduction) όπου οι ρετροϊοί, που περιέχουν γενετικό υλικό RNA, κατά την διάρκεια της μόλυνσης αλληλοεπιδρούν με τον ξενιστή και προκαλούνται βλάβες όπως σημειακές μεταλλάξεις, ελλείψεις και υποκαταστάσεις, σε σχέση με τις αντίστοιχες κυτταρικές αλληλουχίες.¹³² Η ρύθμιση (Modulation) είναι ένας μηχανισμός όπου ένα ενεργοποιημένο ογκογονίδιο προκαλεί την ενεργοποίηση ενός άλλου. Τέλος, με τις χρωμοσωμικές απώλειες (Chromosome deletions) προκαλείται η απώλεια ενός ογκογονιδίου, που έχει ως λειτουργία την καταστολή άλλων κυτταρικών ογκογονιδίων, με τελικό επακόλουθο την ενεργοποίησή τους.

Κεφάλαιο 4

Γενετική του καρκίνου του παχέος εντέρου.

4.1. Μοντέλο καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

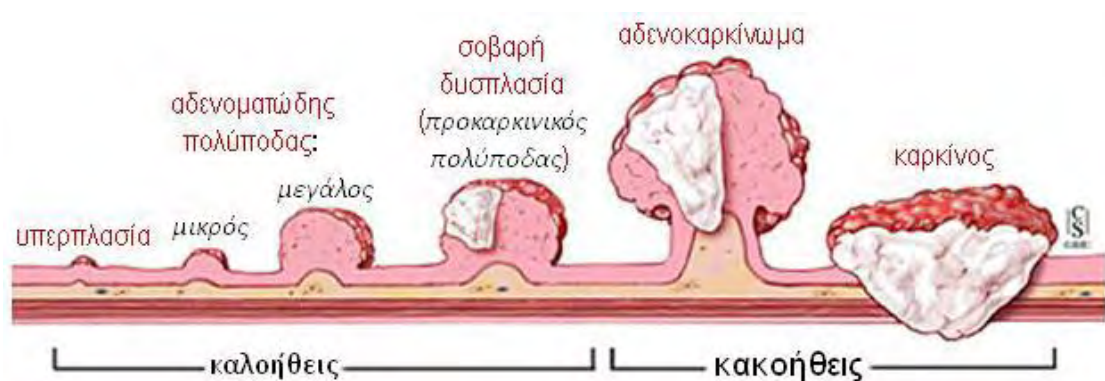
Η εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό είναι μία περίπλοκη διαδικασία, για την οποία είναι αναγκαίο να επέλθουν πολλαπλές και αθροιστικές γενετικές αλλαγές και ειδικότερα συνδυασμός ενεργοποίησης ογκογονιδίων και αναστολής ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Επακόλουθο αυτών των αλλαγών είναι να διαφύγει η κυτταρική λειτουργία από τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί ίσως μία από τις πιο μελετημένες μορφές καρκίνου και έχει σημαντική συνεισφορά στην κατανόηση της γενετικής του καρκίνου.¹³³

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, η αλληλουχία των γεγονότων κατά την ογκογένεση στο παχύ έντερο έχει διασαφηνιστεί και ακολουθεί το ακόλουθο πρότυπο. Ως πρώτο στάδιο αποτελεί η εμφάνιση εστιακών παρεκκλίσεων από το φυσιολογικό στις κρύπτες του βλεννογόνου του παχέος εντέρου (aberrant crypt foci/APC). Αναφέρεται ότι όταν οι εστίες περιλαμβάνουν 10 με 100 κρύπτες δεν είναι ορατές ενδοσκοπικά, ενώ όταν οι εστίες ξεπερνούν τις 110 η αλλοίωση καθίσταται ορατή.¹³⁴ Υπάρχουν συνολικά τέσσερις τύποι εστιακών παρεκκλίσεων που έχουν αναφερθεί: εστίες με υπερπλαστικού τύπου επιθηλιακού επιθηλίου, εστίες επιθηλίου αδενίων υπερπλαστικού τύπου, εστίες μεικτού τύπου αδενωματώδεις και υπερπλαστικού επιθηλίου και εστίες με αδενωματώδεις επιθήλιο.¹³⁵ Η εμφάνιση εστιών είναι συχνότερη σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με τους φυσιολογικούς ανθρώπους, εύρημα που συνηγορεί ότι ασθενείς που παρουσιάζουν AFC έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι δυνατόν να εντοπιστούν ενδοσκοπικά με χρώση με κυανού του μεθυλενίου. Υπάρχει ακόμα η άποψη ότι υφίσταται ένα στάδιο στο οποίο υπάρχει μετάπτωση του υπερπλαστικού τύπου σε αδενωματώδεις, λόγω της συνύπαρξης των δύο τύπων σε μία εστία AFC. Το παραπάνω εύρημα είναι γνωστό ως υπερπλαστικό επιθήλιο με στοιχεία αδενωματώδη σε ορισμένες θέσεις στοιχειοθετώντας την άποψη

ότι ο υπερπλαστικός πολύποδας είναι δυνατόν να μεταπλαστεί σε αδενωματώδη. (Εικόνα 5.1)¹³⁶

Η αιτιολογία των παραπάνω δεν είναι πλήρως γνωστή. Υπάρχει η άποψη ότι η μετάλλαξη του γονιδίου APC έχει άμεση συνάφεια με την εμφάνιση των αδενωματωδών αλλοιώσεων. Έτσι οι εστίες AFC διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις εστίες AFC με δυσπλαστικούς χαρακτήρες και υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο πρωτοογκογονίδιο ras και τις εστίες AFC με δυσπλαστικούς χαρακτήρες και υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο πρωτοογκογονίδιο ras και στο γονίδιο APC.¹³⁷ Υπάρχει η άποψη ότι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω των μηχανισμών ελέγχου του, όπως η απορρύθμιση του γονιδίου p21 και Ki-27, στις εστίες αυτές έχει ως αποτέλεσμα την μετάπτωση της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου σε νεοπλασματικό.¹³⁸

Το πρότυπο του Fearon και Vogelstein έχει προταθεί για να ερμηνεύσει την καρκινογένεση του παχέος εντέρου και την μετάπτωση του αδενώματος σε καρκίνωμα. Με βάση αυτό το πρότυπο επέρχεται μετάλλαξη στο πρωτοογκογονίδιο APC, που παρατηρείται και στον 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.¹³⁹



Εικόνα 4.1. Εικονική παράσταση του μοντέλου καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου.¹⁴⁰

Στον σποραδικό καρκίνο υπάρχει μετάλλαξη του γονιδίου k-ras στο 50%. Η μετάλλαξη αυτή έχει σημασία όταν σχετίζεται με μετάλλαξη του γονιδίου APC σε

εστίες AFC και υπερπλαστικούς πολύποδες. Όταν υφίστανται οι δύο μεταλλάξεις σηματοδοτείται η μετάβαση από πρώιμο στο ενδιάμεσο αδένωμα, με τη δημιουργία κλώνου κυττάρου, που χαρακτηρίζεται από ήπιου και εστιακά μέτριου βαθμού δυσπλασία.¹⁴¹ Ακολούθως, έχουμε απώλεια του γονιδίου DCC και μετάβαση από το ενδιάμεσο στο προχωρημένο αδένωμα. Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι το γονίδιο DCC, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q22, μειώνει την ικανότητα του κυττάρου για φυσιολογική καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το γονίδιο p53 υφίσταται μετάλλαξη στο 70% των σποραδικών καρκίνων. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν πριν την εμφάνιση διήθησης, η οποία σηματοδοτεί την μετάπτωση από αδένωμα σε καρκίνωμα.¹⁴²

Αναφέρεται ότι η νεοπλασματική εξεργασία ξεκινάει από την δυσπλαστική κρύπτη και ακολουθεί η εμφάνιση μικρού σωληνώδους αδενώματος, που μεταπίπτει σε σωληνολαχνωτό αδένωμα. Το τελευταίο αυξάνει σε μέγεθος και σε βαθμό δυσπλασίας και μεταπίπτει σε άμισχο λαχνωτό αδένωμα και ακολούθως σε καρκίνωμα.¹⁴³

4.2. Γενετικό υπόβαθρο κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου.

Η κληρονομική μορφή του καρκίνου του παχέος εντέρου αφορά το 5% των ασθενών με αυτήν την μορφή καρκίνου. Η συγκεκριμένη κατηγορία υποδιαιρείται με βάση την παρουσία ή μη πολυπόδων ως κύριο σύμπτωμα της νόσου. Οι ασθενείς με πολυποδίαση περιλαμβάνουν τα οικογενή σύνδρομα αδενωματώδους πολυποδιάσεως (οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση- FAP, το σύνδρομο Gardner και το σύνδρομο Turcot) καθώς επίσης και τα οικογενή σύνδρομα αμαρτωματώδους πολυποδιάσεως (Peutz-Jeghers, νεανική πολυποδίαση, νόσος Cowden). Η εμφάνιση κληρονομούμενου κολο-ορθικού καρκίνου χωρίς την ταυτόχρονη ανεύρεση πολλαπλών πολυπόδων αποτελεί μία διακριτή νοσολογική οντότητα, γνωστός ως κληρονομικός μη πολυποδιακός κολο-ορθικός καρκίνος (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer HNPCC ή σύνδρομο Lynch). Το σύνδρομο συνοδεύεται με υψηλό ποσοστό ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, ενώ είναι γνωστές οι υποκείμενες μεταλλάξεις.

Στο σύνδρομο οικογενούς αδενωματώδους πολυποδιάσεως (Familial Adenomatous Polyposis, FAP), χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η παρουσία εκατοντάδων έως χιλιάδων πολυπόδων σε όλη την έκταση του παχέος εντέρου. Η

μέση ηλικία ανάπτυξης των πολυπόδων είναι τα είκοσι πέντε έτη και των συμπτωμάτων τα τριάντα τρία,¹⁴⁴ ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου τα τριάντα έξι έτη και διάγνωσης διηθητικού καρκίνου τα σαράντα δύο έτη.¹⁴⁵ Το σύνδρομο όμως συνοδεύεται από μία πληθώρα εξωεντερικών εκδηλώσεων που μπορεί να είναι οστεώματα στη γνάθο, πολύποδες στο ανώτερο πεπτικό σωλήνα, συγγενής υπερτροφία του επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς καθώς επίσης και αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης άλλων νεοπλασιών. Η μετάλλαξη, που είναι υπεύθυνη για αυτήν την νόσο, είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο APC, η οποία κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο με υψηλή διεισδυτικότητα.¹⁴⁶ Η κλινική εικόνα του συνδρόμου σχετίζεται με συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Για παράδειγμα μεταλλάξεις στα εξόνια 1250-1464 σχετίζονται με την εμφάνιση χιλιάδων πολυπόδων, ενώ στα εξόνια 1465-1466 σχετίζονται με εξωεντερικές εκδηλώσεις.¹⁴⁷ Οι ασθενείς με θετικό ιστορικό θα πρέπει να ελέγχονται για πιθανή μετάλλαξη του APC γονιδίου και επί επιθετικού αποτελέσματος να υποβάλλονται σε κολονοσκόπηση από την ηλικία των δώδεκα ετών. Η θεραπεία είναι η ολική κολεκτομή και πρέπει να αντιμετωπίζεται σε κέντρα εξειδικευμένα που παρέχεται και κατάλληλη γενετική καθοδήγηση.¹⁴⁸ Υπάρχει και η εξασθενημένη μορφή του ΣΟΑΠ, όπου οι ασθενείς παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό πολυπόδων (<100). Σε αυτούς τους ασθενείς ο καρκίνος αναπτύσσεται αργότερα κατά μέσο όρο κατά δώδεκα έτη, με διάμεση ηλικία διάγνωσης τα πενήντα οχτώ έτη, ενώ το 68% των ασθενών θα αναπτύξουν καρκίνο στα ογδόντα έτη. Η κατηγορία αυτή οφείλεται πάλι σε μετάλλαξη του γονιδίου APC πλησίον του 5' (εξονίου 158) και 3' (εξονίου 1596) μέρους.¹⁴⁹

Το σύνδρομο Gardner περιλαμβάνει παρόμοιες εκδηλώσεις με το ΣΟΑΠ με περισσότερο έντονες όμως τις εξωεντερικές εκδηλώσεις. Επιπρόσθετα, μπορεί να αναπτύξουν οστεώματα των μακρών οστών, δεσμοειδείς όγκοι και ίνωση του μεσεντερίου.¹⁵⁰

Το σύνδρομο Turcot έχει το χαρακτηριστικό ότι αναπτύσσονται όγκοι στο παχύ έντερο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι αυτού του συνδρόμου, το ΣΟΑΠ σε συνδυασμό με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα λόγω μετάλλαξης του APC και ο καρκίνος του παχέος εντέρου με αστροκύττωμα λόγω μετάλλαξης των γονιδίων επιδιόρθωσης (MMR, mis match repair).¹⁵¹

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers χαρακτηρίζεται με την εναπόθεση μελανίνης πέριξ της ρινός, του στοματικού βλεννογόνου, των χειλών, τις παλάμες και τα πέλματα. Επιπλέον, αναπτύσσουν αιματώματα οπουδήποτε στο γαστρεντερικό σωλήνα με

επακόλουθο αιματώματα, εγκολεασμό ή και απόφραξη. Ένα ποσοστό περίπου στο 50% των ασθενών αυτών θα αναπτύξουν κολο-ορθικό καρκίνο ή νεοπλάσματα στο λεπτό έντερο και σπάνια παγκρεατικό καρκίνο. Η μετάλλαξη που είναι υπεύθυνη για την οντότητα αυτή, βρίσκεται στο γονίδιο LKB1 ή STK11²² που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19p13.3 και κωδικοποιεί μία κινάση.¹⁵²

Το σύνδρομο νεανικής οικογενούς πολυποδίασης έχει το χαρακτηριστικό της ανεύρεσης αμαρτωμάτων κυρίως στο ορθό κατά την παιδική ηλικία και εκδηλώνεται με αιμορραγία. Υπάρχουν τρία είδη: η οικογενής νεανική πολυποδίαση του παχέος εντέρου, η οικογενής νεανική πολυποδίαση του στομάχου και η γενικευμένη νεανική πολυποδίαση. Αιτία αποτελεί μία μετάλλαξη στο γονίδιο SMAD4 (μέλος της οικογένειας υποδοχέων TGF-beta).¹⁵³

Στο σύνδρομο Cowden αναπτύσσονται πολλαπλοί αμαρτωματώδεις όγκοι εκτοδερμικής, μεσοδερμικής και ενδοδερμικής προέλευσης. Οι ασθενείς έχουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης όγκων του μαστού, του θυρεοειδούς, υποδόρια λιπώματα, λειομώματα της μήτρας κ.α. Η υπεύθυνη μετάλλαξη για τη νόσο αυτή εντοπίζεται στο γονίδιο PTEN.¹⁵⁴

Ο κληρονομικός μη πολυποδιακός κολο-ορθικός καρκίνος (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer, HNPCC ή σύνδρομο Lynch) αποτελεί τη συχνότερη μορφή κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου και αφορά το 2-4% όλων των ασθενών που πάσχουν από κολο-ορθικό καρκίνο.¹⁵⁵ Η κληρονομική αυτή μορφή καρκίνου οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων επιδιόρθωσης (MMR, mis match repair) που είναι τα MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Σε περίπτωση ανίχνευσης μετάλλαξης στα γονίδια επιδιόρθωσης τότε ο ασθενής πάσχει από σύνδρομο Lynch και παράλληλα ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό ενδείκνυται να υποβληθούν σε αντίστοιχες εξετάσεις. Οι μεταλλάξεις αυτές εκτός από τον καρκίνο παχέος εντέρου απαντώνται και σε άλλες μορφές καρκίνου, όπως του ενδομητρίου, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης και άλλων. Κατά την διάρκεια της ζωής αυτών των ατόμων η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου προσεγγίζει το 80%, του ενδομητρίου το 60% και όλων των άλλων μορφών το 20%.¹⁵⁶ Τα πρώτα αρχικά διαγνωστικά εργαλεία είναι η ανοσοϊστοχημική ανάλυση για MMR πρωτεΐνες και ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).¹⁵⁷ Για τη διάγνωση του συνδρόμου υπάρχουν διεθνείς οδηγίες όπου οι δύο αυτές εξετάσεις να γίνονται σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο παχέος

εντέρου ή ενδομητρίου με οικογενειακό ιστορικό προκειμένου να γίνει διάγνωση του συνδρόμου.¹⁵⁹

Η οικογενής μορφή του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι μία λιγότερο κατανοητή μορφή καρκίνου. Αποτελεί έως και το 25% των ασθενών που πάσχουν από αυτή την μορφή καρκίνου. Οι ασθενείς έχουν οικογενειακό ιστορικό αλλά δεν εντάσσονται σε κάποια μορφή από τα κληρονομικά σύνδρομα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Κάποια άτομα έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου χαμηλότερο όμως από αυτά που πάσχουν από κάποιο σύνδρομο. Η παρουσία συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο παχέος εντέρου αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου κατά 1,7 φορές σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Ο κίνδυνος αυξάνεται περισσότερο όταν υπάρχουν δύο συγγενείς πρώτου βαθμού με τη νόσο ή το πρώτο περιστατικό της οικογένειας εμφανίστηκε πριν την ηλικία των 55 ετών.¹⁶⁰

Πίνακας 4.1. Συνοπτικός πίνακας με τα σύνδρομα που προδιαθέτουν σε καρκίνο του παχέος εντέρου.¹⁶¹

Σύνδρομο	Γονίδιο	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	Τρόπος κληρονομικότητας	Σηματοδοτικό μονοπάτι
Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP)	APC	Πολλαπλοί αδενωματώδεις πολύποδες παχέος και ανώτερου γαστρεντερικού, καρκίνος παχέος εντέρου, δεσμοειδείς όγκοι και επιδεμοειδείς κύστεις	Αυτοσωμικός επικρατής	WNT
Πολυποδίαση σχετιζόμενη με MUTYH	MUTYH	Αδενωματώδεις πολύποδες παχέος εντέρου και ανώτερου γαστρεντερικού, καρκίνος παχέος εντέρου	Αυτοσωμικός επικρατής	BER
Κληρονομικός μη-πολυποδισιακός καρκίνος του παχέος εντέρου	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Καρκίνος παχέος εντέρου, ενδομητρίου, στομάχου, παγκρέατος κ.α.	Αυτοσωμικός επικρατής	MMR

(σύνδρομο Lynch)				
Νεανική πολυποδίαση Peutz-Jeghers	SMAD4, BMPRIA	Αμαρτωματώδεις πολύποδες του γαστρεντερικού.	Αυτοσωμικός επικρατής	SMAD
	STK11/LKB1	Αμαρτωματώδεις πολύποδες λεπτού εντέρου, υπέρχρωση περιστοματικά, δερματικά, καρκίνος: λεπτού κ παχέος εντέρου, μαστού, ωοθηκών, παγκρέατος, όρχεος, θυρεοειδούς	Αυτοσωμικός επικρατής	PI3K/mTOR
Cowden	PTEN	Αμαρτώδεις πολύποδες του γαστρεντερικού, δερματικά αμαρτώματα, καρκίνος: μαστού, γαστρεντερικού συστήματος, παγκρέατος, θυρεοειδούς, ενδομητρίου	Αυτοσωμικός επικρατής	PI3K/mTOR
Κληρονομικός γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου	CDH1	Γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου, λοβιακός καρκίνος μαστού, καρκίνος παχέος εντέρου	Αυτοσωμικός επικρατής	WNT
Κληρονομικός γαστρεντερικό στρωματικός όγκος	KIT	Στρωματικοί όγκοι	Αυτοσωμικός επικρατής	RTK

4.2.1 Ο ρόλος των MSI/K-RAS/N-RAS/B-RAF.

Η εξέταση της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο όταν πρόκειται να ληφθεί απόφαση για την έναρξη επικουρικής

θεραπείας σε ασθενείς σταδίου II. Στοιχεία αποδεικνύουν, ότι η εξέταση του MSI είναι ένας δείκτης που καταδεικνύει τη χρησιμότητα της φλουροπυραμιδίνης σε αυτούς τους ασθενείς. Το MSI κατηγοριοποιείται ως εξής: το MSI-H (High) και το MSI-L (low), που καθορίζεται από την αστάθεια του γονιδιώματος και όταν εκλείπει αυτό το χαρακτηριστικό χαρακτηρίζεται σταθερό MSI-S (Stable). Ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια MMR χαρακτηρίζονται ως MSI-H.¹⁶²

Μελέτες αποδεικνύουν ότι το χαρακτηριστικό MSI-H είναι περισσότερο συχνό στους ασθενείς σταδίου II σε σχέση με αυτούς σταδίου III (22% vs. 12%). Στους ασθενείς σταδίου IV το ποσοστό αυτό μειώνεται επιπλέον και δεν ξεπερνά το 3,5%. Ασθενείς με MSI-H έχουν μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης μεταστάσεων. Στους ασθενείς με νόσο σταδίου II με MSI-H έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους άλλους ασθενείς. Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με MSI-H δεν έχουν θετική επίδραση από τη χρήση συμπληρωματικής θεραπείας από 5-FU όταν έχουν νόσο στάδιο II, κάτι που δεν ισχύει όταν οι ασθενείς μεταπίπτουν στο στάδιο III.

Σε ποσοστό περίπου 40% των ασθενών που πάσχουν από κολο-ορθικό καρκίνο του παχέος εντέρου απαντώνται μεταλλάξεις στο εξόνιο 2, στα κωδικόνια 12 και 13. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με τη μη ανταπόκριση των ασθενών αυτών στη χημειοθεραπεία με cetuximab και panitumumab, οπότε οι ασθενείς αυτοί δεν έχουν ένδειξη να λάβουν τέτοια. Για την προγνωστική αξία αυτών των μεταλλάξεων υπάρχουν διαφορούμενες απόψεις.¹⁶³

Το γονίδιο BRAF βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 7q34. Η πρωτεΐνη ανήκει στην κατηγορία κινάση σερίνης-θρεονίνης και ενεργοποιείται από το σύνδεσμο GTP – Ras. Εμπλέκεται στη μεταγωγή μιτογόνων σημάτων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στον πυρήνα. Εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και φαίνεται να έχει και αντιαποπτωτική δράση. Η πλέον συνήθης μετάλλαξη του BRAF στον καρκίνο παχέος-ορθού είναι η V600E (εξόνιο 15) που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση βαλίνης με γλουταμικό οξύ στη θέση 600.¹⁶⁴ Περίπου 5-9% των καρκίνων παχέος εντέρου που δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο k-Ras αλλά δείχνουν αντίσταση στα αντι-EGFR μονοκλωνικά, χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF (V600E, V600K),¹⁶⁵ ενώ φαίνεται οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό να έχουν και κάποια προγνωστική αξία για την (αρνητική) έκβαση της νόσου.^{166,167}

Κεφάλαιο 5.

Μόρια GA733-1/-2

5.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνών GA733-1/-2.

Η οικογένεια των γονιδίων *tacstd* έχει δύο μέλη, το τροφοβλαστικό αντιγόνο 1 (Trop1) ή γαστρεντερικό αντιγόνο 2 (GA733-2), ή *tacstd1* και συνηθέστερα γνωστό ως επιθηλιακό μόριο κυτταρικής προσκόλλησης (EpCAM), και το δεύτερο μέλος το τροφοβλαστικό αντιγόνο 2 (Trop2) ή γαστρεντερικό αντιγόνο 1 (GA733-1) ή *tacstd2*. Η πρωτεΐνη GA733-1 αποτελείται από 314 αμινοξέα, έχει MB 35-kDa, μοιράζεται ταυτόσημη αλληλουχία σε ποσοστό 49% με την πρωτεΐνη GA733-2 και υπάρχει ομοιότητα στη δομή των δύο πρωτεϊνών σε ποσοστό 67%. (Εικόνα 5.1).¹⁶⁸ Οι πλέον συντηρημένες περιοχές είναι η περιοχή επανάληψης θυρεοσφαιρίνης?(τι είναι αυτό?) και η διαμεμβρανική περιοχή. Σε αντίθεση με την GA733-1 η οποία δεν περιέχει ιντρόνια, η GA733-2 αποτελείται από εννέα εξόνια, εκ των οποίων τα εξόνια 1-6 κωδικοποιούν την εξωκυτταρική περιοχή, το εξόνιο 7 την διαμεμβρανική περιοχή και τα εξόνια 8-9 την ενδοκυττάρια δομή.¹⁶⁹ Μεταξύ των GA733-1 και GA733-2 πρωτεϊνών διατηρείται η διάταξη της κυστεΐνης και η κατανομή των υδρόφιλων και υδρόφοβων υπολειμμάτων της περιοχής επανάληψης θυρεοσφαιρίνης. Ωστόσο, η GA733-2 έχει μόνο τρεις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης, ενώ η GA733-1 έχει τέσσερις θέσεις, δύο από τις οποίες είναι συντηρημένες.¹⁷⁰ Το ενδοκυττάριο τμήμα της GA733-2 περιέχει δύο πιθανές θέσεις δέσμευσης α-ακτινίνης, που εμπλέκονται στην ιδιότητα της GA733-2 πρωτεΐνης να συμβάλλει στην ικανότητα προσκόλλησης του κυττάρου, καθώς και μία δομή PDZ, η οποία είναι σημαντική για την αγκίστρωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στον κυτταρικό σκελετό.¹⁷¹ Η διαφορετική δομή των ενδοκυτταρικών τμημάτων των πρωτεϊνών GA733-1 και GA733-2 σχετίζεται με την ενεργοποίηση διαφορετικών ενδοκυττάριας σηματοδοτικών μονοπατιών, κάτι που μπορεί να εξηγήσει τη διαφορετική τους λειτουργία και την διαφορετική τους κατανομή στον οργανισμό.

```

Trop2      MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGRQCQCRA LGS 60
EpCAM     -----MAPPQVLAFLG LLLAAATATFAAAQE ECV CENYKLA VNC FVNNNRQCQTSVGA 53
          .** *.: **: **: .:***:*. * .*** . . . :*** :*:
Trop2      GMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDPCDPECRFKARQCN 120
EpCAM     QNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGR-RAKP-EGALQNN DGLYDPCDESGLFKAKQCN 111
          :* ** .*:***:*. * . . . * . :***** . * ***:***
Trop2      QTSVCWCVNSVGVRRTDKGDL SLRCD E LVRTHHILIDL RHRPTAGAFNHS D L D A E L R R L F 180
EpCAM     GTSVCWCVNTAGVRRTDK-DTEITC SERVRTYWI IELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEI 170
          **.*****:***** * .: * * ***: **:***: . .: . . * : * : :
Trop2      RERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQAAGEVDIGDAAYYFERDIKGESL FQGRG 240
EpCAM     TTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESL FHSK 230
          **:*.***: : : * . * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Trop2      GLDLRVRGEPLQVER--TLIYYLDEIPP KFSMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVIT 298
EpCAM     -MDLTVNGEQLDLDPGQTLIYVDEKAPEFSMQLKAGVIAVIVVVVIAVAVAGIVVLVIS 289
          :* * . * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Trop2      NRRKSGKYKVEIKELGELRKEPSL 323
EpCAM     RKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA 314
          .: : . * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Εικόνα 5.1. Η ομολογία μεταξύ των αλληλουχιών των πρωτεϊνών GA733-1 και GA733-2 . Περιοχή επανάληψης της θυρεοσφαιρίνης (κίτρινο), της Διαμεμβρανική περιοχή (κόκκινο), Θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (σκούρο μπλε),αλληλουχίες, Η GA733-1 περιέχει μία περιοχή HIKE (πράσινο) που περιέχει μια δυνητική θέση δεσμεύσεως της PIP2 (υπογραμμισμένη) και μια σερίνη (Ser303, έντονους χαρακτήρες) που μπορεί να φωσφορυλιωθεί από PKC.(αυτά πρέπει να αναφερθούν στο κείμενο και σε λεζάντα μόνο επιγραμματικά όπως τα άλλα). Θέσεις πρόσδεσης α-ακτίνης (γαλάζιο), Θέση δέσμευσης PDZ (διπλή υπογράμμιση) στο ενδοκυτταρικό τμήμα τη; GA733-2 . Η αντιπαράθεση έγινε χρησιμοποιώντας το Clustal W2. (*): ομόλογα αμινοξέα, (:): συντηρημένες υποκαταστάσεις (αμινοξέα), (.): ημισυντημένες υποκαταστάσεις (αμινοξέα).¹⁷²

5.2. Ο ρόλος της GA733-1 στον καρκίνο.

Ο καρκίνος έχει περιγραφεί ως μια αναπτυξιακή διαταραχή, σύμφωνα με την οποία τα μοριακά γεγονότα που διέπουν την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου απορρυθμίζονται οδηγώντας στην ογκογένεση.¹⁷³ Μέχρι στιγμής, το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας σχετικά με το ρόλο της GA733-1 στον καρκίνο επικεντρώνεται στην προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η GA733-1 υπερεκφράζεται στην πλειονότητα των καρκίνων στον άνθρωπο που εξορμάται από τα επιθηλιακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου του παχέος εντέρου,¹⁷⁴ του παγκρέατος,¹⁷⁵ των πνευμόνων,¹⁷⁶ του οισοφάγου,¹⁷⁷ του στόματος,¹⁷⁸ του μαστού,¹⁷⁹

της μήτρας¹⁸⁰ και των ωοθηκών¹⁸¹. Η έκτοπη έκφραση του *GA733-1* γονιδίου σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τα κύτταρα, όταν εγχύονται σε ποντίκια, είναι εξαιρετικά ογκογόνα.¹⁸² Αντιστρόφως, η απενεργοποίηση του *GA733-1*, χρησιμοποιώντας siRNA, σε κύτταρα από καρκίνο παχέος εντέρου και καρκίνου του μαστού, ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίσουν αποικίες in vitro.¹⁸³ Η ανάπτυξη του όγκου σε ποντικούς της οικογένειας nude είναι ανάλογη προς τα επίπεδα έκφρασης *GA733-1* mRNA με μεταμόσχευση κυττάρων που εκφράζουν υψηλά επίπεδα του *GA733-1*, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεγαλύτερων όγκων σε σύγκριση με τους αντίστοιχους με μέση και χαμηλή έκφραση του *GA733-1*.¹⁸⁴ Η ανάπτυξη του όγκου in vivo μπορεί να ανασταλεί με έγχυση των κυττάρων με αντίσωμα αντι- *GA733-1*¹⁸⁵ ή με αναστολή της έκφρασης του γονιδίου *GA733-1* με siRNA¹⁸⁶. Βρέθηκε ότι, ενώ σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς ενηλίκων υπάρχει έκφραση του *GA733-1*mRNA, τα επίπεδα ήταν σχεδόν πάντοτε αυξημένα σε όγκους από τον αντίστοιχο ιστό. Η αυξημένη έκφραση του *GA733-1* ήταν ικανή για να οδηγήσει την ανάπτυξη του όγκου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση του *GA733-1* προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου.¹⁸⁷ Οι πρώτες μελέτες, που συνδέουν το γονίδιο *GA733-1* με την ανάπτυξη των όγκων, οδήγησε στην αρχική περιγραφή του ως ογκογονίδιο, αλλά οι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, ότι αυτό είναι πάρα πολύ απλοϊκή προσέγγιση.¹⁸⁸ Μια εναλλακτική θεωρία είναι ότι η υψηλή έκφραση του *GA733-1* σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να οφείλεται σε μη-ογκογονο-εθισμό,¹⁸⁹ όπου τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται εξαρτώμενα από μη ογκογόνα γονίδια για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους μέσα στο μικροπεριβάλλον ανάπτυξης των όγκων.¹⁹⁰

Εκτός του ότι είναι κρίσιμης σημασίας μόριο για την ανάπτυξη των όγκων, το *GA733-1* εμπλέκεται επίσης στη μετάσταση των όγκων. Υψηλή έκφραση του *GA733-1* έχει συσχετιστεί με αυξημένη μετάσταση σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο,¹⁹¹ με καρκίνο του παγκρέατος,¹⁹² καρκίνο των ωοθηκών,¹⁹³ καρκίνο του μαστού,¹⁹⁴ πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα,¹⁹⁵ και λέμφωμα κυττάρων NK / T,¹⁹⁶. Επιπλέον, το *GA733-1* εκφράζεται σε όλες τις απομακρυσμένες μεταστάσεις σε ανθρώπους με καρκίνο του προστάτη.¹⁹⁷ In vitro, η υπερέκφραση του *GA733-1* αυξάνει τη μετανάστευση των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, ενώ η αναστολή του, χρησιμοποιώντας αντισώματα αντι- *GA733-1*, μειώνει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και του μαστού.¹⁹⁸ Τα ανωτέρω αποτελούν

μία απόδειξη που όπως φαίνεται μπορούν να υποστηρίξουν ένα ρόλο για το GA733-1 στην προαγωγή της ανάπτυξης του καρκίνου και επιθετικότητάς του, με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και της μετανάστευσή τους. Ωστόσο, σε ορισμένες μελέτες το GA733-1 φαίνεται να αναστέλλει, αντί να προάγει την ανάπτυξη του όγκου. Ένα μεγάλο ποσοστό των αδеноκαρκινωμάτων του πνεύμονα, για παράδειγμα, έχουν χαμηλή έκφραση του GA733-1 και σχετίζονται με υπερμεθυλίωση του γονιδιακού τόπου του GA733-1.¹⁹⁹ Η ίδια μελέτη διαπίστωσε ότι η προκλητή υπερ-έκφραση του GA733-1 σε ανθρώπινα κύτταρα αδеноκαρκινώματος πνεύμονα ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εμποδίζει τον σχηματισμό αποικιών, ενώ η απενεργοποίηση του *GA733-1* προκαλεί αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένο αριθμό αποικιών.²⁰⁰ Η απενεργοποίηση του *GA733-1* σε κύτταρα αδеноκαρκινώματος πνεύμονα που στη συνέχεια μεταμοσχεύθηκαν σε ποντικούς της οικογένειας *nude*, αύξησε την ανάπτυξη των όγκων *in vivo*.²⁰¹ Η έκφραση του απενεργοποιημένου GA733-1 είναι επίσης μειωμένη και απουσιάζει ο μεσεγχυματικός υπότυπος του head and neck squamous cell cancer (HNSCC).²⁰² Η μειωμένη έκφραση του *GA733-1* σε αυτά τα κύτταρα αυξάνει την ενεργοποίηση του μέλους της οικογένειας του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα ErbB3, μέσω της αυξημένης διαθεσιμότητας της neuregulin-1 στην κυτταρική επιφάνεια και παρέχει μία δυνητική θέση στοχευμένης θεραπείας (αναστολείς της ErbB3 οδός) για αυτόν τον υπότυπο του HNSCC.²⁰³ Αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τα ευρήματα σε ποντίκια όπου είχε γίνει η απενεργοποίηση του γονιδίου *GA733-1*. Σε ποντίκια όπου έχει διαγραφεί ολόκληρο το ένατο εξόνιο του *GA733-1* δεν προκαλείται καμία μεταβολή στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων.²⁰⁴ Όταν ποντίκια, που έχουν απενεργοποιημένο το γονίδιο *GA733-1*, διασταυρώθηκαν με ποντίκια, που έχουν απενεργοποιημένο το γονίδιο *Arf* (*Arf*:γονίδιο καταστολής όγκων, που είναι αδρανοποιημένο σε πολλούς καρκίνους), υπήρξε μια αύξηση στην ογκογένεση (Wang et al., 2011). *GA733-1^{-/-}/Arf^{-/-}* ποντίκια αναπτύσσουν καρκινώματα του δέρματος (DMBA-TPA). Είναι ενδιαφέρον ότι, η απώλεια του γονιδίου GA733-1 σε συνδυασμό με το γονίδιο *Arf* (*GA733-1^{-/-}/Arf^{-/-}*) κατέληξε σε όγκους που ήταν κυρίως μεσεγχυματικής προέλευσης.²⁰⁵ Επιπλέον, ενώ η απενεργοποίηση του γονιδίου GA733-1 από μόνη της δεν μεταβάλλει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κερατινοκυττάρων *in vitro*, *GA733-1^{-/-}/Arf^{-/-}* κερατινοκύτταρα είχαν αυξήσει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους σε σύγκριση με *Arf^{-/-}* ποντίκια. Ο ρόλος στην καρκινογένεση του

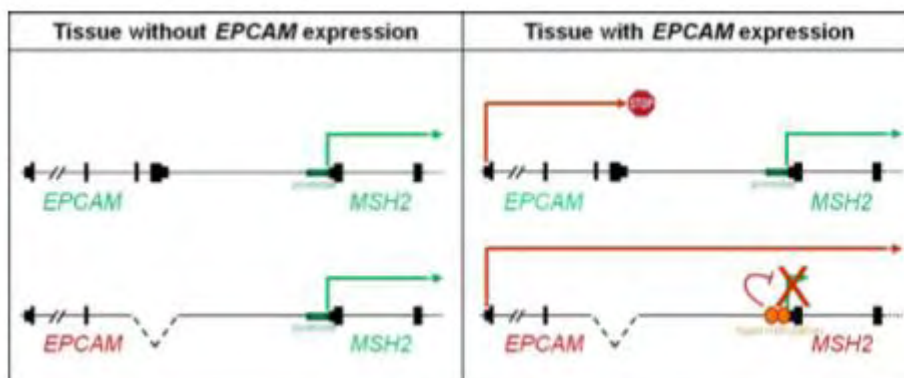
GA733-1 φαίνεται να είναι πιο περίπλοκος από ό,τι προηγούμενες μελέτες δείχνουν. Ο Wang et al προτείνουν ότι το GA733-1 μπορεί να ασκεί την δράση του είτε ως ογκογόνο είτε τροποποιώντας άλλους μηχανισμούς ογκογένεσης.²⁰⁶

5.3. Το γονίδιο GA733-2 και το σύνδρομο Lynch.

Το σύνδρομο Lynch χαρακτηρίζεται από υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου καθώς και την εμφάνιση διάφορων άλλων νεοπλασμάτων εκτός του κολο-ορθικού καρκίνου, ιδιαίτερα του καρκίνου του ενδομητρίου. Το σύνδρομο προκαλείται από μεταλλάξεις που προκαλούν αδρανοποίηση των γονιδίων επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων, τα MLH1, MSH2, MSH6 ή PMS2. Οι ετεροζυγώτες των μεταλλάξεων στο MLH1, MSH2 ή MSH6 έχουν 30-80% αθροιστικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου και για τις γυναίκες 27-71% συνολικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου από την ηλικία των 70 ετών. Παρακολούθηση για τον κολο-ορθικό καρκίνο και τον καρκίνο του ενδομητρίου συνιστάται για όλους τους φορείς των μεταλλάξεων προκειμένου να βελτιωθεί η επιβίωση των ασθενών. Σημαντικό χαρακτηριστικό των όγκων, που προκύπτουν στα πλαίσια του συνδρόμου Lynch, είναι η εμφάνιση μικροδορυφορικής αστάθειας του γονιδιώματος και η απουσία της πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης μίας ή περισσότερων από τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης των αταίριαστων βάσεων. Καθώς το πρότυπο πυρηνικής χρώσης εξαρτάται από το γονίδιο που εμπλέκεται και χρησιμοποιείται, προκειμένου να είναι δυνατόν να γίνει πρόβλεψη για το ποιο γονίδιο είναι φορέας της μετάλλαξης. Για παράδειγμα, η απουσία ενός συνδυασμού των δύο πρωτεϊνών MSH2 και MSH6 στον όγκο σχετίζεται με μετάλλαξη του MSH2. Επίσης μεγάλες διαγραφές συμπεριλαμβανομένου ενός ή πολλών εξονίων είναι μια συγγή αιτία του συνδρόμου Lynch.²⁰⁷ Ορισμένες από αυτές τις διαγραφές επηρεάζουν επίσης το γονίδιο GA733-2 και βρίσκεται μόλις 15 kb παρακείμενα του MSH2.²⁰⁸

Διαγραφή του 3 αμινοτελικού άκρου του γονιδίου GA733-2 χωρίς να επηρεάζεται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του MSH2 παρατηρήθηκαν αρχικά από van der Klift et al. σε μια ομάδα ασθενών που υπήρχε η υποψία του συνδρόμου Lynch.²⁰⁹ Το 2010 η σχέση μεταξύ διαγραφή του 3 αμινοτελικού άκρου του γονιδίου GA733-2 και της απενεργοποίησης του MSH2 ήταν ανεξάρτητα γεγονότα κάτι που αναφέρθηκε από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Ο Kovacs et al. [4] ανίχνευσε τέσσερις διαφορετικές απαλοιφές που περιλαμβάνει τα τελευταία εξόνια του GA733-

2 σε 5 οικογένειες με έναν ή περισσότερους όγκους που εμφανίζουν μικροδορυφορική αστάθεια και απώλεια της πρωτεΐνης MSH2. (Εικόνα 5.2)²¹⁰



Εικόνα 5.2. Ο μηχανισμός αδρανοποίησης του μωσαϊκού MSH2. Ο πάνω πίνακας αντιπροσωπεύει την φυσιολογική κατάσταση στην οποία το MSH2 εκφράζεται ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα του προηγμένου γονιδίου EPCAM. Ο κάτω πίνακας αντιπροσωπεύει την περίπτωση στην οποία έχει διαγραφεί το 3' άκρο του EPCAM, και η μεταγραφή προχωρά πέρα από την αλληλουχία τερματισμού με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του MSH2 σε ιστούς που εκφράζουν το EPCAM.

212

5.4. Ο ρόλος του GA733-2 στην προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων και της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.

Το γονίδιο GA733-2 κωδικοποιεί το μόριο προσκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων EPCAM (CD326) και εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά σε επιθηλιακά κύτταρα φυσιολογικών και παθολογικών ιστών. Σε φυσιολογικούς ιστούς η πρωτεΐνη βρίσκεται στην βασεοπλευρική μεμβράνη, ενώ σε καρκινικούς ιστούς η πρωτεΐνη GA733-2 είναι ομοιογενώς κατανομημένη στην επιφάνεια του κυττάρου. Η πρωτεΐνη GA733-2 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I, η οποία δεν εμπλέκεται μόνο στην κυτταρική προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων (mediating epithelial-specific intercellular adhesion) αλλά, επίσης, και στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, τη μετανάστευση των κυττάρων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Το εξωκυττάριο τμήμα του GA733-2 περιέχει ως τμήμα του ένα

επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) και ενός τμήμα θυρεοσφαιρίνης. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του ErCAM διευκολύνεται από μία ενδο-μεμβρανική πρωτεόλυση κατά την οποία η ενδοκυτταρική περιοχή (ErICD) απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα γίνεται μέρος ενός μεγάλου πυρηνικού συμπλόκου που περιέχει τους μεταγραφικούς ρυθμιστές β-κατενίνης και Lef, οι οποίοι συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt. Η απελευθέρωση της εξωκυττάριας περιοχής μπορεί να εξηγήσει γιατί η χρώσης του ErCAM είναι απύσα στα καρκινικά κύτταρα του κολο-ορθικού εκβλάστη. ^{213,214}

Το ErCAM βρέθηκε ότι εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε βλαστικά κύτταρα από καρκίνο του μαστού, παχέος εντέρου και παγκρέατος. Συνεπώς, εικάζεται ότι το ErCAM μπορεί να παίζει έναν κεντρικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την αυτο-ανανέωση και την ανάπτυξη των βλαστικών καρκινικών κυττάρων χωρίς να απαιτείται η παρουσία επιφάνειας προσκόλλησης.²¹⁵ Από την άλλη πλευρά, η παρατηρούμενη πλήρη απουσία της πρωτεΐνης ErCAM σε ορισμένους κολο-ορθικούς όγκους ασθενών με διαγραφή του 3' άκρο του ErCAM, ή με συνδυασμένο ErCAM-MSH2, υποδεικνύει ότι το ErCAM δεν είναι απαραίτητο για την διατήρηση του όγκου.²¹⁶

Κεφάλαιο 6

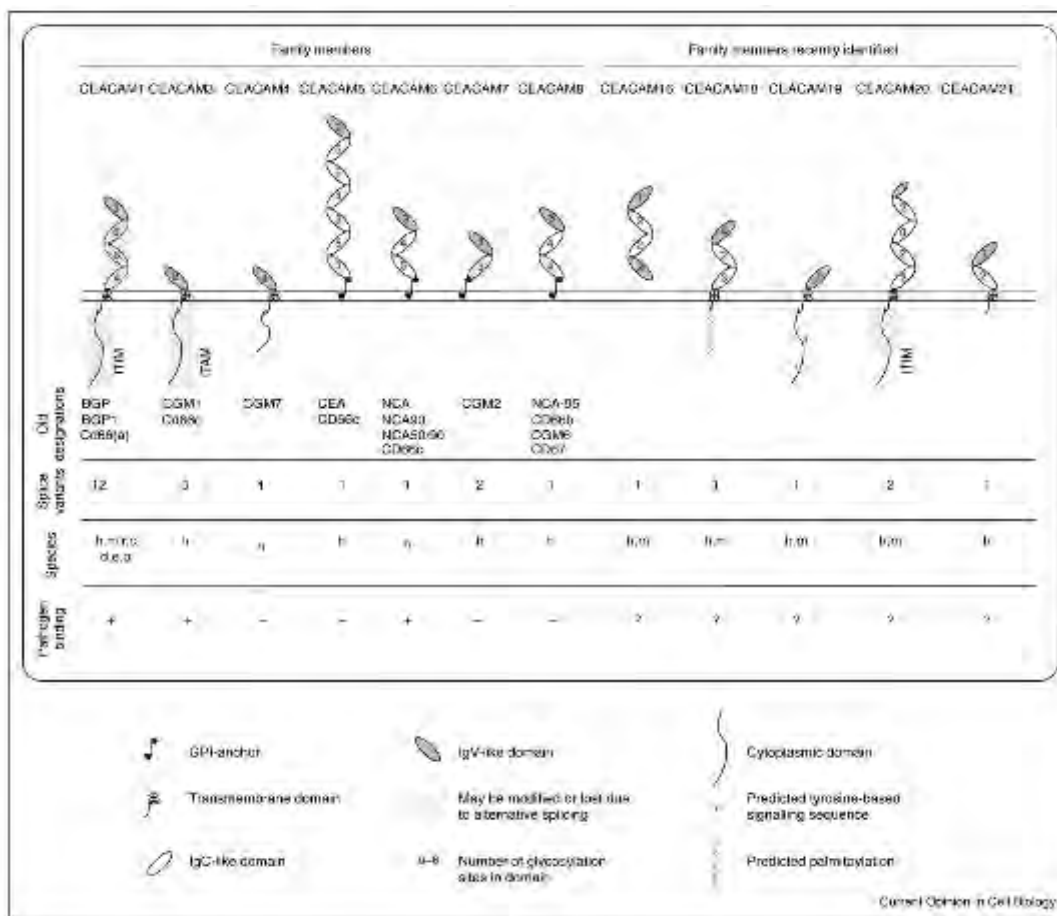
Μόριο CEA.

6.1. Εισαγωγή στα μόρια CEACAMs.

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η διακυτταρική επικοινωνία είναι ζωτικής σημασίας για τη μετακίνηση των κυττάρων στην κατάλληλη θέση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς επίσης και μέσω της κυτταρικής επικοινωνίας τα μεμονωμένα κύτταρα ενσωματώνονται ως μία οντότητα σε λειτουργικούς ιστούς και όργανα και δεν λειτουργούν ανεξάρτητα. Τα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (IgCAMs) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας με αρχέγονη καταγωγή στο ζωϊκό βασίλειο, οι οποίες είναι εξειδικευμένες στην κυτταρική προσκόλληση. Όλα τα IgCAMs αποτελούνται από μία τουλάχιστον ανοσοσφαιρίνη, (Ig)-like περιοχή, μία συμπαγή δομή από 85-110 αμινοξέα που χαρακτηρίζεται από δύο β- τύπου φύλλα σε θέση το ένα απέναντι από το άλλο.²¹⁷ Το Ig τμήμα διαθέτει δύο παραλλαγές και υποδιαιρείται σε δύο τύπων περιοχή, στην Ig μεταβλητή (IgV) και Ig σταθερή (ΔΔ) -1 και -2 περιοχές. Κατά την διάρκεια της εξέλιξης, το Ig τμήμα αποτελεί μία πολύ καλά δομημένη περιοχή, την οποία κωδικοποιούν τα περισσότερα σε αριθμό γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς η περιοχή Ig φαίνεται να αποτελεί μία δομή η οποία έχει την ικανότητα, αποτελώντας τμήμα μίας πρωτεΐνης, να παρέχει στον οργανισμό μόρια που μπορούν να εκτελέσουν μία πλειάδα ενεργειών. Στην περίπτωση της IgCAMs, το ειδικευμένο μόριο πρόσδεσης συχνά συνδέεται με μόρια της ίδιας κατηγορίας ή με μόρια της ίδιας οικογένειας, ένα χαρακτηριστικό που έχει μελετηθεί καλά τόσο γενετικά, όσο βιοχημικά, αλλά και σε επίπεδα δομής.^{218,219}

Ένα σπουδαίο μέλος της υπεροικογένειας των IgCAM είναι και το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), το οποίο εμπλέκεται σε ομοτυπικές και ετεροτυπικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια IgCAMs και το οποίο αποτελεί ένα κλινικό διαγνωστικό δείκτη για την παρακολούθηση ασθενών που πάσχουν από κολο-ορθικό καρκίνο. Το CEA αποτελεί μέλος μίας ομάδας πρωτεϊνών που ονομάζεται οικογένεια CEA-related cell adhesion molecule (CEACAM), μια

υποδιαίρεση της υπεροικογένειας των IgCAMs που μέχρι στιγμής απαντάται μόνο στα θηλαστικά.²²⁰ Η συνολική δομική οργάνωση της ανθρώπινης CEACAMs, ο αριθμός των γνωστών προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος και των αντίστοιχων σε άλλα είδη θηλαστικών παρουσιάζεται στο Εικόνα 6.1. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια των ετών, τα μέλη της οικογένειας CEACAM έχουν λάβει διάφορες αλλαγές στην ονοματολογία τους, για παράδειγμα, η αρχική γλυκοπρωτεΐνη χολής (BGP), χαρακτηρίστηκε αργότερα ως το αντιγόνο CD66a και τώρα έχει γίνει CEACAM1 (εξέλιξη της ονοματολογίας βλέπε Εικόνα 6.1). Αν και τα μόρια CEACAMs έχουν μελετηθεί για δεκαετίες για την λειτουργία τους σε διάφορες μορφές όγκων,²²¹ όπως προκύπτει από τις πρόσφατες μελέτες, τα μέλη αυτής της οικογένειας συμμετέχουν σε κρίσιμες ρυθμιστικές λειτουργίες στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Επιπλέον, αυτοί οι υποδοχείς έχουν εντοπιστεί να αποτελούν στόχο διάφορων παθογόνων βακτηρίων και ιών μέσω των οποίων είναι ικανοί να αποικίσουν τους ξενιστές.²²²



Εικόνα 6.1. Σύνοψη της οικογένειας των CEACAMs στον ανθρώπινο οργανισμό.²²³

6.2. CEA.

Στα μέσα της δεκαετίας του 1960, αναγνωρίστηκε συσχέτιση του αντιγόνου CEA με τον καρκίνο του παχέος εντέρου στον άνθρωπο.²²⁴ Το μόριο CEA είναι προϊόν του γονιδίου CEACAM5 και χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι αποτελείται από επτά εξωκυττάριας περιοχές Ig και ένα μόριο γλυκοζυλο-φωσφατιδυλινοσιτόλη (GPI). Παρόμοια δομή έχει βρεθεί σε αρκετές άλλες πρωτεΐνες, που αποτελούν μέλη της οικογένειας CEACAM, όπως η CEACAM6, CEACAM8 και θα μπορούσε να είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους το διαλυτό CEA μπορεί να ανιχνευθεί στον ορό. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση των μελών της οικογένειας περιορίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα και το CEA εντοπίζεται σε μεγάλη ποσότητα στα κύτταρα του γαστρεντερικού επιθηλίου, αλλά επίσης και στο επιθήλιο άλλων βλεννογόνων, όπως ο ρινοφάρυγγας, ο πνεύμονας, η ουρογεννητική οδός καθώς και οι ιδρωτοποιοί αδένες.²²⁵ Είναι σημαντικό ότι, μέχρι σήμερα πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας δεν έχουν ταυτοποιηθεί σε μη πρωτεύον είδος, καθιστώντας αυτήν την πρωτεΐνη ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των ειδών αυτών. Το CEA μπορεί να μεσολαβήσει μέσω ομότυπης ή ετερότυπης σύνδεσης με ένα από τα διάφορα μέλη της οικογένειας CEACAM και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται διακυττάρια επικοινωνία.²²⁶ Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως με την μεσολάβηση του IgV-like N-terminal domain και φαίνεται να εμπλέκει ένα από τα δύο β-φύλλα (H CFG-face) του Ig τμήματος.²²⁷ Η υπερέκφραση του CEA 10-30 φορές (ένα επίπεδο παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται σε νεοπλασίες στον άνθρωπο) ή υπερέκφραση του CEACAM6, που αποτελεί ένα άλλο GPI-συνδεδεμένο μέλος της οικογένειας CEACAM, έχει δείχθει ότι διαταράσσει την αρχιτεκτονική των ιστών που παρατηρούνται σε 3D καλλιέργειες πολλών κυτταρικών σειρών από κολο-ορθικό καρκίνο.²²⁹ Επίσης, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν μέλη της οικογένειας CEACAMs έχουν αυξημένη πιθανότητα να σχηματίζουν όγκους στο παχύ έντερο μετά από θεραπεία μετά από αζοξυμεθάνιο.²³⁰ Όταν οι μυοβλάστες εκφράζουν το CEA ή το CEACAM6 μειώνεται η απόπτωση, ενισχύοντας την υπόθεση για ένα ρόλο των εν λόγω μελών της οικογένειας CEACAMs που συμβάλλουν στην ανώμαλα αυξημένη κυτταρική προσκόλληση. Όπως φαίνεται για το CEA, η αναστολή της απόπτωσης απαιτεί το IgV-like αμινο-τελικό τμήμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι για την προσκόλληση και την αλληλεπίδραση μεσολαβεί αυτό το τμήμα του CEA.²³¹ Ωστόσο, τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το CEA κάτω από τον φυσιολογικό έλεγχο (CEAtg) δεν

παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασιών, ακόμη και με την απουσία μίας λειτουργικής πρωτεΐνης APC.²³²

6.3. CEACAM1.

Ο CEACAM1 έχει την ευρύτερη κατανομή στους ιστούς σε σχέση με τα άλλα μέλη της οικογένειας. Αυτός ο υποδοχέας δεν είναι μόνο εντοπισμένος στα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά επίσης στα λευκοκύτταρα και μπορεί να εκφραστεί σε άλλα κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα ή T-κύτταρα. Ο CEACAM1 υπόκειται σε έναν αριθμό παράλληλων ματισμάτων με τις περισσότερες ισομορφές να εμπεριέχουν ένα διαμεμβρανικό τμήμα και είτε μία μακριά (L) είτε μία κοντή (S) κυτταροπλασματική περιοχή.²³³ Οι ισομορφές «L» περιλαμβάνουν 70 αμινοξέα (71 στον άνθρωπο) στο κυτταροπλασματικό τμήμα και περιλαμβάνουν σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη, τα οποία μπορούν να υποστούν φωσφορυλίωση και να λάβουν μέρος στο σήμα μεταγωγής και αλληλεπιδράσεως πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε αντίθεση, οι S'-ισομορφές περιλαμβάνουν μόνο 10 κυτταροπλασματικά αμινοξέα και δεν διαθέτουν τις θέσεις για φωσφορυλίωση. Και οι δύο ισομορφές CEACAM1 εκφράζονται παράλληλα στους ιστούς που εκφράζουν το CEACAM1, ενώ η αναλογία μεταξύ των δύο ισομορφών καθορίζει την έκβαση της σηματοδότησης [16,17].²³⁴ Η παρουσία δύο μορίων τυροσίνης στο μακρύ σκέλος της κυτταροπλασματικής περιοχής αποτελούν μία λειτουργική περιοχή αναστολής ανοσοϋποδοχέα βασισμένο σε τυροσίνη (ITIM) [18]²³⁵ υπεύθυνη για την ανασταλτική δραστηριότητα της CEACAM1. Μόρια ομόλογα του CEACAM1 έχουν ταυτοποιηθεί σε τρωκτικά και μια σειρά άλλων θηλαστικών [19],²³⁶ καθιστώντας αυτό μέλος της οικογένειας κατάλληλο για *in vivo* πειραματισμό. Πράγματι, η γενετική απαλοιφή της CEACAM1 από το γονιδίωμα του ποντικού και η παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών εκφράζουν ορισμένες μεταλλάξεις που έδειξαν πρόσφατα ρυθμιστικό ρόλο για CEACAM1 στη νεοαγγείωση, τον μεταβολισμό της ινσουλίνης, ρύθμιση των T-κυττάρων και ογκογένεση.²³⁷

6.4. CEACAM 5/6.

Το CEACAM5 και το CEACAM6 είναι δύο αντιγόνα που σχετίζονται με την καρκινογένεση και διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και την χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων.²³⁸ Η υπερέκφραση του CEACAM6 σχετίζεται με φτωχή μέση επιβίωση και χαμηλή περίοδο ελεύθερης νόσου, ενώ το CEACAM5 δεν φαίνεται να έχει συσχέτιση με αυτά τα αποτελέσματα.²³⁹ Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του CEACAM5 επηρεάζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα, ασκώντας προστατευτική δράση στα καρκινικά κύτταρα του κόλπου από διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα, όπως όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με 5-φθοριουρακίλη.²⁴⁰ Ως εκ τούτου, η έκφραση CEACAM5 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της ανθεκτικότητάς τους στους αποπτωτικούς θεραπευτικούς παράγοντες. Οι Ordonez et al. αναφέρουν ότι η έκφραση τόσο του CEACAM5 όσο και του CEACAM6 παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων όταν εκλείπει το εξωκυττάριο τμήμα τους, μια διαδικασία γνωστή ως αποϊκίς.²⁴¹ Αυξημένη έκφραση του CEACAM6 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίζεται με μειωμένη ευαισθησία σε φάρμακα, όπως η γεμισιταμίνη.²⁴² Επομένως τα δύο αυτά μόρια, το CEACAM5 ή / και το CEACAM6 μπορούν να αποτελέσουν αντικείμενο στοχευμένης θεραπείας μέσω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν τον μηχανισμό της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Έχει αναφερθεί ότι το siRNA των CEACAM6 μειώνει την αντίσταση στην αποϊκίς.²⁴³ Αντισώματα που στοχεύουν τους υποδοχείς των CEACAM6 μπορεί να παρέχουν μία εναλλακτική τεχνική έναντι της RNA σίγασης ως μέθοδο παρεμβολής για την ενίσχυση της απόκρισης στη χημειοθεραπεία σε όγκους που εκφράζουν το CEACAM6. Μέχρι σήμερα, οι παγκρεατικοί όγκοι και οι όγκοι του παχέος εντέρου αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της έκφρασης του CEACAM6,²⁴⁴ αν και έχει γίνει και μελέτη σε όγκους του μαστού, του πνεύμονα, των ωοθηκών και του προστάτη. Η έκφραση είναι άμεσα εξαρτώμενη με τον ιστολογικό τύπο του όγκου αν και οι διαφορές και των CEACAM5/6 είναι συνάρτηση με τον ιστολογικό τύπο.²⁴⁵

Σε μελέτες που ανέλυσαν το πρότυπο έκφρασης του CEACAM6 σε πρωτοπαθείς όγκους και μεταστάσεις έδειξαν ότι στις μισές περιπτώσεις των ασθενών με μεταστάσεις στο ήπαρ είχαν πολύ υψηλότερη έκφραση του CEACAM6 σε σχέση με τον πρωτοπαθή όγκο κυρίως στους ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο, γεγονός, που υποδηλώνει, ότι σε αυτούς τους ασθενείς η έκφραση του CEACAM6 θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να δημιουργήσουν

μεταστάσεις.²⁴⁶ Εντούτοις, η έκφραση του CEACAM6 σε λεμφαδενικές μεταστάσεις ήταν παρόμοια με την έκφραση του σε πρωτοπαθείς όγκους του καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου ή δείγματα όγκων του πνεύμονα, μη εμπλέκοντας τα μόρια της οικογένειας του CEACAM στην διήθηση επιχώριων λεμφαδένων.²⁴⁷ Αντίθετα, το μόριο CEACAM6 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση, διήθηση και προσκόλληση,²⁴⁸ τα βήματα που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη μεταστάσεων σε άλλα όργανα, χωρίς να περιλαμβάνονται οι λεμφαδενικές μεταστάσεις.²⁴⁹

Έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι το ανθρώπινο αντι-CEA (CEACAM5) αντισώμα, MN-14, μπορεί να ενισχύσει τη θεραπευτική δράση των δύο κυτταροτοξικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στον κολο-ορθικό καρκίνο, την φθοριοουρακίλη και CPT-11, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών.²⁵⁰ Παρόμοια αποτελέσματα είχαν αυτά τα αντισώματα και στην περίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της dacarbazine, ένα φάρμακο που δραστηριοποιείται σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.²⁵¹ Ο Duxbury και συνεργάτες έχει δείξει ότι η σίγαση του CEACAM6 με siRNA: (α) ενισχύει την κυτταρική αποίκις, (β) αυξάνει την ενεργοποίηση της κασπάσης σε απάντηση στην αγκύρωση ανεξαρτήτως συνθηκών, (γ) ασκεί αρνητικό ρυθμιστικό μηχανισμό στο μονοπάτι κυτταρικής επιβίωσης Akt, (δ) αναστέλλει την ανάπτυξη μεταστάσεων σε πειράματα *in vivo*, και (ε) αυξάνει την δράση της γεμισιταμπίνης στην χημειοευαισθησία.²⁵²

Κεφάλαιο 7

Αγγειοποιητίνες-1/-2.

7.1. Αγγειογένεση.

Η αγγειογένεση αποτελεί διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων από ένα προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο και διακρίνεται (α) σε φυσιολογική, που αναστέλλεται σε χρονικό διάστημα ημερών ή και εβδομάδων²⁵³ και συμπεριλαμβάνει την φάση της εγκυμοσύνης, την επούλωση τραυμάτων, επιδιόρθωση ιστών και αναγέννηση οργάνων, και (β) σε παθολογική, που εξελίσσεται χρονίως και συνδυάζεται με τον καρκίνο και τις μεταστάσεις, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, ψωρίαση, ρευματοειδή αθρίτιδα κα.^{254,255}

Η αγγειογένεση είναι μία περίπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες που συμβάλλουν ταυτόχρονα και με συντονισμένο τρόπο. Προκειμένου να προαχθεί η διαδικασία της αγγειογένεσης απαιτείται η απόσπαση των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECM) από την περικυττάρια και εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix-ECM), ακολούθως πολλαπλασιάζονται, μεταναστεύουν και σχηματίζουν τριχοειδή αγγεία που συνδέονται με άλλες νεότευκτες αγγειακές δομές.²⁵⁶ Επακόλουθο είναι ο σχηματισμός ενός πρωτόγονου αλλά λειτουργικού αγγειακού δικτύου. Υπάρχουν πρόσφατα στοιχεία, που καταδεικνύουν, ότι η παρουσία συγκεκριμένων κυτοκινών μεσολαβεί προκειμένου τα ενδοθηλιακά κύτταρα να διατηρούν ή μη την δομή τους.²⁵⁷ Οι παράγοντες αυτοί, είτε ασκούν προστατευτική δράση έναντι της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, είτε διευκολύνει την απόκριση στους μιτογενείς παράγοντες. Οι αγγειοποιητίνες είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών, που μεσολαβούν στην σταθερότητα και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

7.2. Οι αγγειοποιητίνες και οι υποδοχείς τυροσίνης κινάσης (Tie-2).

Οι αγγειοποιητίνες είναι μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων, που είναι ειδικευμένοι για το αγγειακό ενδοθήλιο. Η ειδική αυτή δράση των αγγειοποιητινών

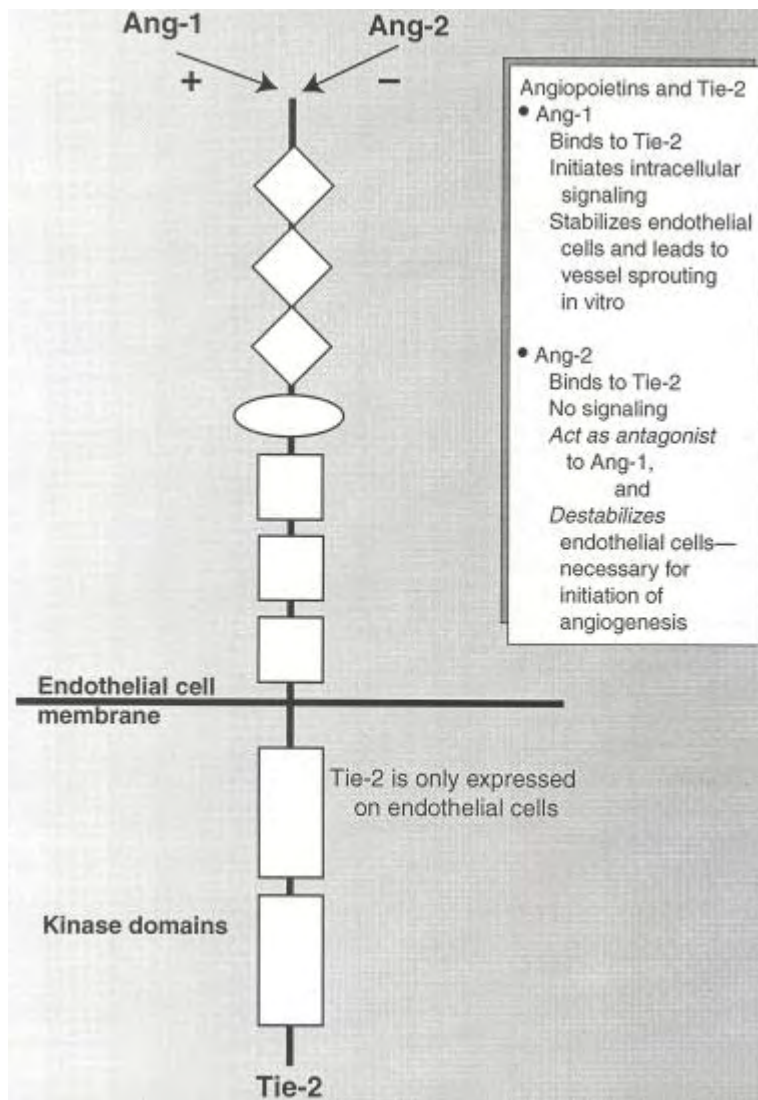
οφείλεται στο ότι οι υποδοχείς των πρωτεϊνών αυτών, που είναι οι υποδοχείς τυροσίνης κινάσης Tie-2 (που είναι γνωστοί και ως TEK²⁵⁸), έχουν περιορισμένη κατανομή στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχουν περιγραφεί συνολικά τέσσερις διαφορετικές αγγειοποιητίνες, οι αγγειοποιητίνες 1,-2, -3 και -4 (Ang-1,-2,-3,-4).^{259,260,261} Οι καλύτερα μελετημένες αγγειοποιητίνες είναι η αγγειοποιητίνη 1 και 2. Η Ang-1 ασκεί τη βιολογική της δράση μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα Tie-2, όπου και επάγει την φωσφορυλίωση του Tie-2.^{262,263} Η Ang-1 μπορεί να ελέγχει την ικανότητα σταθεροποίησης της δομής των ECS και να ρυθμίσει τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων. Μελέτες in vivo με στοχευμένη γονιδιακή απενεργοποίηση της Ang-1 αποκάλυψε ότι η Ang-1 ασκεί σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση και διατήρηση περιενδοθηλιακών υποστηρικτικών κυττάρων.²⁶⁴ Η Ang-2 έχει ανταγωνιστική δράση ως προς την Ang-1, η οποία επίσης δεσμεύεται στον υποδοχέα Tie-2, αλλά δεν επάγει την φωσφορυλίωση. Ωστόσο, σε υπερβολικά μεγάλες δόσεις της, η Ang-2 μπορεί επίσης να εκκινήσει την διαδικασία επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.²⁶⁵ Ο υποδοχέας Tie-1 είναι ένας ορφανός υποδοχέας, αλλά δεν έχει προσδιοριστεί ποιο μόριο συνδέεται με αυτόν.

Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει με in vitro μελέτες, ότι η Ang-1 χρησιμεύει ως παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο Kwak και συν εξέτασαν την επίδραση της Ang-1 επί της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινες ομφαλικές φλέβες (HUVECs).²⁶⁶ Η Ang-1 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο ανέστειλε την απόπτωση, με δόσεις τόσο χαμηλές όσο 50 ng / mL. Επιπλέον, η προσθήκη 20 ng / mL VEGF (ένας ισχυρός αγγειογόνος παράγοντας, γνωστός ότι μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων) μαζί με 200 ng / mL Ang-1 αύξησε την αντιαποπτωτική επίδραση της Ang-1, υποδηλώνοντας, ότι η Ang-1 έδρασε συνεργατικά με τον παράγοντα VEGF. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν σε μία άλλη μελέτη, όπου αποδείχθηκε η σταθερότητα των HUVECs από δοσοεξαρτώμενη χορήγηση Ang-1.²⁶⁷ Επιπλέον, στις παραπάνω μελέτες δείχθηκε ότι αυτή η απόκριση ήταν πράγματι εξαρτώμενη από τους υποδοχείς Tie-2, διότι η προσθήκη μιας διαλυτής μορφής του Tie-2 εμπόδιζε την δράση της Ang-1, αλλά όχι μετά την προσθήκη της διαλυτής μορφής του υποδοχέα Tie-1. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το μονοπάτι σηματοδότησης, μέσω του οποίου η Ang-1 ασκεί την προστατευτική της δράση έναντι της απόπτωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι μέσω της φωσφορυλίωσης της σαρβαϊβίνης και της σερίνης-θρεονίνης κινάσης, Akt.^{268,269} Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν, ότι η ενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών οδών, που

προκαλούνται από την Akt και σαρβαϊβίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μπορεί να διευκολύνει η Ang-1 μέσω της σταθεροποίησης των αγγειακών δομών κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης.²⁷⁰

Είναι πιθανό ότι η Ang-1 να λειτουργεί σε συνδυασμό με το VEGF με σκοπό την σταθεροποίηση των αγγειακών δομών. Η Ang-1 φαίνεται να στρατολογεί περιενδοθηλιακά κύτταρα²⁷¹ και αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό υποστηρίζεται από στοιχεία που δείχνουν, ότι τα έμβρυα που στερούνται το γονίδιο Ang-1 είναι σε θέση να υποβληθούν σε αγγειογένεση εξαρτώμενη από τον VEGF, αλλά τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με περιενδοθηλιακά κύτταρα υποστήριξης.²⁷² Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η παρουσίαση προβλημάτων στα αγγεία. Η Ang-2 είναι μία ανταγωνιστική πρωτεΐνη της Ang-1 και οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.²⁷³

Αναστολή της δραστηριότητας των Angs από διαλυτό Tie-2 έχει διερευνηθεί ως μια μέθοδο αναστολής της αγγειογένεσης. Ερευνητές κατασκεύασαν έναν φορέα-αδενοϊό που περιέχει την εξωκυτταρική περιοχή του ποντικίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Tie-2, το οποίο μπορεί να παρέχει συστηματικά διαλυτή μορφή του υποδοχέα Tie-2 (AdExTek).^{274,275} Η χορήγηση διαλυτών υποδοχέων Tie-2 (AdExTek) ανέστειλε την ανάπτυξη πρωτοπαθών και μεταστατικών όγκων σε ποντίκια. Δεν είναι σαφές πάντως αν οι παρατηρούμενες επιδράσεις οφείλονται στην παγίδευση της Ang-1 ή της Ang-2. (Εικόνα 7.1.)



Εικόνα 7.1. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των Η Ang-1 και η Ang-2 σε σχέση με τον υποδοχέα Tie-2.²⁷⁶

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΚΟΠΟΣ

Κεφάλαιο 8

Σκοπός

8.1. Σκοπός.

Ο κολο-ορθικός καρκίνος είναι μία ετερογενής νόσο, η ετερογένεια της οποίας αντικατοπτρίζει και την διαφορετική θεραπευτική στρατηγική που ακολουθείται σε κάθε ασθενή. Σε ορισμένους ασθενείς είναι επαρκής μόνο η χειρουργική εκτομή, ενώ σε άλλους είναι ενδεδειγμένη η χορήγηση επικουρικής θεραπείας είτε πριν είτε μετά την χειρουργική εκτομή.²⁷⁷ Η απόφαση, που αφορά την λήψη συμπληρωματικής θεραπείας, τροποποιείται σε κάθε ασθενή και σχετίζεται με την επιθετικότητα της νόσου. Ο προσδιορισμός της επιθετικότητας της νόσου καθορίζεται σε κάποιο βαθμό από το στάδιο της αλλά και από την βιολογία του όγκου, που διαφοροποιείται από ασθενή σε ασθενή. Στον εντοπισμό αυτής της διαφορετικότητας της νόσου σε κάθε ασθενή σημαντικό ρόλο έχουν ο Ογκολόγος, ο Παθολογοανατόμος και ο Μοριακός Βιολόγος. Η ωφελιμότητα της χημειοθεραπείας, επί παραδείγματι, ίσως να είναι μικρή σε ασθενείς με όγκο με περιορισμένους παράγοντες κινδύνου και η ασθένεια να έχει μία πολύ καλή πορεία με την χειρουργική αφαίρεση μόνο, ενώ αντίθετα όταν ο όγκος περιγράφεται ως υψηλού κινδύνου για επανεμφάνιση, τότε η χημειοθεραπεία θα περιορίσει αυτό το ενδεχόμενο και θα ενισχυθεί ακόμη περισσότερο η πιθανότητα θεραπείας.

Η μοριακή βιολογία μας επιτρέπει σήμερα να βρούμε μοριακές μεταλλάξεις στον όγκο, οι οποίες διαφοροποιούν τη νόσο και αφορά την ανταπόκρισή της στη θεραπεία, προσφέροντας μέχρι τώρα διάφορα εργαλεία, όπως είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο K-RAS ως προβλεπτικού δείκτη για τη θεραπεία με τους anti- EGFR βιολογικούς παράγοντες, καθώς και μοριακούς δείκτες, όπως για παράδειγμα τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Η εξατομίκευση της θεραπείας συμβάλλει στο βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα για τον ασθενή με τη μικρότερη τοξικότητα, ενώ θα αποφεύγεται η ανώφελη οικονομική επιβάρυνση του συστήματος υγείας.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι εστιασμένη στην προσπάθεια να αποκωδικοποιηθεί η γενετική φύση του κολο-ορθικού καρκίνου, μελετώντας και τις

διάφορες φάσεις εξαλλαγής των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και της ικανότητάς τους να επεκτείνονται, να διηθούν και να μεθίστανται. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν δείγματα από ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο. Από αυτούς τους ασθενείς απομονώθηκε γενετικό υλικό τόσο από τα καρκινικά κύτταρα του όγκου όσο και από κύτταρα του μη νοσούντος εντερικού βλεννογόνου από παρακείμενες θέσεις προκειμένου να παρατηρήσουμε την έκφραση γονιδίων στο φυσιολογικό και παθολογικό ιστό του εντερικού βλεννογόνου. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: α) τα γονίδια GA733-1, G1733-2, CEACAM5, Ang1 και Ang-2, που το καθένα από αυτά πιθανόν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Το κάθε ένα από τα μόρια αυτά θεωρείται ότι είτε μεταβάλλονται στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μεταγωγή σημάτων κατά την φάση της καρκινογένεσης με αποτέλεσμα τη γέννηση παθολογικών κυτταρικών κλώνων, είτε συμβάλλουν στην ικανότητα των καρκινικών όγκων να αναπτύσσονται, να διηθούν και να μεθίστανται σε παρακείμενες δομές. Η παραπάνω μελέτη θεωρείται ότι θα συμβάλει στην καλύτερη χαρτογράφηση της βιολογίας του κολο-ορθικού καρκίνου με αποτέλεσμα την ορθολογική και αποτελεσματική θεραπεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κεφάλαιο 9

Υλικά και μέθοδοι.

9.1. Υλικό.

Το υλικό της παρούσας μελέτης είναι:

- α) Σαράντα-ένα (41) ασθενείς με προεγχειρητική διάγνωση κολο-ορθικού καρκίνου, που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση στην Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.
- β) Λήψη καρκινικού και φυσιολογικού ιστού από τους παραπάνω ασθενείς.

9.2. Μεθοδολογία.

9.2.1. Απομόνωση RNA από ιστό

Για την απομόνωση του RNA από τον ιστό τόσο τον καρκινικό όσο και το φυσιολογικό ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

Την πρώτη ημέρα:

- Η λήψη του ιστού έγινε σε συνεργασία με παθογοανατόμο. Στην περίπτωση που δεν ακολουθούσε άμεση επεξεργασία, ο ιστός αποθηκευόταν στους -80°C.
- Προσθήκη 1600μl RNAsol (με αναλογία 100μl/ 10⁶ κυττάρων), σε σωληνάριο falcon που υπάρχει ο ιστός και διαλυτοποίηση του ιστού.
- Προσθήκη χλωροφορμίου 1/10 του όγκου του RNAsol και ανάδευση ώστε το μίγμα να γίνει ομοιογενές.
- Παραμονή στον πάγο για 15 min με περιοδική ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 1900 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα έχει διαχωριστεί στην υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο, στη μεσόφαση και στην υπερκείμενη υδατική φάση, όπου βρίσκεται το RNA.

- Συλλογή υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο erpendorf, προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης και φύλαξη overnight στους -20 °C.

Την επόμενη ημέρα (δεύτερη ημέρα):

- Φυγοκέντρηση επί 30' στις 12000 rpm στους 4 °C.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml αιθανόλης (70%).
- Φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες επί 20'.
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας δύο ακόμη φορές.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Διάλυση του ιζήματος, που περιέχεται το RNA, σε νερό ελεύθερο από RNάσες.
- Αποθήκευση στους -80°C.
- Έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε 2% gel αγαρόζης.
- Φωτομέτρηση στα 260 και 280nm για τον ποσοτικό έλεγχο του RNA. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280 nm πρέπει να κυμαίνεται από 1,7 έως 1,9. Η συγκέντρωση του RNA (μg/ml) βρίσκεται από τον τύπο $OD_{260} \times 40 \times \text{αραιώση}$.

9.2.2. Καθαρισμός RNA

- Προσθήκη ddH₂O στο σωληνάριο με το RNA σε τελικό όγκο 100μl. Προσθήκη 350 μl Buffer RLT και καλή ανάδευση.
- Προσθήκη 250μl αιθανόλης (100%) και καλή ανάδευση.
- Μεταφορά του δείγματος σε RNAeasy Mini spin στήλη. Φυγοκέντρηση για 15sec στις 10000rpm και απόρριψη του υποκειμένου.
- Προσθήκη 500μl Buffer RPE στην RNAeasy spin στήλη. Φυγοκέντρηση για 15sec στις 10000rpm και απόρριψη του υποκειμένου.
- Προσθήκη 500μl Buffer RPE στην RNAeasy spin στήλη. Φυγοκέντρηση για 2min στις 10000rpm (πλύση της στήλης) και απόρριψη του υποκειμένου.
- Προσθήκη 35 μl ddH₂O στη στήλη και φυγοκέντρηση για 60sec στις 10000rpm.

9.2.3 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) *in vitro* χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random primers, 500μg/ml) και ένζυμο την αντίστροφη μεταγραφάση MML-V (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 1200U/μl). Χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, ρυθμιστικό διάλυμα (RT buffer) (5x) και δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) σε συγκέντρωση 40 mM. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό κυτταρικό RNA, το οποίο αρχικά θερμάνθηκε στους 65°C για 10' προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA. Ακολούθησε παραμονή στον πάγο για 5' και προσθήκη στη συνέχεια της αντίστροφης μεταγραφάσης, του 5x διαλύματος και των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) (Πίνακας 9.1).

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 40 μl και οι συνθήκες οι εξής:

1. 37 °C για 60 λεπτά
2. 94 °C για 2 λεπτά
3. Φύλαξη στους 4 °C

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
RT buffer 5x*	8 μl
dNTPs (40 mM)	4 μl
Τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (3 μg/μl)	2 μl
MML-V RT (1200U/μl)	2 μl
Υπόστρωμα:	
RNA	** μg
ddH ₂ O	*** μl

Πίνακας 9.1. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη σύνθεση cDNA μορίων.

* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος (RT buffer) 5x: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂

** Ο όγκος του RNA υπολογίζεται έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1μg/ 20 μl τελικού όγκου.

*** Ο όγκος του H₂O είναι τέτοιος ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε δείγμα να είναι 40μl.

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφο “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RAR α (retinoic acid receptor α), το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 3μl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR (Πίνακας II) χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RAR α cDNA (RAR6/RAR8, Πίνακας 9.2).²⁷⁸

9.2.3.1. Συνθήκες αντίδρασης για τη σύνθεση του cDNA

-αρχική αποδιάταξη: 94°C για 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

 φάση αποδιάταξης: 94°C για 1 λεπτό

 φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C για 1 λεπτό

 φάση σύνθεσης μορίων DNA: 72°C για 1 λεπτό

-τελική σύνθεση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C για 10 λεπτά.

Πίνακας 9.2. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης RARα.

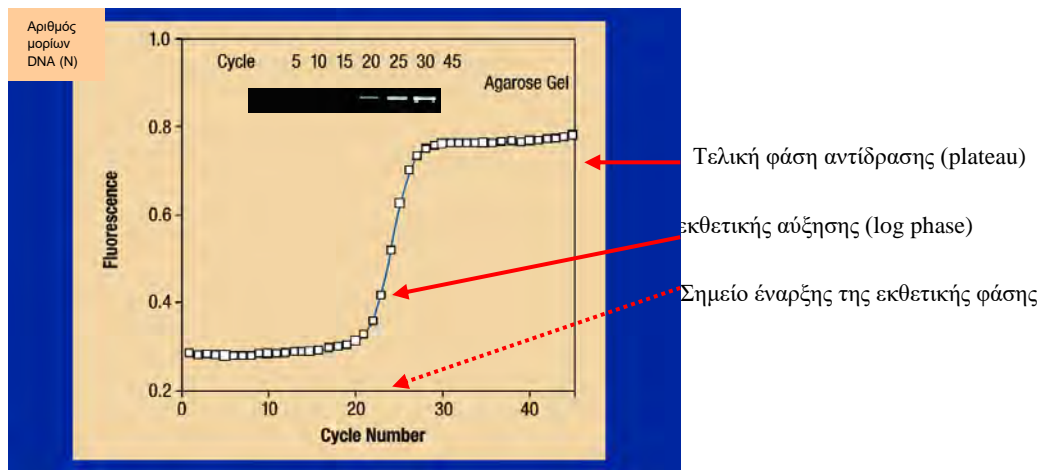
Αντιδραστήρια	Όγκοι
Υπόστρωμα: cDNA	3 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5 μl
MgCl ₂ (50mM)	2 μl
dNTPs (40mM)	1 μl
RAR6 (10pm/μl)	2 μl
RAR8 (10pm/μl)	2 μl
Taq DNA πολυμεράση (5 units/μl)	0,4 μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl

9.3. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του GA733-1, GA733-2, CEA, ANG-1, ANG-2 με την τεχνική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

9.3.1. Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των

ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR). Πρόκειται για τη διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης Real-time PCR. Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR, ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση (Εικόνα 9.1). Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιϊκό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, αναφορές για διάκριση αλληλομόρφων και επιβεβαίωση δεδομένων από μικροσυστοιχίες, ποσοτικοποίηση χμιαρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα υπό μελέτη.²⁷⁹



Αριθμός κύκλων
(Cycle number)

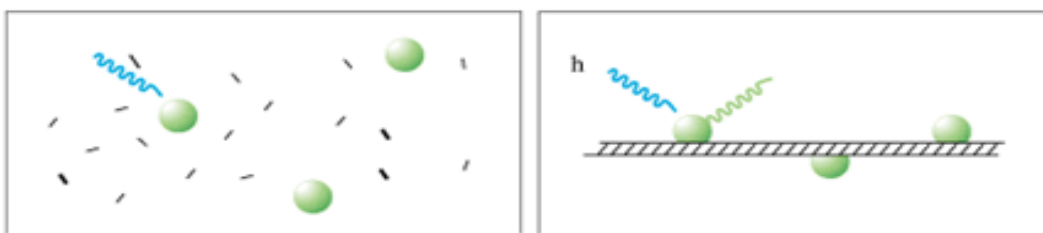
Αρχική φάση αύξησης (background)

Εικόνα 9.1. Κινητική της αντίδρασης της PCR.

Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR) (Εικόνα 9.2):

- Ανάλυση με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης
- Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού (Hybprobes)

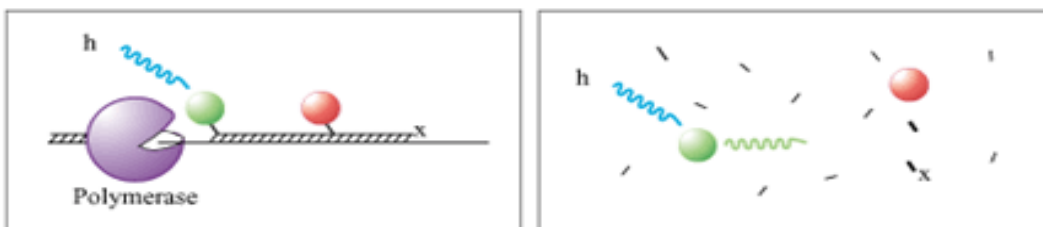
I. SYBR Green



II. Hybridization Probes



III. TaqMan Probes

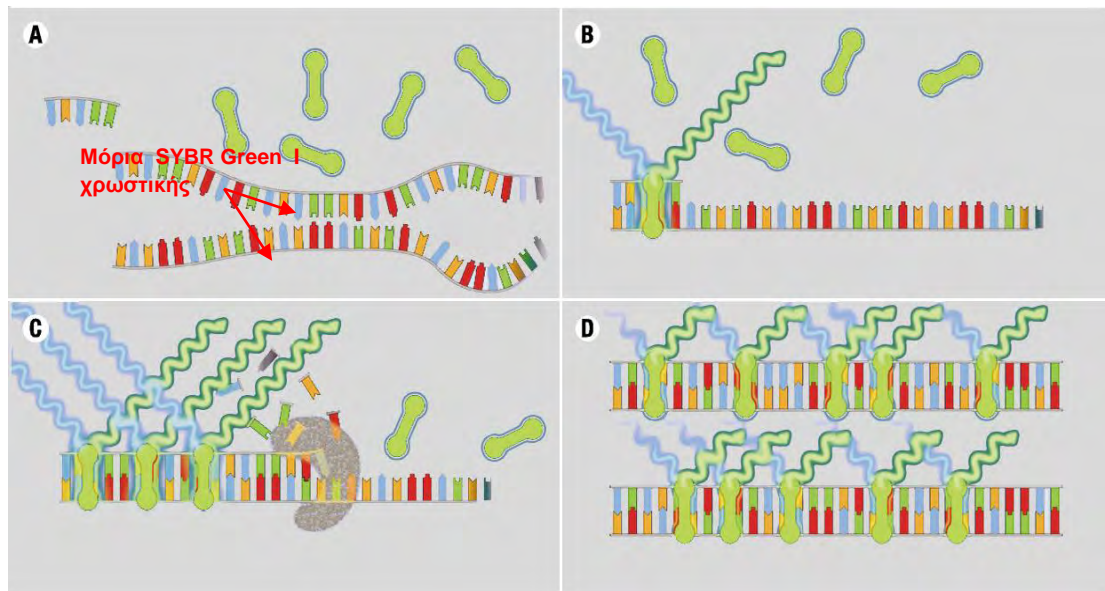


Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης.

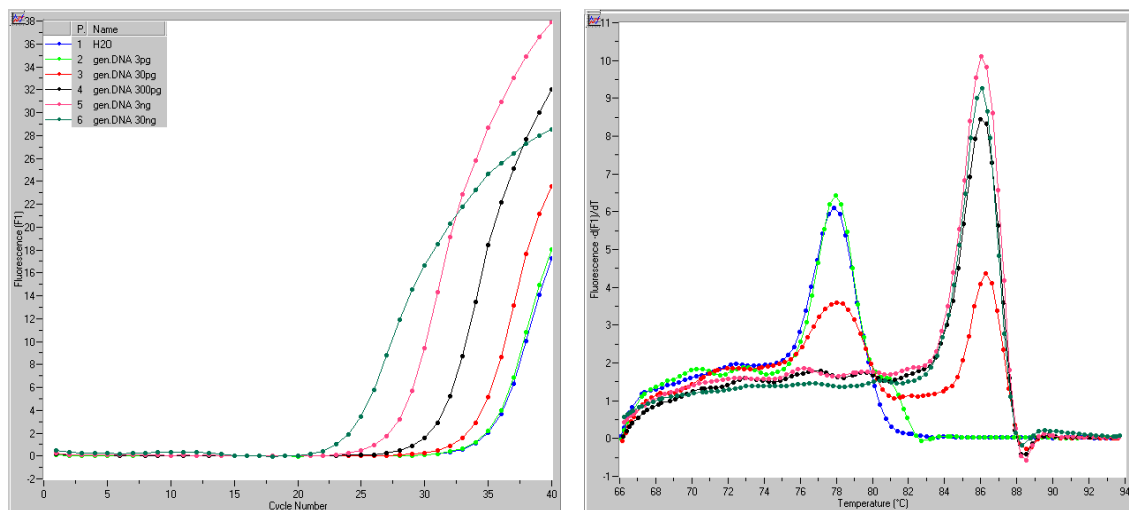
9.3.1.1. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.

Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικόνα 9.3). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα

είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης (Εικόνα 9.4).^{280,281,282}



Εικόνα 9.3. Η χρωστική SYBR Green I παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.



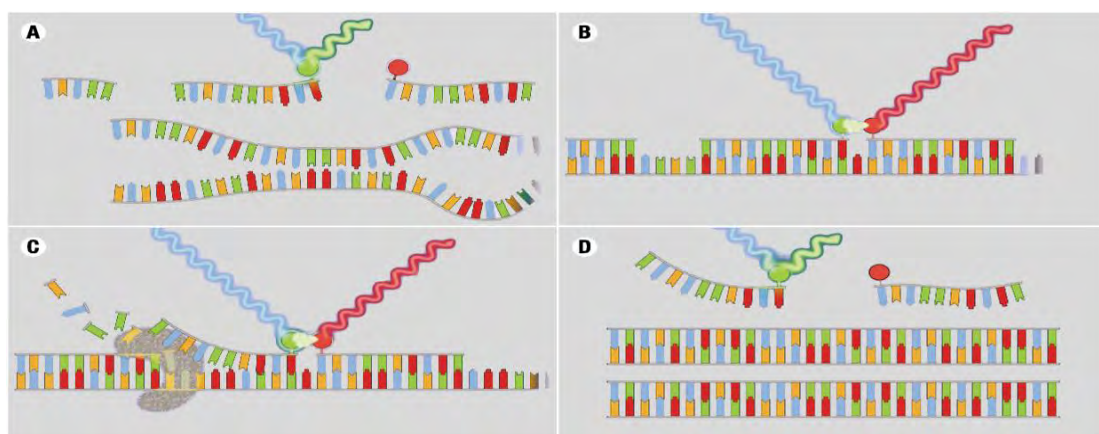
Ποσοτικοποίηση

Καμπύλη τήξης των προϊόντων PCR

Εικόνα 9.4. Παρακολούθηση της PCR με τη χρήση της SYBR Green I χρωστικής.

9.3.1.2. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης.

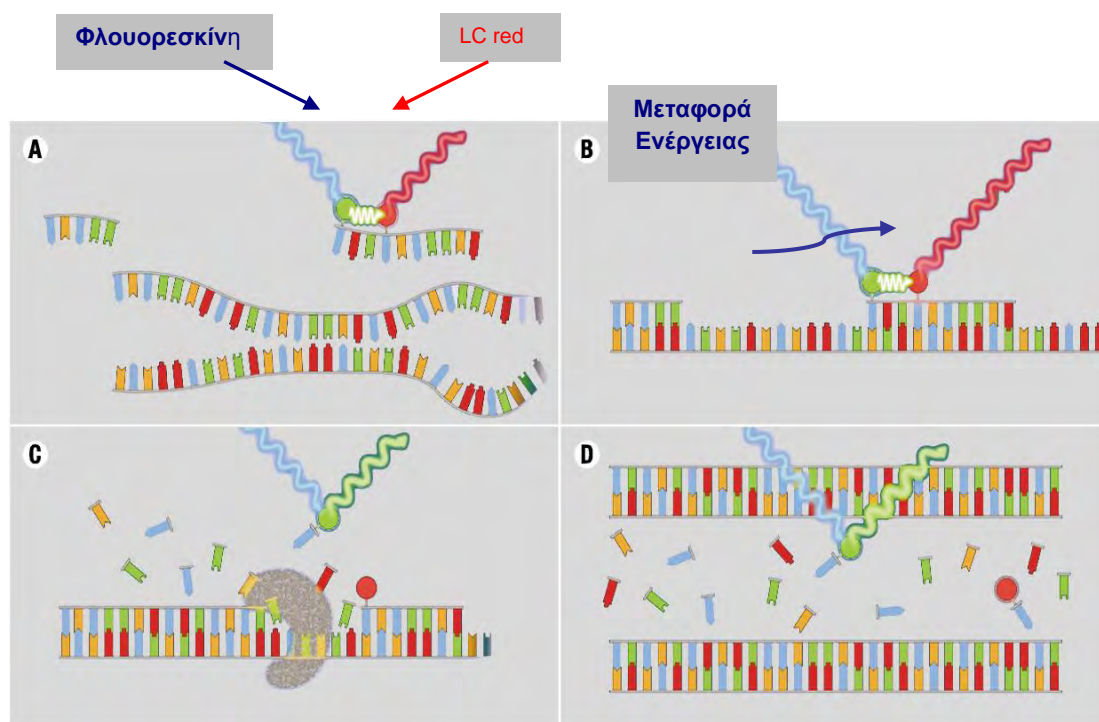
Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και μ' έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς (Εικόνα 9.5).²⁸³



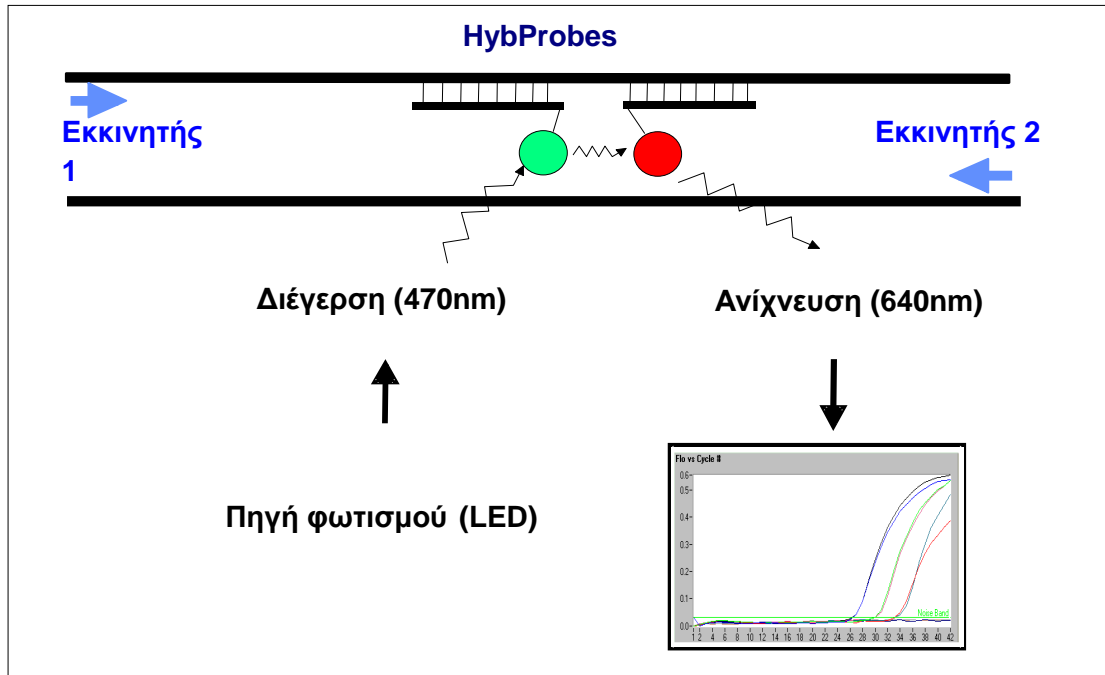
Εικόνα 9.5. Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

9.3.1.3. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Εικόνα 9.6).

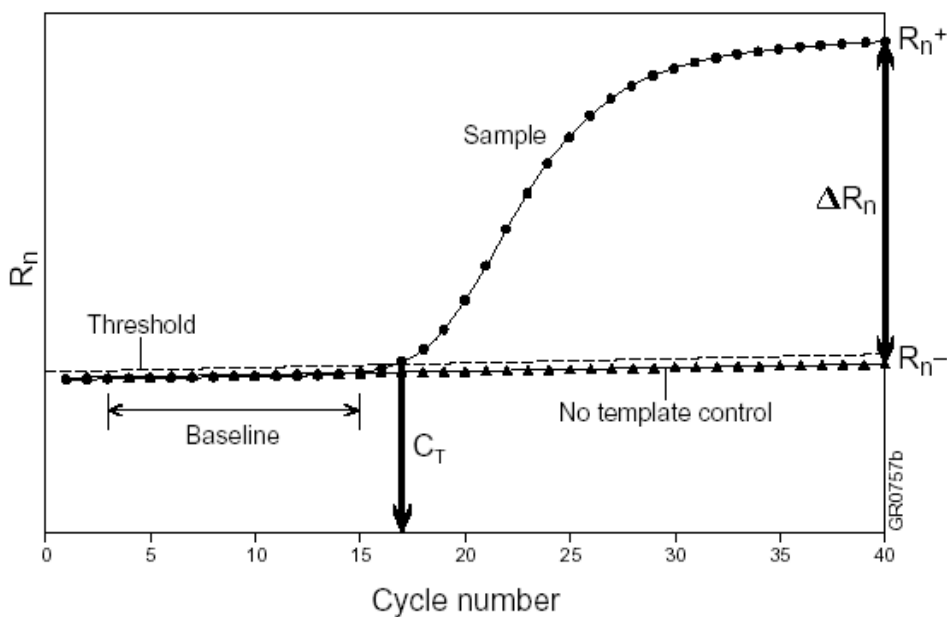


Εικόνα 9.6. Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού.



Εικόνα 9.7. Ενταση σήματος φθορισμού με βάση τη φάση της αντίδρασης.

Σε όλους τους προαναφερόμενους τύπους RQ-PCR ανάλυσης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Εικόνα 9.8).^{284,285}



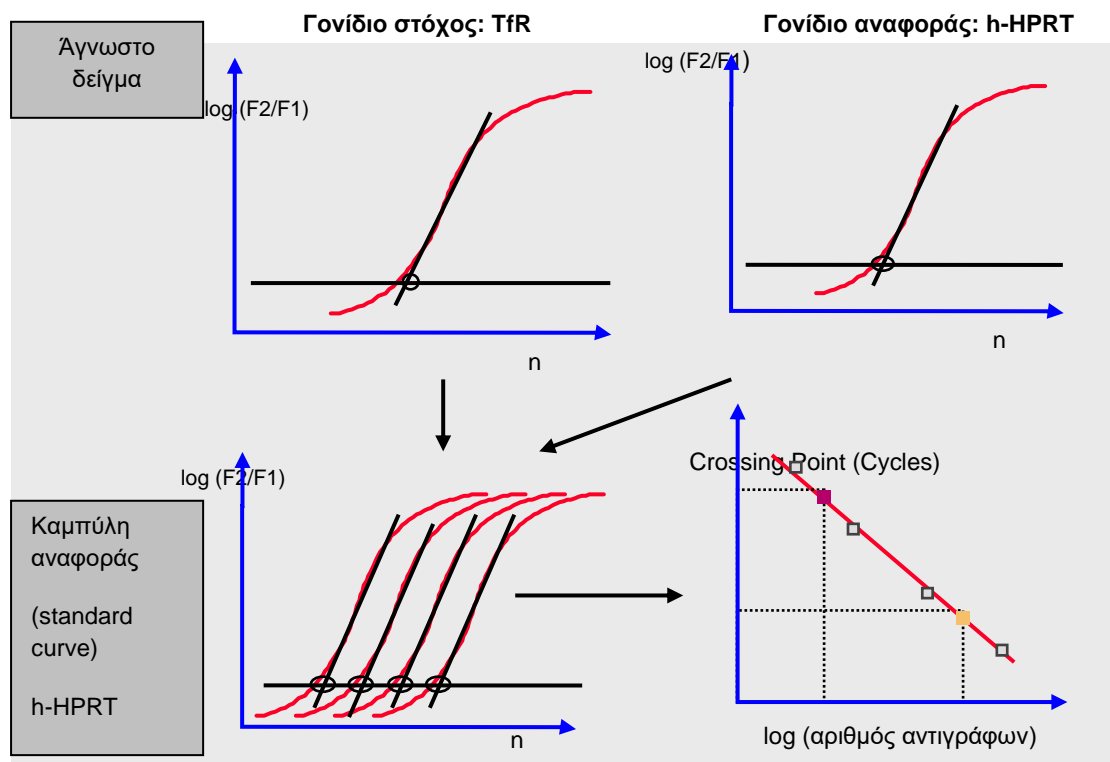
Εικόνα 9.8. Ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το “κατώφλι” μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή C_T), είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσοτέρων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση.²⁸⁶

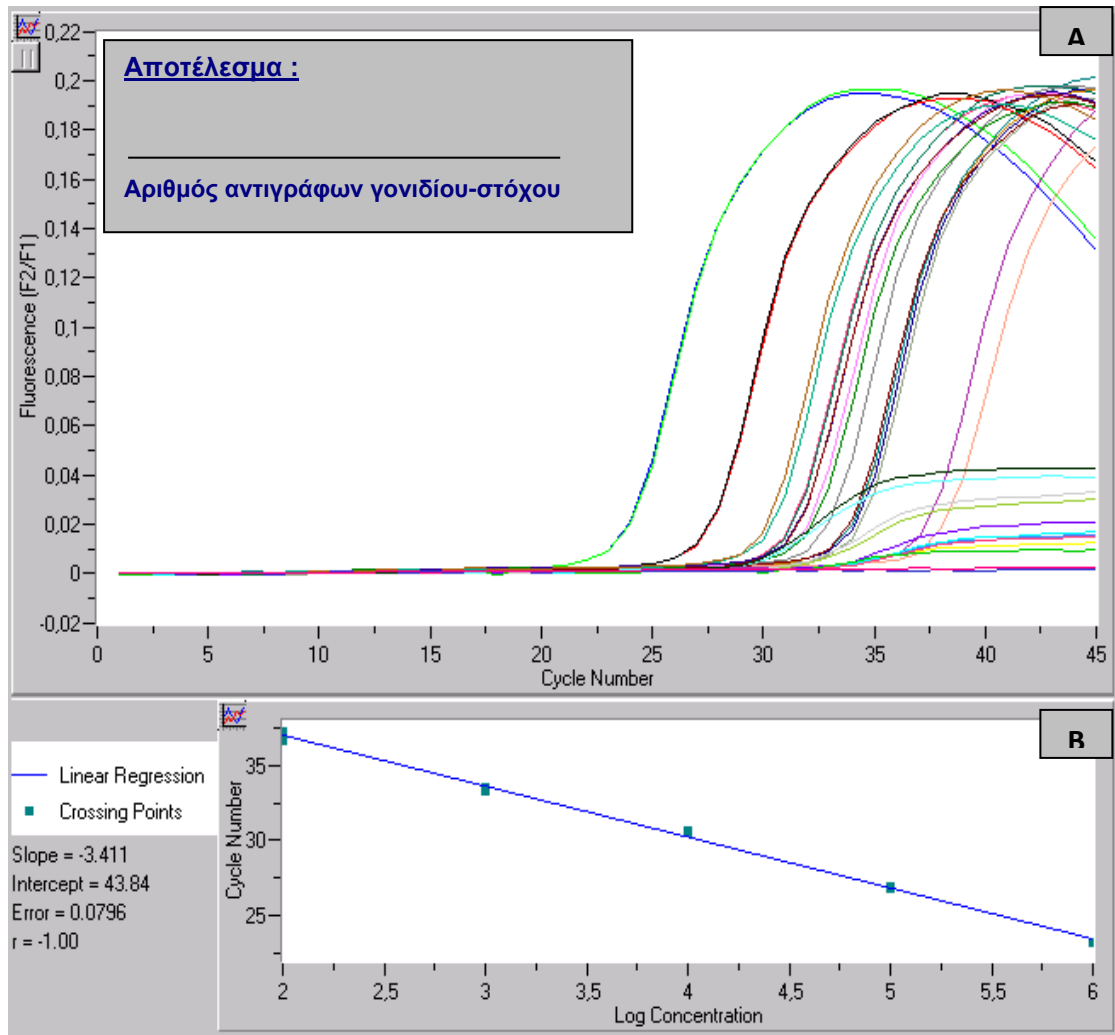
Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που

χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (Εικόνα 9.9).²⁸⁷



Εικόνα 9.9. Σχετική ποσοτικοποίηση αριθμού αντιγράφων με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση πρότυπης καμπύλης εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) με αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (Εικόνα 9.10).²⁸⁸



Εικόνα 9.10. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχάνημα LightCycler (Roche).

Α. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Η σχετική ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με το λόγο του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου στόχου που μελετάται προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. **Β.** Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

9.4. Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων GA733-1, GA733-2, CEA, ANG-1, ANG-2 με την τεχνική RQ-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.

9.4.1. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA

Ολικό κυτταρικό RNA απομονώνεται από δείγματα ιστού ασθενών που χειρουργήθηκαν για καρκίνο παχέος εντέρου (η μέθοδος περιγράφηκε παραπάνω) και μεταγράφεται *in vitro* σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού AMV (AMV kit) τηρώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφή

- Ανάμειξη του RNA με το ddH₂O
- Επώαση στους 65 °C για 10 min
- Παραμονή των δειγμάτων για 5 λεπτά στον πάγο

Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων (παρατίθενται στον Πίνακα 9.3).

Συνθήκες της αντίδρασης:

1. 25 °C για 10 λεπτά
2. 42 °C για 60 λεπτά
3. 99°C για 5 λεπτά
4. 4°C

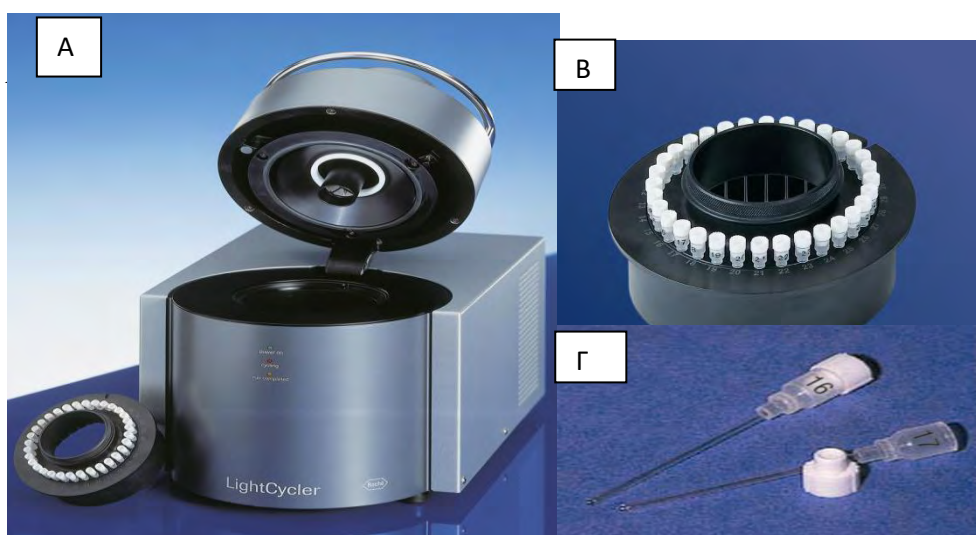
Πίνακας 9.3. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη σύνθεση cDNA με το AMV ΚΙΤ.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
cDNA	* μl
MgCl ₂ (25 mM)	4.0 μl
ddH ₂ O	* μl
Random Primers	2.0 μl
RNAase inhibitor (50 u/ μl)	1.0 μl
AMV (50 u/ μl)	0.8 μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20 μl

- ***/***: Οι ποσότητες του υποστρώματος RNA και του νερού υπολογίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται 1 μg RNA σε τελικό όγκο cDNA 20 μl .

9.4.2. Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR.

Η μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων των γονιδίων GA733-1, GA733-2, CEA, ANG-1, ANG-2 έγινε με τη χρήση του kit “Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes” και του μηχανήματος Light Cycler (Roche) (Εικόνα 9.11).



Εικόνα 9.11. Α. Μηχάνημα Light Cycler ((Roche). Β. Δίσκος τοποθέτησης τριχοειδών (carousel) Γ. Υάλινα τριχοειδή (Glass capillaries).

Το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για εφαρμογές PCR με “εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία”. Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου. Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο h-PBGD). Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA του γονιδίου h-PBGD που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων ($5 \times 10^6 - 5 \times 10^2$ ανά 5 μ l δείγματος).

9.4.2.1. Διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο αναφοράς (h-PBGD).

- Δις απεσταγμένο νερό (ddH ₂ O)	: 7.6 μ l
- MgCl ₂ 25 mM	: 2.4 μ l
-Διάλυμα ανίχνευσης h-PBGD (10X)	: 2.0 μ l
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μ l
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μ l

Στον τελικό όγκο της αντίδρασης (15 μ l) προστίθενται 5 μ l cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

9.4.2.2. Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο GA733-1:

- ddH ₂ O	: 1.95 μ l
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 10 μ l
- Εκκινητής GA733-1 F (Πίνακας 10.4)	: 1.2 μ l
-Εκκινητής GA733-1 R (Πίνακας 10.4)	: 1.2 μ l
-Ανιχνευτής GA733-1 FL(Πίνακας 10.4)	: 1.33 μ l
-Ανιχνευτής GA733-1 LC(Πίνακας 10.4)	: 1.33 μ l
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μ l

Στον τελικό όγκο της αντίδρασης (18 μ l) προστίθενται 2 μ l cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

Το παραπάνω πρωτόκολλο εφαρμόζεται για όλα τα υπό μελέτη γονίδια (GA733-1, GA733-2, CEA, ANG-1, ANG-2).

9.4.2.3. Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης.

Το πρωτόκολλο αποτελείται από τρία προγράμματα :

Πρόγραμμα 1:

Προ-επάση (ενεργοποίηση του ενζύμου) επί 10 λεπτά και αποδιάταξη του cDNA στους 95°C επί 10 λεπτά.

Πρόγραμμα 2:

Η ενίσχυση της cDNA αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιείται σε τρία στάδια επί 45 κύκλους :

- Αποδιάταξη: 95°C επί 5 δευτερόλεπτα
- Σύνδεση με τον εκκινητή (διαφορετική θερμοκρασία ανάλογα με το είδος του εκκινητή και του ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται)
 - GA733-1 : 58°C επί 15 δευτερόλεπτα
 - GA733-2 : 58°C επί 15 δευτερόλεπτα
 - CEA : 60°C επί 15 δευτερόλεπτα
 - ANG-1 : 55°C επί 15 δευτερόλεπτα
 - ANG-2 : 55°C επί 15 δευτερόλεπτα
- Επιμήκυνση στους 72°C επί 20 δευτερόλεπτα

Πρόγραμμα 3:

Ψύξη στους 40°C επί 30 δευτερόλεπτα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος του αριθμού των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ως προς τον αριθμό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς (h-PBGD). Ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου h-PBGD καθορίζονται για κάθε δείγμα με υπολογισμό του μέσου όρου των δύο τιμών των μεταγράφων για το κάθε γονίδιο-στόχο ή γονίδιο-αναφοράς.

Πίνακας 9.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτών υβριδισμού.

Εκκινητής	Αλληλουχία
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'
TACSTD1 S –forward	5'-AAgAAAATGGACCTGACAGTAA-3'
TACSTD1 R –reverse	5'-CCATCTCCTTTATCTCAGCC-3'
TACSTD1 FL	5'-ATCAACATA ATA AATTAAAGTTTGACCAGG- - 3'FL
TACSTD1 LC	5'-LC640-TCCAgATCCAgTTgTTCCCCA- -PH
TACSTD2 F–forward	5'-ATGAGCGCCCCCAAGAA-3'
TACSTD2 R –reverse	5'-GCTGCTCGTAGTGCACGG-3'
TACSTD2 FL	5' -GCCACCGAGTTCACGCACC—3'FL
TACSTD2 LC	5'-LC640-GCACACCGACGTCTGGTTGCACTG—PH
CEA S –forward	5'-GACGCAAGAGCCTATGTATG-3'
CEA R –reverse	5'-GGCATAGGTCCCgTTATTA-3'
CEA FL	5' -CCCAGACTCGTCTTACCTTTTCGG—3'FL
CEA LC	5'-LC640-AGCGAACCTCAACCTCCCTGC—PH
ANG1 S –forward	5'-TGGCTGGGGAATGAGTTTAT-3'
ANG1 R –reverse	5'-CAGTGTGACCTTTTAAATACAACCT-3'
ANG1 FL	5' -ACATGCTAAGAATTGAGTTAATGGACTGG—3'FL
ANG1 LC	5'-LC640-AAGGGAACCGAGCCTATTCACAGT—PH
ANG2 S –forward	5'-CCTAATTCTACAGAAGAGATCAAGG-3'
ANG2 R –reverse	5'-CAGTTGCGAAACAAACTCAT-3'
ANG2 FL	5'-ACGCTGCCATCCTCACGTC--3'FL
ANG2 LC	5'-CTGAATAATTGTCCACCCGCCTCC--3'PH

ΚΕΦΆΛΑΙΟ 10

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 10

Αποτελέσματα.

10.1. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αυτή η μελέτη συμπεριέλαβε συνολικά 41 ασθενείς της Καυκάσιας φυλής. Από αυτούς είκοσι (20) ήταν άνδρες και εικοσι-ένας (21) γυναίκες, με μέση ηλικία 67 έτη (εύρος: 52-85). Οι ασθενείς αυτοί υποβλήθηκαν, ανάλογα με την θέση του όγκου, στην κατάλληλη χειρουργική επέμβαση. Συγκεκριμένα, οι δέκα ασθενείς (10/40, 25%) υποβλήθηκαν σε δεξιά κολεκτομή, οι δύο ασθενείς (2/40, 5%) σε αριστερή κολεκτομή, ενώ οι εικοσι-εννέα ασθενείς (29/40, 70%) σε μια χαμηλή πρόσθια εκτομή και σιγμοειδεκτομή. Οι σαράντα ασθενείς διαγνώστηκαν με αδενοκαρκίνωμα με βάση την ιστολογική έκθεση, ενώ ένας με αδένωμα. Λόγω της διαφορετικής βιολογικής συμπεριφοράς του αδενώματος από το αδενοκαρκίνωμα, ο ασθενής αυτός εξαιρέθηκε από τη μελέτη (Πίνακας 10.1).

Πίνακας 10.1. Δημογραφικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. (* Η σταδιοποίηση περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1.3)

Συνολικός αριθμός ασθενών N=40	
Φύλο (άντρες/ γυναίκες)	19/21
Ηλικία (έτη), διακύμανση (SD)	67, (εύρος: 52-85)
Βαθμός διαφοροποίησης	
Υψηλή	3
Μέση	27
Χαμηλή	10
TNM στάδιο*	
T	
T1	3
T2	7
T3	27
T4	3
N*	
N0	27
N1	5
N2	8
M*	
M0	40
M1	0
Ύπαρξη λεμφαδενικής διήθησης	
Απουσία	27
Παρουσία	13

10.2. Η έκφραση των γονιδίων GA733-1 και GA733-2 σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.

Η ποσοτική πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης/ αντίστροφης μεταγραφής (Q-RT- PCR) πραγματοποιήθηκε σε σαράντα (40) ζεύγη δειγμάτων που είχαν ληφθεί από τους ασθενείς και ειδικότερα από δείγμα καρκινικού και μη καρκινικού βλεννογόνου για να προσδιοριστεί η έκφραση των δύο γονιδίων GA733-1 και GA733-2.

Η έκφραση του γονιδίου GA733-1 mRNA ήταν πολύ χαμηλή στο μη καρκινικό βλεννογονικό ιστό (μέση τιμή: GA733-1/h-PBGD: 0.00093, με διακύμανση από 0,000001 έως 0,0025139) και σημαντικά υψηλότερη η έκφραση του γονιδίου GA733-1 ($p < 0,012$) στον αντίστοιχο καρκινικό βλεννογόνο ιστό [μέση τιμή: GA733-1/h-PBGD: 0.004391 (0.007761 -0.000001)] (Πίνακας 10.2).

Πίνακας 10.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του mRNA των γονιδίων GA733-1/-2 στα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη (από καρκινικό και μη καρκινικό ιστό).

Ιστός	GA733-1/h-PBGD	GA733-2/h-PBGD
Καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 0,004391 [0,000001– 0,007761]	<i>Μέση τιμή:</i> 115,64 [11,58–1.189,14]
Μη καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 0,00093 [0,000001– 0,0025139]	<i>Μέση τιμή:</i> 273.31 [65,24–1.486,41]

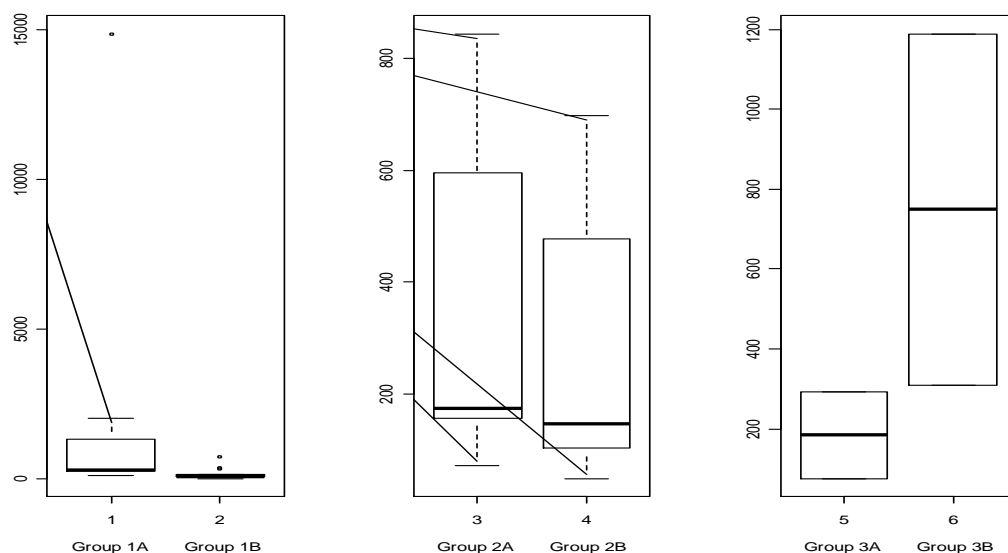
Η έκφραση του γονιδίου GA733-2 ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (Πίνακας 10.3). Η μέση τιμή της έκφρασης GA733-2/h-PBGD mRNA σε μη καρκινικό ιστό ήταν 273,31 [65,24-1,486.41] και υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά με την μέση τιμή της έκφρασης GA733-2/h-PBGD mRNA (115,64) σε καρκινικό ιστό [11,58-1.189,14) ($p=0.0000195$) (Πίνακας 10.2).

Πίνακας 10.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των GA733-2 mRNA μεταγράφων σε κάθε δείγμα (καρκινικό και μη καρκινικό ιστό).

ΔΕΙΓΜΑ	GA733-2/ h-PBGD ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	GA733-2/h-PBGD ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	ΔΕΙΓΜΑ	GA733-2/h-PBGD ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ	GA733-2/h-PBGD ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
1	405,689	82,5630	21	25,628	144,950
2	386,560	1250,560	22	46,163	254,178
3	101,118	156,066	23	90,039	247,676
4	145,091	143,328	24	106,255	168,615
5	211,360	442,388	25	501,335	844,588
6	1189,142	292,457	26	724,035	14862,409
7	201,623	1206,147	27	11,580	116,536
8	193,541	247,318	28	120,829	400,560
9	110,456	310,718	29	56,536	250,301
10	40,735	154,400	30	56,392	1326,764
11	697,318	594,918	31	252,500	453,146
12	379,766	2034,626	32	309,204	75,536
13	341,625	1651,646	33	138,708	732,236
14	89,675	390,490	34	328,122	237,367
15	476,817	609,495	35	102,501	172,812
16	35,459	119,690	36	68,9623	350,599
17	100,199	234,424	37	29,072	82,198
18	37,872	250,826	38	50,222	329,619
19	47,784	71,583	39	159,811	1058,441
20	559,555	672,777	40	40,299	65,239

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι 26/40 ασθενείς (65%) είχαν διαφορετική έκφραση των επιπέδων GA733-2 mRNA μεταξύ μη καρκινικού και καρκινικού ιστού, ενώ παρόμοιος αριθμός GA733-2 mRNA μεταγράφων βρέθηκε σε δεκατέσσερις ασθενείς (35%). Ειδικότερα, 23/40 ασθενείς (56,1%) έφεραν μεγαλύτερο αριθμό GA733-2 mRNA μεταγράφων στον μη καρκινικό ιστό σε σχέση με τον καρκινικό [μέση τιμή έκφρασης GA733-2/h-PBGD mRNA: 329,62 [82.19-1,486.41] στον μη καρκινικό ιστό/ μέση τιμή έκφρασης GA733-2/h-PBGD mRNA στον καρκινικό ιστό: 89,675 [11,58 -724,03], ($p = 0,0000002384$)]. Παρόμοια επίπεδα έκφρασης των GA733-2 mRNA μεταγράφων ανιχνεύθηκαν τόσο σε καρκινικό όσο και σε μη καρκινικό ιστό σε δεκατέσσερις ασθενείς της παρούσας μελέτης (14/40, 37.5%) [μέση τιμή GA733-2/h-PBGD: 242.34 [65,24 -844,58] στο μη καρκινικό ιστό και μέση τιμή GA733-2/h-PBGD: 202,45 [40,30-697,32] στον καρκινικό ιστό ($p = 0,02954$)]. Αντίθετα, σε τρεις από τους ασθενείς μας (3/40, 7,3%) υπήρξε υπερέκφραση του γονιδίου GA733-2 σε δείγματα του καρκινικού ιστού [μέση

τιμή έκφρασης GA733-2/h-PBGD: 405.69 [309.20 -1,189.14] σε σχέση με την μέση τιμή έκφρασης του GA733-2/h-PBGD (82,56) σε δείγματα μη καρκινικού ιστού [75,53 -292,47], ($p = 0,25$) (Σχήμα 10.1).



Σχήμα 10.1. Ραβδογράμματα που αναπαριστούν την μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης του GA733-2/h-PBGD mRNA σε δείγματα μη καρκινικών και καρκινικών ιστών [Group 1: ασθενείς με υπερ-έκφραση του GA733-2 mRNA σε μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) σε σχέση με την έκφραση σε καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B), ($p = 0,0000002384$) Group 2: ασθενείς με παρόμοια έκφραση GA733-2 mRNA σε μη καρκινικό (υπο-ομάδα A) και καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B), ($p = 0,02954$) Group 3: ασθενείς με υπερ-έκφραση GA733-2 mRNA σε καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) σε σχέση με μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A)].

Ακολούθως, μελετήθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα στα πρότυπα έκφρασης των GA733-1 /-2 και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: το φύλο, ο βαθμός διαφοροποίησης, η σταδιοποίηση κατά TNM και η παρουσία ή μη διηθημένων λεμφαδένων. Η εξαιρετικά χαμηλή έκφραση του γονιδίου GA733-1 είχε ως αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η συσχέτιση της έκφρασής του με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Στην περίπτωση της έκφρασης του GA733-2, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε τρεις υποομάδες, αυτοί που φέρουν αυξημένα επίπεδα GA733-2 mRNA σε μη καρκινικό σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (Group 1), αυτοί

που έχουν παρόμοια έκφραση GA733-2 σε καρκινικό και μη καρκινικό ιστό (Group 2) και τέλος στην υποομάδα των ασθενών όπου υπάρχει υπερέκφραση του GA733-2 mRNA στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον μη καρκινικό ιστό (Group 3). (Πίνακας 10.4). Στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις εντοπίστηκαν μεταξύ των ομάδων ως προς το στάδιο N της νόσου ($P = 0,0343$) και με την παρουσία ή όχι λεμφαδενικής διήθησης ($P = 0,008668$).

Πίνακας 10.4. Σύσχεση των mRNA επιπέδων του GA733-2 γονιδίου σε καρκινικό και μη καρκινικό ιστό και των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Παράμετροι	Ομάδες ασθενών ανάλογα με το επίπεδο έκφρασης του GA733-2 /h-PBGD Mrna			
	Group 1*	Group 2*	Group 3*	P > 0.05
Φύλο				
Αντρες	11	6	2	
Γυναίκες	12	8	1	
Βαθμός κοτταρικής διαφοροποίησης				
Υψηλή	2	1	0	0,7329
Μέση	14	10	3	
Χαμηλή	7	3	0	
TNM σταδιοποίηση*				
T				
T				0,1658
T1	0	3	0	
T2	5	2	0	
T3	15	9	3	
T4	3	0	0	
N				
N				0,0343
N0	10	14	3	
N1	5	0	0	
N2	8	0	0	
M				
M				>0.05
M0	23	14	3	
M1	0	0	0	
Λεμφαδενική προσβολή				
Απουσία	10	14	3	0,008668
Παρουσία	13	0	0	

10.3. Η έκφραση του CEACAM5 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.

Η Q-RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε σαράντα (40) ζεύγη δειγμάτων που είχαν ληφθεί από ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου, ειδικότερα από κάθε ασθενή έγινε λήψη δείγματος από τον καρκινικό ιστό και από παρακείμενο μη καρκινικό ιστό βλεννογόνου για να προσδιοριστεί η έκφραση του CEACAM5 γονιδίου (Πίνακας 10.5).

Πίνακας 10.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA επιπέδων του CEACAM5 γονιδίου στον καρκινικό και μη καρκινικό ιστό των ασθενών.

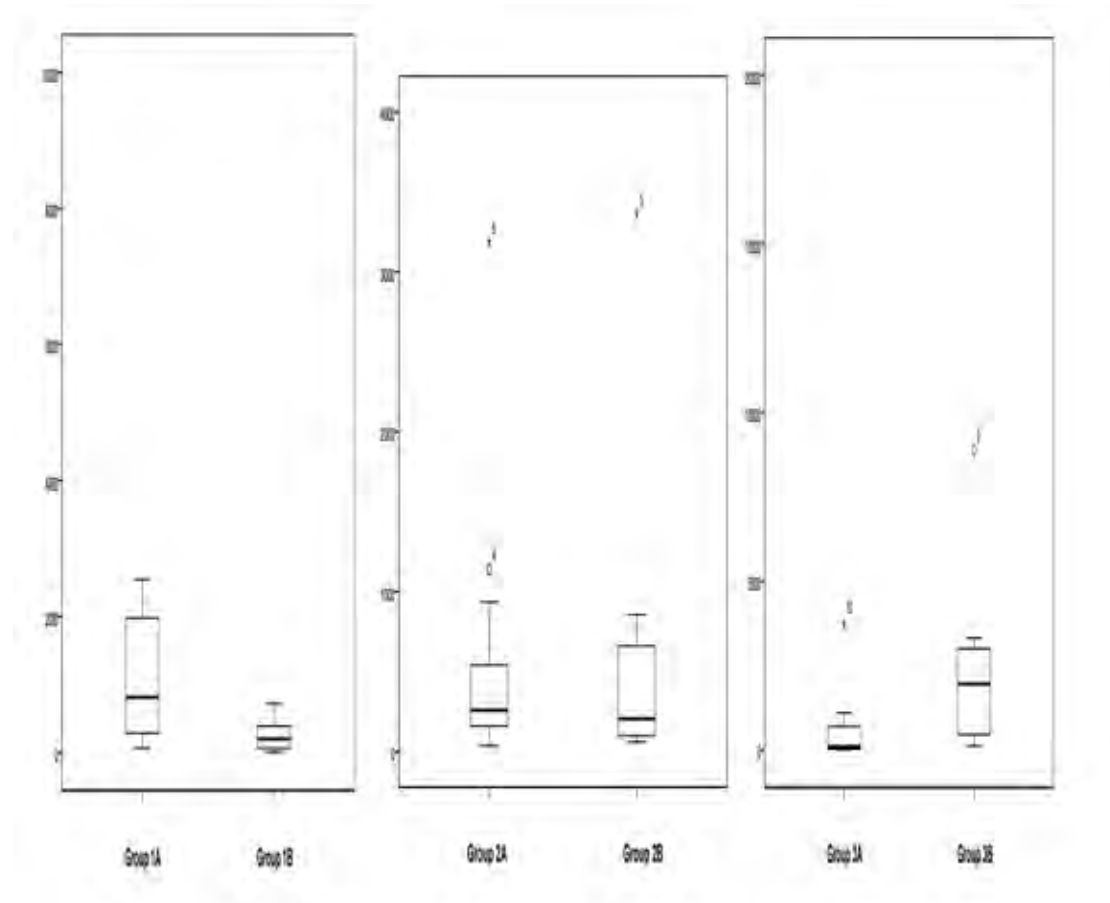
ΔΕΙΓΜΑ	CEACAM5/h- PBGD ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	CEACAM5/h -PBGD ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ Ύ ΙΣΤΟΥ	ΔΕΙΓΜΑ	CEACAM5/h- PBGD ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ	CEACAM5/h- PBGD ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
1	373,96	530,36	21	19,16	114,57
2	667,2	1143,35	22	3735,45	8896,42
3	3358,84	3189,07	23	1099,33	2872,14
4	61,08	35,3	24	28,58	677,38
5	261,24	258,73	25	11,97	158,27
6	261,24	258,73	26	303,5	3137
7	695,15	491,82	27	100,44	2854
8	154,63	382,02	28	35,22	248,82
9	856,42	935,66	29	199,311	3210,44
10	100	86,79	30	828,24	33562,61
11	68,65	83,78	31	231,66	645,99
12	183,49	196,4	32	567,07	2185,56
13	95,62	159,1	33	723,13	5433,98
14	205,34	240,44	34	3,37	236,69
15	388,28	540,5	35	4,83	65,44
16	659,73	752,4	36	174,17	1773,92
17	78,36	94,66	37	13,86	187,04
18	206,52	3315,47	38	239,33	2550,81
19	86,36	1955,31	39	478,77	1442,93
20	110,02	349,23	40	116,15	504,61

Η έκφραση του γονιδίου CEACAM5 ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη και έπασχαν από αδενοκαρκίνωμα Η μέση τιμή των CEACAM5/h-PBGD mRNA επιπέδων ήταν 326,36 [11,97- 3.3562,61] σε μη καρκινικό ιστό και 317,60 [3.37 έως 8896.42] σε καρκινικό ιστό (Πίνακας 10.6).

Πίνακας 10.6. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου CEACAM5 στα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη (από καρκινικό και μη καρκινικό ιστό).

Ιστός	CEACAM5 /h-PBGD
Καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 317,60 [3.37 - 8896.42]
Μη καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 326,36 [11,97 – 3.3562,61]

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι 24/40 ασθενείς (60,00%) υπήρξε διαφορετική έκφραση του CEACAM5 mRNA μεταξύ του μη καρκινικού και του καρκινικού ιστού (Πίνακας 10.5). Πιο συγκεκριμένα, δώδεκα ασθενείς (12/40, 30,00%) είχαν αυξημένη έκφραση του CEACAM5 γονιδίου στον μη καρκινικό ιστό σε σχέση με τον καρκινικό [μέση τιμή CEACAM5/h-PBGD mRNA 1.044,46 [65,44-3.3562,61] στον μη καρκινικό ιστό/ 202,91 [3,37-828,24] στον καρκινικό ιστό ($p < 0,05$). Παρόμοια επίπεδα έκφρασης του CEACAM5 mRNA ανιχνεύθηκαν και στους δύο τύπους ιστών σε 16 ασθενείς (16/40, 40,00%) {μέση τιμή CEACAM5/h-PBGD 320,37 [35,30 -3189,07]/ 233,1205 [61,08 -3.358,84] στο μη καρκινικό και καρκινικό ιστό ($p > 0,05$)}. Τέλος, σε δώδεκα ασθενείς (12/40, 30,00%) υπήρξε υπερέκφραση του γονιδίου CEACAM5 σε δείγματα του καρκινικού ιστού {μέση τιμή CEACAM5/h-PBGD:2.863,07 [114,57-8.896,42]} σε σχέση με το μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή: 149,87 [11,97 -3.735,45]} ($p < 0,05$) (Σχήμα 10.2).



Σχήμα 10.2. Ραβδογράμματα που αποτυπώνουν τη μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης του CEACAM5/h-PBGD mRNA σε δείγματα μη καρκινικών και καρκινικών ιστών [Group 1: ασθενείς με αυξημένα CEACAM5 mRNA επίπεδα σε μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) ($p < 0,05$), Group 2: ομάδα ασθενών με παρόμοια έκφραση του CEACAM5 γονιδίου τόσο στο μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) όσο και στον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) και Group 3: ομάδα ασθενών με υπο-έκφραση του CEACAM5 γονιδίου σε μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B)]

Ακολούθως, μελετήθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα στα πρότυπα έκφρασης του CEACAM5 γονιδίου και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: το φύλο, ο βαθμός διαφοροποίησης, η σταδιοποίηση κατά TNM, και η παρουσία ή μη διηθημένων λεμφαδένων. Στην περίπτωση της έκφρασης του CEACAM5, με βάση την διαφορετική έκφραση που παρουσίαζε στους ασθενείς που συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας, οι ασθενείς

ομαδοποιήθηκαν σε τρεις υποομάδες. Με βάση τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του γονιδίου *CEACAM5* μεταξύ του καρκινικού και του μη καρκινικού ιστού, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν στις ομάδες: α) με αυξημένη έκφραση του γονιδίου *CEACAM5* σε μη καρκινικό σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (Group 1), β) με παρόμοια επίπεδα έκφρασης του *CEACAM5* γονιδίου μεταξύ των δυο τύπων ιστών (Group 2) και γ) με αυξημένη έκφραση στον καρκινικό σε σχέση με το μη καρκινικό ιστό (Group 3) (Πίνακας 10.4). Στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις εντοπίστηκαν μεταξύ της έκφρασης του mRNA του *CEACAM5* γονιδίου και του βαθμού διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων μεταξύ των ομάδων 1 και 2 ($p=0,05$) και μεταξύ 2 και 3 ($p=0.0465$) (Πίνακας 10.7).

Πίνακας 10.7. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του *CEACAM5* γονιδίου σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Παράμετροι	Ομάδες ασθενών ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του <i>CEACAM5 /h-PBGD mRNA</i>			P
	Group 1*	Group 2*	Group 3*	
Φύλο				0,455
Αντρες	5	8	6	
Γυναίκες	7	8	6	
Βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης				0,604
0,0463			0,05	
Υψηλή	0	0	3	
Μέση	8	14	5	
Χαμηλή	4	2	4	
TNM				
σταδιοποίηση*				
T				0,05
T1	1	1	1	
T2	2	3	2	
T3	8	12	7	
T4	1	0	2	
N				>0,05
N0	8	12	7	
N1	2	1	2	
N2	2	3	3	
M				>0,05
M0	12	16	12	
M1	0	0	0	
Παρουσία θετικών λεμφαδένων				0,192
Παρουσία	4	4	5	
Απουσία	8	12	7	

10.3.1. Ποσοτική μέτρηση του καρκινο-εμβρυϊκού αντιγόνου στο περιφερικό αίμα.

Τα επίπεδα του καρκινο-εμβρυϊκού αντιγόνου στον ανθρώπινο ορό αξιολογήθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ασθενών (22/40 και όχι 41). Η μέση τιμή των επιπέδων του CEA στο περιφερικό ορού ήταν 6,58 (0,86 -24,95). Συγκεκριμένα, 5/22 ασθενείς (22,73%) ανήκουν στην ομάδα 1 (Group 1) με μέση τιμή της πρωτεΐνης CEA [6,033 (1,150-13,120)]. Εννέα ασθενείς (9/22, 40,91%) ανήκουν στην ομάδα 2 (Group 2) με τη μέση τιμή CEA στο περιφερικό αίμα [10,15 (1,17 -24,95)] και οκτώ (8/22, 36,36%) στην ομάδα 3 (Group 3) με μέση τιμή [2,882 (0,860 -6,430)] (Πίνακας 10.8). Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των mRNA μεταγράφων του *CEACAM5* γονιδίου και της πρωτεΐνη CEA στον ορό των ασθενών.

Πίνακας 10.8. Ποσοτική μέτρηση του καρκινο-εμβρυϊκού αντιγόνου στο περιφερικό αίμα. *Group: 1: ασθενείς με αυξημένη έκφραση του γονιδίου *CEACAM5* σε μη καρκινικό ιστό σε σχέση με τον καρκινικό ιστό, Group 2: παρόμοια επίπεδα έκφρασης του mRNA του *CEACAM5* γονιδίου μεταξύ των δειγμάτων από καρκινικό και μη καρκινικό ιστό, Group 3: ασθενείς με υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *CEACAM5* στον καρκινικό σε σχέση με τον μη καρκινικό ιστό.

Παράμετρος	Group 1*	Group 2*	Group 3*
Ποσοτική μέτρηση του CEA στο περιφερικό αίμα	Μέση τιμή: 6,033 [1,15-13,12]	Μέση τιμή: 10,15 [1,17-24,95]	Μέση τιμή: 2,88 [0,86-6,43]

10.4. Η έκφραση της Ang-1 και Ang-2 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.

Τα αποτελέσματα της Q-RT-PCR για τα γονίδια *Ang-1* και *Ang-2* στους ασθενείς της μελέτης αποτυπώνονται στους Πίνακες 10.9 και 10.10. (πραγματοποιήθηκε σε σαράντα (40) ζεύγη δειγμάτων, που είχαν ληφθεί από ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου, ειδικότερα από κάθε ασθενή έγινε

λήψη δείγματος από τον καρκινικό ιστό και από παρακείμενο μη καρκινικό ιστό βλεννογόνου για να προσδιοριστεί η έκφραση και της Ang-1 και Ang-2 mRNA (Πίνακας 10.9, 10.10).

Πίνακας 10.9. Ποσοτικός προσδιορισμός των *Ang-1/h-PBGD* mRNA επιπέδων στους ασθενείς της μελέτης (καρκινικός και μη καρκινικός ιστός).

ΔΕΙΓΜΑ	<i>Ang-1/h-PBGD</i> ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	<i>Ang-1/h-PBGD</i> ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	ΔΕΙΓΜΑ	<i>Ang-1/h-PBGD</i> ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	<i>Ang-1/h-PBGD</i> ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
1	0,0348	0,1301	21	3,5714	9,4948
2	0,7757	2,5171	22	0,4990	3,1120
3	0,1602	8,7316	23	0,0139	0,3118
4	0,0414	2,2464	24	0,0199	0,2470
5	0,1398	2,5160	25	0,1352	10,7744
6	0,5704	0,2272	26	0,0409	9,5234
7	11,2039	1,3491	27	1,6635	2,3373
8	1,8515	0,7800	28	0,7277	2,0684
9	0,2089	1,5219	29	2,6480	0,7285
10	0,7695	0,0888	30	1,1057	8,7965
11	0,6023	0,8677	31	0,3927	9,0396
12	0,2178	8,5716	32	0,6383	2,3064
13	1,9268	6,6603	33	0,0144	1,4709
14	0,2138	8,2327	34	0,5947	1,3445
15	0,0193	0,1500	35	0,8695	0,3917
16	0,8732	0,0697	36	0,0002	0,0530
17	0,0418	16,5433	37	2,5674	0,0565
18	0,0053	2,6586	38	1,1688	3,0123
19	0,1249	0,7504	39	0,6203	0,0125
20	0,4019	12,2826	40	0,0140	3,0123

Πίνακας 10.10. Έκφραση του *Ang-2* γονιδίου στον καρκινικό και μη καρκινικό ιστό των υπό μελέτη ασθενών.

ΔΕΙΓΜΑ	<i>Ang-2/h-PBGD</i> ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	<i>Ang-2/h-PBGD</i> ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	ΔΕΙΓΜΑ	<i>Ang-2/h-PBGD</i> ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ	<i>Ang-2/h-PBGD</i> ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
1	0,0109	0,0012	21	2,7177	0,2345
2	0,0176	0,7039	22	0,8986	0,2778
3	0,1145	1,0105	23	0,0122	0,0927
4	0,0171	0,5286	24	0,0216	0,0106
5	0,0020	0,0045	25	0,2000	0,2298
6	0,0220	0,0105	26	0,0386	0,5785
7	0,0119	0,0299	27	2,2010	0,7086
8	0,0492	0,0768	28	0,9549	0,8311
9	0,0478	0,5495	29	10,8911	0,0411
10	0,1765	0,0010	30	5,8436	0,7172
11	0,0176	0,6931	31	1,9912	0,9384
12	0,0529	1,3184	32	1,7588	0,0550
13	0,0490	1,0207	33	0,5092	0,3350
14	0,1786	1,5811	34	3,1338	0,0236
15	0,0215	0,0180	35	2,3270	3,3691
16	1,7453	0,0038	36	0,0128	1,5777
17	0,0345	5,3992	37	10,9665	1,6283
18	0,0045	1,0831	38	5,8701	1,8772
19	0,2406	0,0762	39	2,2364	0,0110
20	0,5751	0,5625	40	0,5127	1,7579

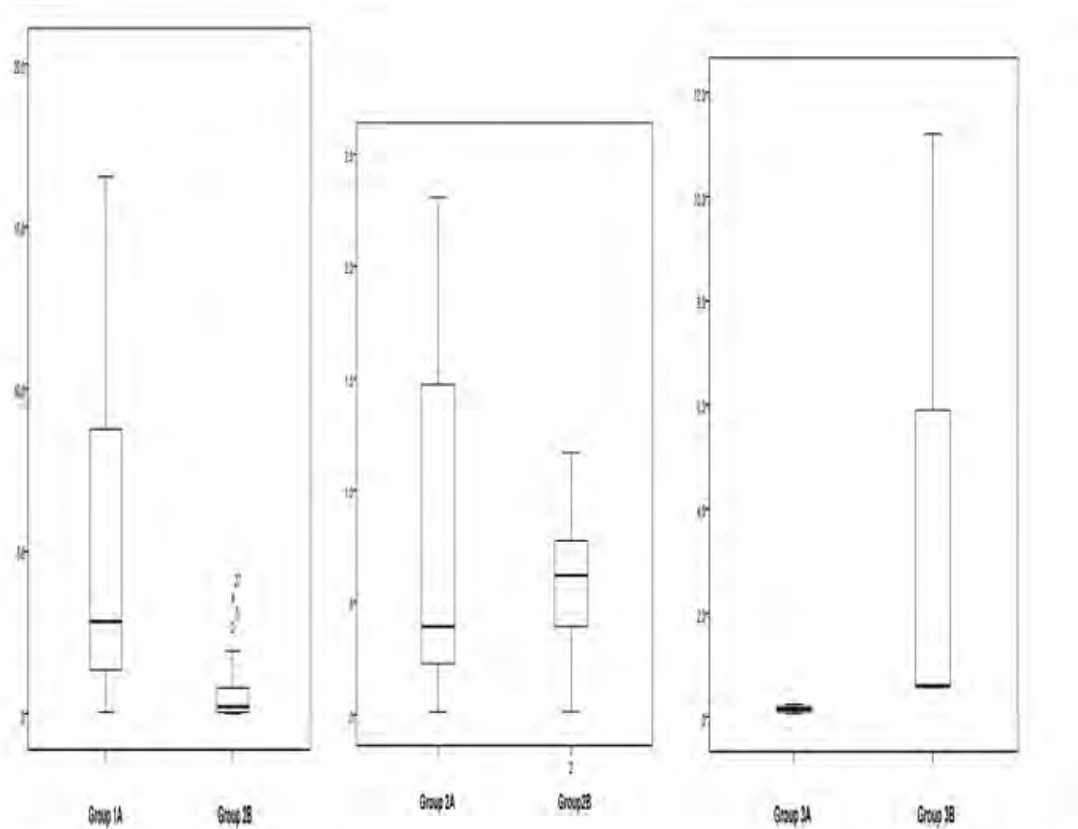
Η έκφραση των *Ang-1/-2* γονιδίων ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη και έπασχαν από αδενοκαρκίνωμα. Η μέση τιμή των *Ang-1/h-PBGD* mRNA επιπέδων ήταν 3,6248 [0,0530-16,5433] στο μη καρκινικό ιστό, ενώ στον καρκινικό ήταν 0,94 [0,0002-11,2039]. Τα μέσα επίπεδα έκφρασης του *Ang-2* γονιδίου ήταν 0,7492 [0,0012-5,3992] στο μη καρκινικό ιστό, ενώ στον καρκινικό *Ang-2/h-PBGD* mRNA:1,4122 [0,0020-10,9665] (Πίνακας 10.11).

Πίνακας 10.11. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων Ang-1 και Ang-2 στα υπό μελέτη δείγματα (καρκινικός και μη καρκινικός ιστός).

Ιστός	Ang-1/h-PBGD mRNA	Ang-2/h-PBGD mRNA
Καρκινικός ιστός	Μέση τιμή: 0,9373 [0,0002-11,2039]	Μέση τιμή: 1,4122 [0,0020-10,9665]
Μη καρκινικός ιστός	Μέση τιμή: 3,6248 [0,0530- 16,5433]	Μέση τιμή: 0,7492 [0,0012-5,3992]

10.4.1. Η έκφραση της Ang-1 mRNA σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό.

Με βάση τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *Ang-1* μεταξύ του καρκινικού και του μη καρκινικού ιστού, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, την ομάδα με αυξημένη έκφραση του γονιδίου *Ang-1* στο μη καρκινικό ιστό (Group 1), στην ομάδα με παρόμοιο αριθμό *Ang-1* mRNA μεταγράφων μεταξύ του καρκινικού και μη καρκινικού ιστού (Group 2) και τέλος στην ομάδα με υπερέκφραση του *Ang-1* γονιδίου στον καρκινικό σε σχέση με τον μη καρκινικό ιστό (Group 3). Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα 1 (Group 1) περιλαμβάνει 28/40 ασθενείς (70,0%) με μέση τιμή Ang-1/h-PBGD mRNA 0,7045 [0,0002-3,5714] στον καρκινικό ιστό, στατιστικά υψηλότερη τιμή σε σχέση με τα αντίστοιχα στον μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή: 4,8827 [0,0530-16.5433] ($p < 0,05$)}. Η ομάδα 2 (Group 2) (9/40, 22,5%) παρουσίασε παρόμοια επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ang-1* τόσο στον καρκινικό όσο και στο μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή Ang-1/h-PBGD: 0,5986 [0,0139-1,1688]/ 0,8693 [0,0124-2,3064] στον καρκινικό και το μη καρκινικό ιστό, αντιστοίχως}. Αντίθετα, στην ομάδα 3 (Group 3) (3/40, 7,3%) ανιχνεύθηκε αυξημένη έκφραση του *Ang-1* γονιδίου στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον μη καρκινικό {μέση τιμή Ang-1/h-PBGD: 4,1255 [0,5704-11,2039]/ 0,1555 [0,0697-0,2469] ($P < 0,05$), αντιστοίχως} (Σχήμα 10.3), (Πίνακας 10.12).



Σχήμα 10.3. Ραβδογράμματα που αποτυπώνουν τη μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης του Ang-1 /h-PBGD mRNA σε δείγματα μη καρκινικών και καρκινικών ιστών [Group 1: ασθενείς με αυξημένα *Ang-1* mRNA επίπεδα σε μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) ($p < 0,05$), Group 2: ομάδα ασθενών με παρόμοια έκφραση του *Ang-1* γονιδίου τόσο στο μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) όσο και στον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) και Group 3: ομάδα ασθενών με υπο-έκφραση του *Ang-1* γονιδίου σε μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B)]

Πίνακας 10.12. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου *Ang-1* στις τρεις ομάδες (Group1-3).

Ιστός	Group 1	Group-2	Group-3
Καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 0,7045 [0,0002 -3,5714]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,5986 [0,0139- 1,1688]	<i>Μέση τιμή:</i> 4,1255 [0,5704-11,2039]
Μη καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 4,8827 [0,0530- 16,5433]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,8693 [0,0124-2,3064]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,1555 [0,0697-0,2469]

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων έκφρασης του *Ang-1* γονιδίου και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν είναι το φύλο, ο βαθμός διαφοροποίησης, η σταδιοποίηση κατά TNM και η παρουσία ή μη διηθημένων λεμφαδένων. Στη συσχέτιση των παραμέτρων αυτών με τις τρεις υποομάδες των ασθενών με βάση τη διαφορετική έκφραση του *Ang-1* γονιδίου, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του mRNA του γονιδίου *Ang-1* και του σταδίου T του όγκου ($p=0.04536$) (Πίνακας 10.13.)

Πίνακας 10.13. Συσχέτιση μεταξύ των υποομάδων των ασθενών με βάση τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του *Ang-1* γονιδίου σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά τους.

Ομάδες ασθενών ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης Ang-1 σε καρκινικό και μη καρκινικό ιστό				
Παράμετροι	και μη καρκινικό ιστό			
	“Group 1”	“Group 2”	“Group 3”	P
Φύλο				P>0.05
Άντρας	13	4	2	
Γυναίκα	15	5	1	
Βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης				0.0827
Υψηλός	3	0	0	
Μέσος	15	9	3	
Χαμηλός	10	0	0	
TNM σταδιοποίηση				
T				0.04536
T1	0	3	0	
T2	4	2	1	
T3	21	4	2	
T4	3	0	0	
N				0.3171
N0	18	7	3	
N1	3	2	0	
N2	7	0	0	
M				
M0	29	9	3	
M1	0	0	0	

10.4.2. Η έκφραση του γονιδίου Ang-2 σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό βλενογόννου.

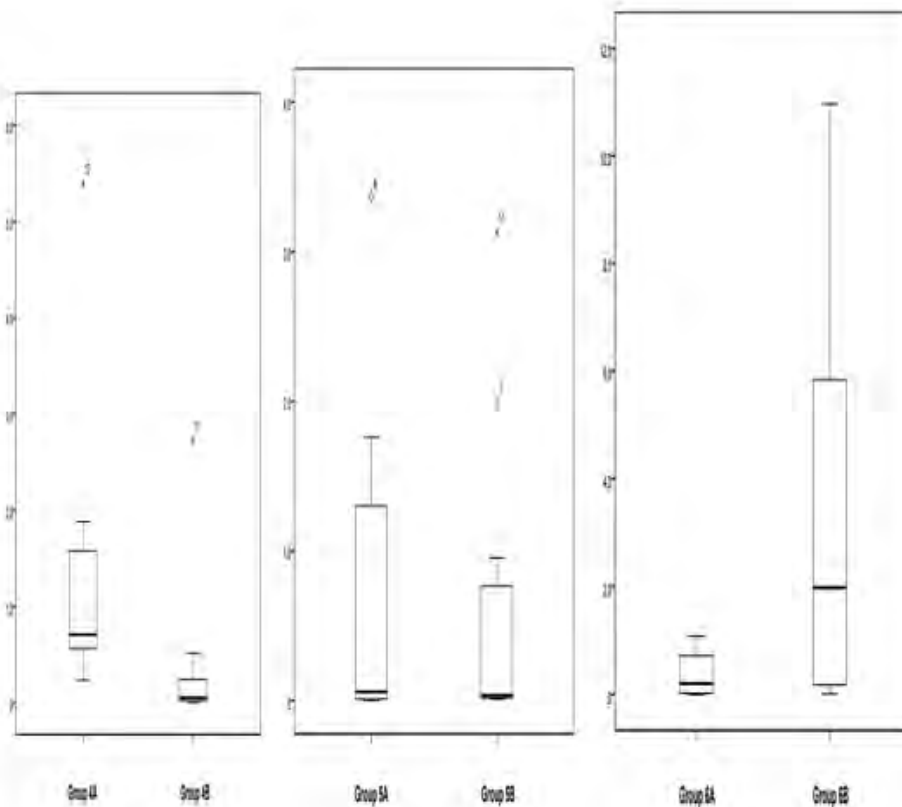
Με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ang-2* μεταξύ του καρκινικού και μη καρκινικού ιστού στους υπό μελέτη ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες: α) υπερέκφραση του mRNA του γονιδίου *Ang-2* στο μη καρκινικό ιστό (Group 4), β) παρόμοια *Ang-2* mRNA επίπεδα μεταξύ καρκινικού και μη καρκινικού

ιστού του κάθε ασθενούς (Group 5) και γ) υπερέκφραση του *Ang-2* γονιδίου στον καρκινικό ιστό (Group 6) (Πίνακας 10.14).

Πίνακας 10.14. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου *Ang-2* στις τρεις ομάδες (Group 4-6).

Ιστός	Group 4	Group-5	Group-6
Καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 0,3172 [0,0020-2,7177]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,5821 [0,0109- 3,1338]	<i>Μέση τιμή:</i> 3,2186 [0,0119 -10,9665]
Μη καρκινικός ιστός	<i>Μέση τιμή:</i> 1,1871 [0,2297-5,3991]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,6658 [0,0012 -3,3690]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,3825 [0,0010 - 1,0831]

Πιο αναλυτικά, στην ομάδα 4 (Group 4) ανήκουν 14 από τους 40 ασθενείς (35,00%) με μέση τιμή έκφρασης *Ang-2/h-PBGD*: 0,3172 [0,0020870-2,7177419] στον καρκινικό ιστό, σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη στον μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή: 1,1871 [0,2297634-5,3991971] ($p < 0,05$)}. Στην ομάδα 5 (Group-5) 12/40 ασθενείς (30,00%), έφεραν παρόμοια επίπεδα έκφρασης του *Ang-2* mRNA τόσο σε καρκινικό όσο και σε μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή *Ang-2/h-PBGD*: 0,5821[0.0109-3,1338]/ 0,6658 [0,0012-3,3690], αντιστοίχως}. Τέλος, στην ομάδα 6 (group 6) ανήκουν 14 ασθενείς (35,00%), όπου παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *Ang-2* σε δείγματα του καρκινικού ιστού {μέση τιμή *Ang-2/h-PBGD*: 3,2186 [0,0119-10,9665]} σε σχέση με το μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή *Ang-2/h-PBGD*: 0,3825 (0,0010-1,0831) ($p < 0,05$)} (Σχήμα 10.4).



Σχήμα 10.4. Ραβδογράμματα που αναπαριστούν την μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης του Ang-2/h- PBGD mRNA σε δείγματα μη καρκινικών και καρκινικών ιστών [Group 4 (πρέπει να αλλάξει και στο σχήμα): υπερ-έκφραση του mRNA του γονιδίου *Ang-2* σε μη καρκινικό (υπο-ομάδα A) σε σχέση με τον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) ($p < 0,05$), Group 5: παρόμοια *Ang-2* mRNA επίπεδα τόσο στο μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A) όσο και στον καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B), Group 6: αυξημένα επίπεδα σε καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα B) σε σχέση με το μη καρκινικό ιστό (υπο-ομάδα A)] Διαφορά για την έκφραση του γονιδίου *Ang-2* διαπιστώθηκε και της ομάδας 2 (Group 2) μεταξύ υποομάδας A vs B.

Ακολούθως, συσχετίστηκαν τα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *Ang-2* με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν, όπως και παραπάνω, είναι το φύλο, ο βαθμός διαφοροποίησης, η σταδιοποίηση κατά TNM, και η παρουσία ή μη διηθημένων λεμφαδένων. Στις συσχετίσεις αυτές βρέθηκε σημαντική σύνδεση με το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων ($p = 0.0049$), (Πίνακας 10.15).

Πίνακας 10.15. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *Ang-2* γονιδίου σε καρκινικό και σε μη καρκινικό ιστό με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Παράμετροι	Ομάδες ασθενών με βάση τον αριθμό μεταγράφων <i>Ang-2/h-PBGD</i>			P
	“Group 4”	“Group 5”	“Group 6”	
Φύλο				P>0,05
Άντρες	7	6	6	
Γυναίκες	7	6	8	
Βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης				0,0049
Υψηλός	0	0	3	
Μέσος	7	12	8	
Χαμηλός	7	0	3	
TNM σταδιοποίηση				
T				0,2494
T1	2	1	0	
T2	3	2	2	
T3	9	9	9	
T4	0	0	3	
N				0,8594
N0	8	10	10	
N1	3	0	2	
N2	3	2	2	
M				
M0	14	12	14	
M1	0	0	0	

10.4.3. Η έκφραση της *Ang-1* και *Ang-2* σε καρκινικό ιστό.

Η έκφραση των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* στον ιστό ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα όπως έχει αναφερθεί. Η μέση τιμή έκφρασης του *Ang-1/h-PBGD* mRNA στον καρκινικό ιστό ήταν 0,9373 [0,0002-11,2039] και αυτή της *Ang-2* 1,4122 [0,0020-10,9665] (Πίνακας 10.16).

Πίνακας 10.16. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* στον καρκινικό ιστό των υπό μελέτη δειγμάτων .

Ιστός	<i>Ang-1/h-PBGD</i>	<i>Ang-2/h-PBGD</i>
Καρκινικός ιστός	Μέση τιμή: 0,9373 [0,0002-11,2039]	Μέση τιμή: 1,4122 [0,0020-10,9665]

Ακολούθως, με βάση τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* στον καρκινικό ιστό ομαδοποιήθηκαν οι ασθενείς σε αυτούς που παρουσίαζαν υπερέκφραση του γονιδίου *Ang-1* σε σχέση με το γονίδιο *Ang-2* (Group 7), στην ομάδα με παρόμοια επίπεδα έκφρασης των δυο γονιδίων (Group 8) και τέλος στην υποομάδα των ασθενών με υπερέκφραση του γονιδίου του *Ang-2* (Group 9). Ειδικότερα, **στην ομάδα 7 (Group 7)** ανήκουν 14/40 ασθενείς (35,00%) με μέση τιμή *Ang-1/h-PBGD* mRNA 1,3369 [0,0348-11,2039], στατιστικά υψηλότερη από αυτή της *Ang-2*. **Στην ομάδα 8 (Group 8)**, με παρόμοια επίπεδα έκφρασης των δυο γονιδίων στον καρκινικό ιστό, 14/40 ασθενείς (35,00%), με μέση τιμή *Ang-1/h-PBGD*: 0,5813 [0,0053-3,5714] και *Ang-2/h-PBGD*: 0,6904 [0,0045-2,7177]. Τέλος, **στην ομάδα 9 (group 9)** είχαμε 12/40 (30,00%) ασθενείς με μέση τιμή *Ang-1/h-PBGD*: 0,8862 [0,0002-2,6480] και στατιστικά χαμηλότερη μέση τιμή της *Ang-2/h-PBGD*: 3,8378 [0,0128-10,9665] ($P < 0,05$) (Πίνακας 10.17).

Πίνακας 10.17. Ποσοτική έκφραση των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* στον καρκινικό ιστό των τριών ομάδων ασθενών (Group 7-9).

	Group 7	Group 8	Group 9
<i>Ang-1/h-PBGD</i> mRNA	Μέση τιμή: 1,3369 [0,0348 - 11,2039]	Μέση τιμή: 0,5813 [0,0053-3,5714]	Μέση τιμή: 0,8862 [0,0002-2,6480]
<i>Ang-2/h-PBGD</i> mRNA	Μέση τιμή: 0,0548 [0,0020-0,1786]	Μέση τιμή: 0,6904 [0,0045-2,7177]	Μέση τιμή: 3,8378 [0,0128-10,9665]

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων έκφρασης των *Ang-1* και *Ang-2* γονιδίων και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων των ασθενών. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν είναι το φύλο, ο βαθμός διαφοροποίησης, η σταδιοποίηση κατά TNM και η παρουσία ή μη διηθημένων λεμφαδένων. Από τα αποτελέσματά μας προέκυψε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* και του σταδίου T του όγκου ($p = 0.0364$) καθώς επίσης και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N) σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM ($p = 0.0363$) (Πίνακας 10.18).

Πίνακας 10.18. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Ang-1/Ang-2* σε καρκινικό ιστό με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Παράμετροι	Ομάδες ασθενών με βάση τα επίπεδα έκφρασης <i>Ang-1vsAng-2</i> /h-PBGD			P
	“Group 7”	“Group 8”	“Group 9”	
Φύλο				P>0,05
Άντρες	6	7	6	
Γυναίκες	8	7	6	
Βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης				0.1938
Υψηλός	0	3	0	
Μέσος	12	11	4	
Χαμηλός	2	0	8	
TNM σταδιοποίηση				
T				0.03644
T1	1	0	2	
T2	2	3	2	
T3	8	11	8	
T4	3	0	0	
N				0.03643
N0	11	10	5	
N1	2	0	3	
N2	1	2	4	
M				
M0	14	14	12	
M1	0	0	0	

10.4.4. Η έκφραση της *Ang-1* σε σχέση με την *Ang-2* σε μη καρκινικό ιστό.

Στον μη καρκινικό ιστό των υπό ανάλυση ασθενών που έπασχαν από αδενωκαρκίνωμα παχέος εντέρου, η μέση τιμή έκφρασης *Ang-1/h-PBGD* mRNA ήταν 3,6248 [0,0530-16,5433], ενώ η μέση τιμή *Ang-2/h-PBGD* mRNA 0,7492 [0,0012-5,3992] στον ίδιο ιστό (Πίνακας 10.19).

Πίνακας 10.19. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* στο μη καρκινικό ιστό.

Ιστός	<i>Ang-1 /h-PBGD</i>	<i>Ang-2 /h-PBGD</i>
Μη καρκινικός ιστός	Μέση τιμή: 3,6248 [0,0530- 16,5433]	Μέση τιμή: 0,7492 [0,0012-5,3992]

Ακολουθως, με βάση τα μεταξύ των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* επιπέδων έκφρασης στον μη καρκινικό ιστό, οι ασθενείς (34/40, 85,00%) απετέλεσαν **την ομάδα 10 (Group 10)** που παρουσίαζαν υπερέκφραση του γονιδίου *Ang-1* σε σχέση με το *Ang-2* στον μη καρκινικό ιστό. Η μέση τιμή *Ang-1/h-PBGD* mRNA είναι 4,0721 [0,0697-16,5433] στατιστικά υψηλότερη από αυτή του γονιδίου *Ang-2* [*Ang-2/h-PBGD*: 0,5807 [0,0010-5,3991] ($p < 0,05$)]. **Η ομάδα 11 (Group 11)** περιλαμβάνει 3 ασθενείς (3/40, 7,50%) με παρόμοια επίπεδα έκφρασης των δυο γονιδίων στο μη καρκινικό ιστό {μέση τιμή *Ang-1/h-PBGD*: 2,0123 [0,0124-3,0123], *Ang-2/h-PBGD*: 1,2153 [0,0109-1,8771]}. **Τέλος, η ομάδα 12 (group 12)** απαρτίζεται από τρεις ασθενείς (3/40, 7,50%) με μέση τιμή έκφρασης της *Ang-1/h-PBGD*: 0,1670 [0,0530-0,3916], στατιστικά χαμηλότερη από αυτή του γονιδίου *Ang-2* {μέση τιμή: *Ang-2/h-PBGD*: 2,1917 [1,5777-3,3690] ($P < 0,05$)} (Πίνακας 10.20).

Πίνακας 10.20. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του mRNA των γονιδίων Ang-1 και Ang-2 στις τρεις ομάδες στον μη καρκινικό ιστό (Group 10-12).

	Group 10	Group 11	Group 12
Ang-1 / h-PBGD mRNA	<i>Μέση τιμή:</i> 4,0721 [0,0697-16,5433]	<i>Μέση τιμή:</i> 2,0123 [0,0124-3,0123]	<i>Μέση τιμή:</i> 0,1670 [0,0530-0,3916]
Ang-2 / h-PBGD mRNA	<i>Μέση τιμή:</i> 0,5807 [0,0010-5,3991]	<i>Μέση τιμή:</i> 1,2153 [0,0109-1,8771]	<i>Μέση τιμή:</i> 2,1917 [1,5777-3,3690]

ΣΥΖΗΤΗΣΗ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

11.1 Εισαγωγή.

Ο ορθο-κολικός καρκίνος είναι ένας από τους πιο συχνούς κακοήθεις όγκους σε δυτικές χώρες. Παγκοσμίως περίπου πάνω από ένα εκατομμύριο άνθρωποι ετησίως αναπτύσσουν αυτού του είδους των όγκων και περισσότεροι από τους μισούς από αυτούς τους ασθενείς θα πεθάνουν από αυτήν την κακοήθεια.²⁸⁹ Για να υπάρξει δυνατότητα πρόγνωσης και ανάπτυξης σωστού σχεδίου θεραπείας για τη νόσο, έχει αναπτυχθεί ο όρος ποσοστό πενταετούς επιβίωσης. Το ποσοστό επιβίωσης συχνά βασίζεται σε μεγάλο αριθμό δεδομένων από τους ασθενείς που νόσησαν στο παρελθόν από κολο-ορθικό καρκίνο, ωστόσο δεν μπορεί να προβλέψει για κάθε ασθενή ξεχωριστά την πιθανότητα θεραπείας της νόσου. Ο τύπος και το στάδιο του καρκίνου ενός ατόμου είναι σημαντικά στοιχεία για την εκτίμηση του προσδόκιμου. Για τον καρκίνο του παχέος εντέρου το στάδιο I έχει 92% ποσοστό επιβίωσης, το στάδιο IIA 87%, το στάδιο IIB 63%, το στάδιο IIIA 89%, το IIIB 69%, το IIIC 53% και τέλος το IV έχει 11%.²⁹⁰ Για τον καρκίνο του ορθού το στάδιο I έχει 87% ποσοστό επιβίωσης, το στάδιο IIA 80%, το στάδιο IIB 49%, το στάδιο IIIA 84%, το IIIB 71%, το IIIC 58% και τέλος το IV έχει 12%.²⁹¹ Πολλοί ακόμα παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την πενταετή επιβίωση ενός ασθενούς, όπως το στάδιο της νόσου, το στάδιο T όσο και ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων, ο βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης, η περινευρική διήθηση, η αγγειακή διήθηση, τα χειρουργικά όρια, η γονιδιακή κατάσταση του όγκου, ειδικά σε κάποια στάδια, πχ στάδιο II και IV, η θεραπεία που έλαβε ο ασθενής καθώς και η απόκριση σε αυτήν. Όλοι αυτοί οι παράγοντες εξατομικεύονται σε κάθε ασθενή και αποτελούν τμήματα ενός παζλ, που πρέπει να συντάξει η θεραπευτική ομάδα προκειμένου να παρέχει τα βέλτιστα αποτελέσματα σε κάθε ασθενή. Το γεγονός όμως ότι ακόμα και ασθενείς του ίδιου σταδίου δεν έχουν το ίδιο προσδόκιμο αποτελεί μια τεράστια πρόκληση και δημιουργεί τεράστιο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα προκειμένου να υπάρξουν βελτιώσεις σε όλους τους τομείς της θεραπευτικής στρατηγικής της νόσου, από την βελτίωση της σταδιοποίησης των ασθενών μέχρι και την χειρουργική προσέγγιση και τη συστηματική επικουρική θεραπεία προκειμένου να βελτιωθεί ή να παραταθεί η επιβίωση.

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου τροποποιείται συνεχώς. Στην 7^η έκδοση του AJCC εγχειριδίου σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου υπήρξαν πολλές τροποποιήσεις στο σύστημα σταδιοποίησης TNM. Στην

προηγούμενη έκδοση το στάδιο II της νόσου υποδιαιρείτο στο στάδιο IIA και IIB που καθορίζονταν από το αν ο πρωτοπαθής όγκος ήταν T3 ή T4, αντίστοιχα. Στην τελευταία έκδοση το στάδιο II υποδιαιρείται σε τρεις υποομάδες. Το στάδιο IIA που αφορά όγκους που κατηγοριοποιούνται ως T3, το στάδιο IIB που ο πρωτοπαθής όγκος κατηγοριοποιείται ως T4a και τέλος το στάδιο IIC όπου ο όγκος κατατάσσεται ως T4b. Η τροποποίηση αυτή στοιχειοθετήθηκε από μία μελέτη 109.953 ασθενών που έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου της βάσης δεδομένων SEER. Με βάση αυτή την βάση δεδομένων διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν αρνητικούς λεμφαδένες και ήταν σταδίου T4a, δηλαδή ο όγκος διηθούσε το σπλαχνικό περιτόναιο είχαν πρόγνωση πενταετούς επιβίωσης κοντά στο 79,6% έναντι των ασθενών που ήταν χωρίς λεμφαδένες και σταδίου T4b, όπου διηθεί ο όγκος παρακείμενα όργανα και η πενταετή επιβίωση ήταν χαμηλότερη (58,4%).²⁹² Ακόμα το στάδιο III υποδιαιρέθηκε περαιτέρω προκειμένου το στάδιο της νόσου να είναι περισσότερο ακριβές και να αντικατοπτρίζει τη βιολογική συσχέτιση μεταξύ της έκτασης της νόσου και του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων. Έτσι πλέον το στάδιο IIIA (με T1-2 και N2) σταδιοποιείται σε IIIA (με T1,N2a) και IIIB (T2, N2a ή T1-2, N2b). Τέλος, οι ασθενείς με νόσο T4b, N1 που σταδιοποιούνταν ως IIB πλέον σταδιοποιούνται IIC, διότι αυτοί οι ασθενείς έχουν παρόμοιο προσδόκιμο με τους ασθενείς με T3-4,N2 νόσο.²⁹³

Η κατάταξη της λεμφαδενικής διήθησης τροποποιήθηκε, επίσης, προκειμένου να αντανakλά την προγνωστική σημασία του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων. Το στάδιο N1 στο οποίο υπήρχαν 1-3 διηθημένοι λεμφαδένες υποδιαιρέθηκε σε N1a (με έναν διηθημένο λεμφαδένα) και N1b (με 2-3 διηθημένους λεμφαδένες). Το στάδιο N2 (4 ή παραπάνω διηθημένους λεμφαδένες) έχει διαιρεθεί στο N2a (4-6 διηθημένοι λεμφαδένες) και N2b (από 7 και πάνω διηθημένους λεμφαδένες). Τέλος, όταν ο όγκος εναποτίθεται στον υποορογόννιο, το μεσεντέριο ή σε μη περιτοναϊκό περικολικό ή περιόρθικό ιστό χωρίς επιχώριους λεμφαδένες κατατάσσεται στο στάδιο N1c.²⁹⁴

Η βελτίωση της χειρουργικής τεχνικής στη χειρουργική του παχέος εντέρου επέφερε μεγάλες βελτιώσεις στην επιβίωση των ασθενών. Στη χειρουργική του ορθού ήταν επικεντρωμένη η προσπάθεια της χειρουργικής κοινότητας τα τελευταία 20 χρόνια με την τυποποίηση και την ευρεία αποδοχή της τεχνικής γνωστής ως TME.²⁹⁵ Κατά την εκτομή του ορθού η διατήρηση της μεσοορθικής περιτονίας του ορθού μειώνει το ποσοστό της τοπικής υποτροπής.²⁹⁶ Με την εφαρμογή αυτής της τεχνικής

στη χειρουργική του ορθού μειώθηκε η πιθανότητα τοπικής υποτροπής από 40% σε 20% και σε μερικές περιπτώσεις ακόμη και κάτω από 10%.²⁹⁷ Αυτά τα αποτελέσματα έχουν συσχετιστεί με μία σταθερή βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του ορθού.²⁹⁸

Τα τελευταία χρόνια εκτός από την χειρουργική του ορθού επήλθε τροποποίηση της χειρουργικής τεχνικής του παχέος εντέρου, που έχει τυποποιηθεί πλέον με επακόλουθο τη βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών.²⁹⁹ Ιστορικά, η επιβίωση των ασθενών, που έπασχαν από καρκίνο του παχέος εντέρου, ήταν πάντοτε 5% έως 10% υψηλότερη από ό,τι σε ασθενείς με καρκίνο του ορθού.³⁰⁰ Με τη βελτίωση της χειρουργικής του καρκίνου του ορθού, που εφαρμόζεται σε πολλές χώρες, επήλθε βελτίωση στην επιβίωση αυτών των ασθενών.³⁰¹ Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι, ότι οι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο παχέος εντέρου έχουν χειρότερη πρόγνωση από αυτή των ασθενών με καρκίνο του ορθού, αν και επικουρική χημειοθεραπεία κατά πάσα πιθανότητα, εφαρμόζονται συχνότερα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και συμβάλλει και αυτή στη βελτίωση του προσδόκιμου.³⁰²

Τα παραπάνω εγείρουν το ζήτημα της βελτίωσης της χειρουργικής του κόλου για καρκίνο με την εφαρμογή της χειρουργικής εκτομής ακολουθώντας τα εμβρυϊκά πλάνα διαχωρίζοντας το σπλαχνικό από το τοιχωματικό περιτόναιο (σε αναλογία με την έννοια TME) και την αληθινή κεντρική απολίνωση του αγγειακού μίσχου. Με αυτήν την τεχνική διατηρείται η ακεραιότητα των εμβρυολογικών περιτόναιων? γύρω από το μεσοκολικό λίπος, μεγιστοποιώντας τον αριθμό των λεμφαδένων που μπορούν να συμπεριληφθούν. Ο αριθμός των λεμφαδένων μπορεί να μεταφράζεται σε βελτιωμένη επιβίωση καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι ο αριθμός των λεμφαδένων που εκτέμνονται συσχετίζεται με την πρόγνωση.³⁰³ Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι – κατ’ αναλογία με την TME - το άθικτο των στρωμάτων της σπλαχνικής περιτονίας του παρασκευάσματος του κόλου έχει προγνωστική σημασία.³⁰⁴ Η έκταση της εκτομής και η ποιότητα του παρασκευάσματος αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες της επιβίωσης των ασθενών.³⁰⁵ Ακόμη και με την εισαγωγή της επικουρικής χημειοθεραπείας, η σημασία αυτών των παραγόντων υφίστανται, ίσως σε μικρότερο βαθμό.³⁰⁶ Αυτή η χειρουργική τεχνική που έχει προταθεί για την χειρουργική του παχέος εντέρου είναι γνωστή ως CME (complete mesocolic excision).

Ακολουθώντας τις αρχές της TME και CME για την χειρουργική του κολοορθικού καρκίνου, το ποσοστό επιπλοκών που σχετίζονται με την χειρουργική

επέμβαση δεν διαφέρει από το ποσοστό επιπλοκών της χειρουργικής, που εφαρμοζόταν στο παρελθόν.³⁰⁷ Ωστόσο, οι χειρουργοί που ακολουθούν αυτές τις χειρουργικές αρχές έχει αποδειχθεί ότι έχουν επιτύχει R0 εκτομή σε ποσοστό 97%.³⁰⁸

Τέλος, η απόφαση για έναρξη επικουρικής χημειοθεραπείας και το είδος της αποτελούν πολύ σημαντικούς παράγοντες για την θεραπευτική στρατηγική της αντιμετώπισης του κολο-ορθικού καρκίνου. Στο στάδιο II της νόσου, που αποτελεί μία γκριζα ζώνη για την έναρξη ή όχι επικουρικής θεραπείας, οι κατευθυντήριες οδηγίες συστήνουν ότι η λήψη της απόφασης για την έναρξη της θεραπείας γίνεται από τον ασθενή και τον ογκολόγο μετά από συζήτηση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της θεραπείας. Αυτό συμβαίνει, γιατί το προσδόκιμο αυτού του σταδίου είναι καλό και δεν προσφέρει πολλά η χημειοθεραπεία, σύμφωνα με προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες. Τελευταίες μελέτες για την αποτελεσματικότητα ή όχι της επικουρικής θεραπείας αναφέρονται στη χρήση του μοριακού δείκτη της “Μικροδορυφορικής αστάθειας, MSI (microsatellite instability)” του όγκου..

Η χημειοθεραπεία χορηγείται επιπρόσθετα μετά την χειρουργική αφαίρεση του καρκίνου με σκοπό την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που πιθανόν να έχουν παραμείνει και που είναι αδύνατον να εντοπισθούν διεγχειρητικά ή με απεικονιστικές μεθόδους λόγω του μικροσκοπικού μεγέθους που έχουν. Η μικροσκοπική εξέταση του όγκου και των λεμφαδένων που έχουν αφαιρεθεί δίνει την δυνατότητα στο ιατρό να σχηματίσει μία κατ’ αρχήν άποψη για τον κίνδυνο επανεμφάνισης του όγκου. Η ωφελιμότητα της χημειοθεραπείας ίσως να είναι μικρή σε ασθενείς με όγκο με περιορισμένους παράγοντες κινδύνου και η ασθένεια να έχει μία πολύ καλή πορεία με την χειρουργική αφαίρεση και μόνο. Αν όμως ο όγκος περιγράφεται ως υψηλού κινδύνου για επανεμφάνιση, τότε η χημειοθεραπεία θα περιορίσει αυτό το ενδεχόμενο και θα ενισχυθεί ακόμη περισσότερο η πιθανότητα θεραπείας.

Συνοπτικά, μπορούμε να πούμε ότι η θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού έχει ως ακρογωνιαίο λίθο μία χειρουργική επέμβαση που διέπει τις αρχές της ολικής εκτομής του μεσοκόλου και μεσοορθού (CME και TME αντίστοιχα) και της υψηλής απολίνωσης των αγγείων. Αυτό, γιατί η χειρουργική επέμβαση μπορεί να βελτιώσει το προσδόκιμο επιβίωσης περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη μορφή θεραπείας.³⁰⁹ Μελέτες της εφαρμογής της τεχνικής CME στη χειρουργική του παχέος εντέρου έδειξε αύξηση των ποσοστών πενταετούς

επιβίωσης στους ασθενείς σε ποσοστό 18%.³¹⁰ Επόμενο βήμα αποτελεί ένα καλό σύστημα σταδιοποίησης που θα ομαδοποιεί τους ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο, ώστε αυτοί να έχουν παρόμοια πρόγνωση και παρόμοια αντιμετώπιση.

Τέλος, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η καρκινογένεση αποτελεί μία μακροχρόνια πολυσταδιακή διαδικασία, όπου η άθροιση πολυάριθμων γενετικών μεταβολών οδηγεί στη διαταραχή των κυτταρικών λειτουργιών, όπως του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μεταγωγής σημάτων, με αποτέλεσμα τη γέννηση παθολογικών κυτταρικών κλώνων, οι οποίοι επικρατούν και στη συνέχεια αποκτούν την ικανότητα να διηθούν και να μεθίστανται. Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρούνται μορφολογικές μεταβολές στους πάσχοντες ιστούς, που ονομάζονται προκαρκινικές αλλοιώσεις. Η αναγνώριση και η επιτήρηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων αποτελεί σημαντικό στάδιο στην πρόληψη του καρκίνου.³¹¹ Ο κολοορθικός καρκίνος όπως και οι άλλες κακοήθειες δεν είναι η ίδια νόσος σε όλους τους ασθενείς. Η μοριακή βιολογία μας επιτρέπει σήμερα να βρούμε μοριακές αλλαγές από άτομο σε άτομο, οι οποίες διαφοροποιούν τη νόσο, τόσο όσον αφορά την πρόγνωση όσο και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ανεύρεση αξιόπιστων προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών στον κολοορθικό καρκίνο έχει καθιερώσει την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο K-RAS ως προβλεπτικό δείκτη για τη θεραπεία με τους anti- EGFR βιολογικούς παράγοντες, καθώς και μοριακούς δείκτες, όπως για παράδειγμα τη μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Η εξατομίκευση της θεραπείας θα προσφέρει στους ασθενείς το βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα με τη μικρότερη τοξικότητα, ενώ θα αποφεύγεται η ανώφελη οικονομική επιβάρυνση του συστήματος υγείας. Για το λόγο αυτό υπάρχει μία μεγάλη προσπάθεια να αποκωδικοποιηθεί η γενετική φύση του καρκίνου μελετώντας και τις διάφορες φάσεις εξαλλαγής των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και της ικανότητάς τους να διηθούν και να μεθίστανται. Μία τέτοια προσπάθεια έγινε στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετώντας τα γονίδια GA733-1, G1733-2, CEACAM5, Ang1 και Ang-2, που το καθένα από αυτά πιθανόν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης.

11.2. Τα γονίδια GA733-1 και GA733-2.

Η ανάπτυξη κακόηθων όγκων χαρακτηρίζεται από την ικανότητα του καρκινικού κυττάρου να υπερνικά την προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου και να

διεισδύει στους παρακαείμενους ιστούς.³¹² Πολλά διαφορετικά μόρια προσκόλλησης κυττάρου ενέχονται στην ανθρώπινη καρκινογένεση. Η έκφραση ορισμένων μορίων προσκόλλησης είναι περιορισμένη, ενώ η έκφραση ορισμένων άλλων επάγεται, κατά τη μετάβαση των κυττάρων από τη φυσιολογική τους δομή στην καρκινική.³¹³

Οι αρχικές μελέτες της γονιδιακής έκφρασης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου και σε ζωικά μοντέλα δεν αναφέρουν την έκφραση του GA733-1 είτε σε καρκινικά είτε σε δείγματα από φυσιολογικό ιστό.³¹⁴ Από την άλλη πλευρά, ορισμένες μελέτες, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, αναφέρουν την υψηλή έκφραση του mRNA GA733-1 σε δείγματα από καρκινικό και μη ανθρώπινο ιστό, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων ωοθηκών και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και δείγματα από ανθρώπινο τροφοβλάστη.^{315,316,317} Σε αυτή τη μελέτη, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *GA733-1* αξιολογήθηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε ασθενείς χωρίς σύγχρονες ηπατικές μεταστάσεις. Τα επίπεδα των GA733-1 mRNA μεταγράφων ήταν πολύ χαμηλά στην πλειοψηφία των καρκινικών και μη καρκινικών κυττάρων του ασθενούς. Επιπλέον, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου *GA733-1* και των άλλων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζονται περαιτέρω από μία πρόσφατη ανεξάρτητη μελέτη που χρησιμοποίησε δύο καρκινικές σειρές, την Hct-116-ltr (με χαμηλό ογκογόνο δυναμικό) και Hct-116, όπου τα προφίλ έκφρασης cDNA των δύο κυτταρικών σειρών έδειξαν ότι μία από τις μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών ήταν τα κατά 17 φορές μειωμένα επίπεδα έκφρασης του mRNA του GA733-1 (*Trop-2*) των κυττάρων της Hct-116-ltr σε σύγκριση με την έκφρασή του στα κύτταρα της Hct-116. Επιπλέον, τα κύτταρα της καρκινικής σειράς Hct-116-ltr σχηματίζουν μικρότερου μεγέθους όγκους (<25% του μεγέθους) σε σχέση με τους όγκους που σχηματίζουν τα κύτταρα της σειράς Hct-116, όταν πραγματοποιείται η αλλομεταμόσχευσή τους σε ποντικούς.³¹⁸ Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *GA733-1* γονιδίου σε καρκινικά κύτταρα του μαστού συσχετίζονται με μετάσταση στους λεμφαδένες.³¹⁹ Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματά μας έρχονται να ενισχύσουν την θεώρηση προηγούμενων μελετών, όπου το γονίδιο *GA733-1* προτάθηκε να σχετίζεται με προχωρημένη νόσο ή είναι ένα γονίδιο σχετιζόμενο με μορφές καρκίνου με επιθετική βιολογική συμπεριφορά και κατ' επέκταση με κακή πρόγνωση, αν και απαιτείται περαιτέρω μελέτες για την συσχέτισή του με την παρουσία ηπατικών μεταστάσεων.

Προηγούμενες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα³²¹ και ανθρώπινα δείγματα έχουν προτείνει μια πιθανή σχέση μεταξύ της έκφρασης του *GA733-2* γονιδίου και της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων.³²² Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *GA733-2* έχουν συσχετιστεί με φτωχή πρόγνωση της νόσου.³²³ Με βάση μία μελέτη της έκφρασης του *GA733-2* γονιδίου στον καρκίνο του λάρυγγα, η απουσία της έκφρασής του στον πρωτοπαθή όγκο σχετίζεται με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.³²⁴ Σε αυτή τη μελέτη, η μείωση του *GA733-2* mRNA στον καρκινικό ιστό συσχετίζεται με την παρουσία διηθημένων λεμφαδένων. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην μεθυλίωση των CpG νησίδων, η οποία έχει ενοχοποιηθεί προηγουμένως για την γονιδιακή σίγαση του *GA733-2* σε καρκινικά κύτταρα.³²⁵

Στην παρούσα εργασία η μειωμένη έκφραση του *GA733-2* γονιδίου στον καρκινικό ιστό των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία διηθημένων λεμφαδένων. Υποθέσαμε ότι τα μειωμένα επίπεδα *GA733-2* mRNA στα καρκινικά κύτταρα αυξάνει την πιθανότητα παρουσίας διηθημένων λεμφαδένων, ένα φαινόμενο που έχει επίσης παρατηρηθεί στον καρκίνο του λάρυγγα.³²⁶ Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *GA733-2* είναι ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης,³²⁷ όπου η απουσία ή μειωμένη έκφραση του γονιδίου *GA733-2* έχει ως αποτέλεσμα τα χαμηλά επίπεδα της έκφρασης της πρωτεΐνης προσφύσεως, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αυξημένη κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και το δυναμικό μετάστασής τους. Ως εκ τούτου, αυτό αυξάνει την πιθανότητα διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο καθώς και τη δυνατότητά τους να μεθίστανται στους επιχώριους λεμφαδένες.³²⁸

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την έκφραση των *GA733-1/-2* γονιδίων σε παρασκευάσματα από ασθενείς που έπασχαν από αδενοκαρκίνωμα του κόλου και του ορθού, αναδεικνύουν ότι η έκφραση του γονιδίου *GA733-2* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας πρώιμος, με ευαισθησία και αξιοπιστία δείκτης για την μετάσταση και την κακή πρόγνωση στον κολο-ορθικό καρκίνο και ειδικά των πρώιμων σταδίων. Αυτό συμβαίνει λόγω της ισχυρής συσχέτισης που παρατηρήθηκε μεταξύ της μείωσης των επιπέδων έκφρασης του *GA733-2* γονιδίου και της λεμφαδενικής διήθησης. Περαιτέρω μελέτες χρησιμοποιώντας ένα μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων από καρκίνο παχέος εντέρου μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη σημαντικών διαγνωστικών εργαλείων για την καλύτερη κλινική διάγνωση και πρόγνωση.

11.3. Το γονίδιο CEACAM5.

Η δομή της πρωτεΐνης CEA αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο δομής Ig σχήματος V, ακολουθούμενο από 6 δομές Ig σχήματος I και ένα υδρόφοβο καρβοξυτελικό άκρο. Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από 26 αμινοξέα που είναι η GPI (glycophosphatidyl inositol) περιοχή προσκόλλησης μέσω της οποίας συνδέεται το CEA με την πλασματική μεμβράνη.³²⁹ Το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA), που είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης, υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα αυξημένα επίπεδα του CEA στον ορό του αίματος μπορούν να προβλέψουν την υποτροπή της νόσου ή την παρουσία μεταστάσεων μετά την εγχείρηση με μια αναφερόμενη ευαισθησία 60-95%,³³⁰ και πιο ευαίσθητο για την εμφάνιση μεταστάσεων στο ήπαρ.³³¹ Παρά το γεγονός αυτό, η παρακολούθηση της μέτρησης του CEA είχε μικρή επίπτωση τόσο στην θνησιμότητα³³² όσο και στην πρώιμη διάγνωση υποτροπών, προκειμένου να γίνει μια δεύτερη χειρουργική παρέμβαση, αφού συχνά υπάρχει εκτεταμένη νόσος που δεν επιδέχεται εκτομή³³³.

Η παρούσα μελέτη αλλά και προηγούμενες μελέτες³³⁴ δεν έχουν αναδείξει συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *CEACAM5* στα καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς που πάσχουν από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με την ποσοτική του έκφραση στο περιφερικό αίμα. Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει μια πιθανή εμπλοκή της κυτταρικής πρωτεΐνης GPI-PLD (GPI-specific phospholipase D) στην έκκριση του καρκινο-εμβρυικού αντιγόνου.³³⁵ Επιπλέον στοιχεία από διάφορες μελέτες φανερώνουν ότι η κυτταρική πρωτεΐνη GPI-PLD προκαλεί υδρόλυση και απελευθέρωση της πρωτεΐνης CEA από τα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου³³⁶ και αυτό αυξάνει την μεταστατική δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων³³⁷. Ο ρόλος του GPI-PLD, τόσο της πρωτεΐνης όσο και του γονιδίου, και ειδικότερα η συσχέτιση του με το μόριο του CEA χρήζει περαιτέρω ερευνητικών προσπαθειών. Η μέτρηση των CEA mRNA μεταγράφων φαίνεται να αποτελεί έναν περισσότερο ευαίσθητο δείκτη σε σχέση με την μέτρηση της πρωτεΐνης στο ορό του αίματος για την πρόγνωση της επανεμφάνισης του όγκου.³³⁸

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική PCR, η οποία έχει μεγάλη ευαισθησία στην ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων, σε σχέση με τις τεχνικές

που ακολούθησαν άλλες ερευνητικές ομάδες, όπως είναι η ανοσοιστοχημεία ή ποσοτική RIA.³³⁹ Από τα αποτελέσματά μας εντοπίστηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του CEACAM5 mRNA και της διαφοροποίησης των κυττάρων (histologic grade) ($p=0.0465$ μεταξύ της ομάδας 2 προαναφέραμε και της ομάδας 3, όπου είχε υπερέκφραση του CEACAM5 στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα μη καρκινικά κύτταρα). Προηγούμενες μελέτες σε *in vivo* και *in vitro* μοντέλα παρουσίασαν ότι η υπερέκφραση των γονιδίων CEACAM5 και CEACAM6 οδηγεί σε μείωση της κυτταρικής διαφοροποίησης^{340,341,342} και διαταραχή της αρχιτεκτονικής των ιστών³⁴³. Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, SW122 and Caco-2, βρέθηκε άμεση συσχέτιση της έκφρασης του CEACAM5/6 με την διαφοροποίηση των κυττάρων κολο-ορθικών καρκινικών σειρών,³⁴⁴ κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται με τα αποτελέσματά μας και σε κλινικά δείγματα ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο.

11.4. Τα γονίδια Ang-1 και Ang-2.

Η αγγειογένεση στους όγκους είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες που δρουν θετικά ή αρνητικά. Οι παράγοντες αυτοί εκκρίνονται από τα καρκινικά ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι απαραίτητοι για την δημιουργία αγγειακού δικτύου που εξασφαλίζει την επιβίωση και ανάπτυξη, αλλά και το μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Η πρόσφατη έρευνα επικεντρώνεται στην αναγνώριση των παραγόντων αυτών που ονομάστηκαν προ-αγγειογενετικοί, με σκοπό την κατανόηση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης και την φαρμακευτική παρέμβαση – αναστολή της.

Την τελευταία δεκαετία πολλοί τέτοιοι προ-αγγειογενετικοί παράγοντες αναγνωρίστηκαν, αποσαφηνίστηκε σε μεγάλο μέρος η συμμετοχή τους στην αγγειογένεση και αναπτύχθηκαν φαρμακευτικοί αναστολείς που τους στοχεύουν. Η στόχευση αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της κλασσικής θεραπείας, καθώς θεωρητικά, στερείται σοβαρών επιπλοκών, η δημιουργία νέων αγγείων συμβαίνει νωρίς κατά την καρκινογένεση και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εύκολα προσβάσιμα μέσω της κυκλοφορίας, ενώ υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι δεν αναπτύσσουν εύκολα αντίσταση σε φαρμακευτικές παρεμβάσεις.³⁴⁵

Ως επακόλουθο των παραπάνω εξελίξεων, πρόσφατα αναπτύχθηκαν περισσότεροι από 200 φαρμακευτικοί παράγοντες που στοχεύουν την αγγειογένεση σε διάφορες

μορφές καρκίνου στον άνθρωπο. Η κλινική εφαρμογή τους έδειξε ότι τα αποτελέσματα στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι υποδεέστερα των αναμενομένων, με εμφάνιση σε μερικές περιπτώσεις σοβαρών επιπλοκών. Σχεδόν σε όλες τις νεότερες, στοχευμένες στην αγγειογένεση θεραπείες υπάρχουν υποομάδες ασθενών που ωφελούνται περισσότερο χωρίς να είναι πάντα εφικτή η αναγνώριση των παραγόντων (μοριακών, δημογραφικών κλπ) που θα μπορούσαν να προβλέψουν την απάντηση στις θεραπείες αυτές. Διαπιστώθηκε ότι η περιπλοκότητα αυτή στα μοτίβα απάντησης οφείλεται στην περιπλοκότητα των οδών που χρησιμοποιούν οι παράγοντες για να μεταδώσουν το προ-αγγειογενετικό σήμα, στην περιπλοκότητα των μεταξύ τους σχέσεων, αλλά και στην ύπαρξη πληθώρας αντι-αγγειογενετικών παραγόντων των οποίων οι σχέσεις με τους προαγγειογενετικούς παράγοντες είναι ελάχιστα κατανοητή.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα ασθενών που έπασχαν από καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα προερχόμενα από τον φυσιολογικό βλεννογόνο για την κατανόηση της διαδικασίας της αγγειογένεσης στην καρκινική εξαλλαγή. Σε αυτή τη μελέτη δείχτηκε ότι όλα τα δείγματα εκφράζουν τόσο *Ang-1* όσο και *Ang-2* ($p=0,03077$). Η μείωση της έκφρασης της *Ang-1* σχετίζεται με μεγαλύτερο στάδιο T του όγκου (σύμφωνα με TNM ταξινόμηση), ενώ η αύξηση της έκφραση της *Ang-2* με τον ιστολογικό βαθμό (grade) του όγκου ($p = 0,00496$). Στην περίπτωση της σύγκρισης της έκφρασης της *Ang-1/Ang-2*, η αύξηση της *Ang-1* σε σχέση με την *Ang-2*, στον καρκινικό ιστό βρέθηκε ότι σχετίζεται με εξέλιξη του σταδίου T του όγκου και την παρουσία διήθησης σε επιχώριους λεμφαδένες.

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει το ρόλο των αγγειοποιητινών στο γαστρεντερικό σύστημα και την εξέλιξη του καρκίνου και των μεταστάσεων του. Σε μία μελέτη που έγινε μέτρηση της έκφρασης των *Ang-1* και *Ang-2* σε δείγματα από φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος εντέρου και δείγματα από καρκίνο παχέος εντέρου, καθώς επίσης και από δείγματα καρκινικών σειρών, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια σχετικά παρόμοια έκφραση της *Ang-1* με την *Ang-2* στο φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Ωστόσο, σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν από τον καρκίνο του παχέος εντέρου παρουσίασαν έκφραση της *Ang-2*, ενώ μόνο 6 από 11 (54%) έκφραση της *Ang-1* ($p = 0.04$). Ομοίως, η πλειονότητα των κυτταρικών σειρών από καρκίνο του παχέος εντέρου εκφράζουν *Ang-2* (14/18)

(78%), ενώ λιγότεροι (7/18) (39%) εκφράζουν την Ang-1 ($p = 0.04$). Αυτές οι μελέτες προτείνουν, ότι στον φυσιολογικό ιστό έχουμε παρόμοια έκφραση των αγγειοποιητινών, ενώ η διαταραχή αυτής της παρόμοιας έκφρασης μπορεί να παίζει ρόλο στην αγγειογένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επομένως, η διαταραχή της ισορροπίας στην έκφραση των αγγειοποιητινών στο φυσιολογικό ιστό συμβάλλει στην ομοιόσταση του οργανισμού, ενώ στον καρκινικό ιστό η υπερέκφραση της Ang-2 έναντι της Ang-1 οδηγεί στην έναρξη της αγγειογένεσης.³⁴⁶

Σε μία άλλη μελέτη όπου έγινε ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της έκφρασης των Ang-1 και Ang-2 σε δείγματα με καρκίνο του παχέος εντέρου και δείγματα ηπατικών μεταστάσεων, τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια έκφραση των Ang-1 και Ang-2 στο φυσιολογικό βλεννογόνο. Αντίθετα, στον καρκινικό ιστό υπήρχε απουσία της Ang-1 και παρουσία της Ang-2 σε όλους τους ιστούς. Ακολούθως, έγινε προσδιορισμός της προέλευσης των κυττάρων που εκφράζουν τις αγγειοποιητίνες και έδειξαν ότι οι Ang-1 και Ang-2 εκφράζονται παράλληλα στα επιθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Η Ang-2 εντοπιζόταν στα καρκινικά κύτταρα στο καρκινικό επιθήλιο, αλλά καμία έκφραση της Ang-1 στο καρκινικό επιθήλιο. Το ίδιο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε και στα δείγματα των ηπατικών μεταστάσεων. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν, επίσης, ότι η διαταραχή της ισορροπίας έκφρασης της Ang-2 έναντι της Ang-1 μπορεί να συνδέεται με την έναρξη αγγειογένεσης σε κακοήθεις ιστούς.³⁴⁷

Σε *in vivo* μελέτες χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, μία που υπερέκφραζε την Ang-1 και μία την Ang-2, και οι οποίες, ακολούθως, τοποθετήθηκαν υποδόρια σε ποντίκια. Τα ποντίκια με την κυτταρική σειρά που υπερέκφραζε την Ang-2 είχαν μεγάλη ανάπτυξη όγκων, αντίθετα με τα ποντίκια στα οποία είχαν εμφυτευτεί τα καρκινικά κύτταρα που είχαν υπερέκφραση της Ang-1 και ανέπτυξαν μικρότερους όγκους. Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα για το αγγειακό δίκτυο στις δύο περιπτώσεις.³⁴⁸

Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη θα μπορούσαμε να πούμε ότι η Ang-1, λόγω του ρόλου της στη σταθεροποίηση της υφιστάμενης δομής των αγγείων, υπερεκφράζεται στο φυσιολογικό ιστό. Πράγματι στην πλειοψηφία των ασθενών (34/40) της παρούσας μελέτης υπάρχει υπερέκφραση της Ang-1 σε σχέση με την Ang-2 στο μη καρκινικό βλεννογόνο, οφειλόμενο πιθανότατα στην ανάγκη του οργανισμού να διατηρήσει τις αγγειακές δομές του. Η μελέτη της έκφρασης των

αγγειοποιητινών σε περισσότερες από μία θέση του μη παθολογικού βλεννογόνου θα μπορούσε να πιστοποιήσει και να ενισχύσει την παρούσα διαπίστωση.

Στον καρκινικό ιστό διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των αγγειοποιητινών έχει άμεση συσχέτιση με το στάδιο T του όγκου. Πράγματι η αγγειοποιητίνη 2 υπερεκφράζεται σε σχέση με την αγγειοποιητίνη 1 στον καρκινικό ιστό και αυτό συμβαίνει, αφού όσο ο όγκος μεθίσταται σε παρακείμενες στοιβάδες του βλεννογόνου του εντέρου αυξάνονται και οι ανάγκες του όγκου σε θρεπτικά στοιχεία. Αποτέλεσμα των αυξημένων αναγκών του καρκινικού ιστού είναι η αυξημένη έκκριση της Ang-2 προκειμένου να αναπτυχθεί νέο αγγειακό δίκτυο. Η έκφραση της Ang-2 συσχετίστηκε με την παρουσία μεταστάσεων σε επιχώριους λεμφαδένες που ενισχύει τα αποτελέσματα και από προηγούμενες μελέτες.³⁴⁹ Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί ότι ο ρόλος της Ang-2 δεν περιορίζεται μόνο στην αγγειογένεση αλλά και στην ανάπτυξη λεμφαγγείων ή το ότι κατά την ανάπτυξη του όγκου αυξάνεται το καρκινικό φορτίο και προφανώς και η πιθανότητα να μεθίσταται σε επιχώριους λεμφαδένες, κάτι που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Σύνοψη διατριβής

Από την παρούσα μελέτη προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Η έκφραση του γονιδίου *GA733-1* συσχετίζεται με προχωρημένη νόσο.
- 2) Η έκφραση του γονιδίου *GA733-2* στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με την παρουσία ή όχι λεμφαδενικής διήθησης.
- 3) Η έκφραση του *CEACAM5* γονιδίου στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με τον βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων.
- 4) Δεν εντοπίστηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *CEACAM5* στα καρκινικά κύτταρα και των επιπέδων του καρκινο-εμβρυικού αντιγόνου στον ανθρώπινο ορό.
- 5) Τέλος, η έκφραση του *Ang-1* γονιδίου συσχετίστηκε με το στάδιο T του όγκου, ενώ η έκφραση του γονιδίου *Ang-2* με τον βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η έκφραση των αγγειοποιητινών *Ang-1* και *Ang-2* έχει άμεση συσχέτιση με το στάδιο T του όγκου καθώς και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κολο-ορθικός καρκίνος αποτελεί τον τέταρτο πιο συχνό τύπο καρκίνου τόσο στον αντρικό όσο και στο γυναικείο πληθυσμό και τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις ΗΠΑ. Τα τελευταία χρόνια όμως παρατηρείται σημαντική μείωση της επίπτωσης της νόσου. Η μείωση αυτή της θνητότητας της νόσου είναι απόρροια της πρόληψης και στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου μέσω των προληπτικών ελέγχων, της καλύτερης διάγνωσης και της βελτίωσης των θεραπευτικών μέσων που διατίθενται.

Ο κολο-ορθικός καρκίνος είναι μία ετερογενής νόσος με διαφορετική θεραπευτική στρατηγική για τον κάθε ασθενή που καθορίζεται από το στάδιο της νόσου και τη βιολογία του όγκου. Η εξέλιξη της μελέτης της μοριακής βάσης της καρκινογένεσης έχει βοηθήσει σημαντικά την κατανόηση της γενετικής φύσης του κολο-ορθικού καρκίνου, αν και υπάρχουν ακόμα πολλά προς διερεύνηση.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάστηκε στη μελέτη της γενετικής βάσης του κολο-ορθικού καρκίνου μελετώντας 40 ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο, από τους οποίους απομονώθηκε γενετικό υλικό τόσο από τα καρκινικά κύτταρα του όγκου όσο και από κύτταρα του μη νοσούντος εντερικού βλεννογόνου από παρακείμενες θέσεις προκειμένου να παρατηρήσουμε την έκφραση γονιδίων στο φυσιολογικό και παθολογικό ιστό του εντερικού βλεννογόνου. Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτική αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης-αντίστροφης μεταγραφής (q-RT-PCR) για τον προσδιορισμό της ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων *GA733-1*, *GA733-2*, *CEACAM5*, *Ang-1* και *Ang-2*. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίστηκαν στη συνέχεια με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η έκφραση του γονιδίου *GA733-1* ήταν πολύ χαμηλή έως μη ανιχνεύσιμη τόσο στο μη καρκινικό βλεννογονικό ιστό όσο και στον καρκινικό. Η έκφραση του γονιδίου *GA733-2* ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα και η μέση τιμή *GA733-2/h-PBGD* ήταν 273,31 (65.24-1,486.41) και 115,64 (11.58-1-189.14???) στο μη καρκινικό και καρκινικό ιστό, αντιστοίχως ($p = 0.0000195$). Στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις εντοπίστηκαν μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *GA733-2* και το στάδιο N της νόσου ($p = 0,0343$) και με την παρουσία ή μη λεμφαδενικής διήθησης ($p=0,008668$). Η έκφραση του *CEACAM5* γονιδίου στον ιστό ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα δείγματα με μέση τιμή *CEACAM5/h-PBGD mRNA*: 326,36 (11,97-3.3562,61) στο μη καρκινικό ιστό, ενώ στον καρκινικό ιστό η μέση τιμή *CEACAM5/h-PBGD mRNA* ήταν 317,60

(3.37 έως 8896.42). Σημαντική συσχέτιση εντοπίστηκε μεταξύ της έκφρασης του *CEACAM5* γονιδίου και του βαθμού διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων ($p=0.0465$). Τα επίπεδα του καρκινο-εμβρυϊκού αντιγόνου στον ανθρώπινο ορό αξιολογήθηκε σε περισσότερους από το 50% των δειγμάτων. Η μέση τιμή των επιπέδων του CEA στο περιφερικό ορό ήταν 6,5715 (0,86-24,95), ενώ δεν εντοπίστηκε κάποια συσχέτιση της έκφρασης του *CEACAM5* στα καρκινικά κύτταρα και των επιπέδων τους στο περιφερικό αίμα. Τέλος, τα γονίδια *Ang-1* και *Ang-2* εκφράζονται σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα. Η μέση τιμή έκφρασης *Ang-1/h-PBGD* ήταν 3,6248 (0,0530-16,5433) και 0,9373 (0,0002-11,2039) στο μη καρκινικό και καρκινικό ιστό, αντιστοίχως. Ως προς την έκφραση του γονιδίου *Ang-2*, η μέση τιμή *Ang-2/h-PBGD* ήταν 0,7492 (0,0012-5,3992) στο μη καρκινικό ιστό και 1,4122 (0,0020-10,9665) στον καρκινικό ιστό. Παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *Ang-1* και του σταδίου T του όγκου ($p=0.04536$) καθώς και του γονιδίου *Ang-2* και του βαθμού διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων ($p=0.0049$). Αναλύοντας τα αποτελέσματά μας προέκυψε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Ang-1/Ang-2* και του σταδίου T του όγκου ($p= 0.0364$) καθώς και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N) σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM ($p= 0.0363$).

Συμπερασματικά, η έκφραση του γονιδίου *GA733-1* συσχετίστηκε με την ανάπτυξη ηπατικών μεταστάσεων και του *GA733-2* γονιδίου με το στάδιο N της νόσου. Η αυξημένη έκφραση του *CEACAM5* γονιδίου πιθανόν να εμπλέκεται στο βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν εντοπίστηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του *CEACAM5* στα καρκινικά κύτταρα και των επιπέδων του στο περιφερικό αίμα. Ως προς την έκφραση των γονιδίων *Ang-1* και *Ang-2* προέκυψε ότι όσο αυξάνεται το στάδιο T του όγκου τόσο μειώνεται η έκφραση της *Ang-1*, ενώ η μειωμένη έκφραση της *Ang-2* παρατηρήθηκε στα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης καρκινικά κύτταρα. Τέλος, η διαφοροποίηση της έκφρασης των δύο αγγειοποιητινών στον καρκινικό ιστό συσχετίστηκε με το στάδιο T του όγκου ($p= 0.0364$) καθώς επίσης και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του κολο-ορθικό καρκίνου θα συμβάλει σημαντικά στην ορθολογικότερη και αποτελεσματικότερη θεραπεία της ασθένειας.

SUMMARY

The colo-rectal cancer is the fourth most common type of cancer in both the male and the female population and the second cause of death from cancer in the US. In recent years, however there is a significant reduction of disease effect. This reduction in disease mortality is a result of progress in the prevention and early detection of cancer through preventive controls, better diagnosis and better therapeutic means available.

Colorectal cancer is a heterogeneous disease with a different therapeutic strategy for each patient. The therapeutic strategy is determined by the stage of the disease and the biology of the tumor. The evolution of the study of molecular basis of carcinogenesis has greatly helped in understanding the genetic nature of colorectal cancer, although there are still many to be looked into.

This thesis is focused on the study of the genetic basis of colorectal cancer by studying 40 patients with colorectal cancer. From those patients genetic material was isolated from both the cancerous cells of the tumor and from cells of non-diseased intestinal mucosa from adjacent positions in order to observe the expression of the genes in normal and in pathological tissue of the intestinal mucosa. This was followed by quantitative reaction of the Polymerase chain reaction-reverse transcription (q-RT-PCR) to determine the quantitative expression of the genes GA733-1, GA733-2, CEACAM5, Ang-1 and Ang-2. These results were then correlated with clinicopathological features of the patients. The expression of the gene GA733-1 was very low to undetectable in both noncancerous mucosal tissue and cancerous tissue. Expression of the gene GA733-2 was detectable in all samples and the mean price GA733-2 / h-PBGD was 273.31 (65.24-1,486.41) and 115.64 (11.58-1-189.14) in noncancerous and cancerous tissue, respectively ($p = 0.0000195$). Statistically significant correlations were found between the expression of the gene GA733-2 and stage N of the disease ($p = 0,0343$), and with the presence or absence of lymph node infiltration ($p = 0,008668$). Expression of the gene CEACAM5 in the tissue was detectable in all samples with mean price CEACAM5 / h-PBGD mRNA: 326,36 (11,97-3.3562,61) in the non-cancerous tissue while in cancerous tissue the mean

price CEACAM5 / h -PBGD mRNA was 317.60 (3.37 to 8896.42). A significant correlation was detected between the expression of CEACAM5 gene and the degree of tumor cell differentiation ($p = 0.0465$). Levels of carcino embryonic antigen in human serum were assessed in more than 50% of the samples. The mean value of CEA levels in peripheral serum was 6.5715 (0.86 to 24.95), while a correlation of CEACAM5 expression was not detected in cancerous cells and their levels in the peripheral blood. Finally, Ang-1 genes and Ang-2 are expressed in all the study samples. The mean value of expression Ang-1 / h-PBGD was 3.6248 (0.0530 to 16.5433) and 0.9373 (0.0002 to 11.2039) in the non-cancerous and cancerous tissue, respectively. As to expression of Ang-2, the average value of Ang-2 / h-PBGD gene was 0.7492 (0.0012 to 5.3992) in noncancerous tissue and 1.4122 (0.0020 to 10.9665) in cancerous tissue. Significant correlations were observed between the expression of Ang-1 gene and the T stage of the tumor ($p = 0.04536$) as the Ang-2 gene and the tumor cell differentiation grade ($p = 0.0049$). Analyzing our results it turned up a correlation between the expression levels of genes Ang-1 / Ang-2 and T phase of the tumor ($p = 0.0364$) and with the presence of lymph node (N) according to the TNM staging system ($p = 0.0363$).

In conclusion, the expression of the GA733-1 gene was associated with the development of liver metastasis and GA733-2 gene with the N stage of disease. Increased expression of CEACAM5 gene might be related to the tumor cell differentiation grade, while it was not detected any correlation between the expression of CEACAM5 in cancer cells and its levels in peripheral blood. As to the expression of Ang-1 gene and Ang-2, it is evident that as the T phase of the tumor is increased the expression of Ang-1 is reduced, while the decreased expression of Ang-2 was observed in the low-grade tumor cells differentiation. Finally, the diversification of the expression of two angiopoietins in the tumor tissue was correlated with stage T of tumor ($p = 0.0364$) as well as with the presence of lymph node metastasis (N). These results suggest that a better understanding of colorectal cancer biology will contribute significantly to a more rational and effective treatment of the disease.

Βιβλιογραφία

- ¹ Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- ² Averbach AM, Jacquet P, Sugarbaker PH Surgical technique and colorectal cancer: impact on local recurrence and survival *Tumori* 1995; 81: 65–71
- ³ Siegel R1, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Mar-Apr;64(2):104-17. doi: 10.3322/caac.21220. Epub 2014 Mar 17.
- ⁴ Siegel R1, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. doi: 10.3322/caac.21208. Epub 2014 Jan 7.
- ⁵ Cheng L1, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. *Am J Clin Oncol*. 2011 Dec;34(6):573-80. doi: 10.1097/COC.0b013e3181fe41ed.
- ⁶ Cheng L1, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. *Am J Clin Oncol*. 2011 Dec;34(6):573-80. doi: 10.1097/COC.0b013e3181fe41ed.
- ⁷ Siegel R1, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul-Aug;61(4):212-36. doi: 10.3322/caac.20121. Epub 2011 Jun 17.
- ⁸ Levine JS, Ahnen DJ. Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med*. 2006 Dec 14;355(24):2588-9.
- ⁹ Hemminki K1, Eng C. Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. *J Med Genet*. 2004 Nov;41(11):801-7.
- ¹⁰ Ahsan H1, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, Wayne JD. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1998 Jun 1;128(11):900-5.
- ¹¹ Bonelli L1, Martines H, Conio M, Bruzzi P, Aste H. Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large bowel. A case-control study. *Int J Cancer*. 1988 Apr 15;41(4):513-7.
- ¹² Hampel H1, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J, Comeras I, de la Chapelle A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5783-8. doi: 10.1200/JCO.2008.17.5950. Epub 2008 Sep 22.
- ¹³ Galiatsatos P1, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2006 Feb;101(2):385-98.
- ¹⁴ Lutgens MW1, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Mar-Apr;19(4):789-99. doi: 10.1097/MIB.0b013e31828029c0.
- ¹⁵ Walker AR, Burkitt DP. Colonic cancer: hypotheses of causation, dietary prophylaxis, and future research. *Am J Dig Dis* 1976; 21: 910-7.
- ¹⁶ PWynder EL. The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res* 1975; 35: 3388-94.
- ¹⁷ World Cancer Research Fund in association with American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: eAmerican Institute for Cancer Research, 1997.
- ¹⁸ Hawk ET, Umar A. Colorectal cancer chemoprevention: an overview of the science. *Gastroenterology* 2004; 126: 1423-47.
- ¹⁹ Slattery ML. Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2000; 11: 142-6.
- ²⁰ Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 1027-39.

-
- ²¹ Corpet DE, Pierre F. Point: from animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 391-400.
- ²² Lamson DW, Brignall MS. Natural agents in the prevention of cancer. Part one: human chemoprevention trials. *Altern Med Rev* 2001; 6: 7-19.
- ²³ Lamson DW, Brignall MS. Natural agents in the prevention of cancer, part two: preclinical data and chemoprevention for common cancers. *Altern Med Rev* 2001; 6: 167-87.
- ²⁴ Ralston RA1, Truby H, Palermo CE, Walker KZ. Colorectal cancer and nonfermented milk, solid cheese, and fermented milk consumption: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(9):1167-79. doi: 10.1080/10408398.2011.629353.
- ²⁵ Phipps AII, Shi Q, Newcomb PA, Nelson GD, Sargent DJ, Alberts SR, Limburg PJ. Associations between cigarette smoking status and colon cancer prognosis among participants in North Central Cancer Treatment Group Phase III Trial N0147. *J Clin Oncol*. 2013 Jun 1;31(16):2016-23. doi: 10.1200/JCO.2012.46.2457. Epub 2013 Apr 1.
- ²⁶ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ²⁷ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ²⁸ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ²⁹ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ³⁰ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ³¹ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ³² Gunderson LL1, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):264-71. doi: 10.1200/JCO.2009.24.0952. Epub 2009 Nov 30.
- ³³ Gunderson LL1, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):264-71. doi: 10.1200/JCO.2009.24.0952. Epub 2009 Nov 30.
- ³⁴ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ³⁵ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ³⁶ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ³⁷ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ³⁸ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ³⁹ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ⁴⁰ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ⁴¹ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.
- ⁴² NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ⁴³ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ⁴⁴ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer

-
- ⁴⁵ Liebig C1, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, Berger DH, Albo D. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5131-7. doi: 10.1200/JCO.2009.22.4949. Epub 2009 Sep 8.
- ⁴⁶ Compton CC1, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):979-94.
- ⁴⁷ Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*. 2004 Nov-Dec;54(6):295-308.
- ⁴⁸ Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*. 2004 Nov-Dec;54(6):295-308.
- ⁴⁹ Jass JR1, Morson BC. Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 1987 Sep;40(9):1016-23.
- ⁵⁰ Recommendations for the reporting of resected large intestinal carcinomas. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Am J Clin Pathol*. 1996 Jul;106(1):12-5.
- ⁵¹ Compton CC1. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2002 Nov;2(3):149-60.
- ⁵² Compton CC1, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*. 2004 Nov-Dec;54(6):295-308.
- ⁵³ Recommendations for the reporting of resected large intestinal carcinomas. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Am J Clin Pathol*. 1996 Jul;106(1):12-5.
- ⁵⁴ Recommendations for the reporting of resected large intestinal carcinomas. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Am J Clin Pathol*. 1996 Jul;106(1):12-5.
- ⁵⁵ Van Cutsem E1, Nordlinger B, Adam R, Köhne CH, Pozzo C, Poston G, Ychou M, Rougier P; European Colorectal Metastases Treatment Group. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer*. 2006 Sep;42(14):2212-21. Epub 2006 Aug 10.
- ⁵⁶ Yoo PS1, Lopez-Soler RI, Longo WE, Cha CH. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clin Colorectal Cancer*. 2006 Sep;6(3):202-7.
- ⁵⁷ Fong Y1, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG, Marrero AM, Prasad M, Blumgart LH, Brennan MF. Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol*. 1997 Mar;15(3):938-46.
- ⁵⁸ Hayashi M1, Inoue Y, Komeda K, Shimizu T, Asakuma M, Hirokawa F, Miyamoto Y, Okuda J, Takeshita A, Shibayama Y, Tanigawa N. Clinicopathological analysis of recurrence patterns and prognostic factors for survival after hepatectomy for colorectal liver metastasis. *BMC Surg*. 2010 Sep 27;10:27. doi: 10.1186/1471-2482-10-27.
- ⁵⁹ Foster JH. Treatment of metastatic disease of the liver: a skeptic's view. *Semin Liver Dis*. 1984 May;4(2):170-9.
- ⁶⁰ Kemeny N1. Management of liver metastases from colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2006 Sep;20(10):1161-76, 1179; discussion 1179-80, 1185-6.
- ⁶¹ Stangl R1, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J. Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet*. 1994 Jun 4;343(8910):1405-10.
- ⁶² Hayashi M1, Inoue Y, Komeda K, Shimizu T, Asakuma M, Hirokawa F, Miyamoto Y, Okuda J, Takeshita A, Shibayama Y, Tanigawa N. Clinicopathological analysis of recurrence patterns and prognostic factors for survival after hepatectomy for colorectal liver metastasis. *BMC Surg*. 2010 Sep 27;10:27. doi: 10.1186/1471-2482-10-27.
- ⁶³ Steward J, Rankin FW: Blood supply of the large intestine: Its surgical consideration. *Arch* 1933; 26:843.
- ⁶⁴ Van Damme JPL, Bonte J: Vascular anatomy in abdominal surgery. New York: Thieme Verlag, 1990.
- ⁶⁵ Cheng B, Chen K, Gao S, Tu Z: Colon interposition. Resent results. *Cancer Res* 2000;231: 173-8.
- ⁶⁶ Steward J, Rankin FW: Blood supply of the large intestine: Its surgical consideration. *Arch* 1933; 26:843.

-
- ⁶⁷ Voiglio EJ, Boutillier du Retail C, Neidhardt JPH, et al: Gastrocolic vein: definition and report of two cases of avulsion. *Surg Radio Anat* 1998; 20: 197-201.
- ⁶⁸ Fishman SJ, Shamberger RC, Fox VL, Burrows PE: Endorectal pull-through abates gastrointestinal hemorrhage from colorectal venous malformations. *JPediatric Surg* 2000; 35: 982-4.
- ⁶⁹ Yada H, Sawai K, Taniguchi H, et al: Analysis of vascular anatomy and lymph node metastases warrants radical segmental bowel resection for colon cancer. *World J Surg* 1997; 21: 109-15.
- ⁷⁰ Volk EE1, Goldblum JR, Petras RE, Carey WD, Fazio VW. Management and outcome of patients with invasive carcinoma arising in colorectal polyps. *Gastroenterology*. 1995 Dec;109(6):1801-7.
- ⁷¹ Carcinoma of the colon. In: (ed) Corman ML: *Colon and rectal surgery*, 5th edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2005, pp 767-903.
- ⁷² Hohenberger W1, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis*. 2009 May;11(4):354-64; discussion 364-5. doi: 10.1111/j.1463-1318.2008.01735.x. Epub 2009 Nov 5.
- ⁷³ Hogan AM, Winter DC. Complete mesocolic excision--a marker of surgical quality? *J Gastrointest Surg*. 2009 Oct;13(10):1889-91. doi: 10.1007/s11605-009-0976-6. Epub 2009 Aug 5.
- ⁷⁴ Culligan K1, Coffey JC, Kiran RP, Kalady M, Lavery IC, Remzi FH. The mesocolon: a prospective observational study. *Colorectal Dis*. 2012 Apr;14(4):421-8; discussion 428-30. doi: 10.1111/j.1463-1318.2012.02935.x.
- ⁷⁵ Petrović T, Radovanović Z, Brebrina M, Gavrančić B. Complete mesocolic excision with central supplying vessel ligation new technique in colon cancer. *Arch Oncol* 2010; 18; 3:36-37.
- ⁷⁶ Petrović T, Radovanović Z, Brebrina M, Gavrančić B. Complete mesocolic excision with central supplying vessel ligation new technique in colon cancer. *Arch Oncol* 2010; 18; 3:36-37.
- ¹⁰⁸ P.A. Futreal, A. Kasprzyk, E. Birney, J.C. Mullikin, R. Wooster, M.R. Stratton, Cancer and genomics. *Nature* 409 (2001) 850-852.
- ¹⁰⁹ D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70.
- ¹¹⁰ R.J. Huebner, G.J. Todaro, Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64 (1969) 1087-1094.
- ¹¹¹ B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10 (2004) 789-799.
- ¹¹² P.A. Futreal, A. Kasprzyk, E. Birney, J.C. Mullikin, R. Wooster, M.R. Stratton, Cancer and genomics. *Nature* 409 (2001) 850-852.
- ¹¹³ B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10 (2004) 789-799.
- ¹¹⁴ H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal, Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417 (2002) 949-954.
- ¹¹⁵ Hamilton SR. The molecular genetics of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 1993;105:3-7.
- ¹¹⁶ P.A. Futreal, L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman, M.R. Stratton, A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 177-183.
- ¹¹⁷ Vogelstein B1, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- ¹¹⁸ W.D. Foulkes, Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 359 (2008) 2143-2153.

-
- ¹¹⁹ Kastan MB1, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11.
- ¹²⁰ Chung DC1, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology.* 1995 Nov;109(5):1685-99.
- ¹²¹ Papadopoulos N1, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, D'Arrigo A, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science.* 1995 Jun 30;268(5219):1915-7.
- ¹²² Papadopoulos N1, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 1994 Mar 18;263(5153):1625-9.
- Papadopoulos N1, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al.
- ¹²³ Yamamoto H, Yamashita K, Perucho M. Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology.* 2001 May;120(6):1565-7.
- ¹²⁴ Kahn A. La SAGA des oncogenes. *Medicine/Sciences* 1985;1:10-11.
- ¹²⁵ Park M, Vande-Woude GF. Principles of Molecular Cell Biology of Cancer. *Oncogenes.* In: De Vita T Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology.*
- ¹²⁶ Park M, Vande-Woude GF. Principles of Molecular Cell Biology of Cancer. *Oncogenes.* In: De Vita T Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology.*
- ¹²⁷ Park M, Vande-Woude GF. Principles of Molecular Cell Biology of Cancer. *Oncogenes.* In: De Vita T Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology.*
- ¹²⁸ Kahn A. La SAGA des oncogenes. *Medicine/Sciences* 1985;1:10-11
- ¹²⁹ Pillai R. Oncogenes and oncoproteins as tumor markers. *Eur J Surg Oncol* 1992;18:417-424
- ¹³⁰ Kahn A. La SAGA des oncogenes. *Medicine/Sciences* 1985;1:10-11
- ¹³¹ Σπαντίδος ΔΑ. Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. *Ιατρική* 1991;60:569-575
- ¹³² Σπαντίδος ΔΑ. Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. *Ιατρική* 1991;60:569-575
- ¹³³ Fenoglio-Preiser CM. *Gastrointestinal Pathology; An atlas and text.* Lppincott Raven, second edition, 1999; pp909-1063.
- ¹³⁴ Hamilton SR, Aaltonen LA. *Pathology and genetic of the digestive system.* World Health Organization Classification of tumors. IARC Press, Lyon 2000; pp111-36.
- ¹³⁵ Nascimbeni R1, Villanacci V, Mariani PP, Di Betta E, Ghirardi M, Donato F, Salerni B. Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease. *Am J Surg Pathol.* 1999 Oct;23(10):1256-63.
- ¹³⁶ Cheng L1, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2003 Dec;9(12):2642-9.
- ¹³⁷ Nascimbeni R1, Villanacci V, Mariani PP, Di Betta E, Ghirardi M, Donato F, Salerni B. Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease. *Am J Surg Pathol.* 1999 Oct;23(10):1256-63.
- ¹³⁸ Cheng L1, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2003 Dec;9(12):2642-9.
- ¹³⁹ Fenoglio-Preiser CM. *Gastrointestinal Pathology; An atlas and text.* Lppincott Raven, second edition, 1999; pp909-1063.
- ¹⁴⁰ Fenoglio-Preiser CM. *Gastrointestinal Pathology; An atlas and text.* Lppincott Raven, second edition, 1999; pp909-1063.

-
- ¹⁴¹ Yamauchi T1, Watanabe M, Hasegawa H, Yamamoto S, Endo T, Kabeshima Y, Yorozuya K, Yamamoto K, Kitajima M. Serrated adenoma developing into advanced colon cancer in 2 years. *J Gastroenterol.* 2002;37(6):467-70.
- ¹⁴² Longacre TA1, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 1990 Jun;14(6):524-37.
- ¹⁴³ Tanaka M1, Kusumi T, Sasaki Y, Yamagata K, Ichinohe H, Nishida J, Kudo H. Colonic intra-epithelial carcinoma occurring in a hyperplastic polyp via a serrated adenoma. *Pathol Int.* 2001 Mar;51(3):215-20.
- ¹⁴⁴ M.L. Bisgaard, K. Fenger, S. Bulow, E. Niebuhr, J. Mohr, Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 3 (1994) 121-125.
- ¹⁴⁵ M.L. Arvanitis, D.G. Jagelman, V.W. Fazio, I.C. Lavery, E. McGannon, Mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 33 (1990) 639-642.
- ¹⁴⁶ K.W. Kinzler, M.C. Nilbert, L.K. Su, B. Vogelstein, T.M. Bryan, D.B. Levy, K.J. Smith, A.C. Preisinger, P. Hedge, D. McKechnie, et al., Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253 (1991) 661-665.
- ¹⁴⁷ L. Bertario, A. Russo, P. Sala, M. Eboli, M. Giarola, F. D'Amico, V. Gismondi, L. Varesco, M.A. Pierotti, P. Radice, Genotype and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis. *Int J Cancer* 95 (2001) 102-107.
- ¹⁴⁸ P. Galiatsatos, W.D. Foulkes, Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101 (2006) 385-398.
- ¹⁴⁹ E.J. Gardner, R.C. Richards, Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis. *Am J Hum Genet* 5 (1953) 139-147.
- ¹⁵⁰ N.S. Fearnhead, M.P. Britton, W.F. Bodmer, The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10 (2001) 721-733.
- ¹⁵¹ G. Joslyn, D.S. Richardson, R. White, T. Alber, Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 11109-11113.
- ¹⁵² R.J. Scott, R. Crooks, C.J. Meldrum, L. Thomas, C.J. Smith, D. Mowat, M. McPhillips, A.D. Spigelman, Mutation analysis of the STK11/LKB1 gene and clinical characteristics of an Australian series of Peutz-Jeghers syndrome patients. *Clin Genet* 62 (2002) 282-287.
- ¹⁵³ R.J. Scott, R. Crooks, C.J. Meldrum, L. Thomas, C.J. Smith, D. Mowat, M. McPhillips, A.D. Spigelman, Mutation analysis of the STK11/LKB1 gene and clinical characteristics of an Australian series of Peutz-Jeghers syndrome patients. *Clin Genet* 62 (2002) 282-287.
- ¹⁵⁴ Mester J1, Eng C. Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. *J Surg Oncol.* 2015 Jan;111(1):125-30. doi: 10.1002/jso.23735. Epub 2014 Aug 11.
- ¹⁵⁵ Hampel H1, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J, Comeras I, de la Chapelle A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5783-8. doi: 10.1200/JCO.2008.17.5950. Epub 2008 Sep 22.
- ¹⁵⁶ H.T. Lynch, A. de la Chapelle, Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348 (2003) 919-932.
- ¹⁵⁷ Hendriks YM1, de Jong AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, Breuning MH, Bröcker-Vriends AH. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin.* 2006 Jul-Aug;56(4):213-25.
- ¹⁵⁹ Hendriks YM1, de Jong AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, Breuning MH, Bröcker-Vriends AH. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin.* 2006 Jul-Aug;56(4):213-25.
- ¹⁶⁰ H.T. Lynch, J.F. Lynch, P.M. Lynch, T. Attard, Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7 (2008) 27-39.

-
- ¹⁶¹ F. Fostira, G. Thodi, I. Konstantopoulou, R. Sandaltzopoulos, D. Yannoukakos, Hereditary cancer syndromes. *J BUON* 12 Suppl 1 (2007) S13-22.
- ¹⁶² Jass JR1, Morson BC. Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 1987 Sep;40(9):1016-23.
- ¹⁶³ Arnold CN¹, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2003 Aug 10;106(1):66-73.
- ¹⁶⁴ Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009 Jul 2;361(1):98-9. doi: 10.1056/NEJMc0904160.
- ¹⁶⁵ Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009 Jul 2;361(1):98-9. doi: 10.1056/NEJMc0904160.
- ¹⁶⁶ Van Cutsem E1, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2011-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.5091. Epub 2011 Apr 18.
- ¹⁶⁷ Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, Weickhardt A, Townsend AR, Wrin JW, Chua A, Shivasami A, Cummins MM, Murone C, Tebbutt NC. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Jul 1;29(19):2675-82. doi: 10.1200/JCO.2010.34.5520. Epub 2011 Jun 6.
- ¹⁶⁸ Szala S, Froehlich M, Scollon M, Kasai Y, Stepiewski Z, Koprowski H, Linnenbach AJ. 1990. Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3542-3546.
- ¹⁶⁹ Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 77:699-712.
- ¹⁷⁰ Schnell U, Kuipers J, Giepmans BN. 2013b. EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Biosci Rep* 33:e00030.
- ¹⁷¹ Schnell U, Kuipers J, Giepmans BN. 2013b. EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Biosci Rep* 33:e00030.
- ¹⁷² McDougall AR, Tolcos M, Hooper SB, Cole TJ, Wallace MJ. Trop2: from development to disease. *Dev Dyn.* 2015 Feb;244(2):99-109.
- ¹⁷³ Dean M. 1998. Cancer as a complex developmental disorder—nineteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 58:5633-5636.
- ¹⁷⁴ Nakashima K, Shimada H, Ochiai T, Kuboshima M, Kuroiwa N, Okazumi S, Matsubara H, Nomura F, Takiguchi M, Hiwasa T. 2004. Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 112:1029-1035.
- ¹⁷⁵ Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. 2006. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:3057-3063.
- ¹⁷⁶ Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, Gastl G, Spizzo G. 2008a. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 99: 1290-1295.
- ¹⁷⁷ Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. 2008. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Therapeut* 7:280-285.
- ¹⁷⁸ Bignotti E, Todeschini P, Calza S, Falchetti M, Ravanini M, Tassi RA, Ravaggi A, Bandiera E, Romani C, Zanotti L, Tognon G, Odicino FE, Facchetti F, Pecorelli S, Santin AD. 2010. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients. *European journal of cancer* 46:944-953.

-
- ¹⁷⁹ Pau Ni IB, Zakaria Z, Muhammad R, Abdullah N, Ibrahim N, Aina Emran N, Hisham Abdullah N, Syed Hussain SN. 2010. Gene expression patterns distinguish breast carcinomas from normal breast tissues: the Malaysian context. *Pathol Res Pract* 206:223–228.
- ¹⁸⁰ Ning S, Liang N, Liu B, Chen X, Pang Q, Xin T. 2013. TROP2 expression and its correlation with tumor proliferation and angiogenesis in human gliomas. *Neurol Sci* 34:1745–1750.
- ¹⁸¹ Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, Aloisi AL, Bonasera V, Lattanzio R, Lange R, Weidle UH, Piantelli M, Alberti S. 2013a. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 32:222–233.
- ¹⁸² Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. 2008. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Therapeut* 7:280–285.
- ¹⁸³ Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, Aloisi AL, Bonasera V, Lattanzio R, Lange R, Weidle UH, Piantelli M, Alberti S. 2013a. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 32:222–233.
- ¹⁸⁴ Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, Aloisi AL, Bonasera V, Lattanzio R, Lange R, Weidle UH, Piantelli M, Alberti S. 2013a. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 32:222–233.
- ¹⁸⁵ Herlyn D, Herlyn M, Ross AH, Ernst C, Atkinson B, Koprowski H. 1984. Efficient selection of human tumor growth-inhibiting monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 73:157–167.
- ¹⁸⁶ Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. 2008. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Therapeut* 7:280–285.
- ¹⁸⁷ Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, Aloisi AL, Bonasera V, Lattanzio R, Lange R, Weidle UH, Piantelli M, Alberti S. 2013a. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 32:222–233.
- ¹⁸⁸ Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. 2008. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Therapeut* 7:280–285.
- ¹⁸⁹ Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, Aloisi AL, Bonasera V, Lattanzio R, Lange R, Weidle UH, Piantelli M, Alberti S. 2013a. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 32:222–233.
- ¹⁹⁰ Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. 2007. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 130:986–988.
- ¹⁹¹ Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. 2006. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:3057–3063.
- ¹⁹² Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, Gastl G, Spizzo G. 2008a. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 99: 1290–1295.
- ¹⁹³ Bignotti E, Todeschini P, Calza S, Falchetti M, Ravanini M, Tassi RA, Ravaggi A, Bandiera E, Romani C, Zanotti L, Tognon G, Odicino FE, Facchetti F, Pecorelli S, Santin AD. 2010. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients. *European journal of cancer* 46:944–953.
- ¹⁹⁴ Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, Wang CJ, Wang ZC, Feng ZQ, Zhu J. 2013. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol* 94:73–78.
- ¹⁹⁵ Wu H, Xu H, Zhang S, Wang X, Zhu H, Zhang H, Zhu J, Huang J. 2013. Potential therapeutic target and independent prognostic marker of TROP2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35:1373–1378.

-
- ¹⁹⁶ Chen R, Lu M, Wang J, Zhang D, Lin H, Zhu H, Zhang W, Xiong L, Ma J, Mao Y, Zhu J, Xu J. 2013. Increased expression of Trop2 correlates with poor survival in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type. *Virchows Arch* 463:713–719.
- ¹⁹⁷ Trerotola M, Jernigan DL, Liu Q, Siddiqui J, Fatatis A, Languino LR. 2013b. Trop-2 promotes prostate cancer metastasis by modulating beta(1) integrin functions. *Cancer Res* 73:3155–3167.
- ¹⁹⁸ Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, Wang CJ, Wang ZC, Feng ZQ, Zhu J. 2013. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol* 94:73–78.
- ¹⁹⁹ Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, Wang CJ, Wang ZC, Feng ZQ, Zhu J. 2013. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol* 94:73–78.
- ²⁰⁰ Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, Wang CJ, Wang ZC, Feng ZQ, Zhu J. 2013. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol* 94:73–78.
- ²⁰¹ Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, Wang CJ, Wang ZC, Feng ZQ, Zhu J. 2013. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol* 94:73–78.
- ²⁰² Zhang K, Jones L, Lim S, Maher CA, Adkins D, Lewis J, Kimple RJ, Fertig EJ, Chung CH, Herrlich A, Ellis MJ, Van Tine BA, Michel LS. 2014. Loss of Trop2 causes ErbB3 activation through a neuregulin-1-dependent mechanism in the mesenchymal subtype of HNSCC. *Oncotarget* 5:9281–9294.
- ²⁰³ Zhang K, Jones L, Lim S, Maher CA, Adkins D, Lewis J, Kimple RJ, Fertig EJ, Chung CH, Herrlich A, Ellis MJ, Van Tine BA, Michel LS. 2014. Loss of Trop2 causes ErbB3 activation through a neuregulin-1-dependent mechanism in the mesenchymal subtype of HNSCC. *Oncotarget* 5:9281–9294.
- ²⁰⁴ Wang J, Zhang K, Grabowska D, Li A, Dong Y, Day R, Humphrey P, Lewis J, Kladney RD, Arbeit JM, Weber JD, Chung CH, Michel LS. 2011. Loss of Trop2 promotes carcinogenesis and features of epithelial to mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 9:1686–1695.
- ²⁰⁵ Wang J, Zhang K, Grabowska D, Li A, Dong Y, Day R, Humphrey P, Lewis J, Kladney RD, Arbeit JM, Weber JD, Chung CH, Michel LS. 2011. Loss of Trop2 promotes carcinogenesis and features of epithelial to mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 9:1686–1695.
- ²⁰⁶ Wang J, Zhang K, Grabowska D, Li A, Dong Y, Day R, Humphrey P, Lewis J, Kladney RD, Arbeit JM, Weber JD, Chung CH, Michel LS. 2011. Loss of Trop2 promotes carcinogenesis and features of epithelial to mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 9:1686–1695.
- ²⁰⁷ Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ et al (2009) Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 76: 1–18
- ²⁰⁸ Charbonnier F, Baert-Desurmont S, Liang P et al (2005) The 50 region of the MSH2 gene involved in hereditary non-polyposis colorectal cancer contains a high density of recombinogenic sequences. *Hum Mutat* 26:255–261
- ²⁰⁹ van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al (2005) Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosom Cancer* 44:123–138
- ²¹⁰ Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al (2009) Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30: 197–203
- ²¹² Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL et al (2009) Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 30 exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41:112–117

-
- ²¹³ Munz M, Baeuerle PA, Gires O (2009) The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69:5627–5629
- ²¹⁴ Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK et al (2012) Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 38:68–75
- ²¹⁵ Gires O (2011) Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci* 68:4009–4022
- ²¹⁶ Huth C, Kloor M, Voigt AY et al (2012) The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Mod Pathol* 25:911–916
- ²¹⁷ Vaughn DE, Bjorkman PJ: The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 1996,16:261-273.
- ²¹⁸ Crossin KL, Krushel LA: Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000, 218:260-279.
- ²¹⁹ Walsh FS, Doherty P: Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13:425-456.
- ²²⁰ Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarstrom S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M et al.: Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 1999, 252 :243-249.
- ²²¹ Hammarstrom S: The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999,9:67-81.
- ²²² Hauck CR, Agerer F, Muenzner P, Schmitter T: Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol* 2006, 85:235-242.
- ²²³ Hammarstrom S: The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999,9:67-81.
- ²²⁴ Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965, 122:467-481.
- ²²⁵ Thompson JA: Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* 1995, 16:10-16.
- ²²⁶ Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shiota K, Stanners CP: Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989, 57:327-334.
- ²²⁷ Taheri M, Saragovi U, Fuks A, Makkerh J, Mort J, Stanners CP: Self recognition in the Ig superfamily. Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion. *J Biol Chem* 2000, 275:26935-26943.
- ²²⁹ Ilantzis C, DeMarte L, Sreaton RA, Stanners CP: Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* 2002, 4:151-163.
- ²³⁰ Chan CH, Cook D, Stanners CP: Increased colon tumor susceptibility in azoxymethane treated CEABAC transgenic mice. *Carcinogenesis* 2006.
- ²³¹ Ordonez C, Sreaton RA, Ilantzis C, Stanners CP: Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 2000, 60:3419-3424.
- ²³² Eades-Perner AM, van der Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, Zimmermann W: Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994, 54:4169-4176.
- ²³³ Turbide C, Kunath T, Daniels E, Beauchemin N: Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res* 1997, 57:2781-2788.

-
- ²³⁴ Singer BB, Scheffrahn I, Obrink B: The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res* 2000, 60:1236-1244.
- ²³⁵ Chen T, Zimmermann W, Parker J, Chen I, Maeda A, Bolland S: Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J Leukocyte Biol* 2001, 70:335-340.
- ²³⁶ Kammerer R, Popp T, Singer BB, Schlender J, Zimmermann W: Identification of allelic variants of the bovine immune regulatory molecule CEACAM1 implies a pathogen-driven evolution. *Gene* 2004, 339:99-109.
- ²³⁷ Hemmila E, Turbide C, Olson M, Jothy S, Holmes KV, Beauchemin N: Ceacam1 a/S mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J Virol* 2004, 78:10156-10165.
- ²³⁸ Glinsky GV: Anti-adhesion and cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 1998, 17:177-186.
- ²³⁹ Jantschkeff P, Borner O, Glatz-Krieger K, Grunert F, Johnson JP, Laffer U, Lowy A, Metzger U, Icheel B, Rochlitz CF, Terracciano L, Wagener C: Expression of CEACAM6 in colorectal cancer: Significant association with overall and disease-free survival: ; Basel, Switzerland. Volume 37. *Eur J Cancer*; 2001:S290.
- ²⁴⁰ Soeth E, Wirth T, List HJ, Kumbhani S, Petersen A, Neumaier M, Czubayko F, Juhl H: Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT-29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001, 7:2022-2030.
- ²⁴¹ Ordonez C, Screaton RA, Ilantzis C, Stanners CP: Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 2000, 60:3419-3424.
- ²⁴² Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Waseem T, Ashley SW, Whang EE: A novel role for carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2004, 64:3987-3993.
- ²⁴³ Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE: CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2004, 23:465-473
- ²⁴⁴ Duxbury MS, Matros E, Clancy T, Bailey G, Doff M, Zinner MJ, Ashley SW, Maitra A, Redston M, Whang EE: CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg* 2005, 241:491-496.
- ²⁴⁵ Cherchi PL, Marras V, Capobianco G, Ambrosini G, Piga M, Fadda GM, Dessole S: Immunohistochemical evaluation of a new epithelial antigen, Ber-EP4, in ovarian cancer: preliminary results. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001, 22:433-435.
- ²⁴⁶ Cherchi PL, Marras V, Capobianco G, Ambrosini G, Piga M, Fadda GM, Dessole S: Immunohistochemical evaluation of a new epithelial antigen, Ber-EP4, in ovarian cancer: preliminary results. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001, 22:433-435.
- ²⁴⁷ Nathanson SD: Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003, 98:413-423.
- ²⁴⁸ Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Ashley SW, Whang EE: CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *British J Cancer* 2004:1-7.
- ²⁴⁹ Fidler IJ: The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002, 70:498-505
- ²⁵⁰ Blumenthal RD, Osorio L, Hayes MK, Horak ID, Hansen HJ, Goldenberg DM: Carcinoembryonic Antigen Antibody Inhibits Metastasis and Augments Chemotherapy in a Human Colonic Carcinoma enograft. *Cancer Immuno Immunother* 2004.
- ²⁵¹ Stein R, Chen S, Goldenberg DM: Labetuzumab, a humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, inhibits growth and sensitizes human medullary thyroid cancer to dacarbazine (DTIC) chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004, 2:1559-1564.

-
- ²⁵² Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Waseem T, Ashley SW, Whang EE: A novel role for carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2004, 64:3987-3993.
- ²⁵³ Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186, 1971.
- ²⁵⁴ Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995.
- ²⁵⁵ Battagay EJ: Angiogenesis: Mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 73:333-346, 1995.
- ²⁵⁶ Fidler IJ, Ellis LM: The implications of angiogenesis to the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79:185-188, 1994.
- ²⁵⁷ Liu W, Ahmad SA, Reinmuth N, et al: Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 5:323-328, 2000.
- ²⁵⁸ Partanen J, Armstrong E, Makela TP, et al: A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol* 12:1698-1707, 1992.
- ²⁵⁹ Grosios K, Leek JP, Markham AF, et al: Assignment of ANGPT4, ANGPT1, and ANGPT2 encoding angiopoietins 4, 1 and 2 to human chromosome bands 20p13, 8q22.3q23 and 8p23.1, respectively, by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 84:118-120, 1999.
9. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, et al: Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1904-1909, 1999.
- ²⁶⁰ Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD: New model of tumor angiogenesis: Dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18:5356-5362, 1999.
- ²⁶¹ Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, et al: Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1904-1909, 1999.
- ²⁶² Jones N, Master Z, Jones J, et al: Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem* 274:30896-30905, 1999.
- ²⁶³ Fujikawa K, de Aos Scherpenseel I, Jain SK, et al: Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. [erratum appears in *Exp Cell Res* Feb 25;255(1):133, 2000]. *Exp Cell Res* 253:663-672, 1999.
- ²⁶⁴ Suri C, Jones PF, Patan S, et al: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [see comments]. *Cell* 87:1171-1180, 1996.
- ²⁶⁵ Kim I, Kim JH, Moon SO, et al: Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* 19:4549-4552, 2000.
- ²⁶⁶ Kwak HJ, So J-N, Lee SJ, et al: Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett* 448:249-253, 1999.
- ²⁶⁷ Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, et al: Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: Evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 79:213-223, 1999.
- ²⁶⁸ Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al: Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* 275:9102-9105, 2000.
- ²⁶⁹ Kim I, Kim HG, So JN, et al: Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction 18. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al: Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284:1994-1998, 1999.
- ²⁷⁰ Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al: Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* 275:9102-9105, 2000.

-
- ²⁷¹ Suri C, Jones PF, Patan S, et al: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [see comments]. *Cell* 87:1171-1180, 1996. - See more at: <http://www.cancernetwork.com/review-article/angiopoietins-and-their-role-colon-cancer-angiogenesis/page/0/3#sthash.5u3rL7Fu.dpuf>
- ²⁷² Suri C, Jones PF, Patan S, et al: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [see comments]. *Cell* 87:1171-1180, 1996. - See more at: <http://www.cancernetwork.com/review-article/angiopoietins-and-their-role-colon-cancer-angiogenesis/page/0/3#sthash.5u3rL7Fu.dpuf>
- ²⁷³ Lin P, Polverini P, Dewhirst M, et al: Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J Clin Invest* 100:2072-2078, 1997.
- ²⁷⁴ Lin P, Polverini P, Dewhirst M, et al: Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J Clin Invest* 100:2072-2078, 1997.
- ²⁷⁵ Lin P, Buxton JA, Acheson A, et al: Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8829-8834, 1998.
- ²⁷⁶ Ellis LM1, Ahmad S, Fan F, Liu W, Jung YD, Stoeltzing O, Reinmuth N, Parikh AA. Angiopoietins and their role in colon cancer angiogenesis. *Oncology (Williston Park)*. 2002 Apr;16(4 Suppl 3):31-5.
- ²⁷⁷ Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- ²⁷⁸ Frazier JL, Caskey JH, Yoffe M, Seligman PA. Studies of the transferrin receptor on both human reticulocytes and nucleated human cells in culture: comparison of factors regulating receptor density. *J Clin Invest* 1982, 69:853-65
- ²⁷⁹ Kawabata H, Yang R, Hiramata T et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2: a new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999, 274:20826-20832
- ²⁸⁰ Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-a supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 2000, 275:16618-16625
- ²⁸¹ Theil EC. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J Nutr* 2003, 133:1549-1553
- ²⁸² Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1275:161-203
- ²⁸³ Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1275:161-203
- ²⁸⁴ Drysdale JW. Human ferritin gene expression. *Prog Nucleic Acid Res* 1988, 35:127-72
- ²⁸⁵ Wagstaff M, Worwood M, Jacobs A. Properties of human tissue isoferritins. *Biochem J* 1978, 173(3):969-77
- ²⁸⁶ Jones T., Spencer R., Walsh C. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues. *Biochem* 1978, 17:4011-4017
- ²⁸⁷ McClarty GA, Chan AK, Choy BK, Wright JA. Increased ferritin gene expression is associated with increased ribonucleotide reductase gene expression and the establishment of hydroxyurea resistance in mammalian cells. *J Biol Chem* 1990, 265:7539-7547
- ²⁸⁸ Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Albertini A, Arosio P. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem* 2000, 275:25122-25129
- ²⁸⁹ Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- ²⁹⁰ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ²⁹¹ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer

-
- ²⁹² Gunderson LL1, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):264-71. doi: 10.1200/JCO.2009.24.0952. Epub 2009 Nov 30.
- ²⁹³ Gunderson LL1, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):264-71. doi: 10.1200/JCO.2009.24.0952. Epub 2009 Nov 30.
- ²⁹⁴ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 2.2015 Colon Cancer
- ²⁹⁵ Martling A, Holm T, Rutqvist LE, Johansson H, Moran BJ, Heald RJ, Cedermark B. Impact of a surgical training programme on rectal cancer outcomes in Stockholm. *Br J Surg* 2005; 92: 225–9.
- ²⁹⁶ Cecil TD, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ. Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph nodepositive rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 1145–50.
- ²⁹⁷ Sauer R, Becker H, Hohenberger W et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731–40.
- ²⁹⁸ Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L, Cedermark B, Glimelius B, Gunnarsson U. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5644–50.
- ²⁹⁹ Jagoditsch M, Lisborg PH, Jatzko GR, Wette V, Kropfisch G, Denk H, Klimpfinger M, Stettner HM. Long-term prognosis for colon cancer related to consistent radical surgery: multivariate analysis of clinical, surgical, and pathologic variables. *World J Surg* 2000; 24: 1264–70.
- ³⁰⁰ Gall FP, Hermanek P. Wandel und derzeitiger Stand der Behandlung des colorectalen Carcinoms. *Chirurg* 1992; 63: 227–34.
- ³⁰¹ Birgisson H, Talbačck M, Gunnarsson U, Pahlman L, Glimelius B. Improved survival in cancer of the colon and rectum in Sweden. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 845–53.
- ³⁰² Iversen LH, Nørgaard M, Jepsen P et al. Trends in colorectal cancer survival in northern Denmark: 1985–2004. *Colorectal Dis* 2007; 9: 210–7.
- ³⁰³ Mammen JM, James LE, Molloy M, Williams A, Wray CJ, Sussman JJ. The relationship of lymph node dissection and colon cancer survival in the Veterans Affairs Central Cancer Registry. *Am J Surg* 2007; 194: 349–54.
- ³⁰⁴ Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, Mander BJ, Bissett IP, Neurland RC. Surgical technique and survival in patients having a curative resection for colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 860–6.
- ³⁰⁵ Kessler H, Mansmann U, Hermanek P Jr, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P: for the Study Group Colo-Rectal Carcinoma (SGCRC) Does the surgeon affect outcome in colon carcinoma? *Semin Colon Rectal Surg* 1998; 9: 33–40
- ³⁰⁶ Taal BG, Van Tinteren H, Zoetmulder FA; NACCP group Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III *Br J Cancer* 2001; 85: 1437–43
- ³⁰⁷ Read TE, Mutch MG, Chang BW, McNevin MS, Fleshman JW, Birnbaum EH, Fry RD, Caushaj PF, Kodner IJ Locoregional recurrence and survival after curative resection of adenocarcinoma of the colon *J Am Coll Surg* 2002; 195: 33–40
- ³⁰⁸ Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, Mander BJ, Bissett IP, Neurland RC. Surgical technique and survival in patients having a curative resection for colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 860–6.
- ³⁰⁹ Averbach AM, Jacquet P, Sugarbaker PH Surgical technique and colorectal cancer: impaction on local recurrence and survival *Tumori* 1995; 81: 65–71
- ³¹⁰ Meyer T, Merkel S, Reingruber B, Papadopoulos T, Wein A, Hahn E, Hohenberger W. The benefit of adjuvant chemotherapy in colon carcinoma UICC stage III depends on surgical quality. Results of the intact I trial *Onkologie* 2008; 31(Suppl. 1): 80–1.

-
- ³¹¹ Williams G, Quirke P, Shepherd N: Dataset for Colorectal Cancer (2nd Ed).The Royal College of Pathologists, 2007. www.rcpath.org
- ³¹² Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, et al. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392: 190–193.
- ³¹³ Gao M, Li W, Wang H and Wang G (2013). The distinct expression patterns of claudin-10, -14, -17 and E-cadherin between adjacent non-neoplastic tissues and gastric cancer tissues. *Diagn. Pathol.* 8: 205.
- ³¹⁴ Fornaro M, Dell’Arciprete R, Stella M, Bucci C, et al. (1995) Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int. J. Cancer* 62: 610–618.
- ³¹⁵ Fornaro M, Dell’Arciprete R, Stella M, Bucci C, et al. (1995) Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int. J. Cancer* 62: 610–618.
- ³¹⁶ Miotti S, Canevari S, Ménard S, Mezzanzanica D, et al. (1987). Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. *Int. J. Cancer* 39: 297–303.
- ³¹⁷ Fradet Y, Cordon-Cardo C, Thomson T, Daly ME, et al. (1984). Cell surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 224–228.
- ³¹⁸ Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, et al. (2008). Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol. Cancer Ther.* 2: 280–285.
- ³¹⁹ Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, et al. (2003). Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 361: 1590–1596.
- ³²⁰ Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, et al. (2013). Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 32: 222–233.
- ³²¹ Basak S, Speicher D, Eck S, Wunner W, et al. (1998). Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 691–697.
- ³²² Zanna P, Trerotola M, Vacca G, Bonasera V, et al. (2007). Trop-1 are conserved growth stimulatory molecules that mark early stages of tumor progression. *Cancer* 110: 452–464.
- ³²³ Joo M, Kim H, Kim MK, Yu HJ, et al. (2005). Expression of Ep-CAM in intestinal metaplasia, gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20: 1039–1045.
- ³²⁴ Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, et al. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268–1272.
- ³²⁵ Tai KY, Shiah SG, Shieh YS, Kao YR, et al. (2007). DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. *Oncogene* 26: 3989–3997.
- ³²⁶ Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Hermans J, et al. (1997). Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 123: 412–419.
- ³²⁷ Chothia C and Jones EY (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 823–862.
- ³²⁸ Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, et al. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268–1272.
- ³²⁹ S.A. Hefta, L.J. Hefta, T.D. Lee, R.J. Paxton, J.E. Shively, Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85 (1988) 4648–4652.
- ³³⁰ Hostetter, R. B., Augustus, L. B., Mankariou, R., Chi, K., Fan, D., Toth, C., Thomas, P., and Jessup, J. M. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 380–385, 1990.

-
- ³³¹ Hashino, J., Fukada, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., and Nakanishi, T. Metastatic potential on human colorectal carcinoma SW1222 cells transfected with cDNA encoding carcinoembryonic antigen. *Clin. Exp. Metastasis*, 12: 324–328, 1994.
- ³³² Gangopadhyay, A., Lazure, D. A., Kelly, T. M., and Thomas, P. Purification and analysis of an 80-kDa carcinoembryonic antigen-binding protein from Kupffer cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 328: 151–157, 1996.
- ³³³ Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C. A., Perez, M., Singhal, A. K., Hakomori, S., and Paulson, J. C. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science (Washington DC)*, 250: 1130–1132, 1990.
- ³³⁴ Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Spila A, Cavaliere F, Arcuri R, D'Alessandro R, Fracasso PL, Casale V, Vecchione A, Casciani CU, Greiner JW, Schlom J. Quantitative analysis of CEA expression in colorectal adenocarcinoma and serum: lack of correlation. *Int J Cancer*. 1997 Sep 17;72(6):949-54.
- ³³⁵ Naghibalhossaini F, Ebadi P. Evidence for CEA release from human colon cancer cells by an endogenous GPI-PLD enzyme. *Cancer Lett*. 2006 Mar 28;234(2):158-67.
- ³³⁶ Naghibalhossaini F, Ebadi P. Evidence for CEA release from human colon cancer cells by an endogenous GPI-PLD enzyme. *Cancer Lett*. 2006 Mar 28;234(2):158-67.
- ³³⁷ Yamamoto Y, Hirakawa E, Mori S, Hamada Y, Kawaguchi N, Matsuura N. Cleavage of carcinoembryonic antigen induces metastatic potential in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 22;333(1):223-9.
- ³³⁸ 35. Kijima M, Togo S, Ichikawa Y, Miura M, Yamagishi S, Matsuo K, Tanaka K, Masui H, Ishikawa T, Ike H, Shimada H. Clinical significance of serum CEA protein and CEA mRNA after resection of colorectal liver metastases. *Anticancer Res*. 2005 Mar-Apr;25(2B):1327-32.
- ³³⁹ Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Spila A, Cavaliere F, Arcuri R, D'Alessandro R, Fracasso PL, Casale V, Vecchione A, Casciani CU, Greiner JW, Schlom J. Quantitative analysis of CEA expression in colorectal adenocarcinoma and serum: lack of correlation. *Int J Cancer*. 1997 Sep 17;72(6):949-54.
- ³⁴⁰ BENCHIMOL, S., FUKS, A., JOTHY, S., BEAUCHEMIN, N., SHIROTA, K. and STANNERS, C.P., Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, 57, 327–334 (1989).
- ³⁴¹ Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. 1989. Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: Homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 164:39–45.
- ³⁴² Stanners CP, Fuks A. 1998. Properties of adhesion mediated by the human cea family. In: Stanners CP, editor. *Cell adhesion and communication mediated by the CEA family: Basic and clinical perspectives*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. pp 57–71.
- ³⁴³ Ilantzis C, DeMarte L, Screaton RA, Stanners CP. 2002. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* 4:151–163.
- ³⁴⁴ Ilantzis C, DeMarte L, Screaton RA, Stanners CP. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*. 2002 Mar-Apr;4(2):151-63.
- ³⁴⁵ Davis DW, McConkey DJ, Abbruzzese JL, Herbst RS. Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials. *Br J Cancer*. 2003 Jul 7;89(1):8-14.
- ³⁴⁶ Ellis LM1, Ahmad S, Fan F, Liu W, Jung YD, Stoeltzing O, Reinmuth N, Parikh AA. Angiopoietins and their role in colon cancer angiogenesis. *Oncology (Williston Park)*. 2002 Apr;16(4 Suppl 3):31-5.

-
- ³⁴⁷ Ahmad SA, Liu W, Jung YD, et al: Expression of angiopoietin-1 and -2 in human colon cancer: Possible mechanism for initiation of angiogenesis. *Cancer* 92:1138-1143, 2001
- ³⁴⁸ Ahmad SA, Liu W, Jung YD, et al: Expression of angiopoietin-1 and -2 in human colon cancer: Possible mechanism for initiation of angiogenesis. *Cancer* 92:1138-1143, 2001
- ³⁴⁹ Ochiuni T, Tanaka S, Oka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma. *Int J Oncol.* 2004 Mar;24(3):539-47.