



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Μελέτη του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο και πιθανή συσχέτισή του με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας του όγκου.

Μαρία Νέτσικα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- Μαρία Ιωάννου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Επιβλέπουσα
 - Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
 - Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική

Λάρισα, Οκτώβριος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

Study of rs1801133 polymorphism of MTHFR gene in patients with colorectal cancer. Correlation with the presence of microsatellite instability.

By
Maria Netsika

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- Maria Ioannou, Associate Professor of Pathology, Supervisor
 - Maria Samara, Assistant Professor of Pathology
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine

Larissa, October, 2017

Στην οικογένειά μου

.....στο Δημήτρη,

.....στο Γιώργο,

.....στην Αγγελική

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής”, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Παθολογικής, κας Ιωάννου Μαρίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου κα. Ιωάννου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή ιστοπαθολογία κα. Σαμαρά Μαρία, για τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή τους στην παρούσα εργασία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Γερμενή για τις εποικοδομητικές του παρατηρήσεις.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω το Διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Κουκούλη Γεώργιο, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, για τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, καθώς και για τη στήριξή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την υποψήφια Διδάκτωρ κ. Παπαθανασίου Μαρία, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και καθοδήγηση στα πλαίσια ενός εξαιρετικά φιλικού περιβάλλοντος στο εργαστήριο.

Κλείνοντας, δεν θα είχα καταφέρει τίποτα από όλα αυτά χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση, την κατανόηση και τη στήριξη της οικογένειάς μου, που στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε εύκολη και δύσκολη στιγμή αυτής της πορείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	Σελ. 6
	ABSTRACT	Σελ. 7
2	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	Σελ. 8
	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	Σελ. 9
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	Σελ. 9
2.1	Καρκίνος	Σελ. 9
2.2	Επιδημιολογικά στοιχεία του ορθοκολικού καρκίνου	Σελ. 9
2.3	Παράγοντες κινδύνου	Σελ. 11
2.4	Ανατομία του παχέος εντέρου	Σελ. 13
2.5	Ιστολογία του παχέος εντέρου	Σελ. 14
2.6	Παθολογική Ανατομική του ορθοκολικού καρκίνου	Σελ. 15
2.6.1	Καλοήθεις όγκοι του παχέος εντέρου	Σελ. 15
2.6.2	Κακοήθεις όγκοι του παχέος εντέρου	Σελ. 16
2.6.3	Σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου	Σελ. 17
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	Σελ. 20
3.1	Καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου	Σελ. 20
3.1.1	Χρωμοσωμική αστάθεια	Σελ. 21
3.1.2	Ο φαινότυπος μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP)	Σελ. 23
3.1.3	Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Instability- MSI)	Σελ. 24
3.2	Μεταβολισμός του φυλλικού οξέος και σχέση με τον ορθοκολικό καρκίνο	Σελ. 27
3.2.1	Το γονίδιο MTHFR	Σελ. 27
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
4	Σκοπός	Σελ. 30
4.1	Υλικό	Σελ. 31
4.2	Μεθοδολογία	Σελ. 32
4.3	Αποτελέσματα	Σελ. 39
5	Συζήτηση	Σελ. 54
6	Βιβλιογραφία	Σελ. 58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ορθοκολικός καρκίνος (colorectal cancer- CRC) είναι μία ετερογενής νόσος με υποτύπους που φέρουν διακριτά μοριακά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Ο φαινότυπος μικροδορυφορικής αστάθειας (microsatellite instability-MSI) αποτελεί έναν από τους κύριους μοριακούς υπότυπους και αφορά στο 12%-20% των περιστατικών στις ανεπτυγμένες χώρες. Η ρεδοκτάση του μεθυλενοτετραυδροφυλικού (Methylenetetrahydrofolate reductase- MTHFR) αποτελεί ένζυμο-κλειδί στο μεταβολισμό του φολικού οξέος με σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της σύνθεσης, της επιδιόρθωσης και της μεθυλίωσης του DNA. Έχει προταθεί ότι η παρουσία του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) του MTHFR μπορεί να προδιαθέτει για ορθοκολικό καρκίνο με μικροδορυφορική αστάθεια, ωστόσο υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των μελετών. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την παρουσία του πολυμορφισμού rs1801133 σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, παρουσία/απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας και τις πιθανές συσχετίσεις του με παραμέτρους, όπως το φύλο, η ηλικία, η παρουσία διήθησης, το στάδιο και η διάμετρος του όγκου. Απομονώσαμε γενομικό DNA από αρχειακό υλικό ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο PCR-RFLP με το περιοριστικό ένζυμο HinfI. Πραγματοποιήσαμε στατιστική ανάλυση με τη δοκιμασία χ^2 (IBM SPSS v23). Αναλύθηκαν 50 ασθενείς- 24 γυναίκες (48%) και 26 άνδρες (52%)- μέσης ηλικίας 65.56 ± 12.48 (εύρος: 37-85 έτη). 35/50 ασθενείς (70%) δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια. Η πλειοψηφία των ασθενών (82%) έφερε όγκους σταδίου II. Η μέγιστη διάμετρος του όγκου κυμάνθηκε μεταξύ 2-7.5 cm (διάμεσος: 4.19 ± 1.4). Δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού rs1801133 με το φύλο, την ηλικία, το στάδιο του όγκου και την παρουσία διήθησης. Παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια είχαν μέγιστη διάμετρο όγκου >4.2 cm ($p= 0.007$). Αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφικού (T) αλληλομόρφου με τη μέγιστη διάμετρο ($p= 0.043$) και τη δεξιά εντόπιση του όγκου ($p=0.043$). Ωστόσο, απαιτείται ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα.

Λέξεις-κλειδιά: ορθοκολικός καρκίνος, μικροδορυφορική αστάθεια, MTHFR γονίδιο, πολυμορφισμός

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a heterogeneous disease with molecular subtypes harboring distinct molecular, pathologic and clinical characteristics. The microsatellite instability (MSI) phenotype is one of the main molecular subtypes of CRCs and accounts for 12%-20% of CRCs in Western countries. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme involved in folate metabolism with essential role in DNA synthesis, repair, and methylation. There is evidence suggesting that rs1801133 (C677T) SNP may predispose to microsatellite instable (MSI) colorectal cancer, although the data remain controversial. In our study, we examined the presence of the rs1801133 (C677T) in CRC cases with or without microsatellite instability and its possible correlation with clinical parameters, such as gender, age, tumor grade, size and invasion. Genomic DNA was extracted from FFPE samples of CRC patients. The PCR-RFLP method was performed using the *Hinf*I restriction enzyme. The CC, CT and TT genotypes were evaluated. Statistical analysis was performed with the IBM SPSS v 23 and chi-square test was used. 50 patients were analyzed - 24 females (48%) and 26 males (52%) - with median age 65.56 ± 12.48 (range: 37-85 years). 35/50 patients (70%) presented microsatellite stability, whereas 15/50 patients (30%) showed microsatellite instability. Most of the patients (82%) had a tumor grade II. The majority of patients had invasive carcinomas. The tumor size ranged from 2-7.5 cm (median: 4.19 ± 1.4). Statistical analysis did not reveal significant correlations between the presence of rs1801133 (C677T) and gender, age, tumor grade and presence of invasion. We noticed that all the samples with MSI had a tumor size larger than 4.2 cm ($p= 0.007$). We found significant correlations between the presence of the polymorphic T allele and the tumor diameter ($p=0.043$) and right-localization of the tumor ($p=0.043$). However, further analysis in a larger number of patients is needed.

Key words: colon cancer, microsatellite instability, MTHFR gene, polymorphism

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος “ορθοκολικός καρκίνος” αναφέρεται στον καρκίνο που αναπτύσσεται στο παχύ έντερο ή το ορθό. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αφορά τον καρκίνο που αναπτύσσεται στο κόλον. Το κόλον αποτελεί το μακρύτερο τμήμα του παχέος εντέρου, ενώ ως καρκίνος του ορθού ορίζεται ο καρκίνος που αναπτύσσεται στο ορθό, που αποτελεί το τελικό τμήμα του παχέος εντέρου και που καταλήγει στον πρωκτό.

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ο συχνότερος καρκίνος στην Ευρώπη και ο τρίτος σε συχνότητα παγκοσμίως. Η πλειοψηφία των ορθοκολικών καρκίνων εντοπίζεται στο κόλον και καλούνται καρκίνοι παχέος εντέρου. Αποτελούν το 9% όλων των μορφών καρκίνου στην Ευρώπη. Ο ορθοκολικός καρκίνος εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Η συχνότητα του ορθοκολικού καρκίνου είναι μεγαλύτερη σε βιομηχανικές και αστικές περιοχές. Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε ηλικία μεγαλύτερη των 60 ετών, ενώ σπανιότερα εμφανίζεται σε ηλικίες κάτω των 40 ετών.

Πρόκειται για μία πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική νόσο. Οι γενετικές και οι επιγενετικές αλλαγές που συμβαίνουν σε συγκεκριμένα γονίδια είναι καθοριστικές για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών καρκινογένεσης. Η μελέτη συγκεκριμένων γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που αφορούν σε συγκεκριμένα γονίδια είναι κρίσιμη για τον καθορισμό της βέλτιστης θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών, καθώς έχουν πλέον αναπτυχθεί στοχευμένες βιολογικές θεραπείες με σκοπό την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

2.1 Καρκίνος

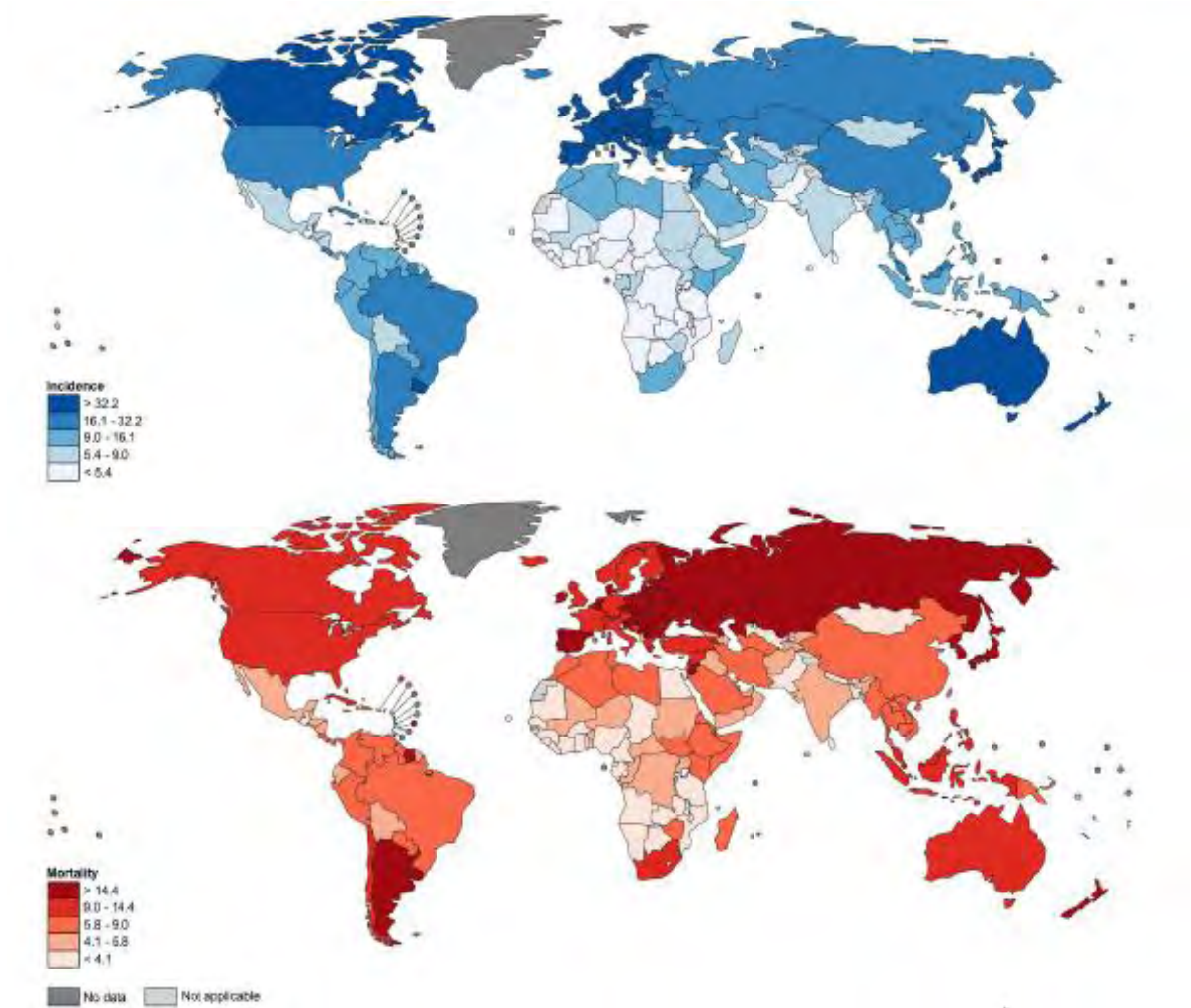
Η φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων ενός οργανισμού βασίζεται στην αρμονική συνεργασία τριών βασικών διαδικασιών: του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Ο καρκίνος προκύπτει από διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών ενός κυττάρου που οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και στην αδυναμία ολοκλήρωσης του προγράμματος κυτταρικής διαφοροποίησης. Αυτές οι σοβαρές διαταραχές έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στα κύτταρα προϊούσας γονιδιακής αστάθειας, αδυναμίας φυσιολογικής γήρανσης και απόκτησης διηθητικής ικανότητας στους γειτονικούς ιστούς [1].

2.2 Επιδημιολογικά στοιχεία του ορθοκολικού καρκίνου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μία από τις βασικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρκίνο στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική και άλλες περιοχές με παρόμοιο τρόπο ζωής και διατροφικές συνήθειες. Είναι τέταρτος σε συχνότητα εμφάνισης μετά τον καρκίνο του μαστού, των πνευμόνων και του προστάτη [2]. Σε παγκόσμιο επίπεδο, προσβάλλει ετησίως 1.000.000 άτομα, 250,000 Ευρωπαίους και 150,000 Αμερικανούς, εκ των οποίων το 1/3 πεθαίνει από τη νόσο [3]. Η επίπτωσή του δε φαίνεται να παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, με εξαίρεση τον καρκίνο του ορθού που είναι πιο συχνός στους άντρες. Παγκοσμίως, καταγράφεται ως ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες (614.000 περιπτώσεις/έτος) και ο τρίτος πιο συχνός στους άντρες (746.000 περιπτώσεις/έτος). Τα ποσοστά επίπτωσης είναι υψηλότερα στις πιο αναπτυγμένες χώρες (737.000 περιστατικά ετησίως) σε σχέση με τις λιγότερο αναπτυγμένες (624.000), ενώ η θνησιμότητα είναι υψηλότερη στη δεύτερη ομάδα (52% των συνολικών θανάτων) [4].

Τα περισσότερα περιστατικά διαγιγνώσκονται σε άτομα άνω των 50 ετών, συνεπώς συνίσταται η πρώτη κολονοσκόπηση να γίνεται στην ηλικία 50 ετών για την καλύτερη πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση [5]. Η επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου φαίνεται ότι μειώθηκε περίπου κατά τουλάχιστον 2% ετησίως μεταξύ του 1998 και 2010. Η μείωση της συχνότητας εμφάνισης του, συνδέεται στενά με τον προσδιορισμό των παραγόντων κινδύνου και την

καλύτερη κλινική αντιμετώπισή του. Η κολonosκόπηση συνέβαλε στη συνολική μείωση της επίπτωσής του κατά 11% και της θνησιμότητας κατά 14% σε χρονικό διάστημα 25 χρόνων. Εκτιμάται ότι περίπου 1.360.000 περιπτώσεις CRC θα διαγνωστούν παγκοσμίως και 700.000 θάνατοι μπορούν να προβλεφθούν [6, 7, 8]. Μια πλήρης κολonosκόπηση μέχρι το τυφλό σε συνδυασμό με βιοψία για ιστοπαθολογική εξέταση, θεωρείται η χρυσή τομή για τη διάγνωση παθήσεων του παχέος εντέρου, λόγω της υψηλής διαγνωστικής αξίας [9, 10]. Αυτή η εξέταση ταυτόχρονα έχει και θεραπευτική αξία, καθώς επιτρέπει και την ενδοσκοπική απομάκρυνση του πολύποδα [11].



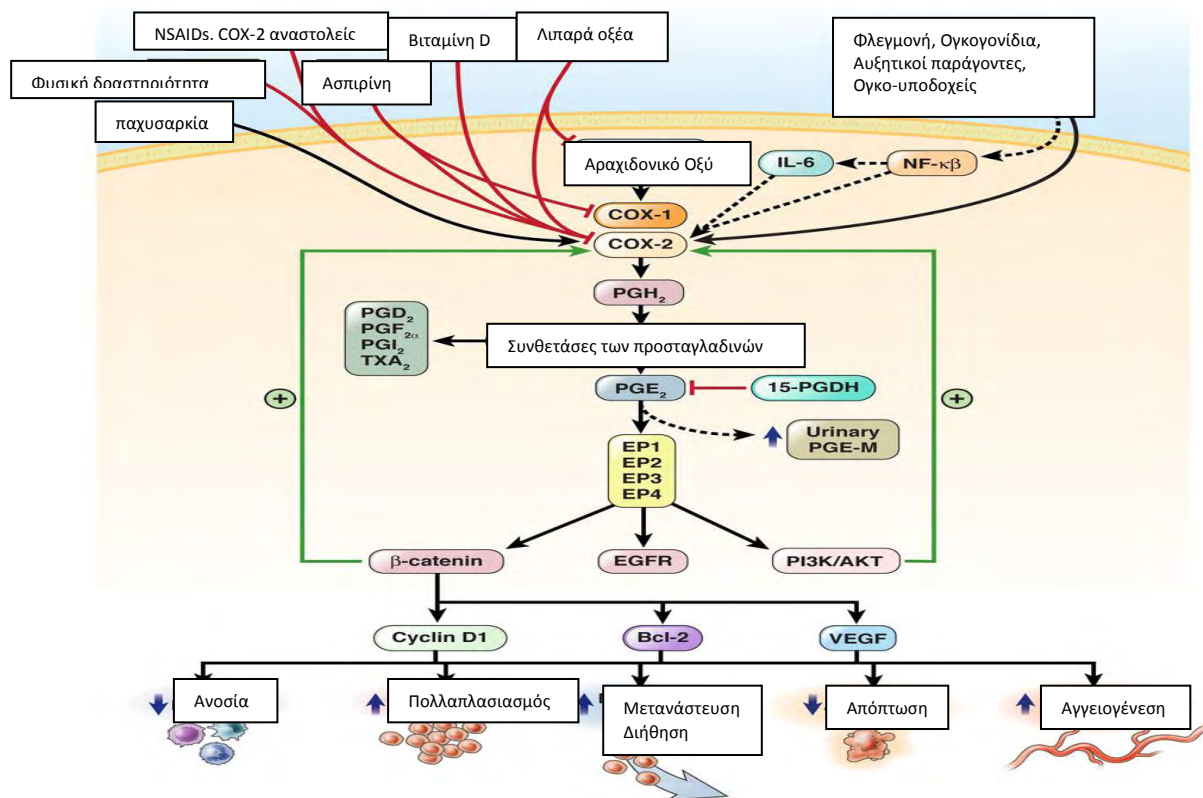
Εικόνα 1. Συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας του ορθοκολικού καρκίνου στους άντρες ανά 100.000 άτομα σε παγκόσμια κλίμακα (Ανατύπωση από Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015, 136: E359-8).

2.3 Παράγοντες κινδύνου

Ο ορθοκολικός καρκίνος συνήθως εμφανίζεται ως σποραδική νόσος, η οποία δε σχετίζεται με κληρονομούμενα γονίδια. Τα κληρονομούμενα γονίδια φέρουν αυξημένο κίνδυνο για αυτόν τον τύπο καρκίνου. Περίπου 20% των ορθοκολικών καρκίνων εμφανίζονται σε οικογενή μορφή. Από αυτούς, λιγότεροι από τους μισούς αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα γνωστών κληρονομούμενων παθήσεων. Στις υπόλοιπες οικογενείς περιπτώσεις η αιτία του καρκίνου παραμένει άγνωστη. Η οικογενής εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου δεν είναι αποτέλεσμα μόνο των κοινών κληρονομούμενων γονιδίων αλλά και κοινών περιβαλλοντικών παραγόντων που αυξάνουν το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Βασικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου είναι η διατροφή. Διατροφή πλούσια σε κόκκινο κρέας (μοσχάρι, αρνί, χοιρινό) και επεξεργασμένο κρέας (χοτ ντογκ και κονσέρβες), πλούσια σε λιπαρά ή/και φτωχή σε φυτικές ίνες μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου. Η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ είναι επίσης παράγοντας κινδύνου για ορθοκολικό καρκίνο, ενώ ενοχοποιούνται επίσης η παχυσαρκία, η καθιστική ζωή και η ηλικία. Άτομα με μειωμένη φυσική δραστηριότητα έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου, ανεξάρτητα από το αν είναι υπέρβαροι ή όχι. Επιπρόσθετα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 αυξάνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου ανεξάρτητα από το αν συνυπάρχει αυξημένο σωματικό βάρος. Τέλος, το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης μεγάλων πολυπόδων στο παχύ έντερο, που αποτελούν προκαρκινωμάτωδεις βλάβες.

Το 2011, το Αμερικανικό Ινστιτούτο έρευνας του καρκίνου και το Ίδρυμα Παγκόσμιας έρευνας του καρκίνου κατέληξαν ότι η φυσική δραστηριότητα και η κατανάλωση τροφίμων με φυτικές ίνες μειώνουν τον κίνδυνο για καρκίνο παχέος εντέρου, ενώ το σωματικό λίπος, το κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας και το αλκοόλ αυξάνουν τον κίνδυνο (Εικόνα 2). Είναι γνωστό πως το κόκκινο κρέας προκαλεί την έκκριση ενδογενούς ινσουλίνης, ενώ δεν είναι σαφής ο ακριβής μηχανισμός συσχέτισης μεταξύ του κόκκινου κρέατος και του καρκίνου του παχέος εντέρου.



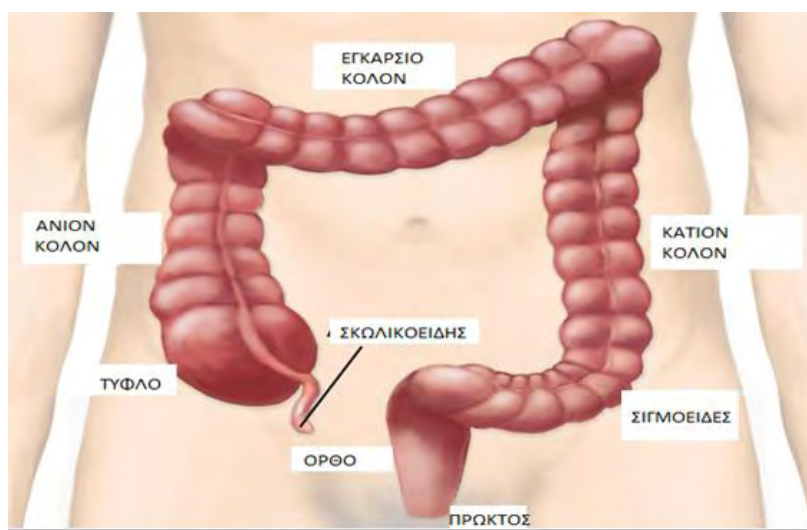
Εικόνα 2. Προτεινόμενοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την ινσουλίνη και συνδέουν τη διατροφή, την παχυσαρκία και τη φυσική δραστηριότητα με τον καρκίνο παχέος εντέρου. Η κοιλιακή παχυσαρκία, σωματική αδράνεια και δυτικά πρότυπα διατροφής διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης και μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο για CRC, προκαλώντας κρίσεις υπερινσουλιναιμίας. Τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης μπορεί να έχουν επιδράσεις σε κύτταρα μέσω υποδοχέων ινσουλίνης ή IGF-1 αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα του ελεύθερου IGF-1. Η ενεργοποίηση υποδοχέα ινσουλίνης ή IGF-1 οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό, μειωμένη απόπτωση και αυξημένο κίνδυνο ογκογένεσης (Ανατύπωση από Giovannucci E. (1995) Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* ;6: 164–179).

Στους ασθενείς με CRC τα νοσήματα που συνήθως συνυπάρχουν είναι ο διαβήτης (17%), η χρόνια πνευμονική ανεπάρκεια (13%) και η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (12%) [8]. Η διατροφή και η σωματική άσκηση είναι αποδεκτές θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη μείωση του κινδύνου διαβήτη και καρδιαγγειακών παθήσεων. Γι' αυτό η βελτίωση της ποιότητας της διατροφής και η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας συστήνονται σε ασθενείς και προληπτικά και αν πάσχουν από κάποιο άλλο νόσημα [13,14].

2.4 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), το ορθό και τον πρωκτικό σωλήνα. Τα πρώτα 6 cm υπό την ειλεοτυφλική βαλβίδα αποτελούν το τυφλό, το ανιόν και ηπατική καμπή αποτελούν μία ξεχωριστή χειρουργική μονάδα, το δεξιό κόλον. Το άπω εγκάρσιο κόλον, η σπληνική καμπή, το κατίον κόλον απαρτίζουν το αριστερό κόλον (Εικόνα 3).

Το παχύ έντερο έχει σωληνώδη εμφάνιση με μήκος που προσεγγίζει τα 30-40 cm κατά την γέννηση και 1-1,5m περίπου στον ενήλικο. Οι κύριες λειτουργίες του είναι η επαναπορρόφηση ύδατος και ηλεκτρολυτών από τα κόπρανα και η περιφερική προώθηση των σταδιακά όλο και πιο στερεών κοπρανωδών μαζών στο ορθό προς αποβολή από τον οργανισμό. Παρά την ανατομική τους εγγύτητα, οι καρκίνοι του πρωκτού ταξινομούνται ξεχωριστά από τους ορθοκολικούς καρκίνους, καθώς προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων και έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 3. Ανατομία πεπτικού συστήματος. Τα διαδοχικά τμήματα του γαστρεντερικού συστήματος αποτελούν ο οισοφάγος, το στομάχι, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο (κόλον και ορθό) και ο πρωκτός (Ανατύπωση από Manne U, Shanmugam C, Katkoori VR, Bumpers HL, Grizzle WE. Development and progression of colorectal neoplasia. Cancer biomarkers : section A of Disease markers. 2010;9 (1-6):235-265).

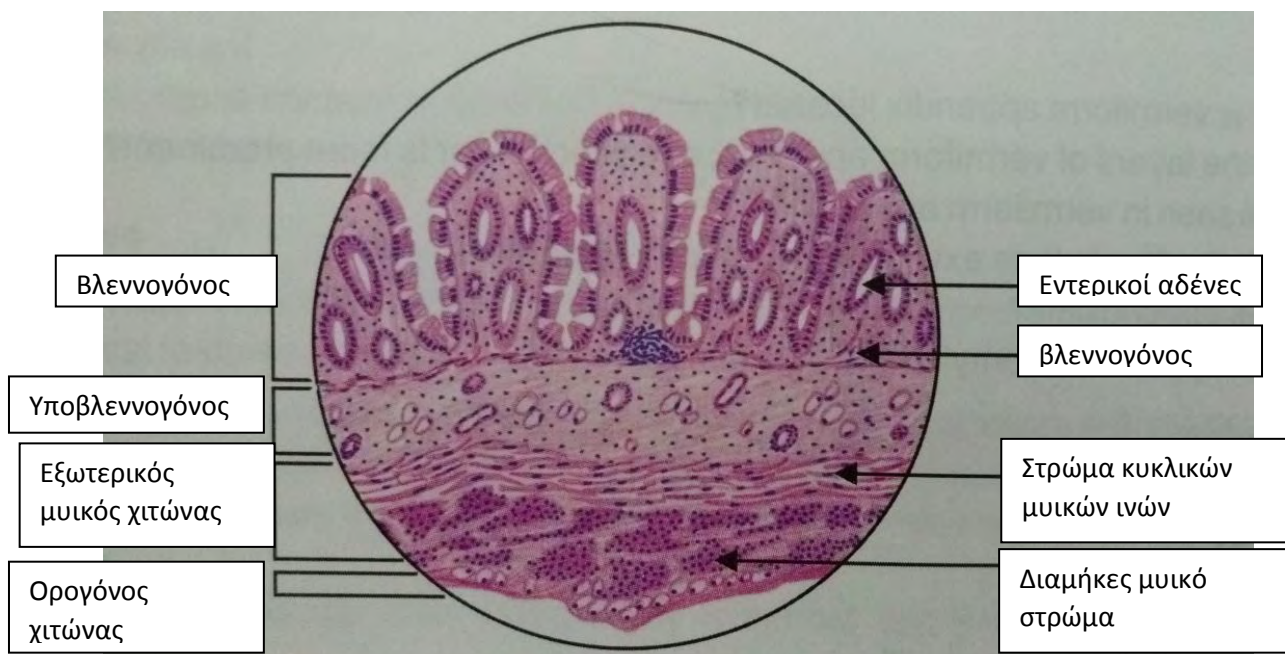
Στο εσωτερικό του παχέος εντέρου εντοπίζονται διακριτές διαφορές στη βιολογία βάσει της ανατομικής θέσης, οι οποίες αντικατοπτρίζονται και στους αναπτυσσόμενους όγκους. Για παράδειγμα, οι όγκοι στο εγγύς παχύ έντερο είναι πολύ πιο συνηθισμένοι στους ηλικιωμένους απ' ό,τι στους νεότερους ασθενείς και στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες. Οι ασθενείς

αυτοί παρουσιάζουν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης από τους ασθενείς με όγκους στο απομακρυσμένο κόλον ή στο ορθό.

2.5 Ιστολογία του παχέος εντέρου

Ιστολογικά το τοίχωμα του παχέος εντέρου από έξω προς τα μέσα αποτελείται από τέσσερις χιτώνες (Εικόνα 4):

- τον ορογόνο (περισπλάχνιο πέταλο του περιτοναίου): καλύπτει κάποια τμήματά του ολοκληρωτικά και κάποια ατελώς.
- τον μυϊκό χιτώνα: αποτελείται από μία έξω επιμήκη και μία έσω κυκλωτή στιβάδα. Η επιμήκης, μάλιστα, στιβάδα είναι εκείνη που παχύνεται κατά τόπους και δημιουργεί τις τρεις κολικές ταινίες.
- τον υποβλεννογόνο χιτώνα: χαλαρός συνδετικός ιστός που συνδέει τον μυϊκό με τον βλεννογόνο χιτώνα.
- τον βλεννογόνο χιτώνα. αποτελείται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο και χόριο και περιέχει διάσπαρτα λεμφοζύδια, εντερικούς αδένες όμοιους με αυτούς του Lieberkuhn στο λεπτό έντερο και μία βλεννογόνο μυϊκή στιβάδα που διαχωρίζει τον βλεννογόνο από τον υποκείμενο υποβλεννογόνο χιτώνα.



Εικόνα 4. Ιστολογική δομή τμήματος του παχέος εντέρου (Ανατύπωση από Manne U, Shanmugam C, Katkoori VR, Bumpers HL, Grizzle WE. Development and progression of colorectal neoplasia. Cancer biomarkers: section A of Disease markers. 2010;9(1-6):235-265).

Ο βλεννογόνος περιέχει κατηγορίες κυττάρων που συμβάλλουν στις δύο βασικές λειτουργίες του παχέος εντέρου, όπως η επαναρρόφηση νερού και η λίπανση κοπράνων για διευκόλυνση της προώθησής τους. Τέτοια κύτταρα είναι τα απορροφητικά και τα βλεννο-εκκριτικά καλυκοειδή. Αυτά βρίσκονται διατεταγμένα σε σωληνώδεις αδένες ή κρύπτες. Με τη διάβαση των κοπράνων κατά μήκος του εντερικού αυλού και την προοδευτική αφυδάτωσή τους, η παραγωγή βλέννης καθίσταται όλο και πιο σημαντική για την προστασία του βλεννογόνου από τραυματισμούς. Τα καλυκοειδή κύτταρα βρίσκονται κυρίως στη βάση των αδένων, ενώ η ενδοαυλική επιφάνεια καλύπτεται από κυλινδρικά απορροφητικά κύτταρα. Το χόριο γεμίζει τα κενά μεταξύ των αδένων και περιέχει άφθονα αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία στα οποία γίνεται παθητική διάχυση νερού. Περιέχει επίσης, κολλαγόνο αλλά και λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα που αποτελούν μέρος του αμυντικού μηχανισμού έναντι των παθογόνων παραγόντων ομού μετά των ενδο-επιθηλιακών λεμφοκυττάρων και των λεμφικών αθροίσεων, οι οποίες είναι μικρότερες από τις πλάκες του Peyer, που εδράζονται στο χόριο και στον υποβλεννογόνο χιτώνα. Η βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα είναι ιδιαίτερος σημαντική αφού οι ρυθμικές συσπάσεις της εμποδίζουν την απόφραξη αδένων και επαυξάνουν την εξώθηση της βλέννης. Ο μυϊκός χιτώνας είναι αρκούτως παχύς και ισχυρός, αποτελείται από την έσω κυκλωτερή και την έξω επιμήκη στιβάδα, με την τελευταία να σχηματίζει –με εξαίρεση το ορθό- επιμήκειες πτυχές, τις κολικές ταινίες.

2.6 Παθολογική Ανατομική

Η σταδιοποίηση για τον ορθοκολικό καρκίνο γίνεται με τη χειρουργική εκτομή του πάσχοντος τμήματος και την παθολογοανατομική εκτίμηση του παρασκευάσματος. Η ιστολογική έκθεση περιλαμβάνει μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση του παρασκευάσματος και φέρει πληροφορίες σχετικά με 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 παρουσία ή απουσία περινευρικής και λεμφαγγειακής διήθησης και την αξιολόγηση της παρουσίας απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλα όργανα, το περιτόναιο ή άλλη ενδοκοιλιακή δομή.

2.6.1 Καλοήθεις όγκοι του παχέος εντέρου

Περίπου το 90% των καλοηθών όγκων είναι πολύποδες. Πολυποδίαση του παχέος εντέρου σημαίνει την ύπαρξη περισσότερων από εκατό πολύποδων. Οι πολύποδες ανακαλύπτονται όλο και συχνότερα με την αύξηση της ηλικίας. Ιστολογικά ανήκουν στα αδενώματα αλλά

εμφανίζουν κίνδυνο εξαλλαγής που σχετίζεται με τη διάμετρο. Η εξαλλαγή είναι σπάνια σε πολύποδες διαμέτρου μικρότερης του ενός εκατοστού, ενώ για μεγαλύτερους πολύποδες ο κίνδυνος αυξάνεται με πιθανότητα εξαλλαγής του 10% των περιπτώσεων [15].

Ο πολύποδας μπορεί εύκολα να εντοπιστεί με την ορθοσκόπηση ή την κολονοσκόπηση. Με το κολονοσκόπιο είναι δυνατή η αφαίρεση των μικρών πολυπόδων ενώ οι μεγάλοι πρέπει να αφαιρούνται με χειρουργική επέμβαση. Συνήθως είναι ασυμπτωματικοί ή μπορεί να προκαλέσουν ανώδυνη αιμορραγία. Η οικογενής πολυποδίαση είναι μια σπάνια κληρονομική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τη εμφάνιση χιλιάδων αδενωματωδών πολυπόδων σε όλο το παχύ έντερο και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο [15].

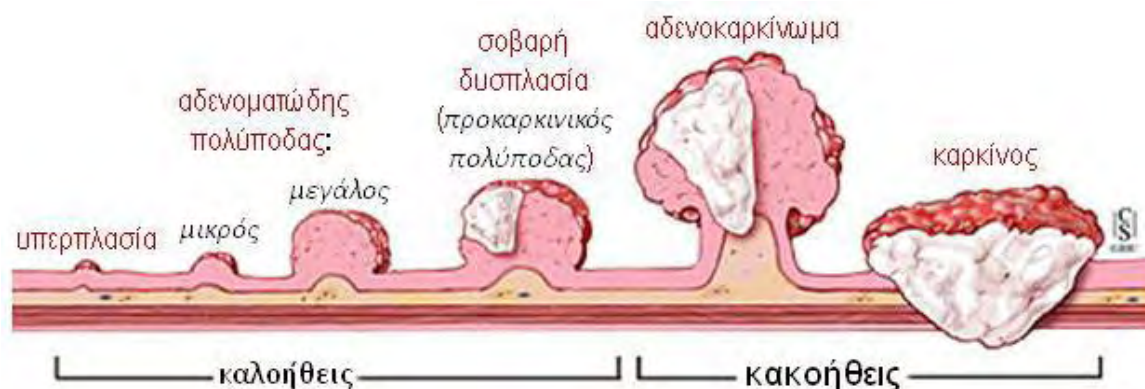
2.6.2 Κακοήθεις όγκοι του παχέος εντέρου

Ο συνηθέστερος κακοήθης όγκος είναι το αδενοκαρκίνωμα. Προσβάλλει άτομα ηλικίας 50-70 ετών. Είναι συχνότερος στις αναπτυγμένες χώρες και σπανιότερος στη Αφρική, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σχέση της νόσου με τις δυτικού τύπου διατροφικές συνήθειες, δηλαδή διατροφή πλούσια σε κρέατα και λίπη και φτωχή σε λαχανικά και φρούτα.

Ο όγκος τυπικά αυξάνεται χωρίς να γίνεται κλινικά εμφανής, δημιουργώντας ελάχιστα μόνο συμπτώματα. Τη χρονική στιγμή που εμφανίζονται τελικά συμπτώματα, η νόσος έχει ήδη επεκταθεί σε βαθύτερα στρώματα του τοιχώματος του εντέρου και ενδεχομένως και τα παρακείμενα όργανα. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου/ορθού επεκτείνεται κατά συνέχεια ιστού, διηθώντας ολόκληρη την περίμετρο του παχέος εντέρου, τον υποβλεννογόνο και τις υπόλοιπες στιβάδες του τοιχώματος του εντέρου. Είναι δυνατόν η άμεση επέκταση της νόσου να έχει ως αποτέλεσμα τη διήθηση των παρακείμενων οργάνων (πχ ήπαρ, μείζων τόξο στομάχου, δωδεκαδάκτυλο, λεπτό έντερο, πάγκρεας, σπλήνας, ουροποιογεννητικό σύστημα και κοιλιακό τοίχωμα). Η συνηθέστερη μορφή διασποράς της νόσου είναι οι μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες (λεμφαδενικές μεταστάσεις) [15].

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου συνιστά το 11-17% νεοεμφανιζόμενων περιπτώσεων καρκίνων διεθνώς. Λαμβάνοντας υπόψη την κληρονομικότητα και τον κίνδυνο ανάπτυξης ο διακρίνονται τρεις κατηγορίες: I) ο σποραδικός καρκίνος (60% των περιπτώσεων), που περιλαμβάνει ασθενείς χωρίς αξιοσημείωτο οικογενειακό ιστορικό και χωρίς κάποια αναγνωρίσιμη κληρονομούμενη γενετική μετάλλαξη, II) ο οικογενής καρκίνος (30% των περιπτώσεων), όπου οι ασθενείς έχουν τουλάχιστον έναν συγγενή με CRC ή αδένωμα, αλλά χωρίς κάποια μετάλλαξη της βλαστικής σειράς III) τα κληρονομικά σύνδρομα CRC (10% των περιπτώσεων), που προκύπτουν από κληρονομική μεταβίβαση μιας μονήρους μετάλλαξης γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας για καρκίνο [16].

Πλήθος γενετικών και επιγενετικών αλλαγών μετασχηματίζουν τα φυσιολογικά αδενικά επιθηλιακά κύτταρα σε διηθητικά αδενοκαρκινώματα. Τα στάδια που μετασχηματίζουν το φυσιολογικό επιθήλιο σε καλοήγη νεοπλάσματα (πολύποδες), ακολούθως διηθητικό καρκίνωμα και τελικά σε μεταστατικό καρκίνο, που περιγράφονται από το κλασικό πρότυπο που προτείνεται από τους Fearon και Vogelstein, όπου το εκτιμώμενο χρονικό διάστημα μετασχηματισμού από φυσιολογικό βλεννογόνο σε πολύποδα και ακολούθως σε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα είναι 5-10 έτη (15) (Εικόνα 5).



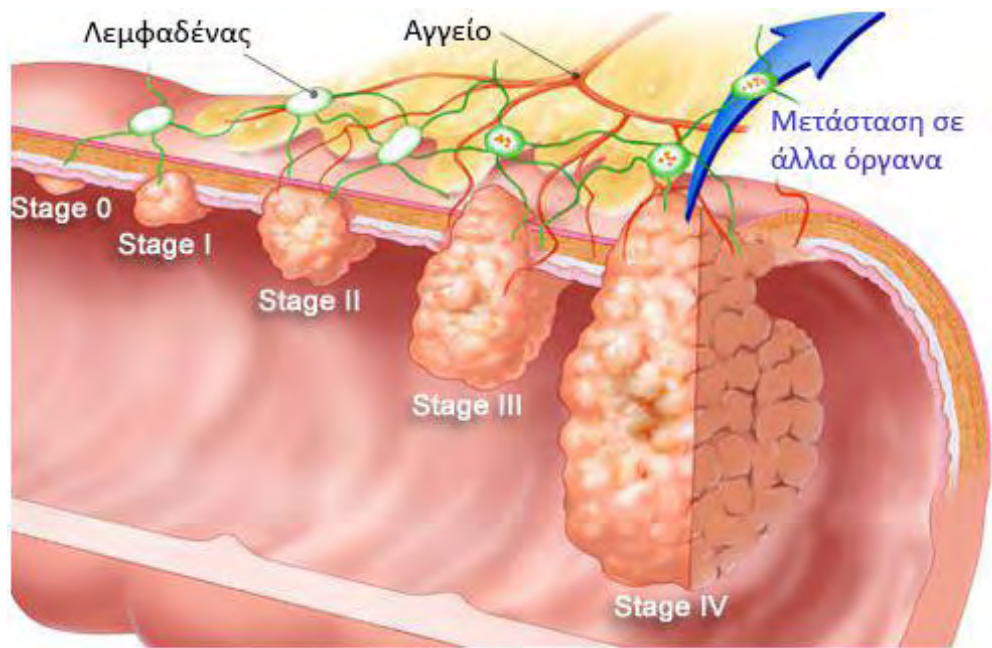
Εικόνα 5. Ανάπτυξη καρκινώματος του παχέος εντέρου (Ανατύπωση από Josh Hopkins Cancer Institute, <http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS>).

2.6.3 Σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου

Το σύστημα σταδιοποίησης, που χρησιμοποιείται ευρέως στον ορθοκολικό καρκίνο, είναι το TNM. 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). 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.

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
IIC	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
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Any T	Any N	M1a	-	-
IVB	Any T	Any N	M1b	-	-

Πίνακας 1. Σταδιοποίηση του καρκίνου κατά το TNM σύστημα. Αντιστοιχία με συστήματα Dukes και MAC.

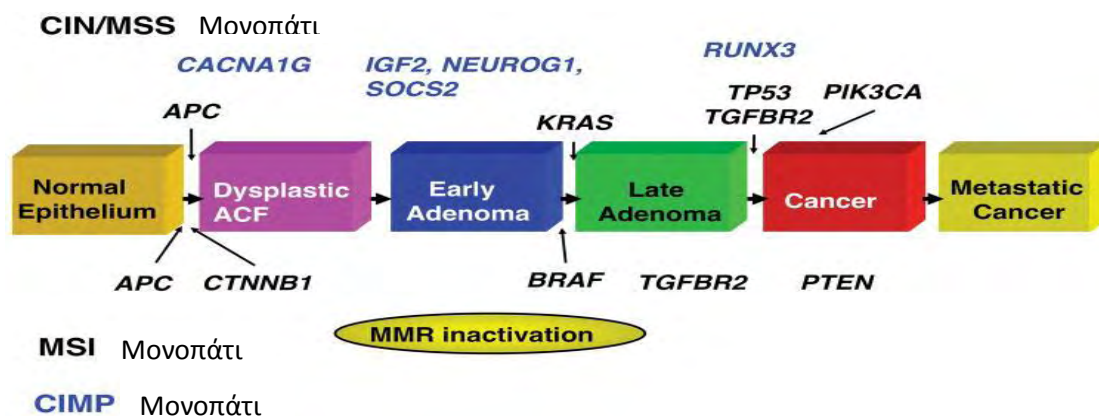


Εικόνα 6. Στάδια ανάπτυξης του ορθοκολικού καρκίνου (Ανατύπωση από Tan AC, Naiman DQ, Xu L, Winslow RL, Geman D. Simple decision rules for classifying human cancers from gene expression profiles. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2005;21(20):3896-3904).

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

3.1 Καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου

Η παθογένεια του ορθοκολικού καρκίνου είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια, που έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών που καθορίζουν τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων όσον αφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αθανατοποίηση, την αγγειογένεση και τη διήθηση [18]. Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου είναι το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (Chromosomal Instability pathway- CIN) και το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (Microsatellite Instability- MSI), που περιλαμβάνουν γενετικές και επιγενετικές αλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Η καρκινογένεση περιγράφεται μέσω δύο καλά-αναγνωρισμένων μονοπατιών (Ανατύπωση από Grady and Pritchard CC, Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer., Toxicol Pathol. 2014 Jan;42(1):124-39).

Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον τέσσερα είδη γενομικής ή επιγενετικής αστάθειας στον ορθοκολικό καρκίνο: α) το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (Chromosomal INstability- CIN), β) ο φαινότυπος μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP), γ) η καθολική υπομεθυλίωση του DNA και δ) το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Instability-MSI).

3.1.1 Χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal INstability-CIN)

Η πιο κοινή μορφή γενομικής αστάθειας, είναι η χρωμοσωμική που συναντάται σε ποσοστό 65-70% των σποραδικών μορφών του CRC [20]. Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ανευπλοειδίας, ορίζεται από την παρουσία αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλαγών και απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity- LOH) ή δομικές μεταβολές του DNA που μπορούν να αξιολογηθούν με κυτταρομετρία ροής. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που την προκαλούν δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η CIN προάγει την καρκινογένεση μέσω κλωνικής ποικιλομορφίας [20, 21]. Μελέτες μετα-ανάλυσης έχουν δείξει ότι αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης στους CRCs, αλλά τεχνικά θέματα στις μεθόδους ελέγχου έχουν οδηγήσει στην περιορισμένη χρήση του διαγνωστικά [22, 23].

Στο μονοπάτι της CIN παρατηρούνται σε σημαντικό βαθμό μοριακές αλλαγές μέσω της συσσώρευσης αριθμητικών ή δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών- ανευπλοειδίες [24]. Η πρώιμη αναγνωρίσιμη βλάβη σε αυτή την οδό είναι η ανώμαλη εστία κρυπτών ACF, μία μικροσκοπική βλάβη του βλεννογόνου που προηγείται της ανάπτυξης του πολύποδα. Το μονοπάτι σχετίζεται με μεταλλάξεις του APC γονιδίου και/ή απώλεια της 5q χρωμοσωμικής περιοχής που περιλαμβάνει αυτό το γονίδιο, μεταλλάξεις του ογκογονιδίου KRAS, απώλεια του χρωμοσώματος 18q και διαγραφή του 17p όπου εδράζεται το γονίδιο TP53 [25, 26].

Το γονίδιο APC είναι εξαιρετικά σημαντικό σε αυτή την οδό, καθώς δεσμεύεται με την β-κατενίνη καταστέλλοντας τη σηματοδότηση μέσω του Wnt μονοπατιού [27]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο APC απαντώνται σε ποσοστό 70% των σποραδικών μορφών καρκίνου. Παρά τον κρίσιμο ρόλο της ενεργοποίησης της Wnt οδού στην καρκινογένεση, δεν υπάρχει μέχρι τώρα εφαρμογή στη θεραπεία, πρόγνωση ή έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου [28].

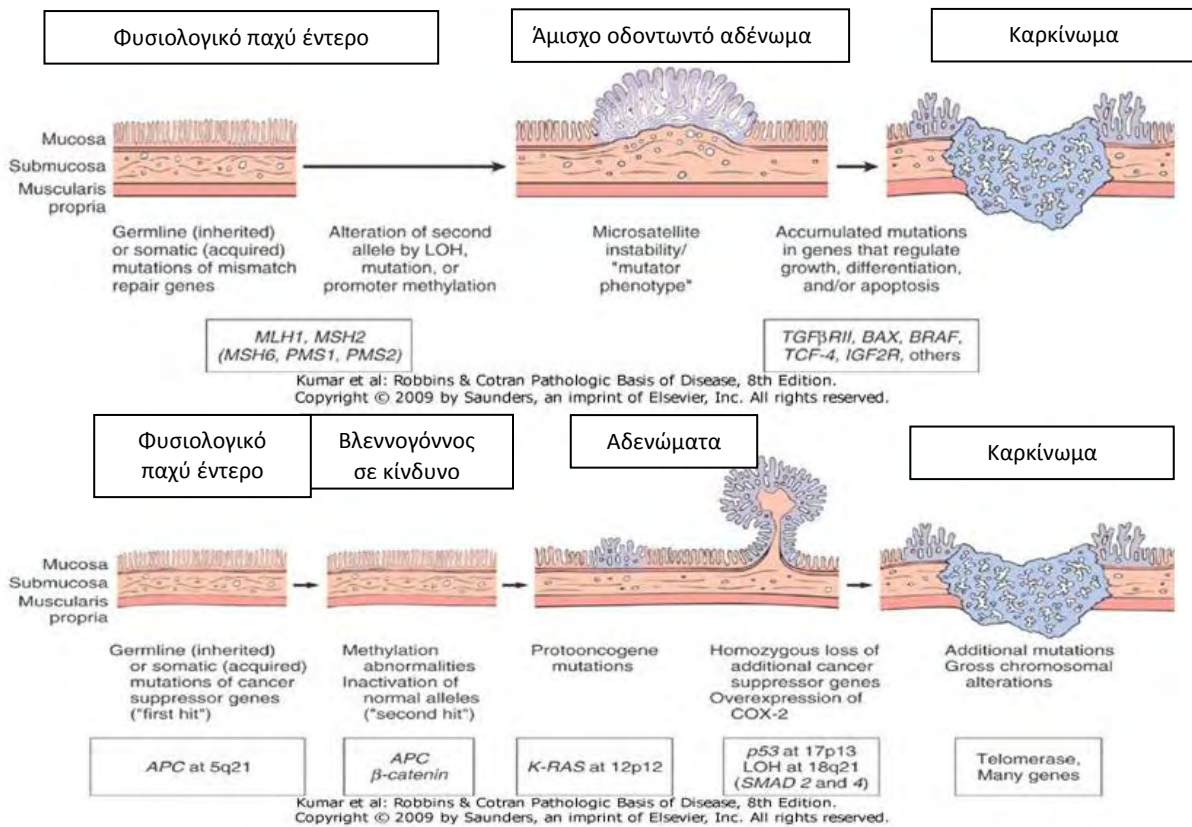
Στην πλειοψηφία των CRC όγκων παρατηρείται απορύθμιση του TGF-β μονοπατιού [29]. Η οδός σηματοδότησης TGF-β/SMAD περιλαμβάνει τους υποδοχείς TGF-β τύπου I (TGFβRI) και τύπου II (TGFβRII) και τις SMAD πρωτεΐνες. Λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις στον TGFβRII έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό έως και 30% των CRC και σχετίζονται με το μετασχηματισμό τον αδενώματος σε κακοήθεια. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι συχνές σε όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια και εμφανίζονται στο 15% των όγκων με μικροδορυφορική σταθερότητα [30, 31].

Τα γονίδια KRAS και BRAF κατέχουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK. Μεταλλάξεις στα γονίδια της οδού των MAPK κινασών παρατηρούνται σε ποσοστό έως και 40% των CRC. Το γονίδιο KRAS, μέλος της οικογένειας των πρωτο-ογκογονιδίων RAS, είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο σε όλους τους καρκίνους του ανθρώπου και το πιο σημαντικό ογκογονίδιο στον CRC. Η πρωτεΐνη KRAS είναι τελεστής του EGFR, που

σηματοδοτεί μέσω του BRAF την ενεργοποίηση της οδού των MAPK κινασών και προάγει την κυτταρική αύξηση και επιβίωση. Οι μεταλλάξεις του KRAS στα κωδικόνια 12, 13, 61 και 146 εμφανίζονται στο 40% των καρκίνων του παχέος εντέρου και οδηγούν στη μείωση της GTPase ικανότητας να ενεργοποιούν πρωτεΐνες υδρόλυσης του GTP-συνδεδεμένου με KRAS [32].

Το γονίδιο BRAF είναι μεταλλαγμένο στο 10-15% των CRC και κωδικοποιεί μία κίνηση που είναι άμεσος στόχος της KRAS στο μονοπάτι Ras/Raf/MAPK. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων του BRAF γονιδίου είναι νουκλεοτιδικές αντικατάστασης μιας βάσης που οδηγούν στην αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος από τη βαλίνη στο κωδικόνιο 600 (V600E) [33]. Οι μεταλλάξεις στα KRAS και BRAF ογκογονίδια σπάνια συνυπάρχουν ταυτόχρονα (mutually exclusive) και προωθούν την ογκογένεση μέσω της MAPK σηματοδότησης [24]. Οι μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο είναι συχνότερες στους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI – 35%) σε σύγκριση με τους όγκους που δεν παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια (MSS-Stable-5%) και είναι στενά συνδεδεμένες με τους CIMP όγκους και το μονοπάτι της οδοντωτής νεοπλασίας (serrated pathway).

Συχνές μεταλλάξεις εμφανίζονται και στην p110α καταλυτική υπομονάδα της PIK3CA, που φθάνουν έως 32% στους CRC όγκους και συμβάλλουν στην εξέλιξη του αδενώματος σε καρκίνωμα [34]. Μεταλλάξεις παρατηρούνται επίσης στο PTEN γονίδιο (φωσφατάση που καταστέλλει την PI3K) σε ποσοστό 30% στους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και σε ποσοστό 9% με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) [35]. Το μονοπάτι (PI3K/PTEN) ρυθμίζεται από τη EGFR σηματοδότηση μέσω της ενεργοποίησης της KRAS πρωτεΐνης και υπάρχει πιθανός ρόλος στις μεταλλάξεις των PIK3CA και PTEN, ως προγνωστικοί δείκτες στη anti-EGFR θεραπεία [36, 37]. Τέλος, μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 εμφανίζονται σε ποσοστό 50% των περιπτώσεων του ορθοκολικού καρκίνου και προάγουν τον κακοήγη μετασχηματισμό των αδενωμάτων [38].



Εικόνα 8. Μοριακά μονοπάτια στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου (Ανατύπωση από Kumar K, Brim H, Giardiello F, et al. Distinct BRAF (V600E) and KRAS Mutations in High Microsatellite Instability Sporadic Colorectal Cancer in African Americans. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(4):1155-1161).

3.1.2 Ο φαινότυπος μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP)

Η επιγενετική αστάθεια στον ορθοκολικό καρκίνο εκδηλώνεται μέσω υπερμεθυλίωσης των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων και μέσω καθολικής DNA υπομεθυλίωσης. Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων στους υποκινητές έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Το μονοπάτι CIMP χαρακτηρίζεται από υπερμεθυλίωση υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, κυρίως MTH1 και MLH1 και σχετίζεται με τη μικροδορυφορική αστάθεια και μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου [40]. Η συγκεκριμένη οδός είναι η δεύτερη πιο συχνή στον σποραδικό CRC, όπου αντιπροσωπεύει το 15% των περιπτώσεων.

Ο φαινότυπος μεθυλίωσης των CpG νησίδων προσδιορίζεται συνήθως από τη μεθυλίωση τριών τουλάχιστον δεικτών μεθυλίωσης σε ένα σύνολο πέντε δεικτών [41]. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν τη διάκριση του CIMP σε δύο κατηγορίες, χαμηλού και υψηλού βαθμού μεθυλίωσης (CIMP1, CIMP2) βάσει της ανάλυσης των δεικτών μεθυλίωσης. Αναδρομικές μελέτες υποστηρίζουν ότι ο φαινότυπος CIMP μελλοντικά θα αποτελέσει προγνωστικό δείκτη,

ωστόσο τα δεδομένα που υπάρχουν δεν είναι επαρκή μέχρι στιγμής [42]. Η μετάλλαξη V600E του BRAF γονιδίου παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την υπερμεθυλίωση του MLH1 γονιδίου.

Επιπρόσθετα, σε πολλούς ορθοκολικούς καρκίνους έχει παρατηρηθεί καθολική υπομεθυλίωση, που συνδέεται στενά με τους όγκους που παρουσιάζουν χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) [43]. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να ελεγχθεί η κλινική χρησιμότητα του γεγονότος αυτού.

3.1.3 Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Instability- MSI)

Οι μικροδορυφόροι είναι μικρά επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA, όπου η δημιουργία λαθών λόγω άνισου επιχιασμού κατά την αντιγραφή οδηγεί στη δημιουργία νέων αλληλομόρφων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια (MicroSatellite Instability-MSI) και σχετίζεται με συχνά βλάβες στα γονίδια επιδιόρθωσης λαθών του DNA [44, 45]. Το μικροδορυφορικό DNA αποτελεί το κατάλληλο πειραματικό μέσο για τη μελέτη της πιστότητας στην αντιγραφή του DNA στα καρκινικά κύτταρα. Πρόκειται συνήθως για επαναλήψεις CA/GT που έχουν βρεθεί σε 100.000 διαφορετικές θέσεις στα χρωμοσώματα του ανθρώπου [46]. Το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας εμπλέκεται στην παθογένεια γενετικών νοσημάτων του νευρικού συστήματος, όπως η χορεία του Huntington [47], το σύνδρομο του ευερέθιστου X [48], η μυοτονική δυστροφία [49], καθώς επίσης στον ορθοκολικό καρκίνο, τόσο στον κληρονομικό τύπο (Lynch Syndrome), όσο και στη σποραδική του μορφή σε ποσοστό περίπου 10-15%.

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) αντιπροσωπεύει ένα μονοπάτι καρκινογένεσης που σχετίζεται με τη χρωμοσωμική αστάθεια, έχει αναγνωρισμένη προγνωστική και ενδεχομένως θεραπευτική αξία και περιγράφηκε αρχικά από τον Vogelstein. Η αστάθεια των επαναλήψεων σε μονο- και δινουκλεοτιδικούς μικροδορυφόρους συνιστά τον κλινικό και βιολογικό ορισμό της MSI [50]. Ωστόσο σε έναν ταχέως αυξανόμενο αριθμό πειραμάτων η αστάθεια των επαναλήψεων στα τετρανουκλεοτίδια έχει περιγραφεί ως ένας ξεχωριστός υπότυπος του MSI σε ένα ευρύ φάσμα όγκων από όργανα της αναπνευστικής οδού και του γαστρεντερικού σωλήνα [51]. Αυτός ο ξεχωριστός υπότυπος ονομάστηκε “elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides” (EMAST).

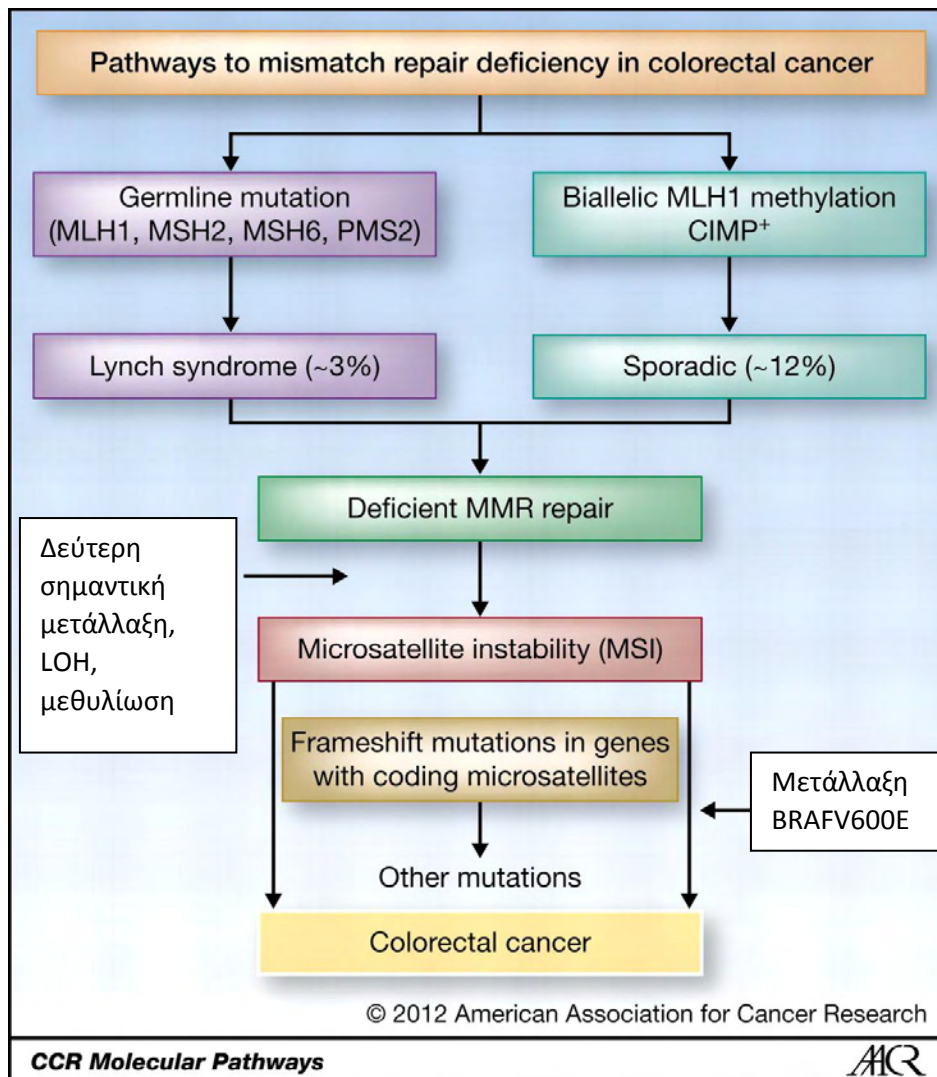
Η μικροδορυφορική αστάθεια εμφανίζεται συνήθως λόγω των αδρανοποιητικών μεταλλάξεων στα γονίδια επιδιόρθωσης λαθών του DNA (MismatchRepair) κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. Τα κύρια ένζυμα του επιδιορθωτικού συστήματος είναι οι ATPάσες hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1, hPMS2, hPMS1, και hMLH3. Το 1997, το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου στα πλαίσια σύσκεψης που διοργανώθηκε, επικύρωσε πέντε δείκτες για τον έλεγχο

της μικροδορυφορικής αστάθειας. Το πάνελ των δεικτών περιελάμβανε δύο μονονουκλεοτιδικούς δείκτες (BAT25 και BAT26) και τρεις δινουκλεοτιδικούς (D5S346, D2S123 και D17S250). Όγκοι με αστάθεια $\geq 30\%$ των δεικτών καλούνται MSI-High (MSI-H), εκείνοι με αστάθεια $<30\%$ καλούνται MSI-Low (MSI-L), ενώ εκείνοι που δεν παρουσιάζουν αστάθεια χαρακτηρίζονται ως MSS (MicroSatellite Stable) [52]. Το MSI-H εντοπίζεται κυρίως στις κληρονομικές μορφές του CRC και στο 15% των σποραδικών μορφών. Οι μεταλλάξεις στα MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 σχετίζεται με κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου Lynch (LS). Μέχρι την ηλικία των 70 ετών, ο κίνδυνος εμφάνισης του συνδρόμου LS εκτιμάται σε ποσοστό 38% στους άντρες και 31% στις γυναίκες. Η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1, MSH2, και MSH6 αυξάνει περαιτέρω τον κίνδυνο εμφάνισης [53]. Εκτιμάται πως το 70-90% των περιπτώσεων με κληρονομικό Lynch Syndrome οφείλεται σε μεταλλάξεις των MLH1 και MSH2 γονιδίων, ενώ το υπόλοιπο 10-30% σε μεταλλάξεις των MSH6 και PMS2 αντίστοιχα.

Έχουν αναφερθεί περισσότερες από 1.500 μεταλλάξεις στη βλαστική σειρά στα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (MMR), λόγω μεθυλίωσης στις CpG νησίδες του υποκινητή του γονιδίου, σωματικές ελλείψεις ή σημειακές μεταλλάξεις [54, 55]. Σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια EPCAM, POLE και POLD1 σχετίζονται επίσης με τον ορθοκολικό καρκίνο. Πρόσφατη μελέτη των Haraldsdottir S. και συνεργατών του, έδειξε μεταλλάξεις σε τουλάχιστον δύο από αυτά τα γονίδια σε ποσοστό περίπου 70% των ασθενών που μελετήθηκαν [56].

Οι MSI-H όγκοι είναι κλινοπαθολογικά διακριτοί. Εμφανίζονται συχνότερα στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες και χαρακτηρίζονται από χαμηλή διαφοροποίηση, λεμφοκυτταρική διείσδυση, εμφάνιση νόσου Crohn και ευνοϊκότερη πρόγνωση. Πρόκειται για μοριακά ετερογενείς όγκους με ποικίλες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένης της ανεπάρκειας των επιδιορθωτικών γονιδίων, μεταλλάξεις σε στόχους μικροδορυφόρων, BRAF μεταλλάξεις, χαμηλού βαθμού υπομεθυλίωση και φαινότυπο μεθυλίωσης των CpG νησίδων [57, 58].

Η επιβίωση και η θνησιμότητα των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο συσχετίστηκαν πρόσφατα με MSI, CIMP και μεταλλάξεις στα BRAF και KRAS ογκογονίδια. Οι MSI-H όγκοι συνδέονται με πενταετή επιβίωση, ακολουθούν οι MSI-L/MSS όγκοι, χωρίς CIMP ή BRAF και KRAS μεταλλάξεις και τέλος οι όγκοι που φέρουν αποκλειστικά KRAS μεταλλάξεις. Οι όγκοι με φαινότυπο CIMP και BRAF μεταλλάξεις παρουσιάζουν τη χειρότερη επιβίωση [59] (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Μονοπάτια που οδηγούν σε ανεπάρκεια των επιδιορθωτικών μηχανισμών στον ορθοκολικό καρκίνο [Ανατύπωση από AACR, 2012].

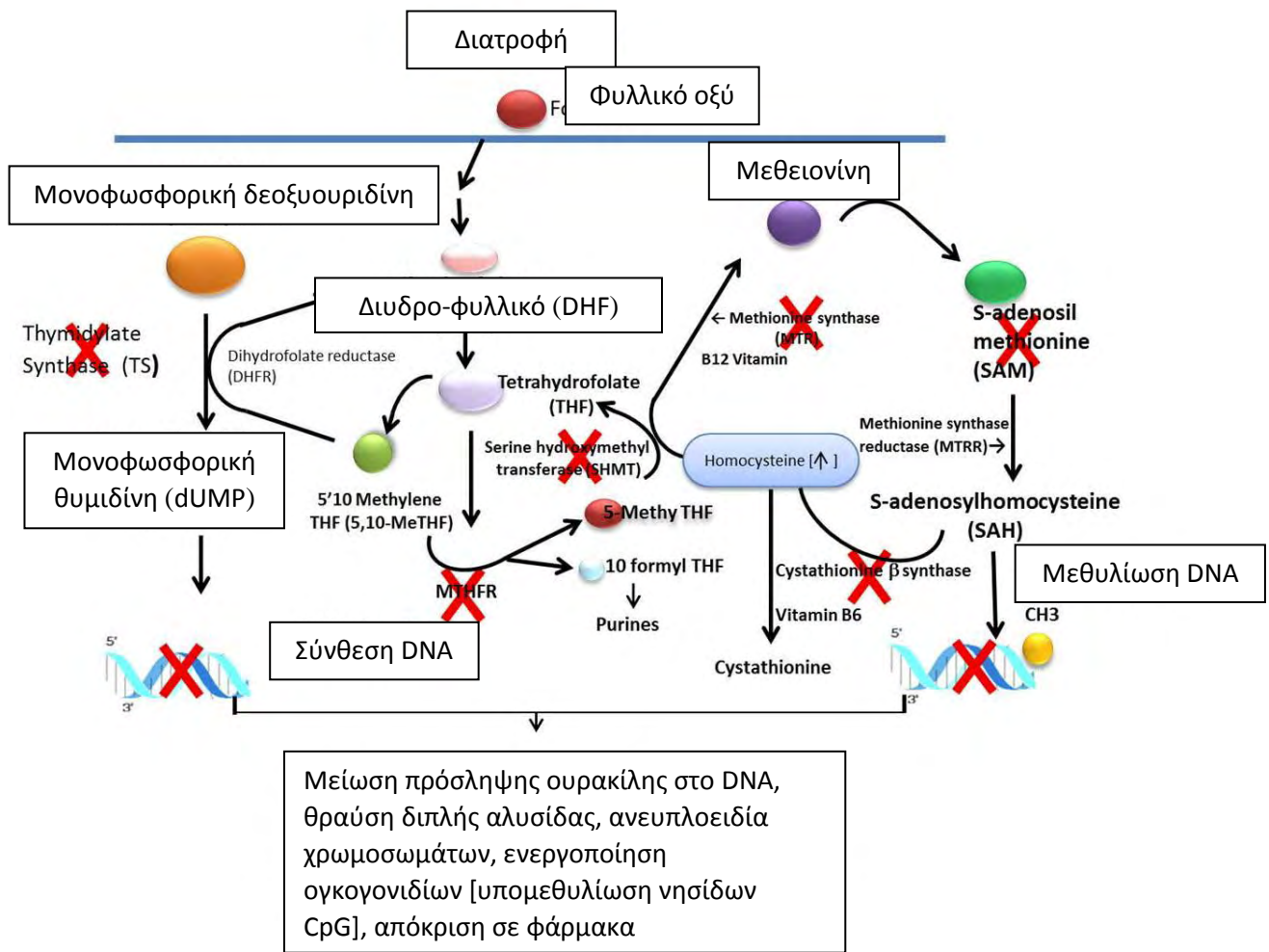
Θεραπευτικά σχήματα που βασίζονται στη 5-φθοριοουρακίλη (5-FU) είναι αναποτελεσματικά ή και επιβλαβή σε ασθενείς με MSI-H όγκους [60]. Αντίθετα αυτοί οι όγκοι φαίνεται να ανταποκρίνονται αποτελεσματικότερα στη χημειοθεραπεία με ιρινοτεκάνη [61, 62]. Μια μεγάλη τυχαίοποιημένη μελέτη ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου III, των Bertagnolli και των συνεργατών του, έδειξε καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών με MSI-H σε θεραπεία με ιρινοτεκάνη σε συνδυασμό με 5-FU συγκριτικά με εκείνους που τους χορηγήθηκε 5-FU και λευκοβορίνη.

3.2 Μεταβολισμός του φυλλικού οξέος και σχέση με τον ορθοκολικό καρκίνο

Πλήθος επιδημιολογικών μελετών σχετίζει το φυλλικό οξύ με την καρκινογένεση, λόγω του ρόλου του στη σύνθεση και μεθυλίωση του DNA. Οι πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος επηρεάζουν τα επίπεδα μεθυλίωσης και κατ' επέκταση τον κίνδυνο εμφάνισης CRC [63, 64]. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν πως η επαρκής πρόσληψή του σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου [65, 66], αν και αυτή η συσχέτιση δεν επιβεβαιώνεται σε όλες τις μελέτες [67, 68]. Μειωμένα επίπεδα φυλλικού οξέος συνδέονται με βλάβες και αστάθεια στο DNA, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ογκογένεση. Προηγούμενες επιδημιολογικές μελέτες έχουν ενοχοποιήσει την ανεπάρκεια του φυλλικού οξέος για την ανάπτυξη καρκίνου (τραχήλου της μήτρας, πνευμόνων, παχέος εντέρου και μαστού) [69, 70].

3.2.1 Το γονίδιο MTHFR

Το γονίδιο MTHFR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1, στη χρωμοσωμική θέση 1p36.22, αποτελείται από 11 εξόνια και είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 74,6 kD και 656 αμινοξέων [71]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγάση (MTHFR) έχει ενζυμική δραστηριότητα και καταλύει τη μετατροπή του 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφυλικού οξέος σε 5-μεθυλοτετραϋδροφυλικό, τον δωρητή άνθρακα για την επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης (Hcy) στη μεθειονίνη [72, 73] με επακόλουθη παραγωγή της S-αδενοσυλ μεθειονίνης (SAM), που αποτελεί τον κύριο δότη των μεθυλομάδων που απαιτούνται για τη μεθυλίωση του DNA στον άνθρωπο (Εικόνα 10). Κατέχει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό του φολικού οξέος, γνωστό και ως βιταμίνη B9 και καθορίζει την ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών μορφών του, για τη σύνθεση και μεθυλίωση του DNA [74]. Επομένως, οποιαδήποτε διαταραχή του MTHFR γονιδίου θα αντανάκλα διαταραχή στο πρότυπο μεθυλίωσης και σύνθεσης του DNA.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος, μεθειονίνη και ομοκυστεΐνη. DHF, dihydrotetrafolate; THF, tetrahydrofolate; 5,10-MTHF, 5,10-methylenetetrahydrofolate; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate; SAM, S-adenosylmethionine; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MTR, methionine synthase; MTRR, methionine synthase reductase (Odin E, Sondén A, Gustavsson B, Carlsson G, Wettergren Y. Expression of Folate Pathway Genes in Stage III Colorectal Cancer Correlates with Recurrence Status Following Adjuvant Bolus 5-FU-Based Chemotherapy. *Molecular Medicine*. 2015;21(1):597-604).

Είναι γνωστοί δύο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) του MTHFR γονιδίου, που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος. Ο C677T SNP στο εξόνιο 4, που οδηγεί σε αντικατάσταση μίας βάσης (Ala222Val) και ο A1298C SNP στο εξόνιο 7 (Glu429Ala) που σχετίζονται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου [72, 76]. Συγκριτικά με τους MTHFR 677CC ομοζυγώτες, οι γονότυποι CT και TT παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα ενζύμου κατά 30% και 70%, αντίστοιχα. Ο δεύτερος πολυμορφισμός οδηγεί σε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 40%. Ο γονότυπος 677TT έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας σε ποσοστό 30% σε σύγκριση με τον αγρίου τύπου γονότυπο CC σε *in vitro* πειράματα [72], ενώ ο

γονότυπος MTHFR 1298CC παρουσιάζει 60% ενζυμική δραστικότητα έναντι του αγρίου τύπου AA in vitro [76, 77].

Οι πολυμορφισμοί MTHFR C677T και A1298C, καθώς μειώνουν τη δραστικότητα του ενζύμου, τα επίπεδα του φυλλικού οξέος οδηγούν σε υπεροκυστεϊναιμία (HHcy) και σχετίζονται με την υπέρταση και την υπέρταση κατά την κύηση [77, 78]. Αρκετές μελέτες αναφέρουν πως υπάρχει σχέση μεταξύ των MTHFR πολυμορφισμών και του κινδύνου εμφάνισης μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα. Μια σειρά πειραμάτων δείχνει ότι ο γονότυπος 677TT συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης [79, 80, 81]. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο C677T πολυμορφισμός δεν σχετίζεται σημαντικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου [82, 83, 84]. Οι πιθανές εξηγήσεις για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα αποδίδονται στο μικρό μέγεθος του δείγματος, στις διαφορετικές εθνικότητες, στη διαίτα, στο περιβάλλον και στη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε.

Λίγα είναι γνωστά για το ρόλο των γονοτύπων του MTHFR στην καρκινογένεση του ορθοκολικού καρκίνου και την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας. Μια προηγούμενη μελέτη ανέφερε μέτρια αλλά όχι σημαντική συσχέτιση μεταξύ του MTHFR 677TT γονοτύπου και του MSI [85], ενώ μια άλλη έδειξε υψηλότερη συσχέτιση αυτού του γονοτύπου με την εμφάνιση όγκων παχέος εντέρου με MSI-H [86]. Σε μία μετά-ανάλυση 25 μελετών αναφέρεται ότι ο γονότυπος MTHFR 677TT σχετίζεται με μετρίου βαθμού, αλλά σημαντικά μειωμένο κίνδυνο για CRC [87]. Ο γονότυπος 677TT του MTHFR γονιδίου σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης CRC σε πληθυσμούς ηλικιωμένων ατόμων, πιθανώς λόγω διαταραχών στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος. Ο γονότυπος MTHFR 677CT σε συνδυασμό με τη χαμηλή πρόσληψη φυλλικού οξέος, διαταράσσει τη μεθυλίωση του DNA και συμβάλει στην καρκινογένεση [88].

Προηγούμενες μελέτες δεν ανέδειξαν συσχέτιση μεταξύ των διατροφικών συνηθειών, όπως η πρόσληψη φυλλικού οξέος με την εμφάνιση CRC και την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας. Δεδομένα και από άλλους πολυμορφισμούς του MTHFR γονιδίου και της συσχέτισής τους με λανθασμένο πρότυπο μεθυλίωσης στον ορθοκολικό καρκίνο, καθιστούν αναγκαία την περαιτέρω μελέτη σε μεγάλο αριθμό ασθενών και σε συγκεκριμένους πληθυσμούς καθώς παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις λόγω γεωγραφικής ετερογένειας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΣΚΟΠΟΣ

Πλήθος μελετών υποστηρίζει ότι η παρουσία του πολυμορφισμού rs1801133 ενδέχεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, ωστόσο υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των μελετών. Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετήσουμε την κατανομή του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) του MTHFR γονιδίου σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο παχέος και την πιθανή συσχέτισή του με την παρουσία ή απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας καθώς και με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως είναι το φύλο, η ηλικία, η παρουσία διήθησης, το στάδιο και η διάμετρος του όγκου.

4.1 ΥΛΙΚΟ

Συλλογή Δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την παρουσία του πολυμορφισμού rs1801133 MTHFR C677T σε αρχειακό υλικό 50 ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, που προσήλθαν στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Για το σκοπό αυτό έγινε μικροσκοπική παρατήρηση των χρώσεων αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H/E), προκειμένου να επιλεγούν κατάλληλες περιοχές με νεοπλασματικό ιστό σε ποσοστό >70%, καθώς και περιοχές που περιέχουν φυσιολογικό και νεοπλασματικό υλικό, ώστε να γίνει έλεγχος για την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας. Από τους κύβους παραφίνης ελήφθησαν τομές πάχους 10 μm, σε σωληνάριο τύπου erpendorf προκειμένου να προχωρήσουμε σε απομόνωση DNA. Επιπρόσθετα, ελήφθησαν δύο τομές πάχους 4 μm για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των MLH1 και PMS2 γονιδίων.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Απομόνωση DNA

Το πρώτο βήμα για την απομόνωση του γενετικού υλικού των επιλεγμένων δειγμάτων είναι η αποπαραφίνωση του εξεταζόμενου ιστού. Για την αποπαραφίνωση ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα.

- Αποθήκευση των τομών σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 2 mL
- Προσθήκη 1 mL διαλύματος ξυλόλης στο σωληνάριο που φέρει τις τομές.
- Επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά με συχνές αναδεύσεις σε μικροδίνη (vortex)
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 1 mL διαλύματος ξυλόλης στο σωληνάριο
- Εκ νέου επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά με συχνές αναδεύσεις σε μικροδίνη (vortex)
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 1 mL διαλύματος 100% αλκοόλης στο σωληνάριο και ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε μικροδίνη (vortex)
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Εκ νέου προσθήκη 1 mL διαλύματος 100% αλκοόλης στο σωληνάριο και ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε μικροδίνη (vortex)
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου

Μετά τη διαδικασία της αποπαραφίνωσης ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης γενομικού DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το PureLink™ Genomic DNA Mini Kit της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Προσθήκη 400 μ L λυτικού διαλύματος (Genomic Digestion Buffer) σε κάθε σωληνάριο για τη λύση του ιστού
- Προσθήκη 40 μ L διαλύματος του ενζύμου πρωτεϊνάσης K, για τη λύση των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες στο DNA
- Επώαση του διαλύματος στους 56°C για 18 ώρες

- Επώαση του διαλύματος στους 90°C για 60 λεπτά
- Σύντομη φυγοκέντρηση του δείγματος
- Προσθήκη 400 μL διαλύματος λύσης/πρόσδεσης (Genomic Lysis/ Binding Buffer) για τη λύση των κυττάρων και την πρόσδεση του γενετικού υλικού στη στήλη απομόνωσης.
- Ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε μικροδίνη (vortex)
- Προσθήκη 400 μL 100% αλκοόλης για τη σταθεροποίηση του DNA
- Ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε μικροδίνη (vortex)
- Προσθήκη 40 μL διαλύματος του ενζύμου RNάση για την απομάκρυνση των μορίων RNA από το διάλυμα
- Φόρτωση 600 μL διαλύματος σε στήλες απομόνωσης που παρέχονται από τον κατασκευαστή.
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του εκλούμενου διαλύματος
- Εκ νέου φόρτωση του εναπομείναντος διαλύματος στις στήλες απομόνωσης
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του εκλούμενου διαλύματος
- Προσθήκη 600 μL διαλύματος καθαρισμού (Wash Buffer 1), που παρέχεται από τον κατασκευαστή
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του εκλούμενου διαλύματος
- Προσθήκη 600 μL διαλύματος καθαρισμού (Wash Buffer 2), που παρέχεται από τον κατασκευαστή
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του εκλούμενου διαλύματος
- Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο τύπου erpendorf για τη συλλογή του DNA
- Προσθήκη 40 μL δις- απεσταγμένου νερού στη στήλη
- Επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 15000 rpm για 10 λεπτά

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για τον έλεγχο της ποιότητας του γενομικού DNA, των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της επώασης με την περιοριστική ενδονουκλεάση για τον προσδιορισμό του γονοτύπου του μελετούμενου πολυμορφισμού, μικροί όγκοι των δειγμάτων φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκαν.

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο αρνητικό φορτίο του DNA. Σύμφωνα με αυτή του την ιδιότητα, ένα δείγμα μπορεί να φορτωθεί σε οπή της πηκτής που βρίσκεται στον αρνητικό πόλο μίας συσκευής ηλεκτροφόρησης και με την εφαρμογή ηλεκτρισμού να μετακινηθεί προς το θετικό πόλο της πηκτής. Η ταχύτητα με την οποία μετακινείται το DNA κατά μήκος της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθός του. Συνεπώς, μεγαλύτερου μήκους μόρια DNA κινούνται με μικρότερη ταχύτητα κατά μήκος της πηκτής, ενώ μικρότερου μήκους μόρια κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα.

Για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης, ενδεικτικός όγκος του δείγματος αναμιγνύεται με χρωστική ουσία. Η χρωστική έχει τη δυνατότητα να καθηλώνει το εξεταζόμενο μόριο στην οπή της πηκτής. Κατά την κατασκευή της πηκτής προστίθεται ποσότητα της χρωστικής του βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στις αζωτούχες βάσεις του DNA. Επίσης, μπορεί να παράγει φωταύγεια όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, κάνοντας το μόριο DNA στο οποίο παρεμβάλλεται, ορατό.

Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1% για τον έλεγχο της ποιότητας του γενομικού DNA και πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 3% για τον έλεγχο τόσο των προϊόντων της PCR όσο και των προϊόντων της πέψης. Ακολούθησε φωτομέτρηση του DNA στα 260/280 nm, και εκτίμηση του λόγου $\lambda = OD_{260}/OD_{280}$ μας δίνει την καθαρότητα.

Η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$C (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 40 \times (1/\text{αραίωση})$$

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs1801133 του γονιδίου του MTHFR ενισχύσαμε τη γονιδιακή περιοχή που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 και ο πολυμορφισμός σηματοδοτεί μία αλλαγή από C→T στην αμινοξική θέση 677, με αριθμό καταχώρησης NM_005957.4:c.665C>T. Η αλληλουχία γύρω από τη θέση του πολυμορφισμού είναι η παρακάτω:

TTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGAG[C/T]CGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTC

Για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου του MTHFR που φέρει τον πολυμορφισμό rs1801133 σχεδιάσαμε πρόσθιο και αντίστροφο εκκινητή με τις παρακάτω αλληλουχίες:

	Αλληλουχία αναγνώρισης
Πρόσθιος εκκινητής	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA- 3'
Αντίστροφος εκκινητής	5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG- 3'

Πραγματοποιήσαμε την PCR σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf, χρησιμοποιώντας το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση της Thermo-Fisher Scientific σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Αντιδραστήρια – Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
10X ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς MgCl ₂	1X
50 mM MgCl ₂	1.5 mM
10 mM dNTPs διάλυμα	0.2 mM
10μM Πρόσθιος εκκινητής	0.5 μM
10μM Αντίστροφος εκκινητής	0.5 μM
Taq DNA πολυμεράση (5U/μL)	1 U
δισ-απεσταγμένο νερό	X (έως 50 μl τελικό όγκο)
Δείγμα (γενομικό DNA)	1-500 ng

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR ακολουθούν παρακάτω:

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (mins)	Κύκλοι
95	2	1
95	1	40
62	1	
72	1	
72	10	1
4	-	-

Τέλος, για τον έλεγχο του γονότυπου των ασθενών για τον πολυμορφισμό rs1801133 πραγματοποιήσαμε πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο HinfI (10.000 units, New England Biolabs), το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία:

5'...G/ANTC...3'

3'...CTNA/G...5'

Η επώαση των PCR προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο HinfI έγινε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C για 18 ώρες, σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

HinfI	10 units
DNA	1 µg
10X ρυθμιστικό διάλυμα	3 µl (1X)
Τελικός όγκος	30 µl

Ανοσοϊστοχημεία.

Με τη χρήση μικροτόμου παρασκευάστηκαν αντιπροσωπευτικές τομές πάχους 4μm από το κάθε κύβο παραφίνης, οι οποίες καθηλώθηκαν σε ηλεκτροστατικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60°C όλη τη νύχτα. Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα:

Πρωτοταγές Αντίσωμα	Κλώνος	Αραίωση	Ισότυπος Ανοσοσφαιρίνης	Εταιρεία	Κωδικός
MLH1	168-15	1:25	IgG ₁	BD Pharmingen	550838
PMS2	A16-4	1:100	IgG ₁ , κ	BD Pharmingen	556415

Η ανοσοϊστοχημική χρώση των προαναφερθέντων αντισωμάτων έγινε σε αυτοματοποιημένο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας (Bond Max Automated Immunohistochemistry Vision Biosystem (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τα MLH1 (κλώνος 168-15) και PMS2 (κλώνος A16-4) αντισώματα.

1. Αποπαραφίνωση των τομών.
2. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών (100%, 96%, 80%). Οι τομές παραμένουν αρχικά για 5 λεπτά σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (100%) (x 2 φορές), 2 λεπτά στα υπόλοιπα διαλύματα της αιθυλικής αλκοόλης και 5 λεπτά σε απεσταγμένο νερό.
3. Ανάκτηση αντιγόνου με θερμική επεξεργασία του ιστού σε διάλυμα ανάκτησης (Epitope Retrieval Solution 2 -EDTA-buffer pH=8.8) για 20 λεπτά στους 98°C.
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 2 λεπτά.
5. Κατανάλωση ενδογενούς υπεροξειδάσης με τη χρήση του κιτ ανίχνευσης πολυμερών προσμίξεων Bond Polymer Refine Detection Kit DC9800 (Leica Microsystems GmbH) για 10 λεπτά.
6. Έκπλυση των τομών με TBST pH=8,4 για 5 λεπτά (x 2 φορές).
7. Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Έκπλυση των τομών με TBST pH=8,4 για 2 λεπτά (x 3 φορές).

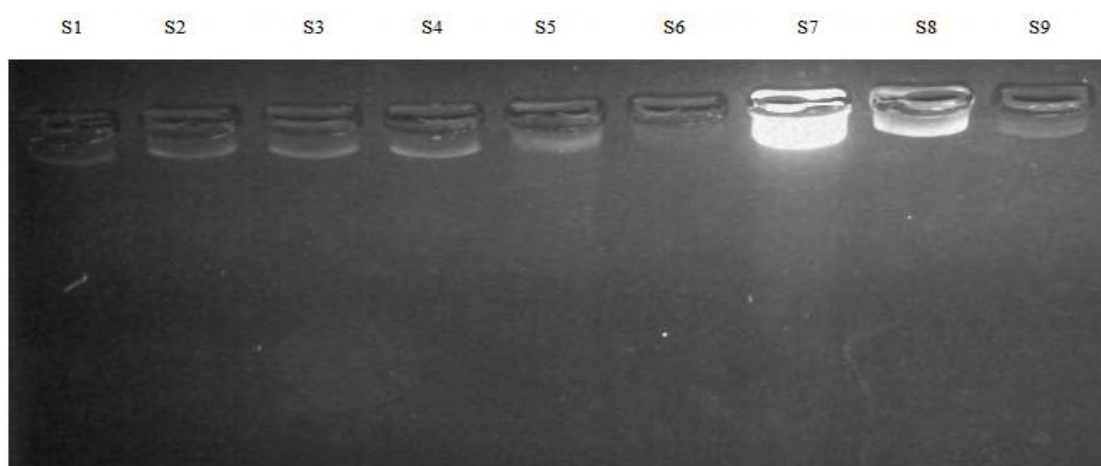
9. Επώαση για 10 λεπτά με το πολυμερές
10. Έκπλυση των τομών για 2 λεπτά (x 3 φορές) με διάλυμα TBST pH=8,4.
11. Η ανίχνευση των περιοχών δραστηκής υπεροξειδάσης πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε διάλυμα Tris υπεροξειδίου του υδρογόνου και τετραϋδροχλωρικής 3,3 – διαμινοβενζιδίνης (DAB) για 10 λεπτά. Το χρωμογόνο DAB δίνει ένα καφέ παράγωγο ανθεκτικό στην αλκοόλη και την ξυλόλη.
12. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό
13. Χρώση με αιματοξυλίνη για 5 λεπτά.
14. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
15. Αφυδάτωση του ιστού σε ανιούσα αλκοολών (80⁰, 96⁰, 100⁰). Σε κάθε διάλυμα ο ιστός παραμένει για 1 περίπου λεπτό.
16. Διαύγαση των τομών σε ξυλόλη για 5 λεπτά και επικόλληση καλυπτρίδων με χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan Merch, Germany).
17. Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

Στατιστική ανάλυση

Τα πειραματικά και κλινικοεργαστηριακά δεδομένα των ασθενών συλλέχθηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε αρχείο Microsoft Excel. Στη συνέχεια κωδικοποιήθηκαν και εισάχθηκαν στο στατιστικό λογισμικό IBM SPSS v22. Οι μεταβλητές που προέκυψαν, εξετάστηκαν για τις συχνότητες και την κατανομή τους. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις της παρουσίας του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου με την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς και οι πιθανές συσχετίσεις της παρουσίας ή απουσίας μικροδορυφορικής αστάθειας με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Οι συσχετίσεις εξετάστηκαν με τη στατιστική δοκιμασία Pearson's chi square (χ^2). Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p = 0,05$.

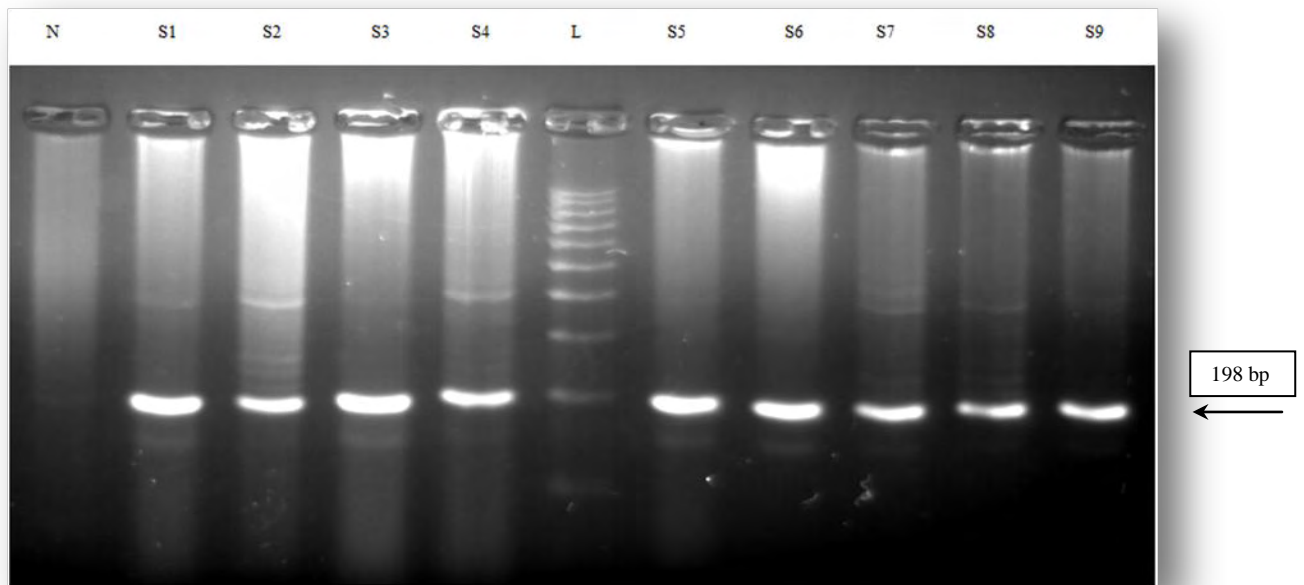
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε την παρουσία του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου, που σηματοδοτεί μία αλλαγή από C→T στη θέση 677, σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Στην έρευνα συμπεριλάβαμε 50 δείγματα ασθενών στους οποίους προσδιορίστηκε η παρουσία ή η απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας. Επιπλέον, έγινε καταγραφή και συσχέτιση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως το φύλο, η ηλικία, το στάδιο και η μέγιστη διάμετρος του όγκου και η παρουσία διήθησης. Έγινε απομόνωση γενομικού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικόνα 11).



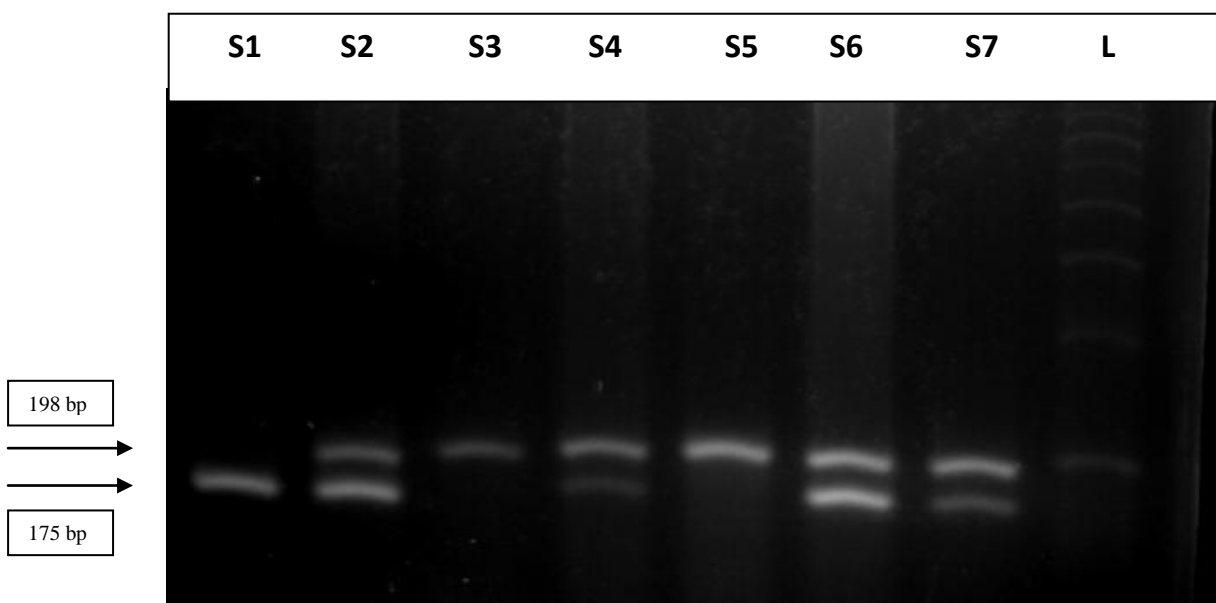
Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση γενομικού DNA σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1%. S1-S9: δείγματα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο.

Μετά την απομόνωση του γενομικού DNA, τον έλεγχο της καθαρότητας και την εκτίμηση της συγκέντρωσής του, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής που φέρει τον πολυμορφισμό rs1801133. Σύμφωνα με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, το τμήμα που ενισχύθηκε και περιλαμβάνει το μελετούμενο πολυμορφισμό έχει μέγεθος 198 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για την ενίσχυση του πολυμορφισμού rs1801133. N: αρνητικός μάρτυρας, S1-S9: δείγματα ασθενών L: 100bp ladder, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (Invitrogen).

Ακολούθησε, στη συνέχεια, επώαση των PCR προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο *HinfI*, που αναγνωρίζει και πέπτει το πολυμορφικό αλληλόμορφο (T) του πολυμορφισμού rs1801133, ενώ το προγονικό αλληλόμορφο (C) παραμένει άπεπτο (198 ζεύγη βάσεων). (Εικόνα 13).



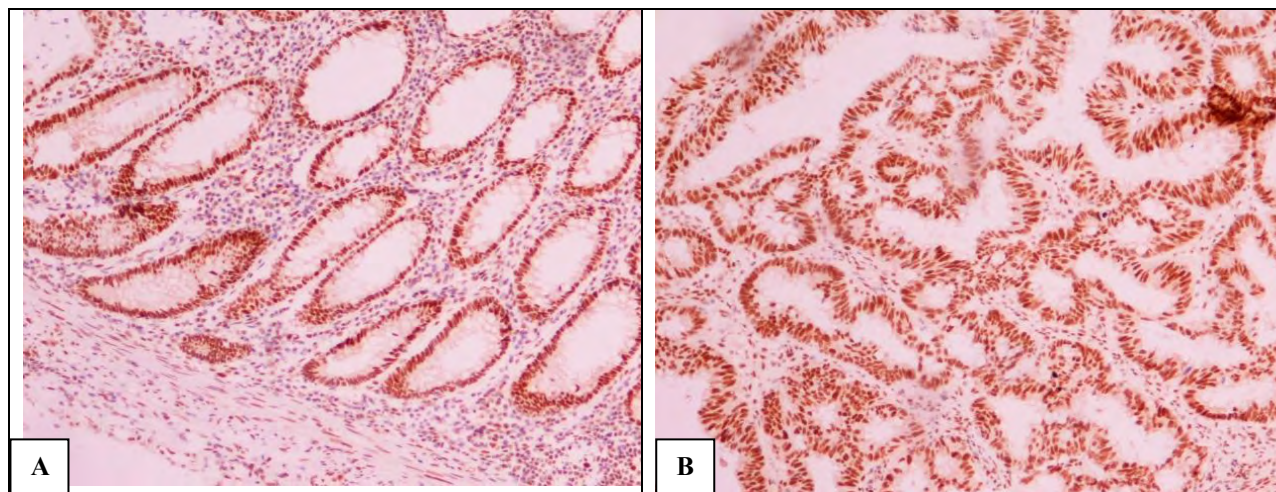
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με το ένζυμο *HinfI* σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 3%. L: 100bp ladder, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (Invitrogen), S3, S5: δείγματα ομόζυγα για τον προγονικό γονότυπο (CC), S2, S4, S6, S7: δείγματα ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό (CT), S1: δείγμα ομόζυγο για τον πολυμορφικό γονότυπο (TT).

Γονότυπος	Κατάσταση αλληλομόρφων γονιδίων	Μέγεθος
CC	Προγονικό σε ομοζυγωτία	198 bp
CT	Ετερόζυγο	198, 175, 23 bp
TT	Πολυμορφικό σε ομοζυγωτία	175, 23 bp

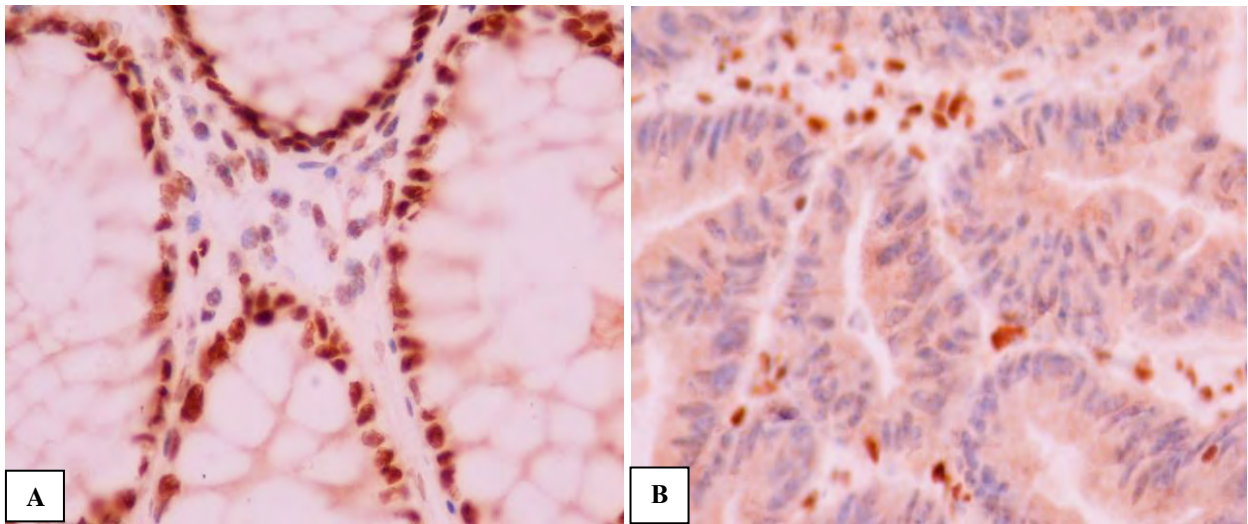
Πίνακας 2. Μεγέθη των προϊόντων πέψης με το ένζυμο HinfI για τον πολυμορφισμό rs1801133.

Ο προγονικός γονότυπος σε ομοζυγωτία (CC) δεν αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο HinfI και ως εκ τούτου δεν πέπτεται δίνοντας προϊόν μήκους 198 ζευγών βάσεων. Το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (TT) πέπτεται εξολοκλήρου από το περιοριστικό ένζυμο δίνοντας δύο ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση, μεγεθών 175 και 23 ζεύγη βάσεων. Τέλος, στην περίπτωση της ετεροζυγωτίας, το ένα αλληλόμορφο είναι το προγονικό και δεν πέπτεται και το άλλο αλληλόμορφο είναι το πολυμορφικό και πέπτεται με αποτέλεσμα κατά την ηλεκτροφόρηση να προκύπτουν 3 διαφορετικές ζώνες με μεγέθη 198, 175 και 23 ζεύγη βάσεων.

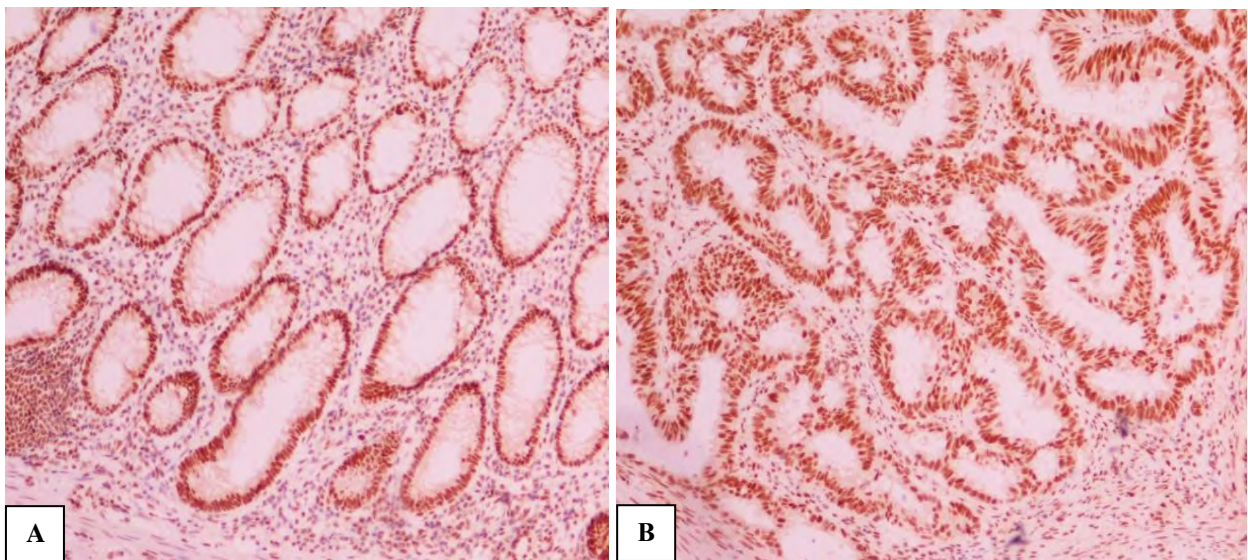
Παράλληλα, ελέγξαμε στα δείγματά μας την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας με ανοσοχρώσεις για τα αντισώματα MLH1 και PMS2 που αποτελούν μέρος του συμπλόκου των ενζύμων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA.



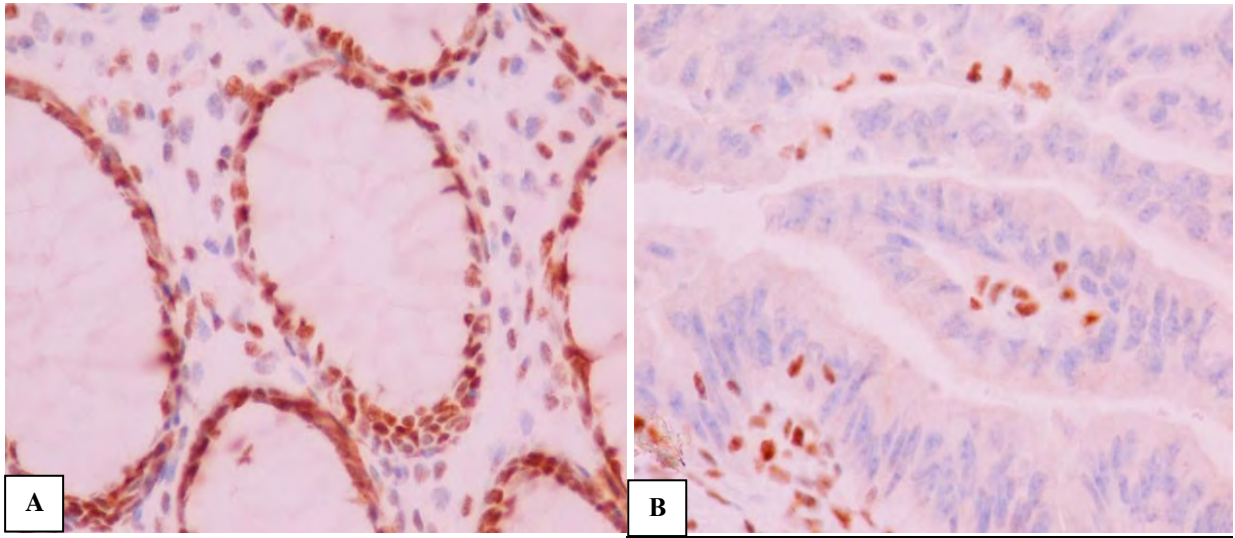
Εικόνα 14. Θετική ανοσοχρώση για το MLH1 σε φυσιολογικό (A) και νεοπλασματικό ιστό (B) ασθενούς με ορθοκολικό καρκίνο. Η παρουσία θετικής πυρηνικής ανοσοχρώσης δηλώνει την απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MS Stable) (x10 μεγέθυνση).



Εικόνα 15. Θετική ανοσοχρώση για το MLH1 σε φυσιολογικό ιστό (A). Απουσία πυρηνικής χρώσης στον νεοπλασματικό ιστό ασθενούς με ορθοκολικό καρκίνο (B). Η απουσία θετικής πυρηνικής ανοσοχρώσης δηλώνει την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MS Unstable) (x40 μεγέθυνση).



Εικόνα 16. Θετική ανοσοχρώση για το PMS2 σε φυσιολογικό (A) και νεοπλασματικό ιστό (B) ασθενούς με ορθοκολικό καρκίνο. Η παρουσία θετικής πυρηνικής ανοσοχρώσης δηλώνει την απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MS Stable) (x10 μεγέθυνση).

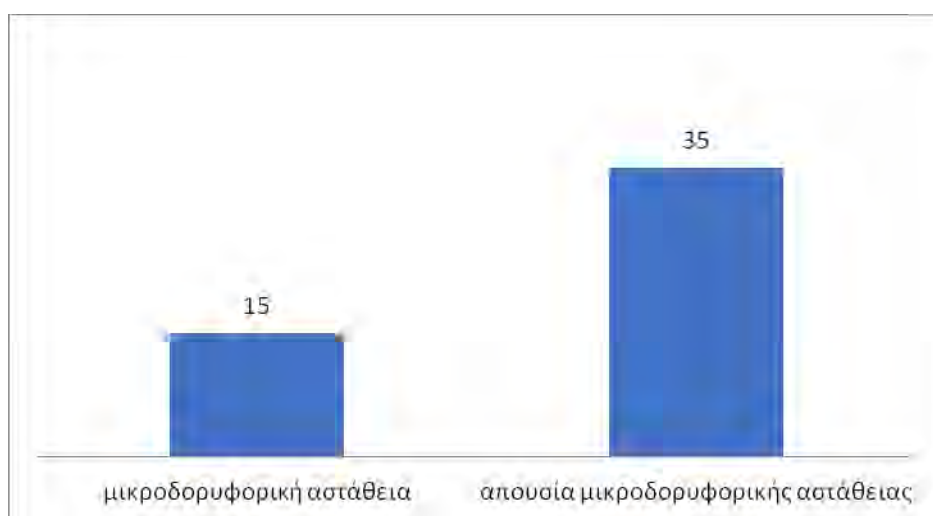


Εικόνα 17. Θετική ανοσοχρώση για το PMS2 σε φυσιολογικό ιστό (A). Απουσία πυρηνικής χρώσης στον νεοπλασματικό ιστό (B) ασθενούς με ορθοκολικό καρκίνο. Η απουσία θετικής πυρηνικής ανοσοχρώσης δηλώνει την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MS Unstable) (x40 μεγέθυνση).

Στατιστική ανάλυση

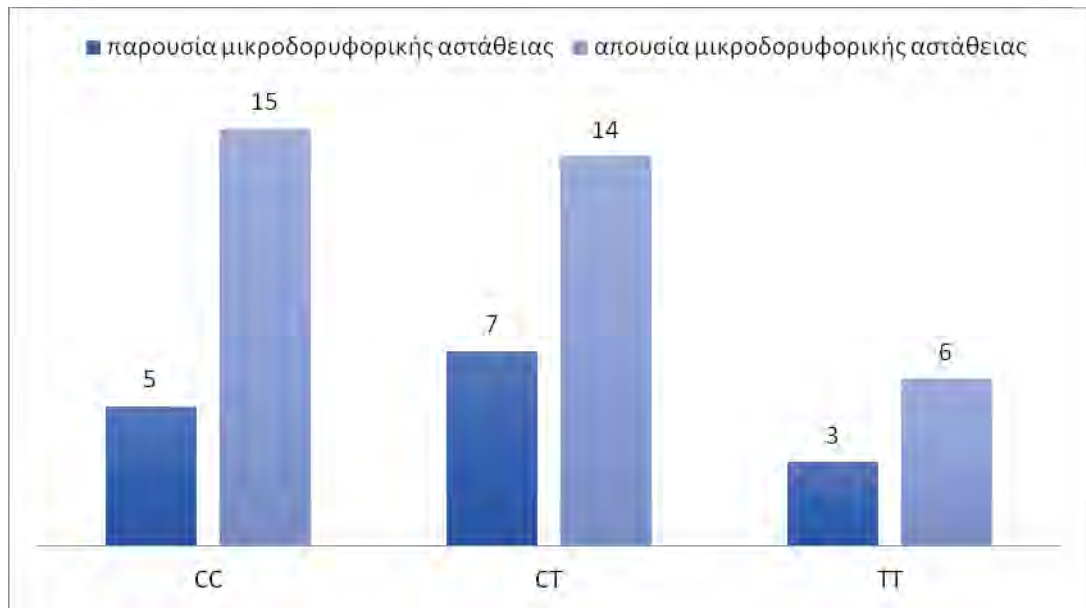
Ολοκληρώνοντας το πειραματικό μέρος της εργασίας συγκεντρώσαμε τα αποτελέσματά μας και τα καταγράψαμε σε ένα αρχείο προσθέτοντας πληροφορίες σχετικά με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως το φύλο και την ηλικία των ασθενών, το στάδιο, τη μέγιστη διάμετρο του όγκου και την παρουσία διήθησης.

Στην έρευνα συμμετείχαν 50 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο. Εξετάζοντας την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας, είδαμε ότι 15/50 ασθενείς (30%) είχαν μικροδορυφορική αστάθεια και 35/50 (70%) από αυτούς δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια (Διάγραμμα 1).

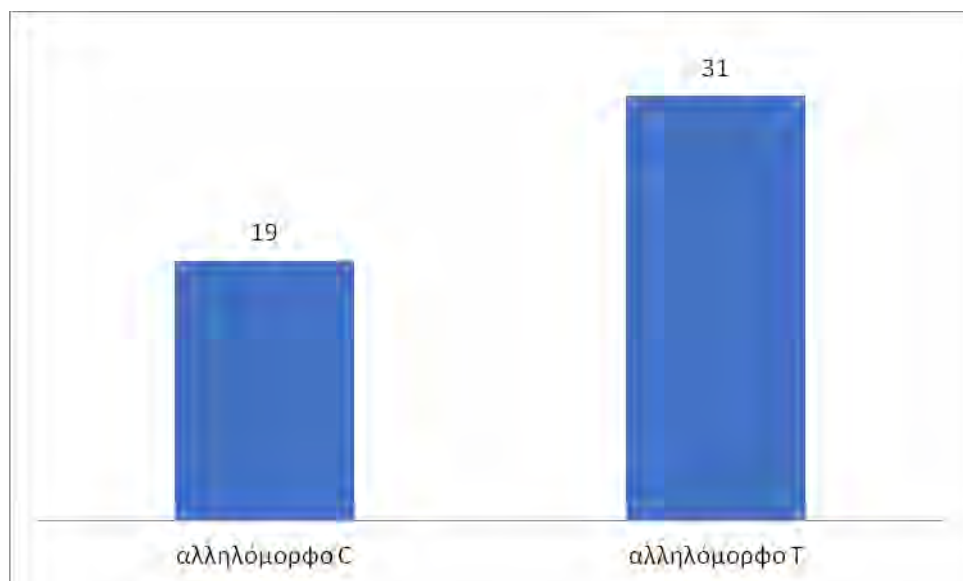


Διάγραμμα 1. Η κατανομή συχνότητας των ασθενών της μελέτης με παρουσία και απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας.

Στη μελέτη μας, 20/50 ασθενείς (40%) έφεραν σε ομοζυγωτία το προγονικό αλληλόμορφο (CC), 9/50 (18%) έφεραν σε ομοζυγωτία το πολυμορφικό αλληλόμορφο (TT) και 21/50 ασθενείς (42%) έφεραν τον γονότυπο CT (ετεροζυγωτία). Η κατανομή των γονότυπων του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου σε συνάρτηση με την παρουσία/ απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας απεικονίζεται στο διάγραμμα 2, ενώ η παρουσία του πολυμορφικού αλληλόμορφου στα δείγματά μας απεικονίζεται στο διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 2. Η κατανομή των γονοτύπων των ασθενών παρουσία και απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας.



Διάγραμμα 3. Η παρουσία του προγονικού και του πολυμορφικού αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs1801133 στους ασθενείς της μελέτης.

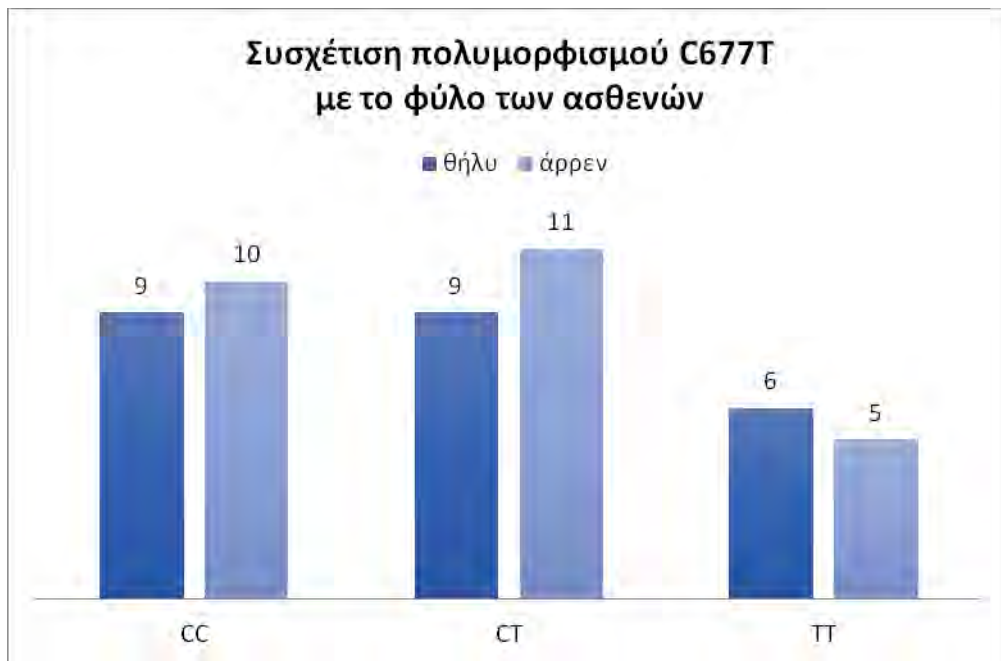
Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 2, ο ετερόζυγος γονότυπος είναι οριακά ο συχνότερος στον πληθυσμό που μελετήσαμε, ενώ αυξημένα είναι και τα περιστατικά που φέρουν τον προγονικό και πολυμορφικό γονότυπο αντίστοιχα. Η κατανομή αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι ιδιαίτερα συχνός στον Ελληνικό πληθυσμό. Αυτό αποδεικνύει και η κατανομή του διαγράμματος 3, όπου φαίνεται πως η παρουσία του

πολυμορφικού αλληλόμορφου T σε ετερόζυγη ή ομόζυγη μορφή είναι 1,5 φορά μεγαλύτερη από το προγονικό αλληλόμορφο C.

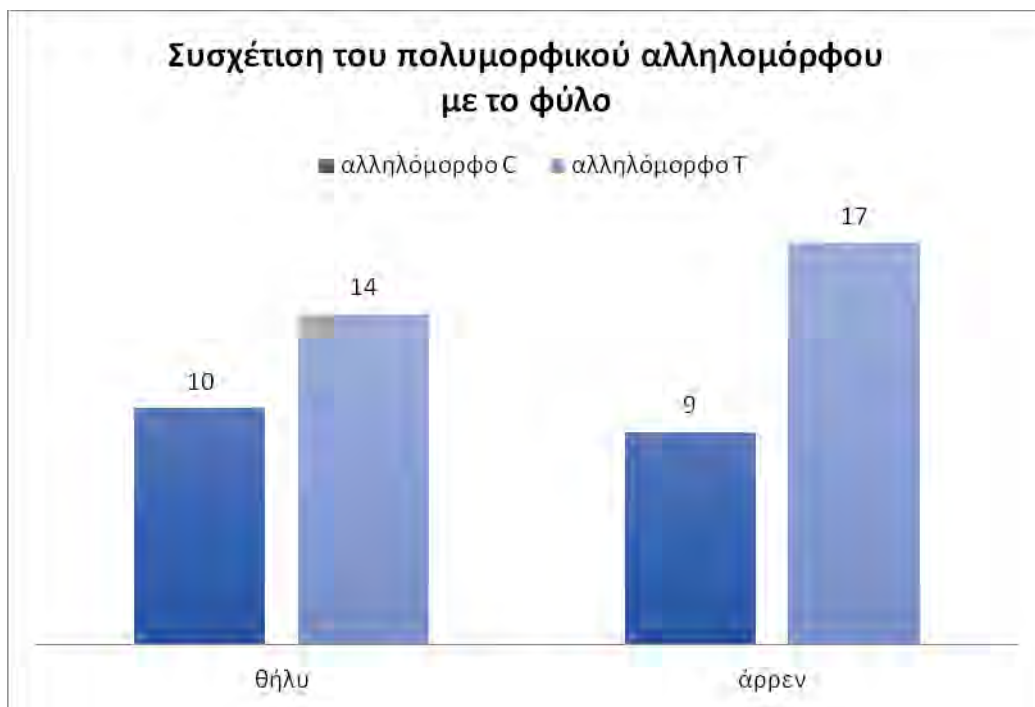
Στη συνέχεια εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση της παρουσίας μικροδορυφορικής αστάθειας στους ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο και του γονοτύπου του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου, καθώς και την πιθανή συσχέτιση της ύπαρξης μικροδορυφορικής αστάθειας και της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου (CT, TT) στους ασθενείς της μελέτης μας. Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε είναι η Pearson's chi square (χ^2) για κατηγοριοποιημένες μεταβλητές. Οι δύο συσχετίσεις που εξετάστηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$), γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση σχετικά με την κατανομή του πολυμορφισμού και την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας.

Κατόπιν, ελέγξαμε τις πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου και των κλινικών παραμέτρων των ασθενών μας. Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η παράμετρος του φύλου. Στη μελέτη συμμετείχαν 24 γυναίκες και 26 άνδρες. Από αυτούς σε 9/24 γυναίκες (37,5%) έφεραν το γονότυπο CC, 9/24 (37,5%) έφεραν το γονότυπο CT, ενώ 6/24 (25%) έφεραν το γονότυπο TT. Στους άνδρες, 10/26 ασθενείς (38,5%) έφεραν το γονότυπο CC, 11/26 (42,3%) έφεραν το γονότυπο CT και 5/26 (19,2%) έφεραν το γονότυπο TT. Η συσχέτιση αυτή δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 4).

Αντίστοιχα, όταν εξετάσαμε την κατανομή των αλληλόμορφων C και T στο φύλο των ασθενών, παρατηρήσαμε ότι 10/24 γυναίκες έφεραν το αλληλόμορφο C (41,7%) και 14/24 έφεραν το αλληλόμορφο T (58,3%). Στους άνδρες, 9/26 άνδρες (34,6%) έφεραν το αλληλόμορφο C και 17/26 (65,4%) έφεραν το αλληλόμορφο T. Η συσχέτιση αυτή δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 5).

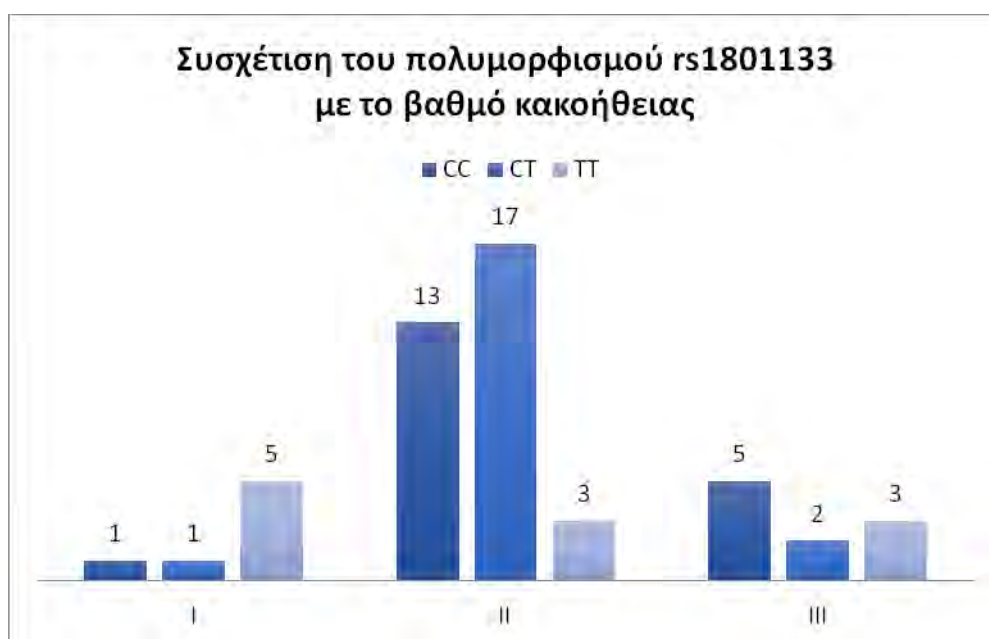


Διάγραμμα 4. Η κατανομή των γονότυπων του πολυμορφισμού C677T και η συσχέτισή τους με το φύλο των ασθενών.



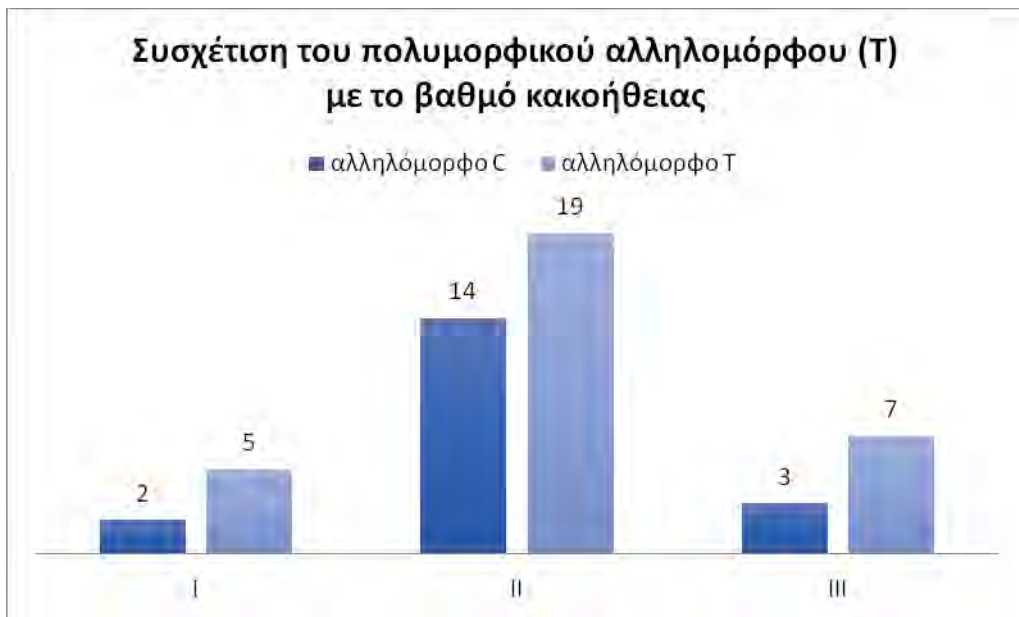
Διάγραμμα 5. Κατανομή του πολυμορφικού αλληλομόρφου (T) στα δύο φύλα.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου με τον βαθμό κακοήθειας του όγκου των ασθενών. Από τους ασθενείς με βαθμό κακοήθειας I 1/19 ασθενείς (5,3%) έχουν γονότυπο CC, 1/20 ασθενείς (5%) είχαν γονότυπο CT και 3/11 (45,45%) είχαν γονότυπο TT. Από τους ασθενείς με βαθμό κακοήθειας II, 13/19 ασθενείς (68,4%) είχαν γονότυπο CC, 17/20 ασθενείς (85%) είχαν γονότυπο CT και 3/11 (27,3%) είχαν γονότυπο TT. Τέλος, από τους ασθενείς με βαθμό κακοήθειας III, 5/19 ασθενείς είχαν γονότυπο CC, 2/20 ασθενείς (10%) είχαν γονότυπο CT και 3/11 ασθενείς (27,27%) είχαν γονότυπο TT. Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801133 με το βαθμό κακοήθειας.

Όταν εξετάσαμε την κατανομή των αλληλομόρφων C και T στα τρία στάδια του όγκου παρατηρήσαμε ότι από τους ασθενείς με το αλληλόμορφο C, 2/19 (10,5%) είχαν βαθμό κακοήθειας I, 14/19 ασθενείς (73,7%) είχαν βαθμό κακοήθειας II και 3/19 (15,8%) είχαν βαθμό κακοήθειας III. Από τους ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο T σε ετερόζυγη ή ομόζυγη μορφή, 5/31 (16,1%) είχαν βαθμό κακοήθειας I, 19/31 (61,3%) είχαν βαθμό κακοήθειας II και 7/31 (22,6%) είχαν βαθμό κακοήθειας III. Η συσχέτιση που προέκυψε επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 7).



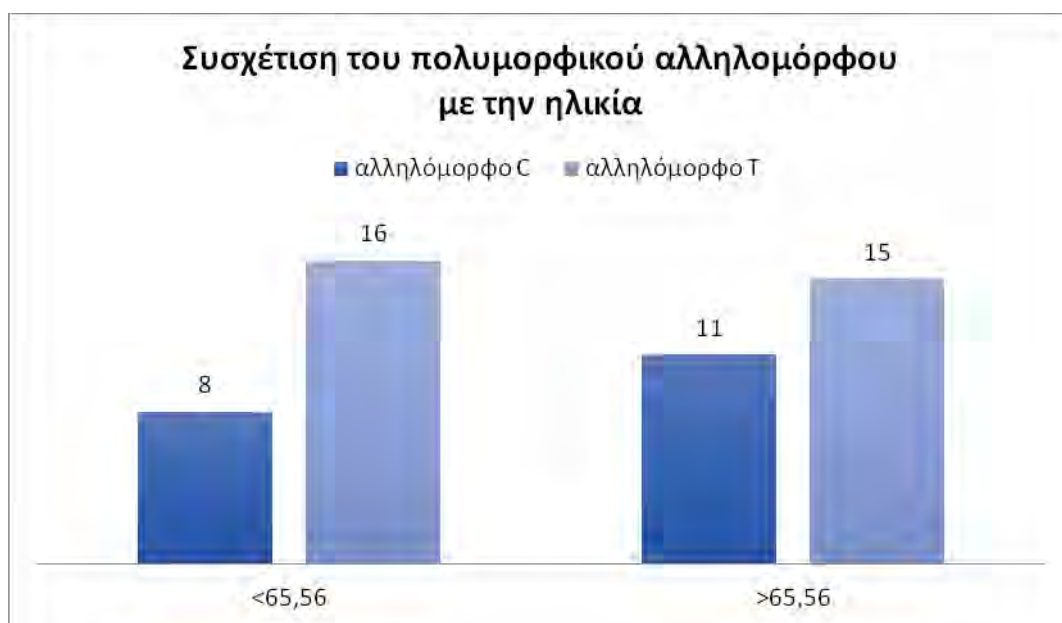
Διάγραμμα 7. Συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου με το βαθμό κακοήθειας.

Στη συνέχεια εξετάσαμε την παρουσία διήθησης στους ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο και την πιθανή της συσχέτιση με τον πολυμορφισμό rs1801133 του MTHFR γονιδίου. Στους ασθενείς με γονότυπο CC, 7/19 (36,8%) δεν είχαν διήθηση, ενώ 12/19 (63,2%) είχαν διαγνωστεί με διηθητικό καρκίνωμα. Στους ασθενείς με γονότυπο CT, 4/20 (20%) δεν εμφάνιζαν διήθηση, ενώ 16/20 (80%) είχαν διηθητικό καρκίνωμα. Τέλος, στους ασθενείς με γονότυπο TT, 1/11 (9%) δεν εμφάνιζαν διήθηση, ενώ 10/11 (91%) είχαν διηθητικό καρκίνωμα. Η συσχέτιση που προέκυψε δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8. Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την παρουσία διήθησης.

Κατόπιν, συγκρίναμε την παρουσία του πολυμορφισμού C677T με την ηλικία των ασθενών μας. Οι ηλικίες των ασθενών κυμαίνονταν από 37 έως 85 έτη με διάμεσο 65,56 έτη ($\pm 12,48$). Οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες. Η μία περιλαμβάνει τους ασθενείς με ηλικία μικρότερη από 65,56 έτη και η άλλη ηλικιακή ομάδα εκείνους με ηλικία μεγαλύτερη από 65,56 έτη. Εξετάζοντας την κατανομή των αλληλόμορφων C και T στις δύο ηλικιακές ομάδες, διαπιστώσαμε ότι στους ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο C, οι 8/19 (42,1%) ανήκουν στη μικρότερη ηλικιακή ομάδα, ενώ οι 11/19 (57,9%) στη μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα. Από τους ασθενείς με το αλληλόμορφο T σε ομο- ή ετεροζυγωτία, οι 16/31 (51,6%) ανήκουν στη μικρότερη ηλικιακή ομάδα, ενώ οι 15/31 (48,4%) ανήκουν στη μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα. Δεν αναδείχθηκε και πάλι στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Διάγραμμα 9).

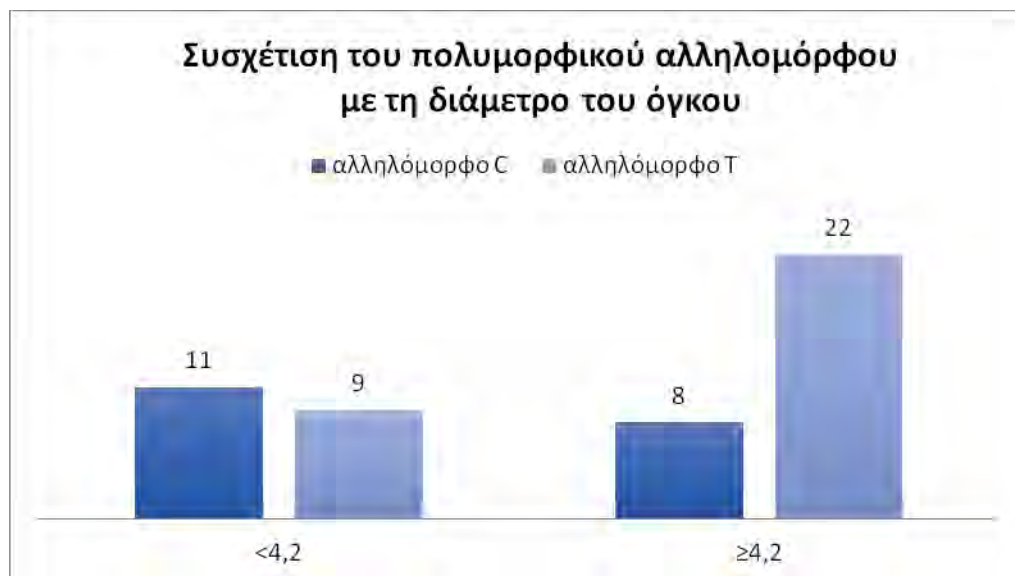


Διάγραμμα 9. Συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου με την ηλικία των ασθενών.

Τέλος, συσχετίσαμε την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου (T) με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου των ασθενών. Το εύρος τιμών για τη μέγιστη διάμετρο του όγκου κυμάνθηκε από 2 έως 7,5 εκατοστά με διάμεσο τιμή 4,2 εκ ($\pm 1,4$). Σύμφωνα με τη διάμεσο των τιμών, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συμπεριλάβαμε τους ασθενείς με μέγιστη διάμετρο όγκου μικρότερη από 4,2 εκατοστά και στη δεύτερη ομάδα εντάξαμε τους ασθενείς με μέγιστη διάμετρο του όγκου ίση ή μεγαλύτερη από 4,2 εκατοστά.

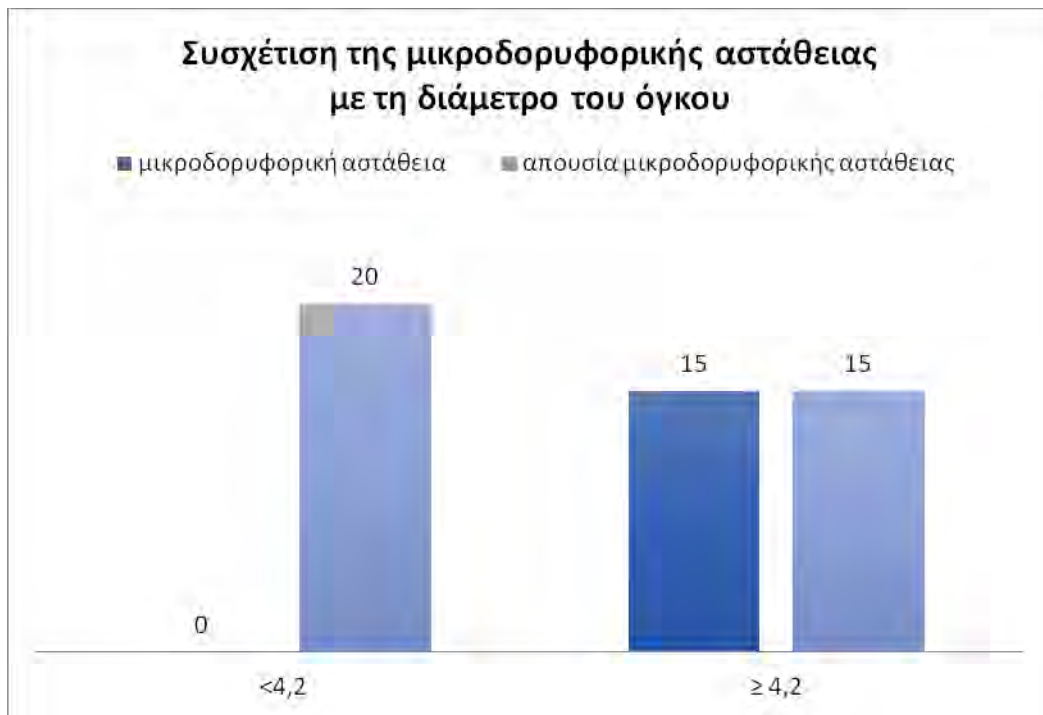
Εξετάζοντας την παρουσία των αλληλόμορφων C και T στις δύο ομάδες που προέκυψαν, διαπιστώσαμε ότι στους ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο C, 11/19 (57,9%) είχαν μέγιστη διάμετρο όγκου μικρότερη από 4,2 εκατοστά, ενώ 8/19 (42,1%) είχαν μέγιστη διάμετρο όγκου μεγαλύτερη ή ίση από 4,2 εκατοστά. Αντιθέτως, στους ασθενείς με το αλληλόμορφο T σε ομο- ή

ετεροζυγωτία, 9/31 (29%) είχαν μέγιστη διάμετρο όγκου μικρότερη από 4,2 εκατοστά, ενώ 22/31 (71%) είχαν μέγιστη διάμετρο όγκου μεγαλύτερη ή ίση από 4,2 εκατοστά. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0.043$) (Διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 10. Συσχέτισης της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την παράμετρο της μικροδορυφορικής αστάθειας με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου στους ασθενείς της μελέτης μας. Από τους ασθενείς που ανήκαν στην ομάδα μέγιστης διαμέτρου μικρότερης από 4,2 εκ 0/15 (0%) διαγνώστηκαν με μικροδορυφορική αστάθεια και 20/35 (57,1%) είχαν απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας. Αντίστοιχα, από τους ασθενείς που ανήκαν στην ομάδα με μέγιστη διάμετρο όγκου μεγαλύτερη ή ίση από 4,2 εκ, 15/15 (100%) διαγνώστηκαν με μικροδορυφορική αστάθεια και 15/35 (42,9%) δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, η συγκεκριμένη συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική ($p= 0.007$) (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11. Κατανομή της παρουσίας και απουσίας μικροδορυφορικής αστάθειας σε σχέση με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου.

Τέλος, εξετάσαμε την εντόπιση του όγκου και την πιθανή συσχέτισή του με την παρουσία/απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς και με την παρουσία των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου. Όσον αφορά στην πρώτη συσχέτιση, δεξιά εντόπιση του όγκου είχαν 9/15 ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια (60%) και 16/35 ασθενείς χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια (45,7%). Από τους ασθενείς με αριστερή εντόπιση του όγκου 6/15 ασθενείς διαγνώστηκαν με μικροδορυφορική αστάθεια (40%) και 19/35 ασθενείς είχαν απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (54,3%). Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Όσον αφορά στη δεύτερη συσχέτιση, από τους ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο C, 8/19 ασθενείς (42,1%) εμφάνιζαν δεξιά εντόπιση του όγκου και 11/19 ασθενείς (57,9%) εμφάνιζαν αριστερή εντόπιση του όγκου. Από τους ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο T σε ομο- ή ετεροζυγωτία, 22/31 ασθενείς (71,0%) είχαν δεξιά εντόπιση του όγκου και 9/31 ασθενείς (29,0%) είχαν αριστερή εντόπιση του όγκου (Διάγραμμα 12). Η συσχέτιση που προέκυψε ήταν στατιστικά σημαντική ($p= 0.043$).



Διάγραμμα 12. Συσχέτιση των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού C677T του MTHFR γονιδίου με την εντόπιση του όγκου.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ο συχνότερος καρκίνος στην Ευρώπη και ο τρίτος σε συχνότητα παγκοσμίως. Παρατηρείται σε μεγαλύτερη συχνότητα στις βιομηχανικές και αστικές περιοχές και έχει συνδεθεί με τις διατροφικές συνήθειες και τον δυτικό τρόπο ζωής [89]. Ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο και την αιτιολογία της νόσου ο ορθοκολικός καρκίνος κατηγοριοποιείται σε τρεις μορφές: τη σποραδική, την κληρονομική ή την οικογενή. Ο σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου αφορά στο 70% του συνόλου των περιπτώσεων και εμφανίζεται σε ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών, πιθανώς ως αποτέλεσμα διατροφικών και περιβαλλοντικών παραγόντων και της γήρανσης [90].

Πρόκειται για μία πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική νόσο. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων με ορθοκολικό καρκίνο αναπτύσσεται από καλοήθεις προνεοπλασματικές βλάβες, τους αδενωμάτωδεις πολύποδες ή τα αδενώματα. Το μοντέλο της πολυσταδιακής καρκινογένεσης, που προτάθηκε από τον Vogelstein, περιγράφει την εξέλιξη ενός καλοήθους αδενώματος σε κακόηθες νεόπλασμα μέσω καλά καθορισμένων ιστολογικών σταδίων. Κατά την εξέλιξη αυτή, πλήθος γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, που συμβαίνουν σε συγκεκριμένα γονίδια, είναι καθοριστικές για την ενεργοποίηση κύριων σηματοδοτικών καρκινογενετικών μονοπατιών. Ο ορθοκολικός καρκίνος φαίνεται να είναι αποτέλεσμα ενός ή συνδυασμού τεσσάρων διαφορετικών μηχανισμών, της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN), της καθολικής υπομεθυλίωσης του DNA, του φαινοτύπου μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP) και της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).

Τελευταία, η έρευνα των μοριακών και επιδημιολογικών μελετών επικεντρώνεται στο ρόλο των πολυμορφισμών (SNPs) στον κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Το γονίδιο MTHFR κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με ενζυμικό ρόλο στο μεταβολισμό του φολικού οξέος. Η ανεπάρκεια του φολικού οξέος αυξάνει τον κίνδυνο καρκινογένεσης τόσο μέσω διαταραχής της μεθυλίωσης του DNA, που μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όσο και μέσω διαταραχών των πρόδρομων νουκλεοτιδικών μορίων, γεγονός που οδηγεί σε μεταλλάξεις και θραύσματα στη διπλή έλικα του DNA και διαταράσσει την ακεραιότητα του DNA [64].

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει το ρόλο των πολυμορφισμών rs1801133 (C677T) και rs1801131 (A1298C) του MTHFR γονιδίου στον ορθοκολικό καρκίνο. Η πλειοψηφία αυτών υποστηρίζει την πιθανή συσχέτιση του rs1801133 πολυμορφισμού με τον κίνδυνο εμφάνισης του ορθοκολικού καρκίνου, ωστόσο τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Ο rs1801133 πολυμορφισμός επηρεάζει τη σταθερότητα και την ενεργότητα της MTHFR πρωτεΐνης και υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται στη μεθυλίωση και συνεπώς συνδέεται με το

μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας [91]. Σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης, συμπεριλήφθηκαν 13 μελέτες για το ρόλο του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στον ορθοκολικό καρκίνο. Οι 8 μελέτες ήταν σημαντικές και οι 5 μη σημαντικές για τον C677T (rs1801133) πολυμορφισμό (Πίνακας 3), [92].

Gastrointestinal and digestive system cancers	Study groups	Geographical region	MTHFR	
			C677T	
			Significant	Non-significant
Colon cancer	Prompthet et al. [76]	Thailand (Khon Kaen)	✓	
	Haghighi et al. [77]	Iran (Tehran)	✓	
	Levine et al. [78]	USA (L. Angeles)	✓	
	El Awady et al. [79]	Egypt (Cairo)	✓	
	Osian et al. [80]	Romania (Cluj-Napoca)	✓	
	Chang et al. [81]	Taiwan (Taipei)		✓
	Zeybek et al. [60]	Turkey (Istanbul)		✓
	Cao et al. [82]	China (Nanjing)		✓
	Wang et al. [83]	Japan (Nagoya)		✓
	Iacopetta et al. [84]	Australia	✓	
	Prasad et al. [21]	(The Netherlands)	✓	
	Komlós et al. [85]	India (Hyderabad)	✓	
	Derwinger et al. [86]	Sweden (Göteborg)		✓

Πίνακας 3. Ο ρόλος του πολυμορφισμού C677T στον ορθοκολικό καρκίνο (Izmirlı A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk, Mol Biol Rep. 2013 Jan;40(1):625-37).

Στην παρούσα εργασία συμπεριλάβαμε 50 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο. Οι ασθενείς εξετάστηκαν για την παρουσία/ απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας και παράλληλα ελέγχθηκαν για τον πολυμορφισμό C677T (rs1801133), δεδομένου ότι τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, σχετικά με το ρόλο του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, είναι αντικρουόμενα, ενώ παράλληλα παρατηρείται μεγάλη γεωγραφική και φυλετική ετερογένεια. Μελετήσαμε 50 ασθενείς συνολικά και η συχνότητα των γονοτύπων του MTHFR γονιδίου ήταν ανάλογη της συχνότητας που έχει καταγραφεί στον ελληνικό πληθυσμό [93]. Στους ασθενείς μας 24 ήταν θήλεα και 26 άρρενα άτομα. Οι γονότυποι CC, CT και TT κατανεμήθηκαν ομοιόμορφα και στα δύο φύλα και δεν αναδείχθηκε κάποια συσχέτιση.

Εξετάζοντας την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801133 του MTHFR γονιδίου με τον βαθμό κακοήθειας του όγκου των ασθενών, παρατηρήσαμε ότι η πλειοψηφία των ασθενών μας είχαν στην πλειοψηφία τους καρκίνωμα σταδίου II, ωστόσο δεν αναδείχθηκε συσχέτιση του βαθμού κακοήθειας και συγκεκριμένου γονοτύπου ή της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου (T).

Οι ηλικίες των ασθενών της μελέτης μας κυμαίνονταν από 37 έως 85 έτη με διάμεσο τιμή 65,56 έτη ($\pm 12,48$), έτσι κατανεμήθηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες, κάτω των 65,56 ετών (α΄ ηλικιακή ομάδα) και πάνω από 65,56 έτη (β΄ ηλικιακή ομάδα). Στην α΄ ηλικιακή ομάδα, φαίνονται να υπερισχύουν ελαφρώς οι ασθενείς που φέρουν το πολυμορφικό αλληλόμορφο (T) σε ομο- ή ετεροζυγωτία (52%), έναντι των ασθενών της β΄ ηλικιακής ομάδας που φέρουν το (T) αλληλόμορφο (48%). Ωστόσο, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Τέλος, μια άλλη παράμετρος που συσχετίστηκε τόσο με την παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου (T), όσο και με την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας ήταν η μέγιστη διαμετρος του όγκου. Με βάση τις ιστολογικές εκθέσεις των ασθενών που μελετήσαμε, η μέγιστη διάμετρος του όγκου κυμάνθηκε από 2 έως 7,5 εκατοστά με διάμεσο τιμή 4,2 εκ ($\pm 1,4$). Οι ασθενείς μας ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες με βάση τη διάμετρο του όγκου. Εξετάζοντας την κατανομή των αλληλομόρφων του rs1801133 πολυμορφισμού στις δύο ομάδες παρατηρήσαμε ότι η πλειοψηφία των ασθενών (71%) που έφεραν το T πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομο- ή ετεροζυγωτία είχαν μέγιστη διάμετρο όγκου ίση ή μεγαλύτερη των 4,2 εκατοστών. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0.043$).

Παράλληλα, στατιστικά σημαντική συσχέτιση προέκυψε μεταξύ της διαμέτρου του όγκου και της μικροδορυφορικής αστάθειας. Πιο συγκεκριμένα, κανένας ασθενής με μέγιστη διάμετρο του όγκου μικρότερη από 4,2 εκατοστά δεν εμφάνισε μικροδορυφορική αστάθεια ($p= 0.007$). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζεται με μεγαλύτερου μεγέθους καρκινώματα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με ανάλογες μελέτες στη βιβλιογραφία που υποστηρίζουν ότι η μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζεται με μεγάλο μεγέθους όγκου [94, 95].

Συνοψίζοντας, είδαμε στο σύνολο των 50 ασθενών που εξετάσαμε ότι αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο της παρουσίας του πολυμορφικού αλληλομόρφου (T) του MTHFR γονιδίου, όσο και της παρουσίας της μικροδορυφορικής αστάθειας με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου. Κανένας ασθενής με διάμετρο όγκου μικρότερη από 4,2 εκατοστά δεν παρουσιάζει μικροδορυφορική αστάθεια. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα 2/3 των ασθενών με διάμετρο όγκου ίση ή μεγαλύτερη από 4,2 εκατοστά φέρουν το πολυμορφικό αλληλόμορφο (T) σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία υποδηλώνουν την πιθανή συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού (CT, TT) σε όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη μελέτη του Shannon και των συνεργατών του [96] που έδειξαν ότι η παρουσία του πολυμορφικού (T) αλληλομόρφου δεν σχετίζεται με παραμέτρους όπως το φύλο, το στάδιο και η θέση του όγκου, αλλά παρατήρησαν μια τάση του γονότυπου TT να απεικονίζεται συχνότερα σε ασθενείς με καρκίνωμα σταδίου II, καθώς επίσης και σε ασθενείς με MSI+ όγκους. Οι ίδιοι έδειξαν ότι ο CRC σε άτομα με TT γονότυπο του MTHFR γονιδίου είναι πιο πιθανό να αναπτυχθεί κατά μήκος της οδού MSI+ της

καρκινογένεσης. Δεδομένου ότι η πλειονότητα των σποραδικών όγκων MSI+ προκύπτουν από τη μεθυλίωση του hMLH1 γονιδίου, ενδεχομένως η συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου TT και του MSI+ ενδέχεται να ανατανακλά την αλλοιωμένης μεθυλίωση του DNA, που σχετίζεται με διαταραχές στο μεταβολισμό του φολικού οξέος.

Σε ανάλογα ευρήματα έχουν καταλήξει οι μελέτες των [97, 98, 99] που υποστηρίζουν ότι οι MTHFR 677 CT, TT γονότυποι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης MSI+ όγκων.

Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας δεν καθιστά ασφαλή τη στατιστική ανάλυση και απαιτείται ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών καθώς και συσχέτιση με τις διατροφικές συνήθειες και την εκτίμηση των επιπέδων του φολικού οξέος, δεδομένου ότι αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η ανεπάρκεια του φολικού οξέος στις μεγαλύτερες ηλικίες σε συνδυασμό με την παρουσία του πολυμορφισμού C677T ευθύνονται για διαταραχές στη σύνθεση του DNA και στη μεθυλίωσή του και κατ' επέκταση ενεργοποιούν καρκινογενετικά μονοπάτια.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΕΠΟΕ (Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων- Ογκολόγων Ελλάδας). Κλινική Ογκολογία 2007. Γενικό Μέρος (Τόμος Α')
2. Feldman M, Friedman L, Brandt L Sleisinger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Diseases. 2010. 9th edition
3. Cappell M Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. Gastroenterol Clin N Am ; 2008, 37:1-24
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015, 136: E359-8
5. Rex DK et al., Narrow-band imaging without optical magnification for histologic analysis of colorectal polyps, Gastroenterology. 2009 Apr;136(4):1174-81. doi: 10.1053/j.gastro.2008.12.009. Epub 2008 Dec 10.
6. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A., Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015. 65:87–108
7. Edwards BK et al., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates., Cancer. 2010 Feb 1;116(3):544-73. doi: 10.1002/cncr.24760.
8. Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, et al., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. Cancer. 2014 120:1290–1314
9. Barret M et al., Factors associated with adenoma detection rate and diagnosis of polyps and colorectal cancer during colonoscopy in France: results of a prospective, nationwide survey., PLoS One. 2013 Jul 18;8(7):e68947. doi: 10.1371/journal.pone.0068947. Print 2013.
10. Kaminski MF, Regula J, Kraszewska E, Polkowski M, Wojciechowska U, Didkowska J, Zwierko M, Rupinski M, Nowacki MP and Butruk E (2010): Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. N Engl J Med 362: 1795-1803Zauber AG et al., 2012

11. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, et al. Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(8):687-696. doi:10.1056/NEJMoa1100370.
12. Giovannucci E. (1995) Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* ;6:164–179
13. Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, et al. (2014) Prevention of diabetes with Mediterranean diets: A subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med*. 160:1–10
14. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, et al. (2014) Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: A systematic review. *Food Nutr Res*. 10:58
15. Manne U, Shanmugam C, Katkooi VR, Bumpers HL, Grizzle WE. Development and progression of colorectal neoplasia. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2010;9(1-6):235-265. doi:10.3233/CBM-2011-0160.
16. Blanes A, Diaz-Cano SJ (2006). Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol*; 12(37):5932-40 Vogelstein B et al., 1988
17. Tan AC, Naiman DQ, Xu L, Winslow RL, Geman D. Simple decision rules for classifying human cancers from gene expression profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(20):3896-3904. doi:10.1093/bioinformatics/bti631.
18. Hanahan and Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. 2000
19. Grady and Pritchard CC, Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer., *Toxicol Pathol*. 2014 Jan;42(1):124-39. doi: 10.1177/0192623313505155. Epub 2013 Oct 31.
20. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* ; 2004 23:11-2
21. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC., Cancer as an evolutionary and ecological process., *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):924-35. Epub 2006 Nov 16.
22. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*., 2005 23:609–18
23. Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*. 2008, 57:941–50
24. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature* 2004 ;432:338-41
25. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, et al., Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001;121:599-611

26. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004 ;23: 11-2
27. Cadigan KM and Liu YI, Wnt signaling: complexity at the surface., *J Cell Sci.* 2006 Feb 1;119(Pt 3):395-402
28. Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML., Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res.* 1999. 59:1442–4
29. Chittenden TW, Howe EA, Culhane AC, et al. Functional Classification Analysis of Somatically Mutated Genes in Human Breast and Colorectal Cancers. *Genomics.* 2008;91(6):508-511. doi:10.1016/j.ygeno.2008.03.002.
30. Grady W, Myeroff L, Swinler S, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh J, Neumann A, Brattain M, Chang J, Kim SJ, Kinzler K, Vogelstein B, Willson J, Markowitz S., Mutational inactivation of transforming growth factor β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999, 59:320–32
31. Grady W, Rajput A, Myeroff L, Liu D, Willis J, Kwon K, Markowitz S., Mutation of the type II TGF- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.*, 1998, 58:3101–3104
32. Downward J, Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways?, *Biochem J.* 2003 Dec 15;376(Pt 3):e9-10.
33. Oddo D, Sennott EM, Barault L, et al. Molecular landscape of acquired resistance to targeted therapy combinations in BRAF mutant colorectal cancer. *Cancer research.* 2016;76(15):4504-4515. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0396.
34. Samuels et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers., *Science.* 2004 Apr 23;304(5670):554. Epub 2004 Mar 11.
35. Danielsen et al., Novel mutations of the suppressor gene PTEN in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability- and TP53 mutation- status., *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):E252-62. doi: 10.1002/humu.20860.
36. Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, et al. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: An exploratory study. *BMC Cancer.* 2008;8:234. doi:10.1186/1471-2407-8-234.
37. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, et al. Multi-Determinants Analysis of Molecular Alterations for Predicting Clinical Benefit to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies in Colorectal Cancer. Cordes N, ed. *PLoS ONE.* 2009;4(10):e7287. doi:10.1371/journal.pone.0007287.

38. Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*.2008, 57:941–50
39. Kumar K, Brim H, Giardiello F, et al. Distinct BRAF (V600E) and KRAS Mutations in High Microsatellite Instability Sporadic Colorectal Cancer in African Americans. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(4):1155-1161. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1029.
40. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(15):8681–6
41. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al., CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006, 38:787-93
42. Iacopetta B et al, Predicting clinical outcome of 5-fluorouracil-based chemotherapy for colon cancer patients: is the CpG island methylator phenotype the 5-fluorouracil-responsive subgroup?, *Int J Clin Oncol*. 2008 Dec;13(6):498-503. doi: 10.1007/s10147-008-0854-3. Epub 2008 Dec 18.
43. Rodriguez MJ, Acha A, Ruesga MT, Rodriguez C, Rivera JM, Aguirre JM. Loss of expression of DNA repair enzyme MGMT in oral leukoplakia and early oral squamous cell carcinoma. A prognostic tool? *Cancer Lett*. 2007;245:263–8
44. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al., CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006, 38:787-93
45. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al., Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res*. 1998, 58:1713– 8
46. Weber JL, May PE, Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. Mar 1989;44(3):388-96
47. Xuereb JH, MacMillan JC, Snell R, Davies P, Harper PS, Neuropathological diagnosis and CAG repeat expansion in Huntington' s disease. *J Neutol Neurosurg Psychiatry*. Jan 1996;60(1):78-81
48. Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeve N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J Med Genet* May 2007; 45(5): 309–313
49. De Leon MB, Cisneros B., Myotonic dystrophy 1 in the nervous system from the clinic to molecular mechanisms. *J Neurosci Res*. Jan 2008;86(1):18-26. Review

50. Umar, A., C. R. Boland, J. P. Terdiman, S. Syngal, A. de la Chapelle, J. Rüschoff, et al.. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J. Natl Cancer Inst* 2004. 96:261–268
51. Watson, M. M., M. Berg, and K. Soreide. Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. *Br. J. Cancer* 2014, 111:823–827
52. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al., A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998, 58: 5248-57
53. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al., Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA.* 2011, 305: 2304-10
54. Ollikainen M, Hannelius U, Lindgren CM, Abdel-Rahman WM, Kere J, Peltomäki P., Mechanisms of inactivation of MLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: a novel approach. *Oncogene.* 2007, 26: 4541-9
55. Woods MO, Williams P, Careen A, Edwards L, Bartlett S, Mclaughlin JR, et al., A new variant database for mismatch repair genes associated with Lynch syndrome. *Hum Mutat.* 2007, 28: 669-73
56. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, Frankel WL, Pearlman R, De La Chapelle A, et al., Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology.* 2014, 147: 1308-1316.e1
57. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH, Kim YS. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004, 10: 191-195
58. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, Fuchs CS., CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009, 58: 90-96
59. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. , Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015, 148: 77-87.e2
60. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon

- Cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;349(3):247-257. doi:10.1056/NEJMoa022289.
61. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, Jewell SD, Mayer RJ, Goldberg RM, Saltz LB, Warren RS, Redston M., Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol*. 2009, 27:1814–21
 62. Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, Sabourin JC, Ducreux M, Praz F. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res*.2003, 63:5738–44
 63. Kim Y-I. , Folate and carcinogenesis: Evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem*, 1999, 10:66-88
 64. Choi S-W, Mason J., Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000,130:129–32
 65. Baron JA, Sandler RS, Haile RW, et al., Folate intake, alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst*. 1998, 90:57– 62
 66. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M., Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999, 8:513– 8
 67. Levi F, Pasche C, Lucchini F, La Vecchia C., Selected micronutrients and colorectal cancer a casecontrol study from the canton of Vaud, Switzerland. *Eur J Cancer*. 2000, 36:2115– 9
 68. Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K, et al., Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer*. 2002, 43:152–82
 69. Männistö S, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, van den Brandt PA, et al., Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.2004, 13:40-8
 70. Jatoi A, Daly BD, Kramer G, Mason JB., Folate status among patients with non-small cell lung cancer: a case-control study. *J Surg Oncol*, 2001, 77:247-52
 71. Yuan J-M, Lu SC, Van Den Berg D, et al. Genetic Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase and Thymidylate Synthase Genes and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2007;46(3):749-758. doi:10.1002/hep.21735.

72. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, denHeijer M, Kluijtmans LAJ, vandenHeuve LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995, 10:111–3
73. Goyette P et al., Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification, *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):195-200
74. Bailey LB, Gregory JF III. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr.*, 1999, 129:919– 2
75. Odin E, Sondén A, Gustavsson B, Carlsson G, Wettergren Y. Expression of Folate Pathway Genes in Stage III Colorectal Cancer Correlates with Recurrence Status Following Adjuvant Bolus 5-FU-Based Chemotherapy. *Molecular Medicine.* 2015;21(1):597-604. doi:10.2119/molmed.2014.00192.
76. Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Gene.* 1998, 62:1044–1051
77. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R., A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998, 64:169– 72
78. van der Put NM and Blom HJ, Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000 Sep;92(1):57-61.
79. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and interaction with smoking and alcohol consumption in lung cancer risk: a case-control study in a Japanese population. *BMC Cancer.* 2011;11:459. doi:10.1186/1471-2407-11-459.
80. Cui L-H, Shin M-H, Kim HN, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with lung cancer in a Korean population. *BMC Medical Genetics.* 2011;12:28. doi:10.1186/1471-2350-12-28.
81. Siemianowicz K et al., Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms in patients with small cell and non-small cell lung cancer., *Oncol Rep.* 2003 Sep-Oct;10(5):1341-4
82. Suzuki T et al., Impact of one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on risk of lung cancer in Japan: a case control study., *Carcinogenesis.* 2007 Aug;28(8):1718-25. Epub 2007 Apr 29.

83. Liu CS et al., Interaction of methylenetetrahydrofolate reductase genotype and smoking habit in Taiwanese lung cancer patients., *Cancer Genomics Proteomics*. 2009 Nov-Dec;6(6):325-9
84. Sheng X. et al, MTHFR C677T polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from 61 case-control studies., *Mol Biol Rep*. 2012 Oct;39(10):9669-79. doi: 10.1007/s11033-012-1832-4. Epub 2012 Jun 23.
85. Toffoli G, Gafa R, Russo A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T polymorphism and risk of proximal colon cancer in north Italy. *Clin Cancer Res*. 2003, 9:743– 8
86. Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B., A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*. 2002, 50:520– 42
87. Hubner RA, Houlston RS MTHFR C677T and colorectal cancer risk: A meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer* Mar 1 2007, ;120(5):1027-35
88. Stern LL et al., Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid to 5-methyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene., *J Nutr*. 2000 Sep;130(9):2238-42
89. Vainio and Miller, Primary and secondary prevention in colorectal cancer, *Acta Oncol*. 2003;42(8):809-15.
90. Sameer, Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms., *Front Oncol*. 2013 May 13;3:114. doi: 10.3389/fonc.2013.00114. eCollection 2013.
91. Cicek et al., Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Aug;13(8):1331-6
92. Izmirli A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk, *Mol Biol Rep*. 2013 Jan;40(1):625-37.
93. Dedoussis et al, An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease., *Int J Cardiol*. 2005 Apr 28;100(3):409-14
94. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001;48(6):821-829. doi:10.1136/gut.48.6.821.
95. Mino P. et al, Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles., *Int J Oncol*. 2010 Sep;37(3):707-18.

96. Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*. 2002;50(4):520-524.
97. Hubner RA, Lubbe S, Chandler I, Houlston RS. MTHFR C677 T has differential influence on risk of MSI and MSS colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2007; 16:1072–7
98. Chang SC, Lin PC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis*. 2007; 22:483–9
99. Naghibalhossaini F. et al. MTHFR C677T and A1298C variant genotypes and the risk of microsatellite instability among Iranian colorectal cancer patients, *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 March ; 197(2): 142–151. doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.11.014