

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Η κλινική σημασία της έκφρασης του VDR στον καρκίνο του
θυρεοειδούς”**

**“The clinical significance of the expression of VDR in thyroid
cancer”**



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΔΙΚΟΓΛΟΥ – ΤΖΑΝΕΤΑΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ - ΑΘΗΝΑ 2018

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογοανατομίας, του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Υπεύθυνος Καθηγητής

Θεοχάρης Σταμάτιος, Καθηγητής Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΣΤΑΜΑΤΙΟΣ ΘΕΟΧΑΡΗΣ
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
ΑΜΚΑ: 24016404212
Αρ. Μητρ. ΤΣΑΥ: 73306

Τριμελής Επιτροπή

Θεοχάρης Σταμάτιος, Καθηγητής Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΣΤΑΜΑΤΙΟΣ ΘΕΟΧΑΡΗΣ
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
ΑΜΚΑ: 24016404212
Αρ. Μητρ. ΤΣΑΥ: 73306

Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

Τρούγκος Κωνσταντίνος, Αν. Καθηγητής Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΡΟΥΓΚΟΣ
Αν. Καθηγητής
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
Εργ. Βιοχημικής Χημείας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ	8
1.1.1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ	8
1.1.2. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ	9
1.1.3. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ.....	9
1.1.4. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ	10
1.1.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ.....	11
1.1.6. ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ	13
1.1.7. ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ	13
1.1.8. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ	13
1.2. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	14
1.2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	15
1.3. VITAMIN D3	15
1.3.1. VITAMIN D RECEPTOR	16
1.3.2. ΓΟΝΙΔΙΟ VDR	16
1.3.3. ΔΟΜΗ ΤΟΥ VDR	17
1.3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ VDRs	18
1.3.5. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ 1,25(OH) ₂ D ₃ / VDR	19
1.4. VDR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	20
1.4.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ 1,25(OH) ₂ D ₃ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	21
1.4.2. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΟΥ 1,25(OH) ₂ D ₃ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	22
1.4.3. VDR ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	22
1.4.4. VDR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	24
1.4.5. ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	26
2. ΣΚΟΠΟΣ	26
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
3.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	27
3.2. ΥΛΙΚΑ	27
3.2.1. ΧΗΜΙΚΑ	27
3.2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	27
3.2.3. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	28
3.2.4. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	28
3.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ	29

3.3.1. ΑΝΟΣΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	29
3.3.2. ΑΝΟΣΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	31
3.3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	31
3.3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	31
3.3.5. ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΠΙΝΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	32
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
4.1. ΑΝΟΣΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ	33
4.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	34
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Επιβλέπων καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Σταμάτιο Θεοχάρη, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Αθηνών για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα, για την πολύτιμη βοήθεια του, τις γνώσεις που μου πρόσφερε, για την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και για την έμπρακτη υποστήριξή του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επ. Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον κ. Τρούγκο Κωνσταντίνο, Αν. Καθηγητή της Ιατρικής Αθηνών.

Συγχρόνως, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό Σαραντή Παναγιώτη για την άριστη επικοινωνία που είχαμε, την άρτια καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου πρόσφερε σε οποιαδήποτε απορία και αν είχα, την υπομονή και την ανοχή του για όλο αυτό το διάστημα και την προσπάθεια του να με καθησυχάζει κάθε φορά που με απασχολούσε οποιαδήποτε μικρή αλλά και μεγάλη ανησυχία.

Συνάμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα άτομα που κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας ήταν πάντα δίπλα μου, με στήριζαν και ήταν πάντα πρόθυμα να με βοηθήσουν με όποιο τρόπο μπορούσαν.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου που με την συνεχή ηθική και όχι μόνο στήριξη της, με βοήθησε να ολοκληρώσω με επιτυχία ένα μεγάλο και σημαντικό κομμάτι της ζωής μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου που δεν έπαψαν να πιστεύουν σε εμένα σε ότι λογικό ή τρελό αποφάσιζα να πράξω.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο θυρεοειδής αδένας αποτελεί συχνότερη θέση ανάπτυξης ενδοκρινικής κακοήθους νεοπλασίας στον άνθρωπο . Οι κακοήθεις όγκοι εμφανίζονται συνήθως με την μορφή ενός μονήρους, βραδέως αυξανόμενου όζου, ο οποίος είναι δυνατό να καθιλώνεται στον περιβάλλοντα ιστό. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στο θυρεοειδή αδένα είναι συχνότερη στις γυναίκες παρά στους άνδρες. Οι περισσότερες φορές αφορούν άτομα ηλικίας 50 έως 60, αν και το θηλώδες καρκίνωμα αναπτύσσεται και σε νέα άτομα κάτω των 30.

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D είναι μέλος της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ανήκει στην κατηγορία 1 και εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε κακοήθεις ιστούς. Οι δράσεις του ξεκινούν με την πρόσδεση της καλσιτριόλης στον VDR και τη επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων. Η σύνδεση αυτή φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου, καθώς και στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων στα οστά.

Ωστόσο, εκτός από τις δράσεις αυτές, όλο και περισσότερες πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι ο VDR κατέχει ένα αξιοσημείωτο αντινεοπλασματικό ρόλο, δεδομένου ότι σε αρκετούς τύπους καρκίνου αναστέλλει την ανάπτυξή τους, ενώ η απουσία της δράσης του φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισής του.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αναζήτηση της έκφρασης του VDR στο θυρεοειδικό φυσιολογικό και καρκινικό ιστό και η πιθανότητα χρήσης της έκφρασης του ως βιοδείκτη διάγνωσης και πρόγνωσης για τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

ABSTRACT

The thyroid gland is a more common place for the development of endocrine malignant neoplasm in humans. Malignant tumors usually appear in the form of a single, slowly growing nodule which can be attached to the surrounding tissue. The incidence of thyroid cancer is more common in women than in men. Most cases are people between the ages of 50-60, although papillary carcinoma develops in young people under the age of 30.

The vitamin D receptor is a member of the superfamily of nuclear receptors and belongs to class 1 and is expressed in epithelial cells in both normal and malignant tissues. Its effects start with the binding of calcitriol to the VDR and the induced transcriptional activation of the respective genes. This association appears to play an important role in calcium homeostasis as well as in the proliferation and differentiation of cells in the bones.

However, in addition to these actions, more and more current studies claim that VDR has a remarkable antitumor role, given that it can suspend growth in many types of cancer, while absence of its properties seems to increase the risk of developing cancer.

The purpose of this dissertation is the exploration of the expression of VDR on normal and cancerous thyroid tissue and the potential use of this expression as a biomarker for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer.

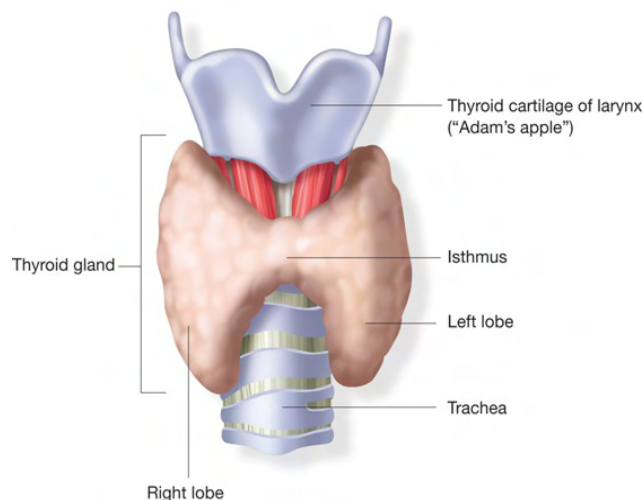
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας του ανθρώπινου σώματος και έχει βάρος από 15 έως 30 γρ. Ο θυρεοειδής έχει σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό μέσω των ορμονών που παράγει, την τρι-ιωδοθυρονίνη (T3) και την θυροξίνη (T4). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι παθήσεις που προκαλούνται από την υπερ- ή υπολειτουργία αυτού που αντίστοιχα είναι ο υπερ- και ο υποθυρεοειδισμός, διαταραχές του μεταβολισμού που επηρεάζουν ιδιαίτερα την ποιότητα ζωής των ασθενών. Πέρα από τέτοιου είδους παθήσεις συχνά στο θυρεοειδή αναπτύσσονται όγκοι, που βέβαια σε ένα μεγάλο ποσοστό μπορούν να ιαθούν, ενώ απαντώνται και οικογενείς όγκοι, οι οποίοι βασίζονται σε μεταλλάξεις του γονιδιώματος (Boocker, Denk, Heitz, 2007).

1.1.1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής αδένας σχηματίζεται αρχικά στο τυφλό τρήμα, δηλαδή στη βάση ή ρίζα της γλώσσας. Η ενδοδερμική καταβολή μεταναστεύει ουραίως μέχρι το ύψος του θυρεοειδούς χόνδρου του λάρυγγα. Εκεί αναπτύσσεται σχηματίζοντας δύο λοβούς, οι οποίοι στη μέση γραμμή μπροστά συνδέονται με τον ισθμό. Τα κύτταρα C είναι νευροενδοκρινικής προέλευσης και μεταναστεύουν στο θυρεοειδικό παρέγχυμα από τον 5^ο φαρυγγικό θύλακο (Boocker, Denk, Heitz, 2007).



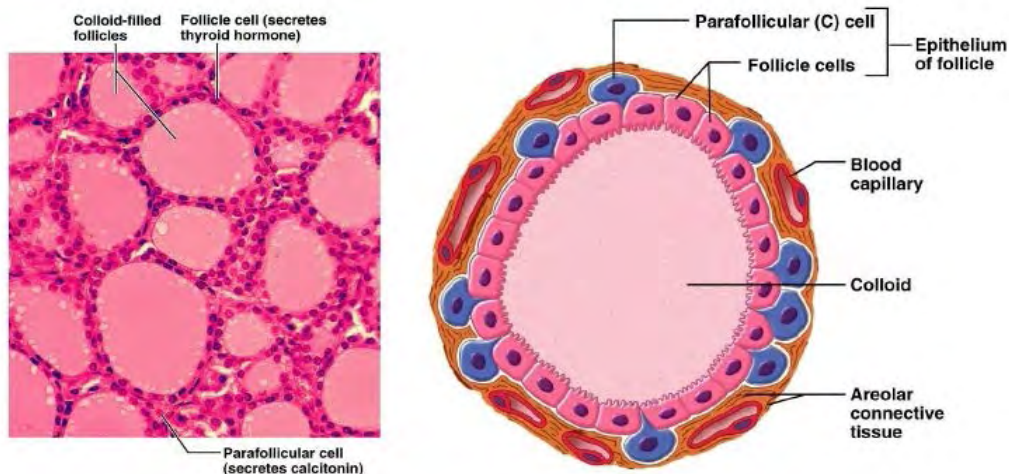
Εικόνα 1: Ανατομικά χαρακτηριστικά του θυρεοειδούς αδένα (Moore K., Dalley A, Agur A, 2013).

1.1.2. ANATOMIA ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής αδένας βρίσκεται κάτω από τους στερνοθυρεοειδείς και τους στερνοϋοειδείς μυς, εντοπιζόμενος μπροστά στον λαιμό στο επίπεδο των Α5-Θ1 σπονδύλων. Αυτός αποτελείται κυρίως από ένα δεξιό και ένα αριστερό λοβό, που βρίσκονται προς τα εμπρός και προς τα έξω του λάρυγγα και της τραχείας. Ένας σχετικά λεπτός ισθμός ενώνει τους λοβούς πάνω από την τραχεία, συνήθως μπροστά από το δεύτερο και το τρίτο ημικρίκιο της τραχείας. Ο θυρεοειδής αδένας περιβάλλεται από μια λεπτή ινώδη κάψα, η οποία αποστέλλει διαφραγμάτια βαθιά μέσα στον αδένα, παχύς συνδετικός ιστός προσφέρει την κάψα στον κρικοειδή χόνδρο και στα ανώτερα ημικρίκια της τραχείας. Έξω από την κάψα βρίσκεται μια χαλαρή θήκη που σχηματίζεται από την σπλαχνική μοίρα της προτραχειακής στοιβάδας της εν τω βάθει τραχηλικής περιτονίας (Moore K. Dalley A. Agur A, 2013).

1.1.3. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ

Η λειτουργική του μονάδα είναι το θυλάκιο, ένα σφαιρικό κυστίδιο αποτελούμενο από βασική μεμβράνη και ένα στοίχο κυβοειδών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά έχουν ένα μεγάλο αριθμό μικρολαχνών στην επιφάνειά τους. Μέσα στον αυλό των θυλακίων υπάρχει κολλεοειδής, το οποίο περιέχει τη θυρεοσφαιρίνη. Αυτή είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 660.000 Dalton, η οποία περιέχει τις θυρεοειδικές ορμόνες τρι-ιωδοθυρονίνη (T3) και την θυροξίνη (T4). Μεταξύ των θυλακιωδών κυττάρων υπάρχουν ενδοκρινικά κύτταρα νευρο-εξωδερμικής προέλευσης, τα κύτταρα C ή παραθυλακιώδη. Τα κύτταρα αυτά παράγουν την καλσιτονίνη και μπορούν να αναγνωρισθούν μόνο μετά από ανοσοϊστοχημική εντόπιση της καλσιτονίνης. Τα θυλάκια χωρίζονται μεταξύ τους με λεπτές δεσμίδες ινώδους συνθετικού ιστού, πλούσιου σε αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία. Ομάδες 20 έως 40 θυλακίων με κοινή αιμάτωση περιβάλλονται από παχύτερες δέσμες συνδετικού ιστού, σχηματίζοντας τα θυρεοειδικά λοβία. Η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών της T3 και T4 προϋποθέτει επαρκή πρόσληψη ιωδίου από τις τροφές και το πόσιμο νερό, ενώ ρυθμίζεται από αυτόνομους ενδοθυρεοειδικούς μηχανισμούς και κυρίως από τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη TSH του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης (Boocker, Denk, Heitz, 2007).

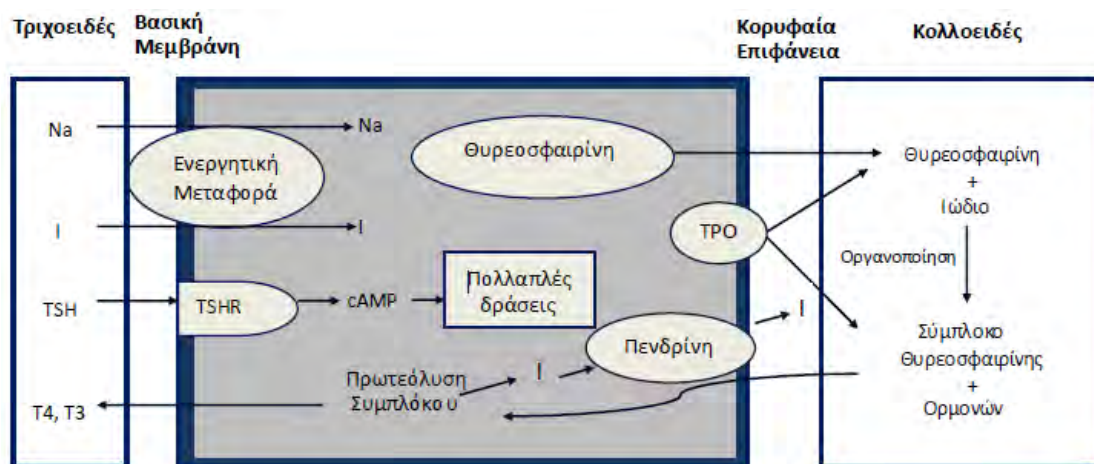


Εικόνα 2 : Ιστολογία του θυρεοειδούς αδένος. Αριστερά: απεικόνιση φυσιολογικού θυλακίου στο μικροσκόπιο. Δεξιά: Μεγέθυνση φυσιολογικού θυλακίου θυρεοειδούς (Boocker, Denk, Heitz, 2007).

1.1.4. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι δύο δραστικές ορμόνες που εκκρίνονται από το θυρεοειδή είναι ιωδιωμένα παράγωγα της τυροσίνης. Οι ορμόνες αυτές είναι η T₄, η οποία περιέχει τέσσερα άτομα ιωδίου, και η T₃, η οποία περιέχει τρία άτομα ιωδίου. Η πρώτη αποτελεί το 90% της παραγωγής του θυρεοειδούς, ενώ η δεύτερη μόνο το 10%. Η βιοσύνθεση και η έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών περιγράφεται παρακάτω. Το πρώτο βήμα είναι η μεταφορά του ιωδίου. Το ανόργανο ιώδιο συγκεντρώνεται στα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς με τη βοήθεια μίας αντλίας ενεργητικής μεταφοράς ιωδίου, του συμμεταφορέα Na⁺/I⁻ (NIS), ο οποίος παγιδεύει το ιώδιο από την κυκλοφορία του αίματος και το μεταφέρει εντός των θυρεοειδικών κυττάρων. Ο συμμεταφορέας ιωδίου ευθύνεται για την μεταφορά δύο ιόντων νατρίου και ενός ιόντος ιωδίου. Μετά τη μεταφορά του ιωδίου εντός του θυρεοειδικού κυττάρου, το ιώδιο μετακινείται από τη βασική μεμβράνη προς την κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου, την οποία και διαπερνά με τη βοήθεια μίας πρωτεΐνης μεταφοράς, γνωστή ως πεντρίνη. Η πεντρίνη φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος. Μεταφέρει ιώδιο και χλώριο από τον ενδοκυττάριο χώρο στην κοίτη του θυλακίου και είναι απαραίτητη για την οργανοποίηση του ιωδίου στην θυρεοσφαιρίνη (Tg) (Bizhanova A., & Kopp, P. 2009). Το επόμενο στάδιο είναι η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών, όπου το συσσωρευμένο στην κορυφαία επιφάνεια των θυρεοειδικών κυττάρων ιώδιο οξειδώνεται ταχέως σε

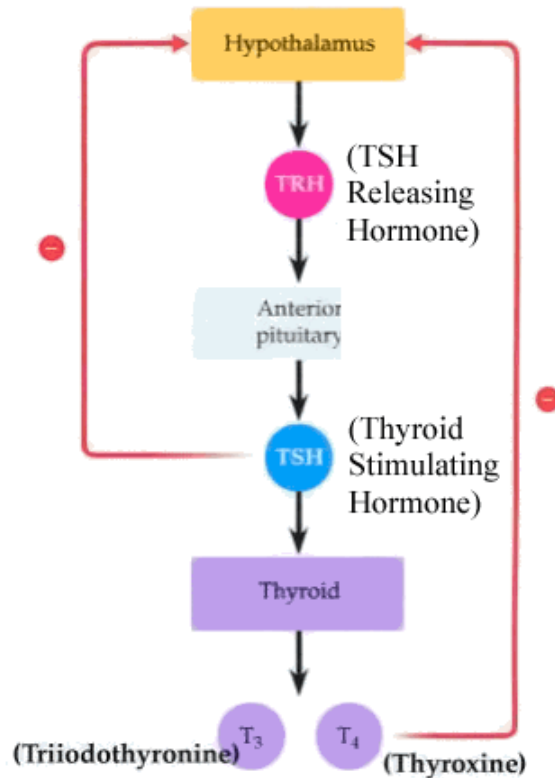
ελεύθερο ιώδιο από το ένζυμο θυροξειδική υπεροξειδάση (TPO). Για την αντίδραση αυτή απαιτείται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο παράγεται τοπικά υπό την επίδραση του συστήματος NADPH-οξειδάσης. Στη συνέχεια, το ιώδιο ενσωματώνεται (οργανοποίηση) στις θέσεις 3' ή και 5' των μορίων τυροσίνης της θυροσφαιρίνης, σχηματίζοντας έτσι τη μονοϊωδοτυροσίνη (MIT) και τη διϊωδοτυροσίνη(DIT) αντίστοιχα. Ακολουθεί η σύζευξη ενός μορίου MIT και ενός DIT, καθώς και δύο μορίων DIT μέσω ενός αιθερικού δεσμού (υπό την επίδραση επίσης της TPO), σχηματίζοντας έτσι τις δραστικές ορμόνες T3 (3, 5, 3' -τριϊωδοθυρονίνη) και T4 (3, 5, 3',5'-τετραϊωδοθυρονίνη ή θυροξίνη) αντίστοιχα, σε σύμπλοκη μορφή με τη θυροσφαιρίνη. Τελικό βήμα είναι η έκκριση των θυροξειδικών ορμονών. Οι θυροξειδικές ορμόνες αποθηκεύονται, όπως αναφέρθηκε σε σύμπλοκη μορφή με τη θυροσφαιρίνη στο κολλοειδές των θυλακίων, μέχρι να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία υπό την επίδραση της θυροξειδοτρόπου ορμόνης (TSH). Με τη δράση της τελευταίας, το σύμπλοκο θυροσφαιρίνη-ορμόνη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των θυλακιωδών κυττάρων (ενδοκυττάρωση) και στη συνέχεια, υφίσταται ενζυμική πρωτεόλυση στα λυσοσώματα απελευθερώνοντας τις θυροξειδικές ορμόνες T4 και T3 στη συστηματική κυκλοφορία. Παράλληλα με τις ενεργείς ορμόνες παράγονται και ιωδιωμένα μόρια τυροσίνης (MIT και DIT), τα οποία αποϊωδιώνονται ενδοκυττάρια και το ιώδιο επαναχρησιμοποιείται για τη σύνθεση των θυροξειδικών ορμονών. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι η TSH ρυθμίζει όλα τα βήματα της θυροξειδικής ορμονογένεσης, δηλαδή την είσοδο του ιωδίου εντός του κυττάρου, τη σύνθεση της θυροσφαιρίνης, την ενεργοποίηση της TPO και, τέλος, τη σύνθεση και απελευθέρωση των δραστικών ορμονών στην κυκλοφορία (Guyton and Hall, 2013).



Εικόνα 3 : Η πορεία της βιοσύνθεσης και της έκκρισης των θυροξειδικών ορμονών (Guyton and Hall, 2013).

1.1.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η ανάπτυξη και η λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος ελέγχεται από τον υποθάλαμο-υποφυσιακό-θυρεοειδικό άξονα. Ο υποθάλαμος εκκρίνει μία ορμόνη, την εκλυτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης (TRH), η οποία με τη σειρά της διεγείρει τη σύνθεση και έκκριση της TSH από την υπόφυση. Η τελευταία δρα σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη των θυρεοειδικών κυττάρων, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των G –πρωτεϊνών και διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια αύξηση του cAMP και της πρωτεϊνικής κινάσης A. Μέσω του μηχανισμού αυτού, η TSH διεγείρει την ορμογένεση (λειτουργία) των θυρεοειδικών κυττάρων. Οι ελεύθερες θυρεοειδικές ορμόνες (κυρίως η FT3) ασκούν αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στην έκκριση της TRH στο επίπεδο του υποθαλάμου αλλά κυρίως στην έκκριση της TSH, μειώνοντας τον αριθμό των υποδοχέων της TRH στα θυρεοτρόπα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης. Με τον τρόπο αυτό, ο υποθαλαμο-υποφυσιακό-θυρεοειδικός άξονας διατηρείται σε ισορροπία και εξασφαλίζεται η σωστή λειτουργία του θυρεοειδούς. Η έκκριση της TSH αναστέλλεται επίσης και από άλλες ορμόνες, όπως η σωματοστατίνη και η ντοπαμίνη, καθώς και οι κυτταροκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες (IL-) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α) (Guyton and Hall, 2013).



Εικόνα 4: Ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδή αδένος από τον υποθάλαμο-υποφυσιακό-θυρεοειδικό άξονα. (Guyton and Hall, 2013).

1.1.6. ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ

Στις καλοήθειες καταστάσεις του θυρεοειδή αδένου ανήκουν ο υποθυρεοειδισμός, ο υπερθυρεοειδισμός και οι θυρεοειδίτιδες. Στον υποθυρεοειδισμό γίνεται λόγος για πρωτοπαθή, όταν το αίτιό του εντοπίζεται στον ίδιο το θυρεοειδή και για δευτεροπαθή όταν υπάρχει ανεπαρκής διέγερση από ορμόνες του υποθαλάμου ή της υπόφυσης. Στον υποθυρεοειδισμό διακρίνουμε μια ιδιαίτερα χαμηλή έκκριση T3 και T4 η οποία οφείλεται είτε σε λειτουργικές διαταραχές της σύνθεσης και έκκρισης της T3/T4 (πιο συχνή είναι η βρογχοκήλη λόγω έλλειψης ιωδίου) είτε σε ελάττωση του θυρεοειδικού παρεγχύματος. Αντιθέτως, ο υπερθυρεοειδισμός οδηγεί σε μια υπερμεταβολική κατάσταση, η οποία βασίζεται σε μια ακατάλληλα αυξημένη έκκριση T3 και T4. Αυτός συνήθως πάντοτε προκαλείται από μια από τις εξής τρεις παθήσεις: τον αυτοάνοσο υπερθυρεοειδισμό ή αλλιώς νόσος του Graves, την τοξική οζώδη βρογχοκήλη και το τοξικό αδένωμα. Τέλος, στις θυρεοειδίτιδες ιδιαίτερη σημασία έχει η χρόνια λεμφοκυτταρική θυρεοειδίτιδα ή αλλιώς θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η οποία χαρακτηρίζεται από μια ανοσολογικά καθοριζόμενη, εκτεταμένη καταστροφή του θυρεοειδικού παρεγχύματος. Σε αυτή συμμετέχουν τόσο τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα όσο και αντισώματα, τα οποία στρέφονται ενάντια στο επιθήλιο των θυλακίων, στην θυρεοσφαιρίνη και σπανιότερα ενάντια στις ορμόνες T3 και T4 (Σιβρίδης, 2007).

1.1.7. ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ

Τα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς εμφανίζονται συνήθως με τη μορφή ενός μονήρους βραδέως αυξανόμενου όζου. Ο όζος είναι δυνατό να καθηλώνεται στον περιβάλλοντα ιστό. Οι όγκοι του θυρεοειδή δεν είναι συχνοί: οι κακοήθειες όγκοι αποτελούν το 1% στη γυναίκα και το 0,15% στον άνδρα μεταξύ όλων των κακοηθών όγκων. Από τους μονήρες νεοπλασματικούς όζους του θυρεοειδούς, το 80-90% είναι αδενώματα και το 10-20% καρκινώματα, με πιθανή εξαίρεση το μυελοειδές καρκίνωμα. Οι όγκοι είναι δύο με τρεις φορές πιο συχνοί στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες και γενικά εμφανίζονται μετά το 50^ο έτος της ζωής. Εξαίρεση αποτελεί το θηλώδες καρκίνωμα το οποίο εκδηλώνεται ήδη σε παιδιά και συχνά σε νεαρά άτομα. Η νόσος φαίνεται να εκδηλώνεται με διόγκωση του θυρεοειδούς, δύσπνοια, δυσφαγία, βήχα και παράλυση του λαρυγγικού νεύρου (Σιβρίδης, 2007).

1.1.8. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ

Τα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς αδένου υποδιαιρούνται σε επιθηλιακούς και μη επιθηλιακούς όγκους. Στους επιθηλιακούς όγκους εντάσσονται το:

Θυλακιώδες αδένωμα: είναι ένας καλοήθης όγκος που προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα του οργάνου και ανοσοϊστοχημικώς εμφανίζει θετικότητα στη θυρεοσφαιρίνη και στις κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους.

Θηλώδες καρκίνωμα: είναι ένας κακοήθης επιθηλιακός όγκος με θηλώδεις, συχνά όμως και θυλακιώδεις ιστολογικές δομές. Το θηλώδες καρκίνωμα αποτελεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα του θυρεοειδούς και αναγνωρίζεται με την ίδια συχνότητα άτομα κάθε ηλικίας, ακόμα και παιδιά.

Θυλακιώδες καρκίνωμα: πρόκειται για ένα κακοήθη επιθηλιακό όγκο με θυλακιώδη διαφοροποίηση, χωρίς όμως θηλώδεις περιοχές. Ανοσοϊστοχημικώς, εμφανίζει θετικότητα στα αντιγόνα επιφάνειας θυρεοσφαιρίνης, λαμινίνη, κολλαγόνο IV, επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο και κερατίνες 8-18.

Μυελοειδές καρκίνωμα: αποτελεί σπάνιο νεόπλασμα των παραθυλακιωδών κυττάρων του θυρεοειδούς που παράγουν κυρίως καλσιτονίνη. Ανοσοϊστοχημικώς παρουσιάζει θετικότητα στη καλσιτονίνη, στη χρωμογρανίνη, στη σωματοστατίνη στην ειδική ενολάση των νευρικών κυττάρων, σε κερατίνες στο καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνου (CEA) και στη χοριακή γοναδοτροπίνη. Αντιθέτως, ανοσοϊστοχημικά είναι αρνητικός για το αντιγόνο επιφάνειας θυρεοσφαιρίνης.

Αδιαφοροποίητο (αναπλαστικό) καρκίνωμα: είναι ένας όγκος υψηλής κακοήθειας που συγκροτείται από κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης, ενώ συχνά παρατηρούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο p53. Ανοσοϊστοχημικώς εμφανίζει θετικότητα στα αντιγόνα επιφάνειας κερατίνες, στο επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο (EMA), στο CEA. Αντίστοιχα, ο σαρκωματοειδής τύπος εμφανίζει θετικότητα στη βιμεντίνη. Η έκφραση του γονίδιο p53 είναι σταθερά θετική. Στους μη επιθηλιακούς όγκους ανήκουν τα κακοήθη λεμφώματα τα οποία αναπτύσσονται σε κάθε ηλικία και είναι συχνότερα στις γυναίκες (Boocker, Denk, Heitz,2007).

1.2. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (nuclear receptors, NRS) αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες τάξεις μεταγραφικών παραγόντων και ελέγχουν διάφορες λειτουργίες όπως η ομοιόσταση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Η ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων γίνεται μέσω των προσδετών τους, οι οποίοι μπορεί να είναι στεροειδείς ορμόνες όπως οιστρογόνα, προγεστερόνη, βιταμίνη D3, καθώς και λιποδιαλυτά μόρια όπως το ρετινοϊκό οξύ, οι θυρεοειδικές ορμόνες και οι οξυστερόλες (Robinson-Rechavi, 2003). Μέσα στα κύτταρα στην ανενεργή τους κατάσταση βρίσκονται ως μονομερή, όμως η σύνδεσή τους με τον προσδέτη οδηγεί στο διμερισμό

τους, στην πρόσδεση στο DNA και στην επακόλουθη τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Έχοντας τη δυνατότητα να ρυθμίζουν αρκετούς μηχανισμούς ελέγχου της φυσιολογίας του κυττάρου, η οποιαδήποτε δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές του μεταβολισμού, της ανάπτυξης ακόμα και της αναπαραγωγής. Γι' αυτό το λόγο μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (Germain, Staels, Dacquet, Spedding, & Laudet, 2006).

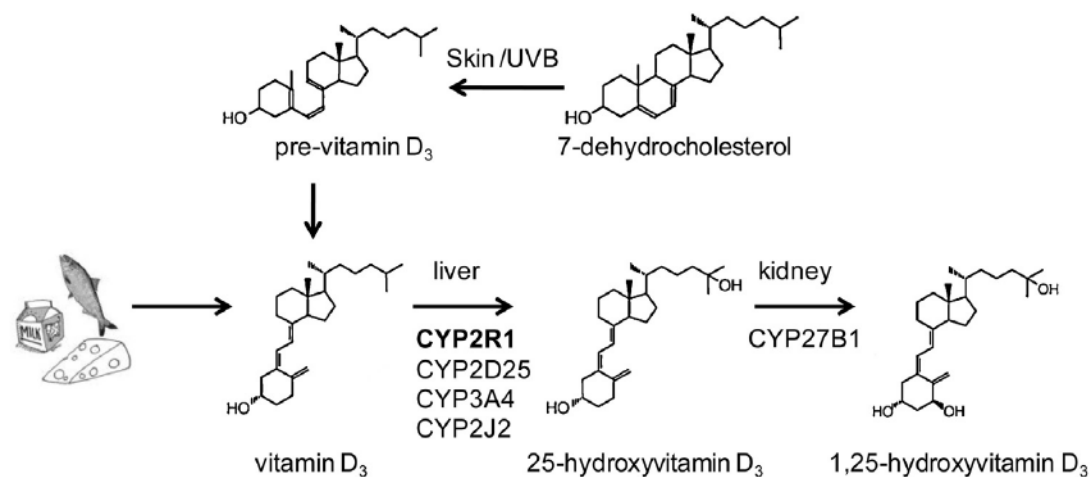
1.2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών που λειτουργούν ως ομοδιμερή, η δεύτερη τους υποδοχείς RXR (retinoid X receptor) που λειτουργούν ως ετεροδιμερή. Η τρίτη και η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει τους ορφανούς υποδοχείς οι οποίοι μπορούν να λειτουργούν ως ομοδιμερή (κατηγορία 3) αλλά και ως μονομερή (κατηγορία 4) για τους οποίους όμως δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί φυσικοί προσδέτες (Olefsky, 2001).

1.3. VITAMIN D3

Αρχικά η 1,25 διυδροξυβιταμίνη D3 [1,25 (OH)₂D₃], η ενεργή μορφή της βιταμίνης D φάνηκε ότι διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο τόσο στην ομοίωση των οστών όσο και των μετάλλων. Αν και η βιταμίνη D μπορεί να προέλθει από θρεπτικές πηγές όπως είναι τα λιπαρά ψάρια και τα εμπλουτισμένα γαλακτικά προϊόντα, η πλειονότητα της βιταμίνης D συντίθεται στο δέρμα. Ειδικότερα η προβιταμίνη D₃ σχηματίζεται υπό τη δράση της UV ακτινοβολίας από ένα πρόδρομο της χοληστερόλης την 7-δευδροχοληστερόλη, όπου μετέπειτα πραγματοποιείται θερμικός ισομερισμός σε βιταμίνη D₃. Ακολούθως λαμβάνουν χώρα δύο στάδια υδροξυλίωσης για να ληφθεί η ενεργή μορφή 1,25 (OH)₂D₃. Πρώτα πραγματοποιείται μια γρήγορη και όχι αυστηρά 25-υδροξυλίωση της βιταμίνης D₃ (25-OHD₃) από διάφορα ένζυμα του P450 στο συκώτι. Από αυτά τα ένζυμα το CYP2R1 αναγνωρίστηκε ως το πιο κρίσιμο για τη σύνθεση του 25-OHD₃. Στη συνέχεια ένα δεύτερο στάδιο περιορισμού της υδροξυλίωσης λαμβάνει χώρα στο νεφρό και προκαλείται από το ένζυμο CYP27B1 το οποίο μετατρέπει το 25-OHD₃ σε 1,25 (OH)₂D₃. Η νεφρική δραστηριότητα του CYP27B1 ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από το ασβέστιο, τα φωσφορικά, την καλσιτονίνη, την παραθορμόνη (PTH) και την ίδια την 1,25 (OH)₂D₃. Τέλος τα 1,25 (OH)₂D₃ και το 25-OHD₃ καταβολίζονται από τα CYP24A1 σχεδόν σε όλα τα κύτταρα στόχους, οδηγώντας στη διάσπαση και αδρανοποίηση της πλευρικής αλυσίδας. Η βιταμίνη D και οι

μεταβολίτες της μεταφέρονται στην κυκλοφορία όπου συνδέονται με την πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D (DBP) (Clinckspoor et al., 2013).



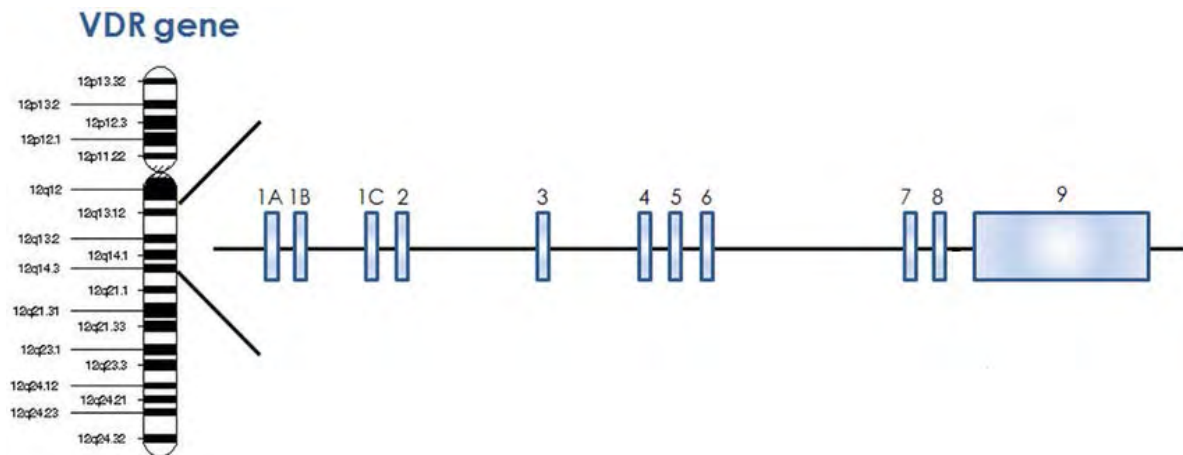
Εικόνα 5 : Μεταβολισμός της 1,25(OH)₂D₃. Η ενεργοποίηση της βιταμίνης D₃ λαμβάνει χώρα μέσω δύο σταδίων υδροξυλίωσης, στο ήπαρ και στο νεφρό από τα CYP2R1 και CYP27B1 (Clinckspoor et al., 2013).

1.3.1. VITAMIN D RECEPTOR

Οι γονιδιωματικές δράσεις της 1,25 (OH)₂D₃ ξεκινούν με τη σύνδεση της με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (Clinckspoor et al., 2013). Ο υποδοχέας της βιταμίνης D είναι μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (NR111) ανήκει στην κατηγορία 1 και εκφράζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα τόσο σε κανονικούς όσο και σε κακοήθεις ιστούς (Germain, Staels, Dacquet, Spedding, & Laudet, 2006).

1.3.2. ΓΟΝΙΔΙΟ VDR

Το ανθρώπινο γονίδιο VDR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 (12q13.1), περιέχει 11 εξόνια και η έκτασή του είναι περίπου 75kb. Στην 5' περιοχή του γονιδίου πριν το κωδικόνιο έναρξης υπάρχει το εξόνια 1A, 1B, 1C, ενώ το μεταφραζόμενο προϊόν κωδικοποιείται από επιπλέον αμινοξέα (2-9). Υπάρχουν 3 μοναδικές ισόμορφες του mRNA οι οποίες παράγονται ως αποτέλεσμα του διαφορετικού ματίσματος των εξονίων 1B και 1C. Η ακολουθία του DNA άνω του εξονίου 1A είναι πλούσια GC και δεν περιέχει TATA box. Τα εξόνια 2 και 3 του γονιδίου εμπλέκονται στη δέσμευση του DNA, ενώ τα 7, 8, 9 εμπλέκονται στη σύνδεση με τη βιταμίνη D (Miyamoto et al., 1997).



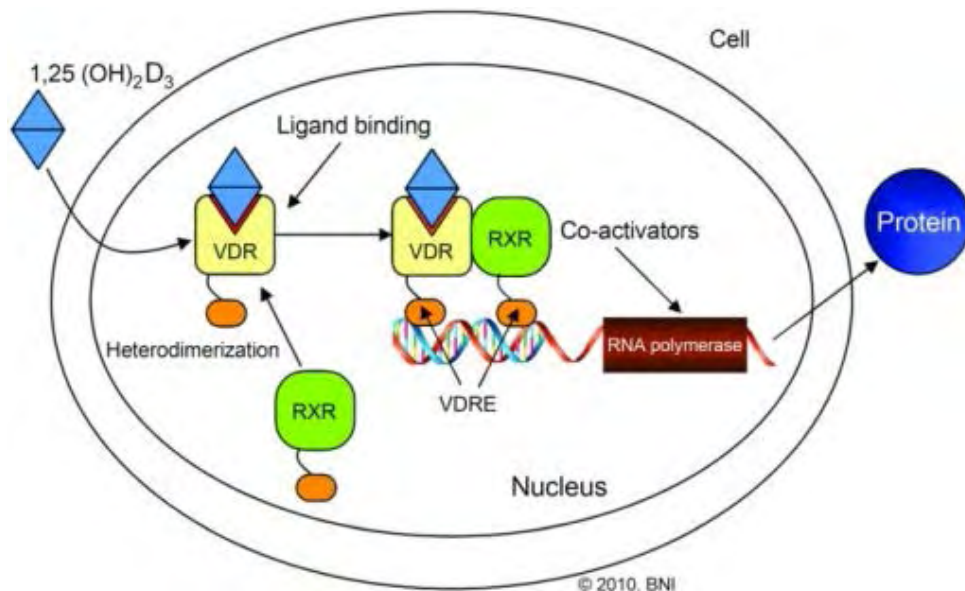
Εικόνα 6: Απεικόνιση της χρωμοσωμικής τοποθέτησης του VDR γονιδίου αλλά και των κωδικονίων του (Morand, Daniela, & Michael, 2014).

1.3.3. ΔΟΜΗ ΤΟΥ VDR

Ο VDR όπως και οι άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν μια κοινή δομική οργάνωση η οποία αποτελείται από 6 επικράτειες. Η περιοχή του αμινοτελικού άκρου (επικράτεια A/B) εμφανίζει υψηλό βαθμό μεταβλητότητας, ενώ περιλαμβάνει και μια ενεργή περιοχή trans-ενεργοποίησης (AF-1) και αρκετά αυτόνομες περιοχές trans-ενεργοποίησης (AD). Η πιο συντηρημένη περιοχή είναι η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DBD) (επικράτεια C) η οποία κατευθύνει τον υποδοχέα σε υψηλής εξειδίκευσης περιοχές που είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης (REs). Η DBD περιλαμβάνει επίσης ένα P-box, ένα σύντομο μοτίβο με νουκλεοτιδική αλληλουχία “AGGTCA” που είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη πρόσδεση στο DNA, το οποίο εμπλέκεται στο διμερισμό των υποδοχέων. Συγχρόνως έχει βρεθεί ότι η DBD αποτελείται από δυο υψηλά συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης ψευδάργυρου μέσω τεσσάρων κυστεϊνών. Η μεγαλύτερη επικράτεια είναι η E ή αλλιώς περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD), η οποία περιλαμβάνει και τη θέση σύνδεσης του προσδέτη αλλά και την εξαρτώμενη από προσδέτη θέση trans-ενεργοποίησης (AF-2), ενώ διαθέτει και επιφάνειες αλληλεπίδρασης για άλλους συμπαράγοντες. Μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή άρθρωσης είναι η επικράτεια D, η οποία συνδέει την DBD με την LBP. Η επικράτεια αυτή είναι ιδιαίτερα μεταβλητή σε μήκος και ακολουθία και περιέχει σήματα εντοπισμού. Τέλος οι NRs είναι πιθανόν με την E επικράτεια να περιέχουν και μια F που όμως είναι ιδιαίτερα μεταβλητή και δεν γνωρίζουμε πολλά για τη δομή της και τη λειτουργία της (Robinson-Rechavi, 2003).

1.3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ VDRs

Οι δράσεις του 1,25 (OH)₂D₃ ή της καλσιτριόλης όπως αλλιώς ονομάζεται ξεκινούν μέσω της σύνδεσης της με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR). Η σύνδεση του προσδέτη επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα της βιταμίνης D, οι οποίες οδηγούν στον ετεροδιμερισμό του VDR με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RXR). Ακολούθως, το ετεροδιμερές VDR-RXR μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στο στοιχείο απόκρισης της βιταμίνης D (VDRE) στη περιοχή του υποκινητή των αντίστοιχων γονιδίων στόχων. Με την σύνδεση του προσδέτη, οι συν-καταστολείς, οι οποίοι συγκρατούν τη χρωματίνη σε μεταγραφική κατασταλακτική κατάσταση, απελευθερώνονται. Ταυτόχρονα, συν-ενεργοποιητές όπως αυτοί της οικογενείας CBP/p300 καθώς και της οικογενείας των πρωτεϊνών p160, κάνουν την εμφάνιση τους. Αυτοί έχουν δραστικότητα ακετυλοτρανσφεράσης, με αποτέλεσμα να οδηγούν σε άνοιγμα της δομής της χρωματίνης και έτσι να δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για μεταγραφή της πρωτεΐνη δέσμευσης του ασβεστίου (Ca²⁺). Ωστόσο, πέρα από τη μεταγραφική ενεργοποίηση, το 1,25(OH)₂D₃ μπορεί επίσης να οδηγήσει και στη μείωση της μεταγραφής γονιδίων όπως η PTH και το CYP27B1. Κατά τη διάρκεια της μεταγραφικής καταστολής η δέσμευση του ετεροδιμερούς VDR-RXR σε ένα αρνητικό VDRE (nVDRE) προσλαμβάνει καταστολείς με δραστικότητα HDAC, αποτρέποντας την έκθεση της χρωματίνης και συνεπώς τη μεταγραφή (Clincksproor et al., 2013).



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα της βιταμίνης D (Martirosyan et al., 2016)

1.3.5. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ 1,25 (OH)₂D₃ / VDR

Το 1,25 (OH)₂D₃ /VDR διαδραματίζει ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου και των οστών. Στο έντερο η επαγόμενη από την 1,25 (OH)₂D₃ / VDR απορρόφηση του Ca²⁺ ακολουθεί ένα μηχανισμό 3 σταδίων. Αρχικά το Ca²⁺ εισέρχεται στο κύτταρο διαμέσου της κορυφαίας μεμβράνης μέσω των διαύλων ασβεστίου και πιο συγκεκριμένα από το κανάλι TRPV6 (transient potential vanilloid type 6). Στο πλαίσιο της ομοιόστασης του Ca²⁺ η μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί το TRPV6 φαίνεται να ρυθμίζεται από την οδό βιταμίνη D/VDR/RXR. Ακολούθως η μεταφορά του Ca²⁺ στο κύτταρο διαμεσολαβείται από την calbindinD9K. Σε ένα τρίτο βήμα το Ca²⁺ μεταφέρεται διαμέσω της βασοπλευρικής μεμβράνης έναντι της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης που προκαλείται από τη μεμβρανική ATPάση του ασβεστίου (PMCA1b). Η επαναρρόφηση του Ca²⁺ στο νεφρό ακολουθεί ένα παρόμοιο μονοπάτι το οποίο περιλαμβάνει τη μεταφορά μέσω της επιθηλιακής μεμβράνης από το TRPV5, μια κυτοσολική μεταφορά από την calbindingD9K/28K και την εξώθηση της από τον ανταλλάκτη Na⁺/ Ca²⁺ και την PMCA1b. Πέρα όμως από αυτό το 1,25(OH)₂D₃ έχει την ικανότητα να ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον κορεσμό των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, την επαναρρόφηση των οστών και την ανοργανοποίηση . Φαίνεται ότι το 1,25 (OH)₂D₃ μέσω του VDR αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το κολλαγόνο τύπου 1, την οστεοκαλσίνη και την οστεοποντίνη που οδηγούν στον σχηματισμό οστού. Επιπλέον, η 1,25(OH)₂D₃ / VDR επάγει την έκφραση του προσδέτη του πυρηνικού υποδοχέα NF-κB (RANKL) από τους οστεοβλάστες, που με τη σειρά του προκαλεί διαφοροποίηση και αυξημένη δραστηριότητα των οστεοκλαστών, εξασφαλίζοντας έτσι την οστική διαμόρφωση. Αυτή η αλληλουχία μεταβολικών διεργασιών υποδηλώνει ότι η 1,25(OH)₂D₃ έχει την ικανότητα να ασκεί τόσο αναβολικές όσο και καταβολικές επιδράσεις στα οστά. Σε ορό με χαμηλά επίπεδα ασβεστίου, ανεξάρτητα από την αιτία, η επαγόμενη από 1,25(OH)₂D₃ / VDR οστική επαναρρόφηση είναι σημαντική για τη διατήρηση της ασβεστίου (Khammissa et al., 2018). Εκτός από τις κλασσικές επιδράσεις στην ομοιόσταση ασβεστίου και των οστών, το 1,25 (OH)₂D₃ έχει ανοσοδιαμορφωτική ικανότητα. Το 1,25(OH)₂D₃ στοχεύει διάφορα ανοσοκύτταρα, περιλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων (DCs) καθώς και των Β-λεμφοκυττάρων, ρυθμίζοντας έτσι τις έμφυτες και προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις. Επιπλέον, τα ανοσοκύτταρα εκφράζουν το CYP27B1, επιτρέποντας την τοπική ενεργοποίηση και μετατροπή του 25-OHD₃ σε 1,25(OH)₂D₃. Τα αποτελέσματα του 1,25(OH)₂D₃ στα ανοσοκύτταρα

διαδραματίζονται μέσω αλληλεπιδράσεων με παράγοντες πυρηνικής μεταγραφής (NF-AT, NF-κB) ή με άμεση αλληλεπίδραση με VDREs στην περιοχή του υποκινητή των κυτοκινών. Η διαφοροποίηση και η ωρίμανση DC αναστέλλεται από 1,25(OH)₂D₃, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II (MHC-II), των συνδιεγερτικών μορίων και της ιντερλευκίνης-12 (IL-12). Επιπλέον, η παραγωγή IL-10 και η απόπτωση DC ενισχύεται από το 1,25(OH)₂D₃. Επομένως, η ενεργοποίηση των T-κυττάρων από DC αναστέλλεται (Clincksproor et al., 2013).

1.4. VDR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Υπάρχει μια ισχυρή βιολογική άποψη για το ρόλο της έλλειψης βιταμίνης D στον αυξανόμενο κίνδυνο για καρκίνο και για τη χρήση της βιταμίνης D ή των βιοενεργών αναλόγων της για την πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου. Το VDR εκφράζεται στους περισσότερους καρκινικούς ιστούς και τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών σε ζώα και *in vitro* μελετών σε κυτταροκαλλιέργειας δείχνουν ότι το 1,25(OH)₂D₃ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγειογένεση, την εισβολή και προάγει τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Σε καρκινικά κύτταρα, 1,25(OH)₂D₃ / VDR ενεργοποιεί κυκλίνο-εξαρτώμενους αναστολείς κινάσης (π.χ. p21, p27), αναστέλλει μιτογονικούς παράγοντες ανάπτυξης όπως IGF-1 και EGF και προάγει τη δράση του TGF-β αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη του καρκίνου. Η σηματοδότηση 1,25(OH)₂D₃ / VDR έχει την ικανότητα να μειώνει την έκφραση των οδών κυκλοοξυγενάσης-2, προσταγλανδίνης και NF-κB, αναστέλλοντας έτσι τη φλεγμονή που σχετίζεται με τον όγκο. Συγχρόνως, καταστέλλει τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (π.χ. Bcl2) και ενεργοποιεί τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες (π.χ., Bax, BAK). Έτσι λοιπόν όλα αυτά μπορούν να καταστείλουν την ανάπτυξη του καρκίνου (Khammissa et al., 2018). Αυτά τα αντικαρκινικά αποτελέσματα επιτυγχάνονται άμεσα μέσω δέσμευσης με το VDR ή έμμεσα μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους σημαντικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές ή συστήματα κυτταρικής σηματοδότησης (Clincksproor et al., 2013). Ειδικότερα, ο παράγοντας μεταγραφής NF-κB ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την εισβολή και τη μετάσταση. Έχει αναφερθεί ότι η 1,25(OH)₂D₃ / VDR μπορεί να καταστείλει τις δραστηριότητες του NF-κB, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και της φλεγμονής που σχετίζεται με τον καρκίνο, γεγονότα που οδηγούν στην επιβράδυνση της ανάπτυξης του καρκίνου. Ένας άλλος πιθανός αντικαρκινικός μηχανισμός του 1,25(OH)₂D₃

είναι μέσω της αλληλεπίδρασης με την οικογένεια των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του παράγοντα μετασχηματισμού του αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες προάγουν τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων αλλά αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους. Όπως υπογραμμίζεται παραπάνω, η 1,25(OH)₂D₃ έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τις οδούς σηματοδότησης TGF-β, έτσι μπορεί να προάγει τις δραστηριότητες καταστολής όγκων. Ακόμα, αξίζει να τονισθεί ότι οι περισσότεροι καρκίνοι δεν εκφράζουν μόνο το VDR αλλά επίσης και τα CYP27B1 και CYP24A1 επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να ρυθμίζουν τοπικά τα επίπεδα της 1,25(OH)₂D₃. Έχει λοιπόν αναφερθεί ότι οι καρκίνοι που εκφράζουν το CYP27B1 τείνουν να είναι καλά διαφοροποιημένοι, ενώ οι καρκίνοι που δεν εκφράζουν το CYP27B1 τείνουν να διαφοροποιούνται ελάχιστα, ενώ οι καρκίνοι που εκφράζουν το CYP24A1 τείνουν να είναι πιο επιθετικοί από αυτούς που δεν το κάνουν (Khammissa et al., 2018).

1.4.1. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ 1,25 (OH)₂D₃ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.

Φαρμακολογικά οι δόσεις της 1,25(OH)₂D₃ είναι απαραίτητες για την επαγωγή διαφοροποίησης και την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Για να επιτραπεί η κλινική χρήση της 1,25 (OH)₂D₃ για τη θεραπεία του καρκίνου, μια σειρά αναλόγων έχει σχεδιαστεί τα τελευταία χρόνια για να παρακάμψει τις παρενέργειες της υπερασβεστιαϊμίας που προκαλείται από υψηλές δόσεις της 1,25 (OH)₂D₃. Ιδανικά, δομικά ανάλογα έχουν βελτιωμένο αντιπολλαπλασιαστικό προφίλ και επίπεδα διαφοροποίησης και / ή μειωμένα αποτελέσματα ασβεστίου. Η αυξημένη δραστηριότητα μπορεί να είναι ένα αποτέλεσμα ενός αναλόγου με μεγαλύτερη αντοχή στη μεταβολική αποικοδόμηση, όπως τα ανάλογα φθοριωμένης πλευρικής αλυσίδας. Οι ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με τους συνενεργοποιητές μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη αντινεοπλασματική ισχύ. Μία άλλη δυνατότητα *in vitro* είναι ότι το ανάλογο είναι λιγότερο συνδεδεμένο με τη DBP που υπάρχει στο μέσο και ως εκ τούτου είναι περισσότερο διαθέσιμο για να προσληφθεί από τα κύτταρα. Τα *in vivo* ανάλογα με χαμηλή δέσμευση στη DBP μπορούν να φθάσουν γρήγορα και σε υψηλά επίπεδα στους ιστούς στόχους σε σύγκριση με 1,25 (OH)₂D₃, ενώ τα αποτελέσματα του ασβεστίου ελαχιστοποιούνται λόγω της ταχείας κάθαρσης του αναλόγου (Clinckspeer et al., 2013).

1.4.2. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΗΣ 1,25(OH)₂D₃ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.

Ο συνδυασμός χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με διαφορετικούς μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου ή στη χρήση φαρμάκων σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν την επιπρόσθετη ή συνεργιστική δράση του συνδυασμού 1,25(OH)₂D₃ με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως παράγοντες που διαταράσσουν τους μικροσωληνίσκους (paclitaxel, docetaxel), παράγοντες που καταστρέφουν το DNA (σισπλατίνη, καρβοπλατίνη, δοξορουμπικίνη), αντιμεταβολίτες (5-φθοροουρακίλη, κυταραβίνη και γεμισιταβίνη). Η βέλτιστη δράση παρατηρήθηκε όταν χορηγήθηκε 1,25(OH)₂D₃ πριν ή ταυτόχρονα με τη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, το 1,25(OH)₂D₃ ενισχύει τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της γ-ακτινοβολίας και ορισμένων αντιοξειδωτικών (Ma, Trump, & Johnson, 2010). Ο σημαντικός ρόλος των μικροσωληνίσκων στην κυτταρική διαίρεση τους καθιστά έναν επιθυμητό στόχο για τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που δρουν ενάντια στα ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα. Οι ταξάνες, όπως η πακλιταξέλη και η δοκεταξέλη, είναι σταθεροποιητές μικροσωληνίσκων, αυξάνουν τον πολυμερισμό και καταστέλλουν τη δυναμική των μικροσωληνίσκων, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M και τελικά στην απόπτωση. Το 1,25(OH)₂D₃ ενισχύει την αντινεοπλασματική δραστηριότητα και προάγει την απόπτωση της πακλιταξέλης μέσω μειωμένης έκφρασης του p21 σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη που καθιστά τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα σε παράγοντες που καταστρέφουν τους μικροσωληνίσκους. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η 1,25(OH)₂D₃ αυξάνει τη φωσφορυλίωση του BCL-2 και επομένως αδρανοποιεί την αντιαποπτωτική του λειτουργία του, ενώ ενισχύει την προ-αποπτωτική έκφραση BAX σε κύτταρα καρκίνου μαστού και προστάτη (Clincksproor et al., 2013).

1.4.3. VDR ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Πολλοί είναι πλέον οι μηχανισμοί που αποδεικνύουν την τεράστια σημασία του VDR και του ενεργού μεταβολίτη του, την καλσιτριόλη, στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία του καρκίνου. Δεδομένων όλων αυτών θα γίνει αναφορά στον τρόπο δράσης του VDR σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.

Καρκίνος του παχέος εντέρου: Τα έντερο είναι το όργανο με την υψηλότερη έκφραση του υποδοχέα της βιταμίνης D με αποτέλεσμα η καλσιτριόλη να έχει πολλές σημαντικές ομοιοστατικές δράσεις σε αυτό το όργανο. Πράγματι, ο

καρκίνος του παχέος εντέρου (colorectal cancer, CRC) σχετίζεται αρκετά συχνά με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D. Μάλιστα η καλσιτριόλη φαίνεται να παίζει ενεργό ρόλο στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, στην επαγωγή της απόπτωσης αλλά και στο να προάγει τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών καρκινικών σειρών παχέος εντέρου που εκφράζουν τον VDR μέσω ρύθμισης μεγάλου αριθμού γονιδίων. Ειδικότερα:

- Η καλσιτριόλη εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό αναστέλλοντας τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), αλλά και ενεργοποιώντας τους αναστολείς τους. Ακόμα προάγει την έκφραση γονιδίων που σταματούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1, ενώ καταστέλλει άμεσα και έμμεσα το C-MYC.
- Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι η καλσιτριόλη ανταγωνίζεται την οδό σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης, της οποίας η παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση είναι το αρχικό συμβάν και συνεισφέρει σημαντικά στην πρόοδο του CRC. Η καλσιτριόλη ασκεί αυτόν τον ανταγωνισμό δρώντας σε διάφορα επίπεδα: α) στην διάσπαση των μεταγραφικών συμπλοκών TCF / β-κατενίνης λόγω της επαγωγής σύνδεσης του VDR με τη β-κατενίνη, β) στην επαγόμενη από την καλσιτριόλη μείωση της περιεκτικότητας σε πυρηνική β-κατενίνη, μέσω ενίσχυσης της δέσμευσης της στα σημεία συνένωσης με την E-καντερίνη και γ) στη ρύθμιση του εξωκυτταρικού αναστολέα Wnt Dickkopf (DKK)
- Επίσης, επάγει ένα μονοπάτι σηματοδότησης που περιλαμβάνει μία ταχεία αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} και την επακόλουθη ενεργοποίηση της μικρής RhoA GTPase και των κινασών ROCK, ρ38MAPK και MSK1. Αξιοσημείωτα, η ενεργοποίηση αυτής της οδού εξαρτάται από το VDR και απαιτείται για την αναστολή της οδού Wnt / β-κατενίνης
- Η καλσιτριόλη ενεργοποιεί τη απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μέσω της αύξησης των προαποπτωτικών γονιδίων (BAK1, BAG1 και G0S2), της αρνητικής ρύθμισης των γονιδίων επιβίωσης και παρακρινικά, μέσω της παρεμβολής στην έκκριση της IL- 1β από μακροφάγα (Ferrer-Mayorga, Larriba, Crespo, & Muñoz, 2018).

Καρκίνος του δέρματος: Ο VDR διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο και στον καρκίνο του δέρματος καθώς ελέγχει τόσο το μονοπάτι της wnt / β-κατενίνης όσο και αυτό του sonic hedgehog (shh). Η ενεργοποίηση και των δυο μονοπατιών είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στο σχηματισμό καρκίνου του δέρματος. Αναλυτικότερα:

- Η β-κατενίνη συνδέεται με τις LEF/TCF θέσεις γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση. Ο VDR φαίνεται να “μετατοπίζει” τη σύνδεση της β-κατενίνης σε γονίδια που ελέγχονται από αυτό. Με αυτό τον τρόπο τόσο ο VDR όσο και η 1,25(OH)₂D₃ καταστέλλουν την ενεργοποιημένη από την β-κατενίνη δραστηριότητα του LEF1/TCF.
- Ομοίως το μονοπάτι του shh ρυθμίζεται από το VDR και την 1,25(OH)₂D₃ οι οποίοι καταστέλλουν την έκφραση του shh και του Gli1, όπου ο τελευταίος αποτελεί βασικό παράγοντα της μεταγραφικής οδού του SHH.
- Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η απαλοιφή του VDR μειώνει την ικανότητα των κερατινοκυττάρων να διαγράφουν μεταλλάξεις του DNA που προκύπτουν από την UVB. Αυτό εν μέρει οφείλεται στην ικανότητα του 1,25(OH)₂D₃/VDR να επάγει ένα από τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA το XPC (Biphenyls, 2015)

1.4.4. VDR ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το ενδιαφέρον λοιπόν για τη συσχέτιση των επιπέδων της βιταμίνης D και του υποδοχέα VDR με τον καρκίνο έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια (Sharma, Fretwell, Crees, Kerege, & Klapper, 2010). Προσπάθειες συσχέτισης των επιπέδων του VDR γίνονται και για τον καρκίνο του θυρεοειδούς και κυρίως του θηλώδους και του θυλακιώδους καρκινώματος που αποτελούν τους πιο κοινούς ενδοκρινείς όγκους (Izkhakov et al., 2016). Το VDR εκφράζεται στο φυσιολογικό θυρεοειδή ιστό. Αυξημένη έκφραση της VDR και της CYP27B1 πρωτεΐνης σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό παρατηρήθηκε στο ανθρώπινο θηλώδες καρκίνωμα. Πρόσφατα, αυτά τα ευρήματα επεκτάθηκαν και σε άλλους υπότυπους του καρκίνου του θυρεοειδούς όπου πραγματοποιήθηκε σύγκριση του προφίλ έκφρασης του VDR, CYP25A1 και CYP27B1 με το φυσιολογικό ιστό, το θυλακιώδες αδένωμα και τους υπότυπους του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς (θηλώδεις καρκίνωμα με θηλώδες ή θυλακιώδη διαμόρφωση). Σε σχέση με το φυσιολογικό θυρεοειδή ιστό παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων του VDR, το CYP24A1 και του CYP27B1 τόσο στο θυλακιώδες αδένωμα όσο και στο διαφοροποιημένο καρκίνο. Μάλιστα υψηλή έκφραση της VDR πρωτεΐνης εντοπίστηκε στο 21% του θυλακιώδους αδενώματος και στο 66% του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς ενώ η έκφραση της ήταν αρκετά χαμηλή στο φυσιολογικό ιστό. Το υψηλό αυτό προφίλ του VDR υποδηλώνει την ισχυρή αντινεοπλασματική του απόκριση, αυξάνοντας την τοπική διαθεσιμότητα και δράση της 1,25(OH)₂D₃. Η μετάσταση αντιπροσωπεύει ένα κεντρικό βήμα στην πρόοδο του καρκίνου. Ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς, συχνά εξαπλώνεται τοπικά στους λεμφαδένες.

Ερευνητές παρατήρησαν μειωμένη έκφραση της VDR πρωτεΐνης σε ιστό όγκου από μετάσταση λεμφαδένων σε σύγκριση με τον πρωτεύοντα θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Πρωτογενής ιστός του μεταστατικού θηλώδους καρκίνου συγκρινόμενος με αυτόν τον τύπο καρκίνου χωρίς μεταστάσεις κατέδειξε μειωμένη έκφραση VDR και ρ21 καθώς και υψηλότερη έκφραση Kι67 (δείκτης καρκινικού πολλαπλασιασμού). Εκτός από την μειωμένη έκφραση του VDR, επίσης μειωμένη έκφραση των CYP24A1 και CYP27B1 παρατηρήθηκε στο μεταστατικό θηλώδες καρκίνωμα. Η γονιδιακή έκφραση του VDR συσχετίστηκε θετικά με τα CYP24A1 και CYP27B1 και η γονιδιακή έκφραση του αναστολέα κυτταρικού κύκλου του ρ21 συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση VDR και CYP24A1. Οι τρέχουσες αποδείξεις συνεπώς υποδηλώνουν μια μειωμένη ευαισθησία 1,25 (OH)₂D₃ σε πρωτογενείς όγκους επιρρεπείς σε μετάσταση. Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από επιθετική ανάπτυξη με την παρουσία μακρινών μεταστάσεων ήδη κατά τη διάγνωση. Σε σύγκριση με τον καλά διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, υπάρχει μεγαλύτερη από τριπλάσια αύξηση της έκφρασης πρωτεΐνης Kι67. Η πλειονότητα των αναπλαστικών καρκίνων του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από αρνητική έκφραση VDR και αρνητική έκφραση του CYP24A1 σε σύγκριση με τον διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς. Επιπλέον, σε αναπλαστικούς ιστούς καρκίνου του θυρεοειδούς με υψηλή έκφραση (> 30%) Kι67 και σε περιπτώσεις αναπλαστικού καρκίνου θυρεοειδούς με απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά τη διάγνωση ήταν πιο συχνή η τριπλή αρνητική (VDR, CYP24A1 και CYP27B1) χρώση, αποδεικνύοντας ότι η εξέλιξη του υψηλά πολλαπλασιαζόμενου και ο μεταστατικού αναπλαστικού καρκίνου του θυρεοειδούς χαρακτηρίζεται από την απώλεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη σηματοδότηση της βιταμίνης D ή στην ευαισθησία για το εξωγενές 1,25 (OH)₂D₃. Ανακεφαλαιώνοντας, η υψηλή έκφραση του mRNA αλλά και της πρωτεΐνης του VDR, CYP24A1 και CYP27B1 σε καλοήθεις όγκους αλλά και στο διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς προτείνει την τοπική αντineοπλασματική δράση της 1,25(OH)₂D₃. Επίσης η ύπαρξη μετάστασης στο θηλώδες καρκίνωμα συσχετίστηκε με μειωμένη έκφραση των βασικών μορίων λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό και στη σηματοδότηση της βιταμίνης D. Τέλος η εμφάνιση μετάστασης στην περίπτωση του αναπλαστικού καρκίνου σχετίστηκε με ολοκληρωτική απώλεια των πρωτεϊνών σηματοδότησης της βιταμίνης D (Clinckspoor et al., 2013).

1.4.5. ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Οι παρενέργειες της χρήσης ασβεστίου σε υψηλές συγκεντρώσεις εμποδίζουν την κλινική εφαρμογή του $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ως αντιπολλαπλασιαστικού παράγοντα. Ωστόσο, έχει σχεδιαστεί μια σειρά δομικών αναλόγων με διακριτά αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα. Σε αρκετές μελέτες, τα ανάλογα έδειξαν ότι είναι δραστικά όσο αφορά τα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα σε χαμηλότερες, κλινικά εφικτές, συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την μητρική ένωση $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Η μελέτη του μη στεροειδούς αναλόγου 17-μεθυλ D-ring CD578 σε κύτταρα καρκίνου του θυρεοειδούς πραγματοποιήθηκε καθώς έχει αποδειχθεί ότι η ένωση αυτή είναι 20 φορές ισχυρότερη στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των MCF-7 κυττάρων στο καρκίνου του μαστού και είναι 100 φορές λιγότερο ασβεστιομυϊκή *in vivo* σε σύγκριση με τη μητρική ένωση. Η θεραπεία με το ανάλογο CD578 σε 1000 φορές χαμηλότερη συγκέντρωση μείωσε εξίσου τον αριθμό και το μέγεθος των αποικιών που σχηματίστηκαν σε κύτταρα HT_h74 (κυτταρική σειρά του αναπλαστικού καρκίνου του θυρεοειδούς), ενώ αυτή η επίδραση χάθηκε σχεδόν πλήρως στα κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 10^{-9}M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Επίσης ερευνητές έδειξαν ότι *in vitro* θεραπεία με το αναλογικό JK 1624 F (2) - 2 επηρέασε την έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER β) σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του θυρεοειδούς, υποδηλώνοντας ένα ρόλο για τη βιταμίνη D στην ανάπτυξη κυττάρων καρκίνου του θυρεοειδούς μέσω τροποποιημένης σηματοδότησης οιστρογόνου-ER. Τέλος, ο περιορισμός της δόσης λόγω σοβαρών παρενεργειών αποτελεί ένα μειονέκτημα για τους αντινεοπλασματικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του αναπλαστικού καρκίνου του θυρεοειδούς. Οι συνδυασμένες θεραπείες με διαφορετικούς αντινεοπλασματικούς παράγοντες σε ανεκτές δόσεις θα μπορούσαν να αποτελέσουν λύση (Clinckspoor et al., 2013).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Είναι φανερό πλέον ότι το ενδιαφέρον των ερευνών τα τελευταία χρόνια έχει προσανατολισθεί όχι μόνο στις φυσιολογικές δράσεις του υποδοχέα της βιταμίνης D, αλλά και στην αντικαρκινική του ικανότητα η οποία αποδεικνύεται σταδιακά σ' όλο και περισσότερους τύπους καρκίνου.

Σκοπός της εργασίας αυτής, ήταν η αναζήτηση της έκφρασης του VDR στο θυρεοειδικό φυσιολογικό και καρκινικό ιστό και η πιθανότητα χρήσης της έκφρασης του ως βιοδείκτη διάγνωσης και πρόγνωσης για τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Αναλυτικότερα, η έκφραση του VDR συσχετίστηκε με τα κλινικά

και ιστολογικά χαρακτηρίστηκα των ασθενών και οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν το σύστημα TNM, το σημείο διήθησης, οι επιμέρους παθήσεις του θυρεοειδούς, η ύπαρξη καλοήθους ή κακοήθους όγκου, καθώς η ηλικία και το φύλο.

Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε περιστατικά θυρεοειδικού ιστού, τα οποία μας παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Αθηνών και ύστερα από ανοσοϊστοχημική επεξεργασία, μικροσκοπική απεικόνιση, στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οδηγηθήκαμε στα συμπεράσματα που θα αναλυθούν παρακάτω.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Μηχάνημα αποκάλυψης (DAKO)
- Κλίβανος 60°C (LABTech)
- Αναδευτήρας (Heidolph)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus)

3.2. ΥΛΙΚΑ

3.2.1. ΧΗΜΙΚΑ

- Αιθανόλη 70% 80% 96% και 100% (Applichem)
- Ξυλόλη (Sigma)
- H₂O₂ (Sigma)
- DAB (Cell signaling)
- Αιματοξυλίνη (Thermo scientific)
- DPX (BDH)

3.2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ

Για την παρασκευή 3% υπεροξειδίου (H₂O₂) σε falcon 50 ml τοποθετήσαμε 45 ml dH₂O και 5 ml H₂O₂ 30 %

- BLOCKING

Για την παρασκευή 200 blocking ξεπαγώσαμε 1,5 ml NGS και στη συνέχεια αναμίχθηκε με 30 ml PBS

- PBS: Διάλυμα της Gimco 10X που αραιώθηκε σε 1X

- DAB

Για την παρασκευή του DAB στο αντίστοιχο buffer που περιέχει το kit για κάθε 1ml τοποθετήσαμε 1 σταγόνα που αντιστοιχεί περίπου σε 50 ml από το χρωμογόνο

- ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ: Κάθε φορά πριν χρησιμοποιηθεί γινόταν πρώτα διήθηση

- ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Για την παρασκευή 70% αιθανόλη σε τελικό όγκο 200ml τοποθετήθηκε 140 ml αιθανόλη και 60 ml dH₂O

Για την παρασκευή 80% αιθανόλη σε τελικό όγκο 200 ml τοποθετήθηκε 160 ml αιθανόλη και 40 ml dH₂O

Για την παρασκευή 96% αιθανόλη σε τελικό όγκο 200 ml τοποθετήθηκε 192 ml αιθανόλη και 8 ml dH₂O

Για την παρασκευή 100% αιθανόλη σε τελικό όγκο 200 ml τοποθετήθηκε μόνο αιθανόλη

3.2.3. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- **ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ**

Αντίσωμα anti-VDR mouse monoclonal I₉G₂₈ (SC-13133) (D-6)

- **ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ**

Δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse, SignalStain Boost Detection Reagent

3.2.4. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Falcons
- Eppendorfs
- Πιπέτες (20, 200, 1000 μl)
- Καλυπτρίδες
- Διηθητικό χαρτί
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου-
- Πάραφιλμ

3.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3.3.1. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί τεχνική ιστού ευρύτατα χρησιμοποιούμενη στην ιστολογία και στην παθολογική ανατομική και ασχολείται με την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και ιστών. Με την ανοσοϊστοχημεία επιτυγχάνεται η ανίχνευση πρωτεϊνών και η ενδοκυττάρια κατανομή τους. Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων – στόχων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ειδικές χρωστικές που καθιστούν έτσι ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων αυτών.

1^η ΜΕΡΑ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Για την πραγματοποίηση αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη δειγμάτων θυρεοειδικού φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Τα δείγματα αυτά τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 60°C για περίπου δεκαπέντε λεπτά. Ακολούθως τα πλακάκια τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα αποκάλυψης σε pH=6 που προτιμάται για το VDR και βασίζεται στα κιτρικά προκειμένου να επιτευχθεί η αποπαραφίνωση. Συγκεκριμένα το μηχάνημα αυτό πραγματοποιεί τα βήματα της αποπαραφίνωσης δηλαδή επωάζει τα πλακάκια σε ξυλόλη και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της ενυδάτωσης όπου τα πλακάκια ξεπλένονται σε αιθανόλη 100°C, μετά σε 96°C, σε 80°C και τέλος σε 70°C. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία ακολουθούν δυο ξεπλύματα με νερό. Επειδή είναι απαραίτητο να μην υπάρχει background στο δείγμα μας, οι τομές καλύπτονται με H₂O₂ 3% για δέκα λεπτά και στη συνέχεια ξεπλένουμε δυο φορές με dH₂O και μια με PBS. Ύστερα από αυτή τη διαδικασία ακολουθεί το blocking solution που γίνεται πριν την κάλυψη της τομής από το 1^ο αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), με σκοπό να αδρανοποιηθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Στα συγκεκριμένα πειράματα η επώαση κράτησε 1 ώρα και τοποθετήθηκαν περίπου 200μl σε κάθε πλακάκι. Μετά την επώαση και χωρίς καθόλου ξέπλυμα ούτε με dH₂O ούτε με PBS πάνω στα πλακάκια τοποθετήθηκε το 1^ο αντίσωμα και καλύφθηκαν με μεμβράνη πάραφιλμ όπου έγινε επώαση overnight στους 4°C.

2^η ΜΕΡΑ ΑΝΟΣΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Την επόμενη μέρα οι τομές με τον ιστό επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά και έγιναν 3 ξεπλύματα με PBS που απείχαν μεταξύ τους, περίπου 5 λεπτά. Έπειτα, οι τομές με τον ιστό επωάστηκαν με το 2^ο αντίσωμα, το οποίο παρέμεινε για 30 με 35 λεπτά. Συνέχεια αυτού ήταν πάλι 3 ξεπλύματα με PBS.

DAB

Η DAB (3,3'-διαμινοβενζιδίνη) οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδάσης και υπεροξειδίου του υδρογόνου με αποτέλεσμα την εναπόθεση ενός καφέ, αδιάλυτου σε αλκοόλη ιζήματος στη θέση της ενζυματικής δραστηριότητας. Η DAB (3,3'-διαμινοβενζιδίνη) παράγει ένα σκοτεινό καφέ προϊόν αντίδρασης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ανοσοϊστοχημικές όσο και για εφαρμογές στυπώματος. Επόμενο βήμα λοιπόν, ήταν η επώαση με DAB για 10 με 12 λεπτά. Η τοποθέτηση της DAB έγινε με ιδιαίτερη προσοχή λόγω της καρκινογόνου της δράσης. Έπειτα έγινε ξεπλυμα της DAB 2 φορές με dH₂O και ακολούθησε το στάδιο της αιματοξυλίνης.

ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ

Η αιματοξυλίνη είναι η πλέον διαδεδομένη χρώση και θεωρείται χρώση ρουτίνας Είναι συνδυασμός δύο διαφορετικών χρωστικών της Αιματοξυλίνης και της Ηωσίνης. Οι δύο χρωστικές εκμεταλλεύονται τις διαφορές της χημικής σύστασης του ιστού και τον βάφουν με διαφορετικά χρώματα. Η σύνδεση των χημικών στοιχείων του ιστού με τις χρωστικές είναι ιοντική δέσμευση και περιλαμβάνει την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των ιόντων αντίθετου φορτίου, ένα από τα οποία βρίσκεται στον ιστό, και το δεύτερο στην χρωστική. Πριν την εφαρμογή της αιματοξυλίνης, γινόταν διήθηση αυτής, με σκοπό την αποφυγή δημιουργίας ιζημάτων τα οποία θα κατέστρεφαν τη σαφή εικόνα που θα αντικρίζαμε στο οπτικό μικροσκόπιο. Για να εξασφαλιστεί ο κορεσμός των χημικών θέσεων δέσμευσης, η χρωστική εφαρμόζεται περισσότερο από όσο χρειάζεται, με αποτέλεσμα την υπερχρώση (overstaining) των ιστών. Η πλεονάζουσα ποσότητα της χρωστικής απομακρύνεται με εμβάπτιση των τομών σε αλκαλικό περιβάλλον (νερό βρύσης). Στη συγκεκριμένη περίπτωση η χρήση της αιματοξυλίνης βοηθούσε στο διαχωρισμό με το καφέ χρώμα της DAB, καθώς αυτή είχε μπλε-μωβ χρώμα. Όπως προαναφέρθηκε, λοιπόν επόμενο βήμα ήταν η εμβάπτιση στο νερό και έπειτα η αφυδάτωση. Στην αφυδάτωση τα πλακάκια τοποθετήθηκαν σε δοχεία που περιέχουν αιθανόλη για περίπου 3 λεπτά με την ακόλουθη σειρά 70°C, 80°C, 96°C και 100°C. Καλό είναι να εισέρχονται σε περισσότερα από ένα δοχεία των 100°C

αιθανόλης προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη αφυδάτωση. Τέλος, πραγματοποιείτο η επώαση στην ξυλόλη και σταδιακά σε κάθε πλακάκι τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα, η οποία κόλλησε χάρη στο DPX και ύστερα από λίγα λεπτά ήταν έτοιμα να αξιολογηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο.

3.3.2. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Από τη στιγμή που έλαβε τέλος η διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας, επόμενο βήμα ήταν η παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Εκεί, αναλύθηκε κάθε περιστατικό ξεχωριστά και ελέγχθηκε ο φυσιολογικός αλλά και ο παθολογικός ιστός. Η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση πραγματοποιήθηκε μετρώντας τουλάχιστον 1000 καρκινικά κύτταρα σε κάθε περίπτωση από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές με τυφλό τρόπο, που δεν γνώριζαν τα κλινικά δεδομένα. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα VDR όταν περισσότερα από 5% των καρκινικών κυττάρων σε κάθε ιστολογική τομή παρουσίαζαν θετική χρώση. Ο χαρακτηρισμός έγινε ως εξής. Για να προσδιοριστεί η διαβάθμιση της έντασης της χρώσης στον ιστό, συμβολίσαμε κάθε περιστατικό με ένα σταυρό όταν η ένταση δεν ήταν μεγάλη, με δύο όταν ήταν μέτρια και με τρεις όταν ήταν ιδιαίτερα έντονη. Ταυτόχρονα, με ποσοστά αξιολογήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που ήταν θετικά στη χρώση. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά συγκεντρώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στη στατιστική ανάλυση.

3.3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η ανοσοδραστικότητα εκτιμήθηκε με το H-score που αποτελεί το γινόμενο της έντασης με το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά στη χρώση. Έτσι δημιουργήθηκε ένα θεωρητικό εύρος από το 0 έως το 300. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ορίστηκε ως cut off τιμή το 100 και όλες οι τιμές που βρίσκονταν από το 0 μέχρι το 100 θεωρήθηκαν χαμηλής έκφρασης, low H-score, ενώ από το 101 μέχρι το 300 υψηλής έκφρασης, high H-score.

3.3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS22. Η δοκιμασία chi-square χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η συσχέτιση της έκφρασης του VDR με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές που εμφάνιζαν p-value (p) μικρότερη του 0,05 ($P < 0,05$).

3.3.5. ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΠΙΝΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η Ταξινόμηση TNM είναι ένα ανατομικά βασισμένο σύστημα που καταγράφει την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου, την επέκταση του στους τοπικούς λεμφαδένες και την απουσία ή παρουσία μεταστάσεων. Το σύστημα σταδιοποίησης που χρησιμοποιείται συχνότερα για τον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι το σύστημα TNM AJCC (American Joint Committee on Cancer), το οποίο βασίζεται σε 3 βασικά στοιχεία πληροφοριών:

- T (Tumor): υποδηλώνει το μέγεθος- την έκταση του όγκου και συνήθως υπάρχουν 4 κύρια στάδια από T1 έως T4.

T1 = Το μέγεθος του όγκου είναι 2 cm πλάτος ή μικρότερο

T2 = Το μέγεθος του όγκου είναι πλάτος 2-4 cm

T3 = Το μέγεθος του όγκου είναι μεγαλύτερο από 4 cm ή έχει αρχίσει να αναπτύσσεται εκτός του θυρεοειδούς

T4 = Ο όγκος (οποιουδήποτε μεγέθους) έχει αναπτυχθεί εκτεταμένα πέρα από τον θυρεοειδή αδένα σε τοπικούς ιστούς αυχένα ή ο όγκος έχει αυξηθεί πίσω προς τη σπονδυλική στήλη ή σε τοπικά μεγάλα αιμοφόρα αγγεία

- N(Nodes) : υποδηλώνει την πιθανότητα ο καρκίνος να έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες.

N0 = Δεν υπάρχει εξάπλωση στους τοπικούς λεμφαδένες

N1 = Ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε τοπικούς λεμφαδένες

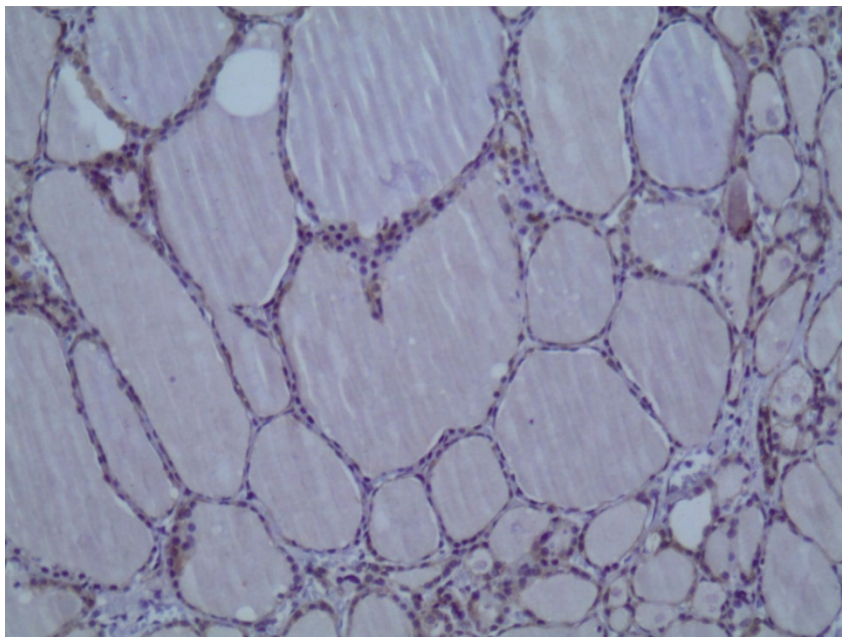
- M (metastasis) : υποδηλώνει την πιθανότητα εξάπλωσης του καρκίνου σε άλλα μέρη του σώματος όπως οι πνεύμονες ή τα κόκαλα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΗΣΗ

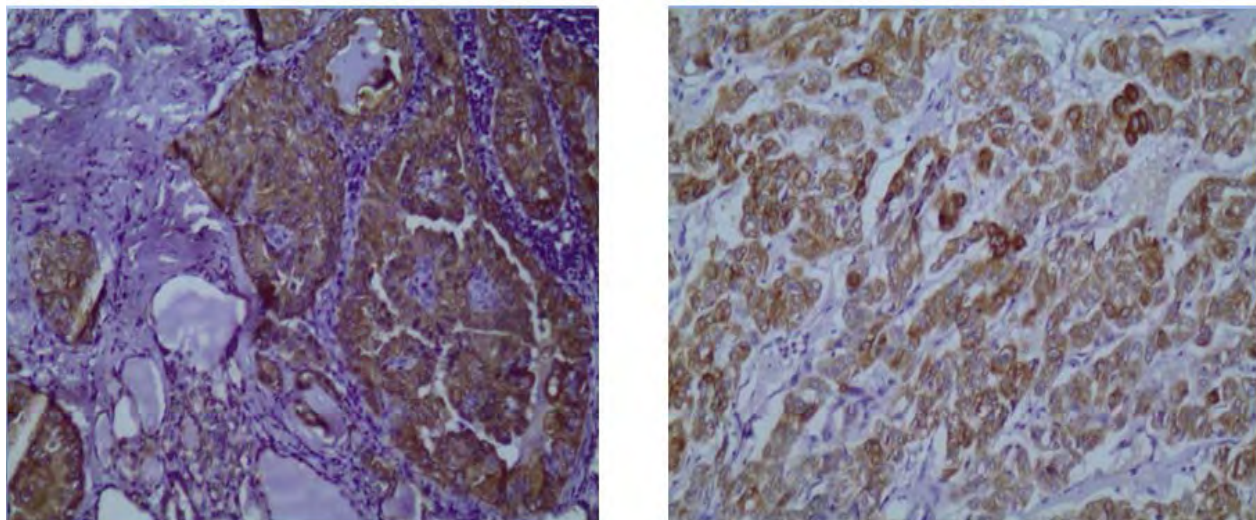
Όπως περιγράφηκε και παραπάνω πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία έναντι της πρωτεΐνης VDR όπου και βάφτηκαν 115 περιστατικά θυρεοειδή αδένια. Στο οπτικό μικροσκόπιο κάθε περιστατικό αναλύθηκε ξεχωριστά και ελέγχθηκε και ο φυσιολογικό αλλά και ο παθολογικός ιστός. Ενδεικτικές εικόνες από την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο είναι οι ακόλουθες

Στην εικόνα 1 που απεικονίζεται παρακάτω βλέπουμε ένα φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό όπου διακρίνονται το θυλάκιο με τα θυλακικά κύτταρα και το κολλοειδές. Σε αυτά αναγνωρίζεται ήπια θετική κυτταροπλασματική και πυρηνική ανοσοχρώση της VDR πρωτεΐνης στα θυλακικά κύτταρα.



Εικόνα 1 : Αντιπροσωπευτική ανοσοϊστοχημική απεικόνιση φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού.

Στις εικόνες 2 και 3 αναγνωρίζεται αυξημένη κυτταροπλασματική έκφραση της VDR πρωτεΐνης σε κακοήγη νεοπλασματικά κύτταρα θυρεοειδούς.



Εικόνα 2-3 : Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση θυρεοειδικού ιστού με καρκινικές εστίες.

4.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε βάσει των δεδομένων που πήραμε από την ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο και τον χαρακτηρισμό των περιστατικών με την μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα «Τεχνικές». Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε ο παρακάτω πίνακας στον οποίο έγινε η συσχέτιση της χαμηλής και της υψηλής έκφρασης του VDR με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία.

Πίνακας: Στατιστικά Αποτελέσματα των Δεδομένων από την Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση.

Clinicopathological characteristics	VDR low H-score	VDR High H-score	p-value
Tumor			
T1	12	36	0,454
T2	7	8	
T3	1	3	
T4	1	2	
Node			
N0	19	33	0,033
N1	2	17	
Capsule Invasion			
NO	11	29	0,029
YES	1	21	
Lymph Invasion			
NO	11	32	0,018
YES	0	18	
Vessel Invasion			
NO	11	45	0,274
YES	0	5	
Πάθηση			
ΘΗΛΩΔΕΣ	10	49	0,001
ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ	4	1	
ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ	2	0	
ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ	3	1	
Hashimoto	6	1	
Οζώδης υπερπλασία	32	3	
Malignant/Benign			
Καρκίνος	21	51	0,001
Οζ.Υπερπλασία	33	3	
Hashimoto	6	1	
Gender			
	17	17	0,839
	34	37	
Age			
	28	27	0,365
	31	21	

Τα συμπεράσματα λοιπόν που προκύπτουν από τον παραπάνω πίνακα είναι ότι η θετικότητα του VDR εντοπίστηκε σε 90 από τα 115 περιστατικά θυρεοειδή αδένια (H-score > 0). Από τα 115 τα 55 εμφάνιζαν υψηλή VDR ανοσοδραστικότητα. Η κυτταρική εντόπιση του VDR είναι κυτταροπλασματική. Η ανοσοδραστικότητα του VDR είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ των καλοηθών και των κακοηθών όγκων του θυρεοειδή αδένια ($p=0,001$). Μάλιστα, υψηλή έκφραση του VDR παρατηρήθηκε και στις επιμέρους παθήσεις του θυρεοειδή ($p=0,001$) με υψηλότερη αυτή του θηλώδους καρκινώματος. Συγχρόνως η έκφραση του VDR σχετίστηκε με την καψική διήθηση ($p=0,029$) αλλά και με την λεμφαγγειακή ($p=0,018$). Ωστόσο, δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση του VDR με την αγγειακή διήθηση ($p=0,274$).

Στατιστικά σημαντική ήταν η συσχέτιση της υψηλής έκφρασης του VDR με την παρουσία μετάστασης στους λεμφαδένες ($p=0,033$) αλλά όχι με την έκταση του όγκου ($p=0,454$).

Τέλος, δεν εντοπίστηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VDR με τη ηλικία και το φύλο των ασθενών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο VDR, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων διαδραματίζει ένα αρκετά σημαντικό ρόλο τόσο στην ομοίωση του ασβεστίου και των οστών όσο και στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Όλο και περισσότερες έρευνες των τελευταίων χρόνων υποστηρίζουν ότι ο ενεργός υποδοχέας του VDR έχει την ικανότητα να ελαττώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, αλλά και να συμμετέχει στη θεραπεία αυτού. Πράγματι, τα αποτελέσματα των *in vivo* και *in vitro* μελετών δείχνουν ότι ο VDR αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγειογένεση, ενώ προάγει τη διαφοροποίηση και την απόπτωση σε καρκινικούς ιστούς (Khammissa et al., 2018).

Συγχρόνως, δεδομένα από έρευνες τόσο στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Ferrer-Mayorga et al., 2018) όσο και του δέρματος (Biphenyls, 2015) έρχονται να συμπληρώσουν τα ήδη υπάρχοντα στοιχεία. Καθώς, αποδεικνύουν ότι ο VDR σε συνεργασία με την καλσιτριόλη συμβάλει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και στην ενεργοποίηση της απόπτωσης στον CRC, ενώ φαίνεται να ελέγχει το μονοπάτι της β-κατενίνης και του sonic hedgehog που εμπλέκονται στο σχηματισμό καρκίνου του δέρματος.

Ως εκ τούτου, κατά τη διάρκεια της μελέτης που έλαβε χώρα στα πλαίσια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η πιθανότητα ο VDR να αποτελεί βιοδείκτη διάγνωσης για τις παθήσεις του

θυρεοειδή και ειδικότερα του καρκίνου. Για την επίτευξη του στόχου αυτού μελετήθηκαν περιστατικά θυρεοειδικού ιστού στα οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική επεξεργασία και στην συνέχεια απεικόνιση στο οπτικό μικροσκόπιο και στατιστική ανάλυση. Από τα δεδομένα που αποκτήθηκαν η έκφραση του VDR συσχετίστηκε με τα κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών τα οποία περιλαμβάνουν το σύστημα TNM, το σημείο διήθησης, τις επιμέρους παθήσεις, την ύπαρξη καλοήθους ή κακοήθους όγκου καθώς και την ηλικία και το φύλο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής ο VDR αποδείχθηκε ότι αποτελεί βιοδείκτη διάγνωσης για τον καρκίνο του θυρεοειδή. Συγκεκριμένα, η έκφραση του VDR συσχετίστηκε με το είδος της πάθησης του ιστού αυτού (θηλώδες θυλακίωδες, αναπλαστικό, μυελώδες καρκίνο του θυρεοειδή, θυρεοειδίτιδα Hashimoto αλλά και οζώδη υπερπλασία), αλλά και με την διάκριση ανάμεσα σε καλοήθεις και κακοήθεις καταστάσεις. Περιγράφηκε επίσης, για πρώτη φορά μια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VDR και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων που είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για την πρόγνωση και την θεραπεία των ασθενών. Αναλυτικότερα, η αυξημένη έκφραση του VDR συσχετίστηκε με το ποσοστό των προσβεβλημένων λεμφαδένων, ενώ σημειώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις τόσο με την παρουσία καψικής διήθησης όσο και με την λεμφική διήθηση. Αντίθετα, ο VDR δεν φάνηκε να μπορεί να συσχετισθεί με την αγγειακή διήθηση.

Μέσα στους επόμενους στόχους, όσο αφορά τη συνέχεια της έρευνας, είναι η συσχέτιση του VDR με τις επιμέρους παθήσεις του θυρεοειδή. Δηλαδή, να μπορεί να γίνει διάκριση ανάμεσα στο θηλώδες, στο θηλακίωδες, στο αναπλαστικό και στο μυελώδες καρκίνο του θυρεοειδή, ακόμα και στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto αλλά και στη οζώδη υπερπλασία. Επίσης, από τα σημαντικά ευρήματα της εργασίας αυτής, θα μπορούσε να εξεταστεί η συσχέτιση του VDR με τους κλινικοπαθολογικούς αυτούς παράγοντες και σε άλλους τύπους καρκίνου που όμως γνωρίζουμε ότι ο VDR έχει ενεργό ρόλο τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία του καρκίνου. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη ότι μια από τις φυσιολογικές λειτουργίες του VDR είναι η ομοιοστάση του ασβεστίου, διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού που συμμετέχει στον καρκίνο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μελλοντικό στόχο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Biphenyls, C. P. (2015). HHS Public Access, 91(2), 165–171.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.037>.Reactivity
2. Bizhanova, A., & Kopp, P. (2009). The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid. *Endocrinology*, 150(3), 1084–1090.
<http://doi.org/10.1210/en.2008-1437>
3. Clinckspoor, I., Verlinden, L., Mathieu, C., Bouillon, R., Verstuyf, A., & Decallonne, B. (2013). *Vitamin D in thyroid tumorigenesis and development. Progress in Histochemistry and Cytochemistry* (Vol. 48). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2013.07.001>
4. Ferrer-Mayorga, G., Larriba, M. J., Crespo, P., & Muñoz, A. (2018). Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (June), 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.002>
5. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 685–704. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.2>
6. Izhakov, E., Somjen, D., Sharon, O., Knoll, E., Aizic, A., Fliss, D. M., ... Stern, N. (2016). Vitamin D receptor expression is linked to potential markers of human thyroid papillary carcinoma. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 159, 26–30.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.016>
7. Khammissa, R. A. G., Fourie, J., Motswaledi, M. H., Ballyram, R., Lemmer, J., & Feller, L. (2018). The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9276380>
8. Ma, Y., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2010). Vitamin D in combination cancer treatment. *Journal of Cancer*, 1(1), 101–107.
<https://doi.org/10.7150/jca.1.101>

9. Martirosyan, N. L., Patel, A. A., Carotenuto, A., Kalani, M. Y. S., Belykh, E., Walker, C. T., ... Theodore, N. (2016). Genetic Alterations in Intervertebral Disc Disease. *Frontiers in Surgery*, 3(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00059>
10. Miyamoto, K., Kesterson, R. A., Yamamoto, H., Taketani, Y., Nishiwaki, E., Tatsumi, S., ... Pike, J. W. (1997). Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol. Endocrinol.*, 11(0888–8809 (Print)), 1165–1179. <https://doi.org/10.1210/mend.11.8.9951> [doi]
11. Morand, G. B., Daniela, S., & Michael, P. (2014). Insights into genetic and epigenetic determinants with impact on vitamin D signaling and cancer association studies : the case of thyroid cancer, 4(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00309>
12. Olefsky, J. M. (2001). Nuclear Receptor Minireview Series. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36863–36864. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100047200>
13. Robinson-Rechavi, M. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, 116(4), 585–586. <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>
14. Sharma, V., Fretwell, D., Crees, Z., Kerege, A., & Klopper, J. P. (2010). Thyroid cancer resistance to vitamin D receptor activation is associated with 24-hydroxylase levels but not the ff FokI polymorphism. *Thyroid : Official Journal of the American Thyroid Association*, 20(10), 1103–1111. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.0096>
15. Σιβρίδης Ε. (2007), Παθολογική Ανατομική, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης. Τόμος 2^{ος}, σ. 744-761
16. Moore K. Dalley A. Agur A, (2013), Κλινική Ανατομία, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, 2^η Ελληνική Έκδοση, σ.1097-1098
17. Guyton and Hall, (2013), Ιατρική Φυσιολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισσιανού, 12^η Ελληνική Έκδοση, σ. 831-838

18. Boocker. Denk. Heitz, (2007) Παθολογική Ανατομική, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, σ.569-598