



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα:

«Μελέτη πολυμορφισμών των γονιδίων REN, AGT, AT1R και AT2R σε ασθενείς με καρκίνο του νεφρού»

Αναστασίου Ζωή - Ιωάννα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία (Επιβλέπουσα)
- κ. Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
- κ. Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

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

Λάρισα, Οκτώβριος, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

“Study of the REN, AGT, AT1R and AT2R polymorphisms in patients with Renal Cell Carcinoma”

By

Anastasiou Zoe Joanna

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία (Επιβλέπουσα)
- κ. Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
- κ. Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

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, 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον Καθηγητή Ανοσολογίας κύριο Ματθαίο Σπελέτα που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών των Κλινικών Εφαρμογών Μοριακής Ιατρικής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κύριο Γεώργιο Κουκούλη, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, καθώς και για την ερευνητική του ανατροφοδότηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια, κυρία Μαρία Σαμαρά, για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε τον τελευταίο χρόνο, όπως και για τις προκλήσεις που μου έθεσε, ώστε να ξεπεράσω τον εαυτό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, κυρίες Μαρία Παπαθανασίου και Αικατερίνη Χατζούλη, για την πολύτιμη βοήθειά τους, την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα και την άψογη συνεργασία μας που συνέβαλλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ.06
ABSTRACT	σελ.07
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
1.1 Ανατομία του Νεφρού	σελ.08
1.2 Ιστολογία του Νεφρού	σελ.13
1.3 Φυσιολογία του Νεφρού	σελ.16
1.4 Καρκίνος του Νεφρού	σελ.17
1.4.1 Επιδημιολογικά Στοιχεία	σελ.17
1.4.2 Αιτιοπαθογένεια	σελ.19
1.4.3 Γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται με το RCC	σελ.20
1.4.4 Ιστοπαθολογία	σελ.21
1.4.5 Υπότυποι	σελ.22
1.4.6 Σταδιοποίηση – Προγνωστικοί Παράγοντες	σελ.25
1.4.7 Θεραπεία	σελ.28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
2.1 Το Σύστημα Ρενίνης – Αγγαιοτενσίνης (RAAS)	σελ.31
2.1.1 Λειτουργία Συστήματος Ρενίνης Αγγαιοτενσίνης (RAAS)	σελ.32
2.1.2 Ρενίνη	σελ.33
2.1.3 Αγγαιοτενσινογόνο	σελ.34
2.1.4 Υποδοχέας Αγγαιοτενσίνης II Τύπου I (AT1R)	σελ.35
2.1.5 Υποδοχέας Αγγαιοτενσίνης II Τύπου II (AT2R)	σελ.36
2.2 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide polymorphisms, SNPs) των γονιδίων του συστήματος RAAS	σελ.37
2.2.1 AT1R rs5186 πολυμορφισμός (A1166C)	σελ.37
2.2.2 AT2R rs11091046 πολυμορφισμός (A3123C)	σελ.38

2.2.3 Αγγειοτενσινογόνο	σελ.38
2.2.3.1 AGT rs699 πολυμορφισμός (M235T)	σελ.38
2.2.3.2 AGT rs4762 πολυμορφισμός (T174M)	σελ.39
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
3.1 Σκοπός	σελ.41
3.2 Υλικό της μελέτης	σελ.41
3.3 Απομόνωση DNA από νωπό ιστό (DNA Extraction)	σελ.41
3.4 Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός DNA	σελ.44
3.4.1 Φωτομέτρηση	σελ.44
3.4.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	σελ.44
3.4.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης	σελ.44
3.4.4 Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης	σελ.45
3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	σελ.46
3.5.1 Αρχή Λειτουργίας	σελ.46
3.5.2 Πρωτόκολλο PCR	σελ.47
3.5.3 Αλληλουχίες εκκινήτων των υπό εξέταση γονιδίων	σελ.48
3.6 Πέψεις των PCR Προϊόντων	σελ.50
3.6.1 Πέψη των γονιδίων REN και AT1R με περιοριστικό ένζυμο HpyF31 (DdeI)	σελ.50
3.6.2 Πέψη του γονιδίου AT2R με περιοριστικό ένζυμο AluI	σελ.51
3.6.3 Πέψη του γονιδίου AGT με περιοριστικά ένζυμα NcoI και SfaNI	σελ.52
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.54
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο νεφρός έχει σημαντικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό, διατηρώντας τον όγκο και τη σύσταση των διαλυμάτων του οργανισμού σταθερά και εξισορροπώντας τις διακυμάνσεις τους. Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί τον 6^ο και 10^ο συχνότερα διαγνωσμένο καρκίνο σε άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα, και αποτελεί την 13^η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Με βάση την κυτταρική διαφοροποίηση ο όγκος ταξινομείται κατά Fuhrman, σε τέσσερα στάδια (Grade 1 έως 4), ενώ ιστολογικά ταξινομείται με βάση το σύστημα UICC 2017 TNM (Tumor Nodes Metastasis). Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης είναι ένα από τα σημαντικότερα ομοιοστατικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης. Στην παρούσα εργασία μελετούμε τη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών rs5186 (A1166C), rs12750834 (C5312T), rs699 (M235T), rs4762 (T174M) και rs11091046 (A3123C) του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και την πιθανή συσχέτισή τους με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Εξετάσαμε γενομικό DNA από νωπό ιστό 40 ασθενών με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και από ολικό αίμα 40 υγιών ατόμων. Πραγματοποιήσαμε εξαγωγή γενομικού DNA από τα δείγματα των δύο ομάδων και οι γονιδιακές περιοχές που εμπεριέχουν τους προαναφερόμενους πολυμορφισμούς ενισχύθηκαν επιλεκτικά με τη μέθοδο της PCR. Ακολούθησε RFLP ανάλυση των ενισχυμένων PCR προϊόντων με ειδικά περιοριστικά ένζυμα. Οι γονότυποι που προέκυψαν αναλύθηκαν στατιστικά με το λογισμικό πρόγραμμα IBM SPSS έκδοση v22. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ τόσο του rs5186 (A1166C) πολυμορφισμού του AT1R γονιδίου, όσο και του rs11091046 (A3123C) του AT2R γονιδίου και του κινδύνου ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκινώματος ($p=0.019$, OR= 0.26, 95% CI: 0.10-0.66) και ($p=0.001$, OR= 0.08, 95% CI : 0.02-0.4) αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι τα πολυμορφικά αλληλόμορφα 1166C και 3123C των δύο πολυμορφισμών αντίστοιχα έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι του κινδύνου ανάπτυξης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος. Επιπρόσθετα, αναδείχθηκε ότι η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου και του υψηλότερου σταδίου κατά Fuhrman (3 και 4) στους ασθενείς ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.03$). Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι οι πολυμορφισμοί του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους δείκτες για την πρόληψη, τη σταδιοποίηση και την πρόγνωση του νεφροκυτταρικού καρκίνου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

ABSTRACT

Kidneys hold a crucial role in the human body, maintaining the volume and concentration of organic solutions steady and balancing any fluctuations. Renal cell carcinoma is classified as sixth and tenth most commonly diagnosed cancers in men and women respectively and the 13th most common cause of cancer death worldwide. According to cellular differentiation, renal cell carcinoma can be classified as Furhman Grade 1 to 4, while histologically, it is classified according to the UICC 2017 TNM (Tumor Nodes Metastasis) system. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is one of the most important homeostatic mechanisms of the human body, controlling blood pressure. In this thesis we study the frequency of five renin-angiotensin-aldosterone system single nucleotide polymorphisms (SNPs), namely rs5186 (A1166C), rs12750834 (C5312T), rs699 (M235T), rs4762 (T174M) and rs11091046 (A3123C) in patients with renal cell carcinomas as well as their possible correlation with risk for renal cancer development. We tested fresh frozen tissue from 40 renal cell cancer patients and peripheral blood from 40 healthy individuals. Genomic DNA was extracted from both groups and specific gene fragments containing the above-mentioned SNPs were amplified through PCR. RFLP analysis of amplified PCR products was performed with specific restriction endonucleases. Genotypes were statistically analyzed by the IBM SPSS v.22 software. Our results showed a statistically significant correlation for both rs5186 (A1166C) SNP of AT1R gene and rs11091046 (A3123C) of AT2R gene and the risk of renal cell cancer development ($p= 0.019$, OR= 0.26, 95% CI: 0.10-0.66) and ($p = 0.001$, OR= 0.08, 95% CI: 0.02-0.4) respectively. More precisely, our findings suggest a protective role for both alleles (1166C, 3123C) against the risk for renal cell cancer development. Additionally, AT1R A1166C correlated with higher Furhman grade (3 and 4) in renal cancer patients ($p = 0.03$). Our results indicate that the RAAS system's SNPs could serve as possible markers for renal cell cancer risk assessment, staging and prognosis, but larger scale studies are required.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Ανατομία του Νεφρού

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελείται τους νεφρούς, τους νεφρικούς κάλυκες, τις νεφρικές πυέλους, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα (Χατζημπούγιας Ιωάννης, 2009: 159-165). Πρόκειται για μία ομάδα οργάνων με ρόλο τη διήθηση και αποβολή της περίσσειας υγρών και άλλων ουσιών από την αιματική κυκλοφορία. Σημαντικό όργανο του συστήματος αυτού είναι οι νεφροί, που αποτελούν τα κύρια όργανα της ομοιόστασης, καθώς συμβάλλουν στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας και της ισορροπίας ύδατος και ηλεκτρολυτών στο αίμα (Smith, Peter, 1998).

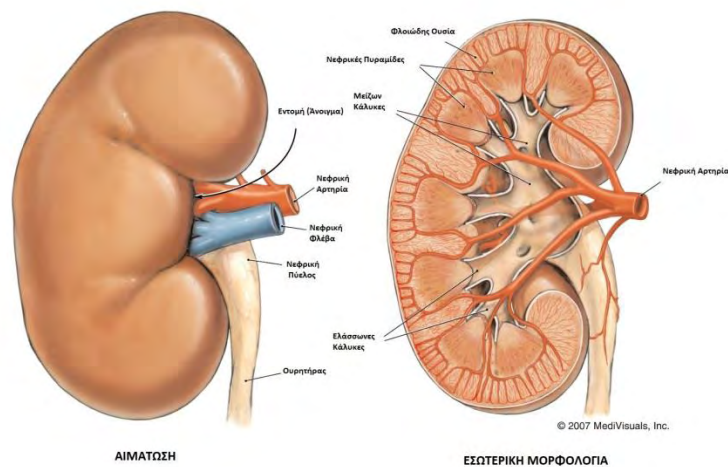
Οι νεφροί είναι δύο, έχουν σχήμα φασολιού, ερυθρο-καστανό χρώμα, βάρος 250-350 γραμμάρια, μήκος 10-12 περίπου εκατοστά και βρίσκονται εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, στο ύψος της οσφυϊκής μοίρας. Ο δεξιός νεφρός βρίσκεται χαμηλότερα του αριστερού, λόγω του ήπατος. Ο αριστερός νεφρός έρχεται σε σχέση με το σπλήνα, το στομάχο, το πάγκρεας, το δωδεκαδάκτυλο και το παχύ έντερο. Η πρόσθια επιφάνεια του κάθε νεφρού καλύπτεται από το περιτόναιο, ενώ η οπίσθια εφάπτεται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Στο μέσο κάθε νεφρού υπάρχει η νεφρική πύλη, μία εντομή από την οποία εισέρχονται η νεφρική αρτηρία και τα νεύρα και εξέρχονται η νεφρική φλέβα και η νεφρική πύελος (Εικόνα 1) (Χατζημπούγιας Ιωάννης, 2009: 159-165).

Ο νεφρός περιβάλλεται από τα εξής περιβλήματα:

- Ο ινώδης χιτώνας, μια σκληρή κάψα ινώδους συνδετικού ιστού που αποτελείται από κολλαγόνες, ελαστικές και λείες μυϊκές ίνες,
- Η λιπώδης κάψα ή περινεφρικό λίπος,
- Η νεφρική περιτονία, που περιβάλλει ολόκληρο το νεφρό και το σύστοιχο επινεφρίδιο,
- Το περιτόναιο, το οποίο περιβάλλει μόνο την πρόσθια επιφάνεια του νεφρού.

Ο νεφρός στη διατομή του, εμφανίζει δύο μοίρες:

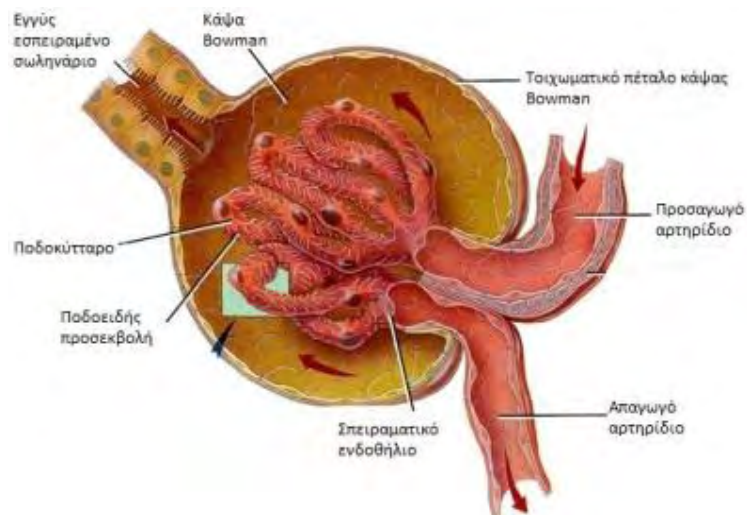
- Το *μυελό*, που διαιρείται σε 8-18 κωνοειδείς περιοχές, τις νεφρικές πυραμίδες. Η κορυφή της κάθε πυραμίδας ονομάζεται *θηλή*, εντάσσεται προς το κέντρο του νεφρού περιβάλλεται από έναν ελάχιστον νεφρικό κάλυκα από όπου εκβάλλουν τα ουροφόρα σωληνάρια.
- Το *φλοιό*, που καταλαμβάνει τους χώρους μεταξύ των πυραμίδων και σχηματίζει τις νεφρικές στήλες, περιβάλλοντας τη μυελώδη ουσία και εισχωρώντας ανάμεσα στις νεφρικές πυραμίδες. Οι νεφρικές στήλες εξυπηρετούν την αιμάτωση, αποτελούν διαύλους αιμοφόρων αγγείων, που φέρνουν αίμα στο φλοιό του νεφρού για διήθηση κυρίως αλλά και θρέψη. Σταθεροποιούν επίσης το φλοιό του νεφρού. Αποτελείται από τα *ουροφόρα σωληνάρια* που ξεκινούν από τη φλοιώδη μοίρα και καταλήγουν στη θηλή της νεφρικής πυραμίδας.



Εικόνα 1. Η μορφολογία και αιμάτωση του νεφρού.

Πηγή:<http://www.arizonatransplant.com/healthtopics/index.html>

Νεφρώνας αποκαλείται το νεφρικό σωματίο, μαζί με τα ουροφόρα σωληνάρια. Είναι η ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού και η χρησιμότητα του είναι η απέκκριση των ούρων. Κάθε νεφρός έχει 1 – 3 εκατομμύρια νεφρώνες περίπου (Εικόνα 2) (Χατζημπούγιας Ιωάννης, 2009: 159-165).

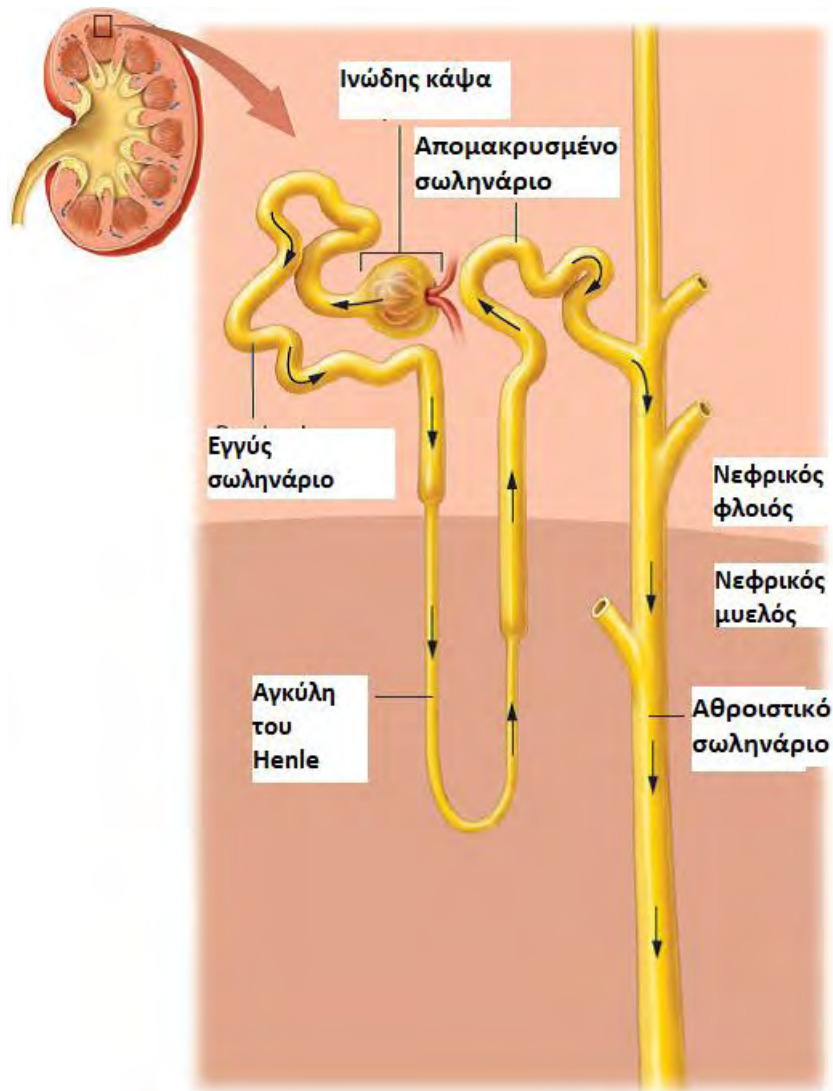


Εικόνα 2. Το νεφρικό σωματίο - Νεφρώνας. Πηγή: <http://www.beltina.org/health-dictionary/glomerulus-function-definition.html>

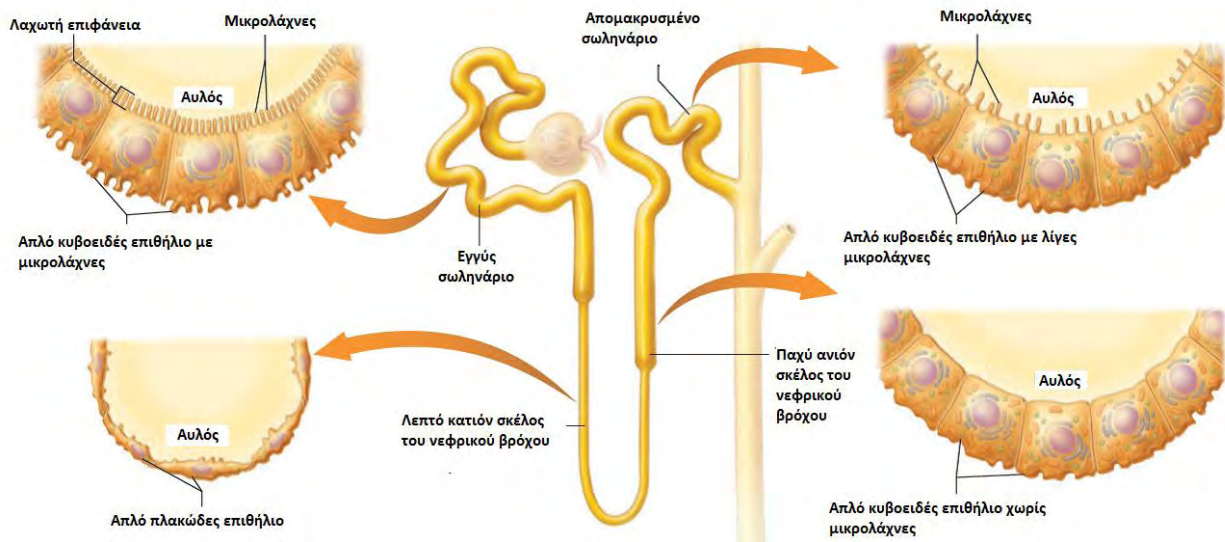
Το νεφρικό σωματίο αποτελείται από το σπείραμα και το επιθηλιακό έλυτρο την κάψα του Bowman. Τα νεφρικά σωματίδια βρίσκονται αποκλειστικά στο νεφρικό φλοιό και του προσδίδουν τη χαρακτηριστική κοκκώδη εμφάνισή του. Το νεφρικό σωματίο αποτελείται από:

- Η κάψα του Bowman (Βωμάνειο έλυτρο), είναι το αρχικό άκρο του ουροφόρου σωληναρίου. Αποτελείται από μονόστιβο φολιδωτό επιθήλιο και ανάμεσα στα τοιχώματα του επιθηλίου σχηματίζεται η αγγειώδης κοιλότητα, που δέχεται το αγγειώδες σπείραμα, που αποτελείται από το προσαγωγό αρτηρίδιο, τα τριχοειδή και το απαγωγό αρτηρίδιο,
- Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, που είναι ελικοειδές στο πρώτο τμήμα του και επενδύεται από απλό κυβοειδές επιθήλιο με μικρολάχνες, που έχουν ως ρόλο την αύξηση της επιφάνειας απορρόφησης (Χατζημπούγιας Ιωάννης, 2009: 159-165).
- Η αγκύλη του Henle (αγκύλη του νεφρώνα), σωληνάριο σε σχήμα U με λεπτό κατιόν σκέλος και παχύ ανιόν σκέλος. Πρωταρχικός της ρόλος είναι η συμπύκνωση του άλατος στον ενδιάμεσο ιστό που περιβάλλει την αγκύλη.
- Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, που επενδύεται από απλό κυβοειδές επιθήλιο, παρόμοιο σε δομή και λειτουργία με το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Τα κύτταρα που επενδύουν το σωληνάριο αυτό φέρουν πολυάριθμα μιτοχόνδρια, επιτρέποντας την ενεργητική μεταφορά ουσιών μέσω ενέργειας προερχόμενης από το μόριο του ATP (Mader, Sylvia S, 2004).

- Τα αθροιστικά σωληνάκια, που καταλήγουν στη μυελώδη μοίρα. Σε κάθε αθροιστικό σωληνάριο εκβάλλουν περισσότεροι από ένας νεφρώνες. Η συνένωση πολλών αθροιστικών σωληναρίων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ευρύτερων ουροφόρων σωληναρίων, που εκβάλλουν μέσω των νεφρικών θηλών στην πύελο (Εικόνες 3, 4) (Βλαχογιάννης Ι Γ, 2009).

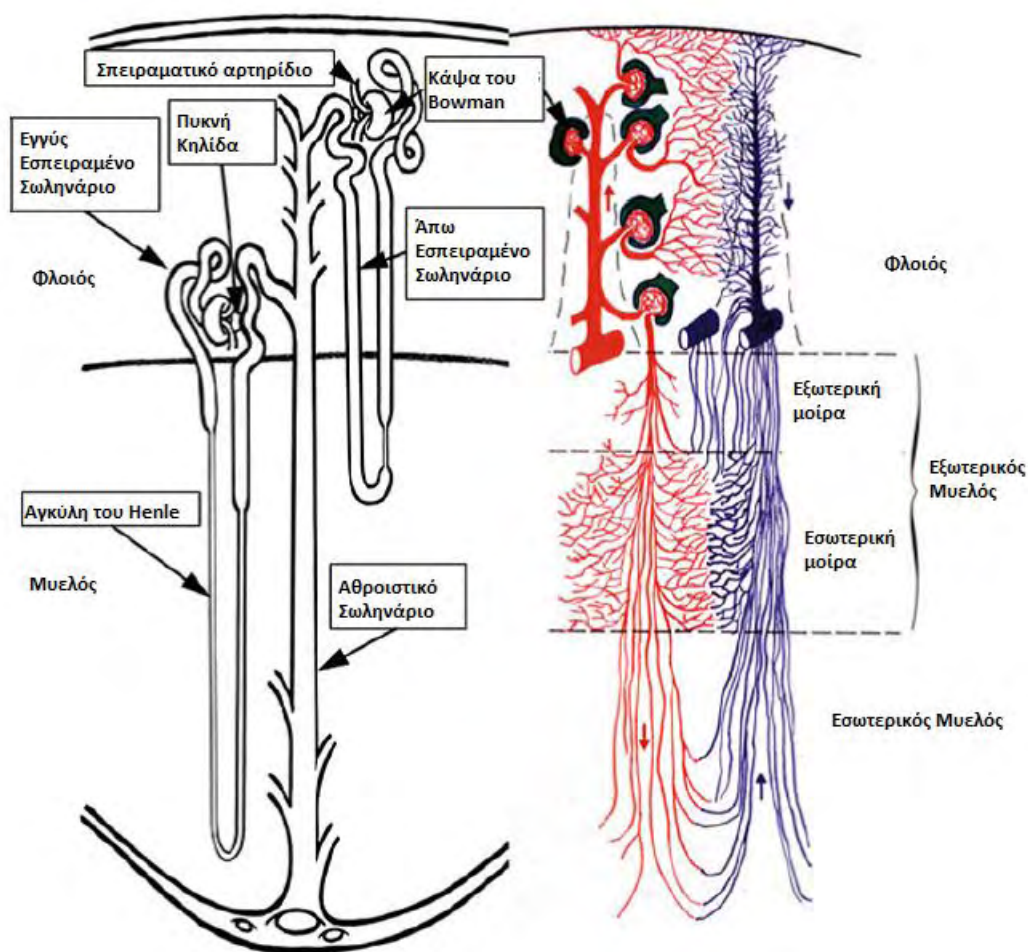


Εικόνα 3. Γενικευμένη εικόνα νεφρού και συστήματος συλλογής. Πηγή: Πηγή: Amerman C, Human Anatomy & Physiology, Chapter 24 The Urinary System, 2014: 941-984



Εικόνα 4. Δομικά χαρακτηριστικά του νεφρικού σωληναρίου. Πηγή: Amerman C, Human Anatomy & Physiology, Chapter 24 The Urinary System, 2014: 941-984

Η αιμάτωση του νεφρού είναι τέσσερις φορές μεγαλύτερη από αυτήν του ήπατος και οκτώ φορές μεγαλύτερη από των στεφανιαίων αγγείων (Εικόνα 5) (Βλαχογιάννης Ι Γ, 2009).



Εικόνα 5. Νεφρόνες και η αιμάτωσή τους. Αριστερά: ένα σύντομου βρόχου - και ένας εκτενούς βρόχου νεφρώνας. Δεξιά: οι διαφορετικές αγγειακές περιοχές και η θέση τους στις τέσσερις νεφρικές ζώνες. Για λόγους σαφήνειας, ο φλοιός έχει διευρυνθεί και ο εσωτερικός μυελός είναι συμπιεσμένος (Rayner H et al, Kindey Anatomy and Physiology, Chapter 1, The Basis of Clinical Nephrology, 2016)

1.2 Ιστολογία του Νεφρού

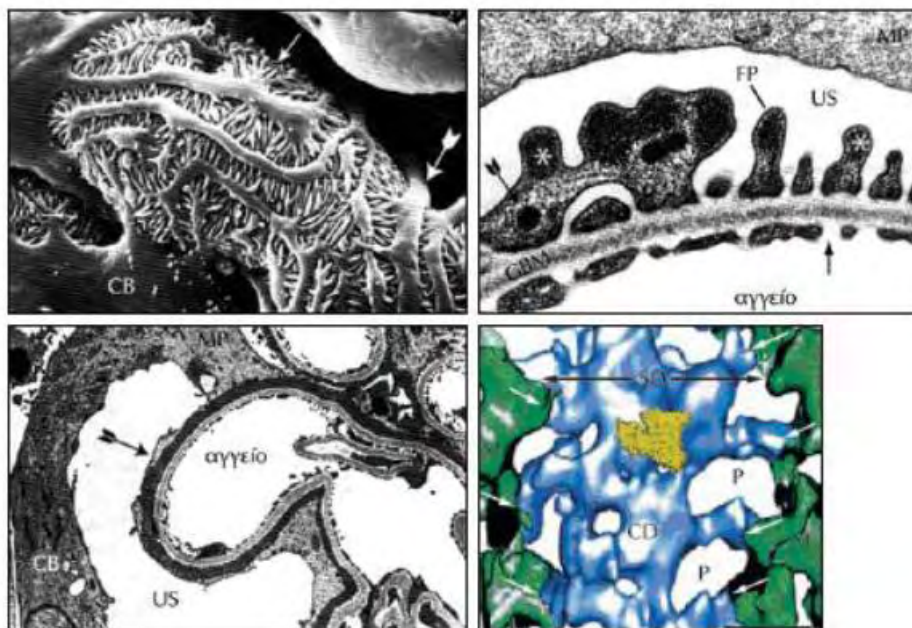
Η κάψα του Bowman περιβάλλει το νεφρικό σπείραμα και αποτελείται από το περισπλάχνιο (έσω) πέταλο (απλά πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα) και το περίτονο (έξω) πέταλο (απλά πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα). Το περισπλάχνιο πέταλο βρίσκεται κάτω από την παχιά σπειραματική βασική μεμβράνη και σχηματίζεται από τα ποδοκύτταρα που δημιουργούν προσεκβολές μέσα στο νεφρικό σπείραμα. Οι προσεκβολές των ποδοκυττάρων διαπλέκονται μεταξύ τους και δημιουργούν τις σχισμές διήθησης. Το μέγεθος της σχισμής διήθησης περιορίζει τη διέλευση μεγάλου μεγέθους μορίων (π.χ. αλβουμίνη) και κυττάρων. Παράλληλα, οι

προσεκβολές των ποδοκυττάρων φέρουν ένα αρνητικώς φορτισμένο στρώμα (γλυκοκάλυκας) που περιορίζει τη διήθηση των αρνητικώς φορτισμένων μορίων (ηλεκτροστατική απόθεση).

Το περίτονο πέταλο της κάψας του Bowman περιγράφεται από μία μονή στιβάδα πλακώδους επιθηλίου. Ανάμεσα στο περισπλάγχιο και στο περίτονο πέταλο βρίσκεται ο χώρος του Bowman, μέσα στον οποίον εισέρχεται το διήθημα αφού διέλθει από τις σχισμές διήθησης των ποδοκυττάρων (Graaff, Van De, 2002).

Το αίμα εισέρχεται στο σπείραμα μέσω του προσαγωγού αρτηριδίου και το εγκαταλείπει μέσω του απαγωγού. Μέρος του διηθήματος διέρχεται από τον ενδοαγγειακό χώρο (τριχοειδή) στον εξωαγγειακό χώρο. Το τοίχωμα που πρέπει να διαπεράσουν το νερό και οι ελεύθερα διηθούμενες ουσίες (ηλεκτρολύτες, μικρομοριακές ουσίες κ.α) αποτελείται από το τοίχωμα των τριχοειδών και το τοίχωμα των επιθηλιακών κυττάρων του περισπλαγχνίου πετάλου της κάψας του Bowman (ποδοκύτταρα). Η βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων συνδέεται με την αντίστοιχη μεμβράνη των ποδοκυττάρων σχηματίζοντας μια ενιαία βασική μεμβράνη του σπειράματος (Glomerular basement membrane-GBM).

Οι διηθούμενες ουσίες πρέπει να διέλθουν το θυριδωτό ενδοθήλιο, τη βασική μεμβράνη και τις σχισμές διήθησης που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες των ποδοκυττάρων (Εικόνα 6).

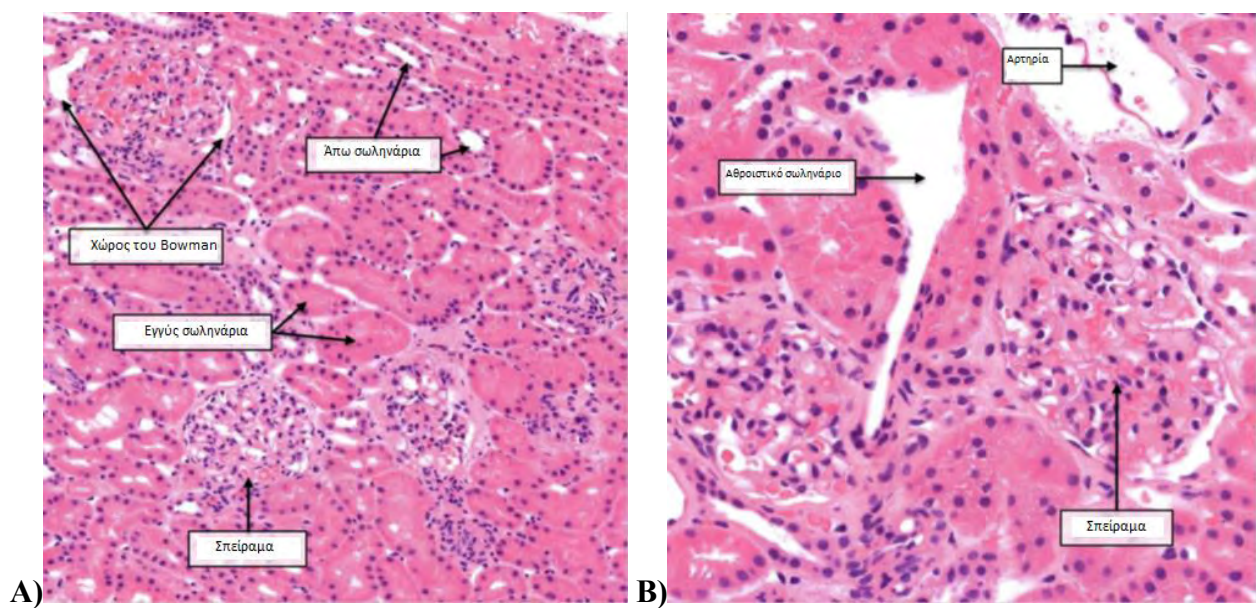


Εικόνα 6. Απεικόνιση του φραγμού διήθησης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και σχηματικά (FP: εκβλαστήσεις ποδοκυττάρων).

Η βασική μεμβράνη του σπειράματος (GBM) διατηρεί την αρχιτεκτονική του σπειράματος φυσιολογική, δεσμεύει τα γειτονικά κύτταρα και λειτουργεί ως φραγμός διήθησης για τις μεγαλομοριακές ουσίες. Ο σκελετός της βασικής μεμβράνης δομείται από διαπλεκόμενες ίνες κολλαγόνου τύπου IV. Οι κενοί χώροι του ινώδους δικτύου πληρούνται από διάφορες ουσίες, όπως είναι η λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες.

Τα τριχοειδή αγγεία του σπειράματος σταθεροποιούνται εντός της κάψας του Bowman με το μεσάγγειο, συσκευή που αποτελείται από μεσαγγειακά κύτταρα και θεμέλια ουσία. Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα με ικανότητα σύσπασης, παράγουν συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας και εκδηλώνουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες. Μικρό ποσοστό των μεσαγγειακών κυττάρων (3-7%) προέρχεται από το μυελό των οστών, ως μακροφάγα που διηθούν το μεσάγγειο.

Η θεμέλια ουσία του μεσαγγείου αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, V και II, κύριο συστατικό των οποίων αποτελεί η φμπρονεκτίνη. Τα μεσαγγειακά κύτταρα, ως τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν να συσπώνται και να μεταβάλλουν μέσω της θεμέλιας ουσίας τη μορφολογία της επιφάνειας διήθησης και επομένως και τη διηθητική λειτουργία (Βλαχογιάννης Ι Γ, 2009).



Εικόνα 7. Δομή φυσιολογικού νεφρικού φλοιού. Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης. Α) (μεγέθυνση x 100), Β) (μεγέθυνση x 200).

1.3 Φυσιολογία του Νεφρού

Ο κύριος ρόλος του νεφρού είναι η διατήρηση του όγκου και της σύστασης των διαλυμάτων του ανθρωπίνου οργανισμού σταθερών και η εξισορρόπηση των διακυμάνσεων που ακολουθούν την λήψη τροφής, τον κυτταρικό μεταβολισμό και άλλους παράγοντες, όπως η σωματική κούραση, η άσκηση και το περιβάλλον.

Σε υγιή άτομα η αποκατάσταση διαταραχών πραγματοποιείται εντός ωρών ώστε να μην παρατηρείται απόκλιση του όγκου ή της σύστασης των διαλυμάτων από το φυσιολογικό. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις και οι διαταραχές καθίστανται μόνιμες. Οι κύριες λειτουργίες του νεφρού μπορούν να κατανεμηθούν σε τρεις κατηγορίες:

- Τη **ρυθμιστική λειτουργία**, με την οποία διατηρείται σταθερός ο όγκος και η σύσταση των διαλυμάτων του ανθρωπίνου σώματος (διήθηση, απέκκριση, επαναρρόφηση). Η ρύθμιση γίνεται εμμέσως με την αποβολή ή την κατακράτηση ύδατος ή ηλεκτρολυτών ή οξέων σύμφωνα με τις ανάγκες της εσωτερικής ομοιόστασης. Η σταθερότητα της οσμωτικότητας, των ηλεκτρολυτών και της οξεοβασικής ισορροπίας εξασφαλίζεται με την επί μέρους νεφρική ρύθμιση της αποβολής ιόντων νατρίου, καλίου, χλωρίου, μαγνησίου, ασβεστίου, φωσφόρου, μορίου του ύδατος και ιόντων υδρογόνου.
- Την **απεκκριτική**, όπου αποβάλλονται τα τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού ή εξωγενείς ουσίες (φάρμακα κ.λ.π.). Με τον τρόπο αυτό διατηρείται η εσωτερική ομοιόσταση.
- Την **παραγωγή και έκκριση ενζύμων και ορμονών**. Με τη λειτουργία αυτή εξασφαλίζονται ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η αιμοδυναμική σταθερότητα, ο μεταβολισμός των οστών και η αιμοποίηση. Τα κοκκιώδη κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής παράγουν και εκκρίνουν το ένζυμο ρενίνη, που καταλύει τη σύνθεση της αγγειοτενσίνης I από το αγγειοτενσινογόνο (μια σφαιρίνη του πλάσματος). Με τη δράση αυτή, η αγγειοτενσίνη I μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη II, η οποία εμπλέκεται στη *ρύθμιση του ισοζυγίου του νατρίου και της αρτηριακής πίεσης*. Τα κύτταρα του ενδιάμεσου σωληναριακού χώρου παράγουν μια γλυκοζιωμένη πρωτεΐνη, την ερυθροποιητίνη, που ρυθμίζει την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων στον μυελό των οστών, επομένως και την *ερυθροποίηση*. Παραλληλα στα επιθηλιακά κύτταρα των εσπειραμένων σωληναρίων α' τάξεως γίνεται η ενεργοποίηση της ανενεργούς μορφής της

βιταμίνης D₂ σε ενεργό μορφή. Η βιταμίνη D ρυθμίζει το ισοζύγιο ασβεστίου και φωσφόρου, συνεπώς την *ομοιόσταση των οστών* (Βλαχογιάννης Ι Γ, 2009).

1.4 Καρκίνος του Νεφρού

1.4.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (Renal Cell Carcinoma – RCC) αποτελεί τον έκτο συχνότερα διαγνωσμένο καρκίνο στους άνδρες και το δέκατο αντίστοιχα στις γυναίκες παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης του RCC έχει αυξηθεί, γεγονός που εν μέρει αποδίδεται στην αυξημένη τυχαία εύρεση μαζών στους νεφρούς κατά την απεικόνιση κοιλίας για μυοσκελετικές ή γαστρεντερικές παθήσεις. Αν και οι αλλοιώσεις που ανιχνεύονται είναι μικροί όγκοι, η τοπικά εντοπισμένη νόσος εξακολουθεί να διαγιγνώσκεται σε σημαντικό ποσοστό ασθενών και σημαντικό ποσοστό αυτών, της τάξης του 17%, φέρει απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης (Capitanio U, Montorsi F., 2016; 387: 894–906).

Στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική, ο κίνδυνος ανάπτυξης RCC κατά τη διάρκεια της ζωής κυμαίνεται μεταξύ 1.3% και 1.8%. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας συμβαίνουν περίπου 140.000 θάνατοι ετησίως, καθιστώντας το RCC ως την 13η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al., 2013) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Συχνότητα και αθροιστικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του νεφρού στην Ευρώπη.

Population	Quality ^a	Numbers	Crude rate	ASR (W)	Cumulative risk
Czech Republic	A2	3313	31.4	16.7	2.01
Lithuania	A1	773	23.5	13.2	1.61
Slovakia	A1	1063	19.4	12.5	1.49
Estonia	A1	284	21.2	11.7	1.39
Belarus	A2	1575	16.5	11.1	1.29
Slovenia	A1	400	19.6	11.1	1.27
Latvia	A1	449	20.1	10.9	1.31
Germany	B2	18 615	22.7	10.6	1.27
Croatia	A2	821	18.7	10.0	1.16
France (metropolitan)	B2	11 023	17.4	9.7	1.14
Norway	A2	798	16.1	9.3	1.08
Hungary	G1	1554	15.6	9.1	1.03
Russian Federation	D2	19 313	13.5	8.9	1.05
Iceland	A1	45	13.7	8.8	1.17
The Netherlands	A2	2679	16.0	8.8	1.04
Italy	B2	11 300	18.5	8.7	1.01
Belgium	A2	1763	16.3	8.7	1.03
Ireland	A1	571	12.5	8.4	0.99
Luxembourg	D2	70	13.4	8.3	1.00
UK	A1	9714	15.5	8.2	0.93
Poland	C3	5244	13.7	8.1	0.95
Malta	A1	57	13.6	8.0	0.91
Austria	A2	1322	15.7	8.0	0.95
Finland	A1	882	16.3	7.9	0.90
Spain	B2	6474	13.8	7.9	0.89
Ukraine	A2	5240	11.7	7.5	0.87
Serbia	B2	1127	11.4	7.4	0.85
Denmark	A2	754	13.5	7.2	0.87
Bulgaria	A2	881	11.9	6.9	0.80
Montenegro	G6	59	9.3	6.6	0.75
Switzerland	B2	948	12.3	6.5	0.74
Sweden	A2	1125	11.8	6.4	0.75
Albania	G3	228	7.1	5.8	0.71
Romania	E1	1940	9.1	5.7	0.66
Bosnia Herzegovina	D5	292	7.8	5.2	0.57
Portugal	C3	1004	9.4	5.0	0.57
Republic of Moldova	G1	230	6.5	4.6	0.55
Greece	G3	1094	9.6	4.5	0.48
FYR Macedonia	G3	104	5.0	3.6	0.41
Cyprus	A3	46	4.1	3.0	0.35

Τα ποσοστά θνησιμότητας ποικίλουν γεωγραφικά κι ενώ στις Σκανδιναβικές χώρες, στη Γαλλία, στη Γερμανία, στην Αυστρία, στις Κάτω Χώρες και στην Ιταλία έχουν μειωθεί, ωστόσο

σε χώρες όπως η Ιρλανδία, η Κροατία, η Ελλάδα, η Εσθονία και η Σλοβακία τα ποσοστά θνησιμότητας παρουσιάζουν αύξηση (Levi F, Ferlay J, Galeone C, et al., 2008; 101: 949–58).

Το φύλο και η ηλικία σχετίζονται στενά με τον κίνδυνο εμφάνισης RCC. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται κυρίως στις ηλικίες των 60 – 70 ετών και συχνότερα στους άνδρες, συγκριτικά με τις γυναίκες σε αναλογία 1.5:1, αναλογία που διευρύνεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancertype/>).

Πρόκειται για έναν αρκετά επιθετικό όγκο, ώστε το 1/3 περίπου των ασθενών να έχουν μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης, ενώ το 40% αυτών καταλήγουν. Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα παρουσιάζει δύο μορφές την κληρονομική και τη σποραδική. Η σποραδική μορφή απαντάται σε ποσοστό 85% του συνόλου των περιπτώσεων.

Η νόσος παραμένει συνήθως ασυμπτωματική μέχρι τα προχωρημένα στάδια. Το 30% των συμπτωματικών ασθενών εμφανίζουν παρανεοπλασματικά σύνδρομα, οι συμπτωματικοί ασθενείς πιθανόν να παρουσιάσουν συμπτώματα από μεταστατική νόσο όπως βήχα ή πόνο στα οστά. Ποσοστό της τάξης 6-10% των ασθενών εμφανίζουν την τριάδα του πόνου στην όσφυ, της μακροσκοπικής αιματουρίας και της ψηλαφητής κοιλιακής μάζας και αυτό συσχετίζεται με προχωρημένη νόσο και επιθετική ιστολογία (Scanlon C. Valerie, Sanders Tina, 2007: 421-429). Η αιματουρία αποτελεί το συχνότερο σύμπτωμα σε ποσοστό 60%, ακολουθεί η οσφυϊκή μάζα (45%) και το οσφυϊκό άλγος (40%). Η απώλεια βάρους, ο πυρετός, η αιφνίδια ανάπτυξη κίρσοκλήλης αποτελούν συνήθη ευρήματα επίσης.

1.4.2 Αιτιοπαθογένεια

Η αιτιολογία του νεφροκυτταρικού καρκινώματος δεν είναι ακόμη γνωστή, ωστόσο μερικοί παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η υπέρταση και η έκθεση σε άσβεστο, διαλύτες και κάδμιο χαρακτηρίζονται ως δυνητικώς παθογόνοι. Το κάπνισμα σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες τύπου ασθενών - μαρτύρων, φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης RCC με τον σχετικό κίνδυνο να κυμαίνεται από 1.2 έως 2.3, ενώ φαίνεται επίσης να υπάρχει δόσοεξαρτώμενη συσχέτιση, καθώς οι βαρύτεροι καπνιστές έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Yuan JM, Castela JE et al, 1998, 7: 429-433).

Η παχυσαρκία φαίνεται να αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου εμφάνισης RCC. Σε μία μετα-ανάλυση που έγινε από τον Renehan και συνεργάτες (2008) έδειξε ότι η αύξηση του Δείκτη Μάζας Σώματος (Body Mass Index: BMI) κατά 5 μονάδες αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης RCC κατά 24% στους άνδρες και κατά 34% στις γυναίκες (Renehan AG et al, 2008, 371: 569-578) .

1.4.3 Γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται με το RCC

Όπως προαναφέρθηκε, το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα παρουσιάζει δύο μορφές, την κληρονομική και τη σποραδική. Και οι δύο μορφές έχουν συνδεθεί με δομικές μεταβολές στο χρωμόσωμα 3p. Οι κληρονομικές μορφές του νεφροκυτταρικού καρκινώματος είναι σπάνιες και εμφανίζονται σε διάφορα κληρονομικά σύνδρομα όπως το σύνδρομο von Hippel-Lindau (VHL), το κληρονομικό θηλώδες νεφρικό καρκίνωμα (HPRC), το σύνδρομο Birt-Hogg-Dube, την κληρονομική λειομυωμάτωση και την οζώδη σκλήρυνση.

Το *σύνδρομο von Hippel-Lindau* χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρο διαυγοκυτταρικό νεφρικό καρκίνο (22-59%), αιμαγγειοβλαστώματα της παρεγκεφαλίδας, αγγειώματα του αμφιβληστροειδούς, φαιοχρωμοκύττωμα και κύστεις διαφόρων οργάνων (παγκρέατος, νεφρών, επιδιδυμίδας). Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα τύπο και έχει παρατηρηθεί ότι το 50% των σποραδικών όγκων παρουσιάζουν μετάλλαξη στο γονίδιο VHL. Η κωδικοποιούμενη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη συμβάλλει σε πλήθος λειτουργιών του κυττάρου, όπως η ρύθμιση της απόκρισης του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας, ο έλεγχος του ενδοκυττάρου pH και των διαύλων ιόντων, η παραγωγή του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (Transforming Growth Factor β-TGF-β), η αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια ουσία και η σταθερότητα του mRNA του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (Πιορούλος Ο et al, 2000, 27:138-149).

Οι όγκοι αυτοί εμφανίζονται συνήθως σε άτομα νεαρής ηλικίας και ο αθροιστικός κίνδυνος για ανάπτυξη RCC είναι > 70% για άτομα φορείς ηλικίας άνω των 60 ετών.

Το *κληρονομικό θηλώδες νεφρικό καρκίνωμα (HPRC)* σχετίζεται με μεταλλάξεις του c-Met, ενός πρωτογονιδίου που εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 (7q31.1-34). Συνήθως είναι αμφοτερόπλευρο και πολυεστιακό. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο και οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο c-Met γονίδιο προκαλούν αυξημένη λειτουργία της πρωτεΐνης-υποδοχέα που παράγεται και συνεπώς αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη ικανότητα διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας (Πιορούλος Ο et al, 2000, 27:138-149).

Το *σύνδρομο Birt-Hogg-Dube* κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο και χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη του γονιδίου BHD που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 (17q12p11). Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από τη ανάπτυξη καλοήθων όγκων στους θύλακες

των τριχών, του δέρματος και των μαλακών μορίων καθώς και ανάπτυξη πολυπόδων του εντέρου και πνευμονικών κύστεων που μπορούν να οδηγήσουν σε αυτόματο πνευμοθώρακα και στην εμφάνιση διαφόρων νεφρικών όγκων, συνήθως χρωμόφοβων καρκινωμάτων και ογκοκυτωμάτων.

Την *κληρονομική λειομυώματωση* στην οποία η γενετική βλάβη εντοπίζεται σε μία περιοχή στο χρωμόσωμα 1 (1q42.3-43). Χαρακτηρίζεται από λειομύματα του δέρματος και της μήτρας και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης θηλώδους νεφροκυτταρικού καρκίνου τύπου 2 (Αθανασόπουλος Α, Δημητριάδης Γ, et al, 2016).

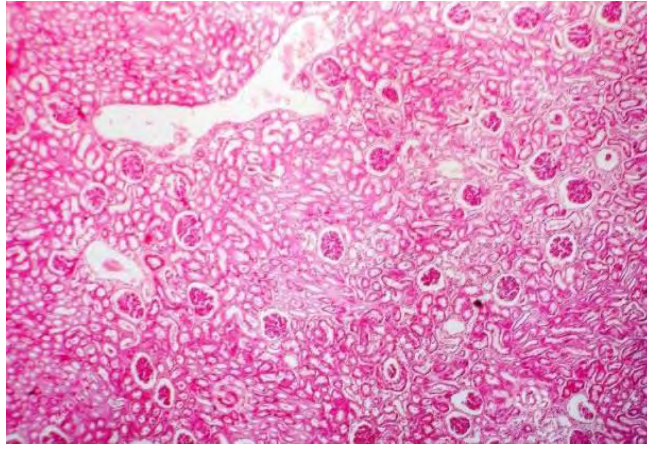
Η *οζώδης σκλήρυνση*, είναι μια επικρατούσα αυτοσωματική διαταραχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου TSC1 (χρωμόσωμα 9q) ή του γονιδίου TSC2 (χρωμόσωμα 6p). Τα γονίδια αυτά εκφράζουν ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες. Η οζώδης σκλήρυνση χαρακτηρίζεται από σχηματισμό καλόηθων αμαρτωμάτων, ιδιαίτερα στο ΚΝΣ και οι πάσχοντες εμφανίζουν διαταραχές συμπεριφοράς και νοητική στέρση. Οι ασθενείς με οζώδη σκλήρυνση παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης RCC (Πιορούλος Ο et al, 2000, 27:138-149).

1.4.4 Ιστοπαθολογία

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα είναι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ετερόπλευρο. Το καρκίνωμα αναπτύσσεται από το επιθήλιο των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και τοπικά ο όγκος εξορμάται από το νεφρικό φλοιό, επεκτεινόμενος προς το περινεφρικό λίπος και την περιτονία του Gerota. Η συχνότητα εμφάνισης είναι ίδια για τους δύο νεφρούς, όπως και για τους δύο πόλους.

Μακροσκοπικά, ο καρκίνος του νεφρού εμφανίζει ψευδοκάψα που αποτελείται από συμπιεσμένο νεφρικό παρέγχυμα, φλεγμονώδη κύτταρα και ινώδη συνθετικό ιστό. Σε τομή εμφανίζει νεκρωτικές και αιμορραγικές περιοχές και ανομοιογένεια.

Μικροσκοπικά, τα κύτταρα του νεφροκυτταρικού καρκινώματος είναι μεγάλα, πολυγωνικά με διαυγές ή κοκκώδες κυτταρόπλασμα. Σπάνια, βρίσκονται κύτταρα με σαρκωματώδη διαμόρφωση, διατεταγμένα σε στρώματα ή δεσμίδες (Αθανασόπουλος Α, Δημητριάδης Γ, et al, 2016).

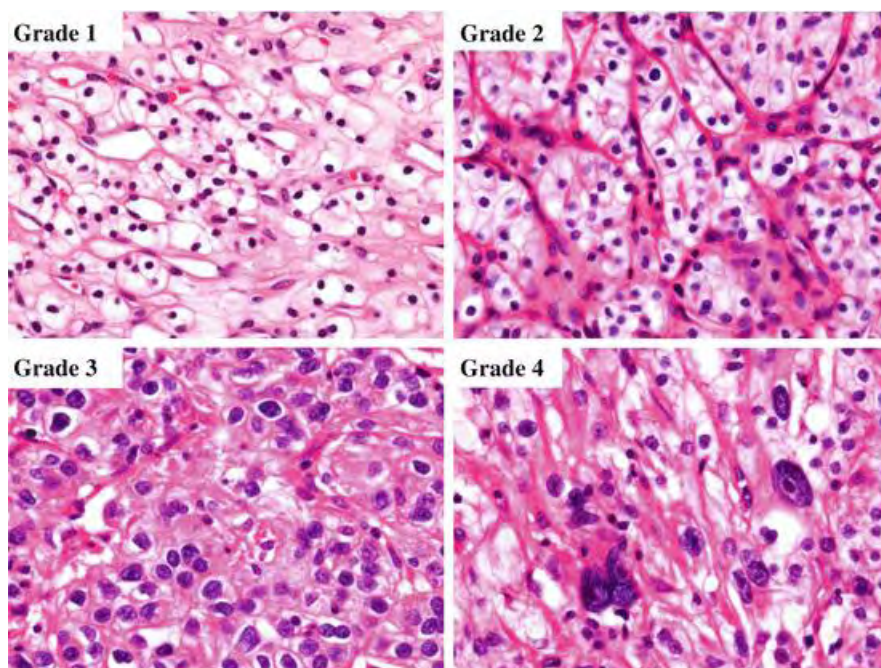


Εικόνα 8. Φυσιολογική μικροσκοπική εικόνα του νεφρού. Πηγή: <https://oncohemakey.com/pathology-of-renal-cell-carcinoma-2/>

1.4.5 Υπότυποι

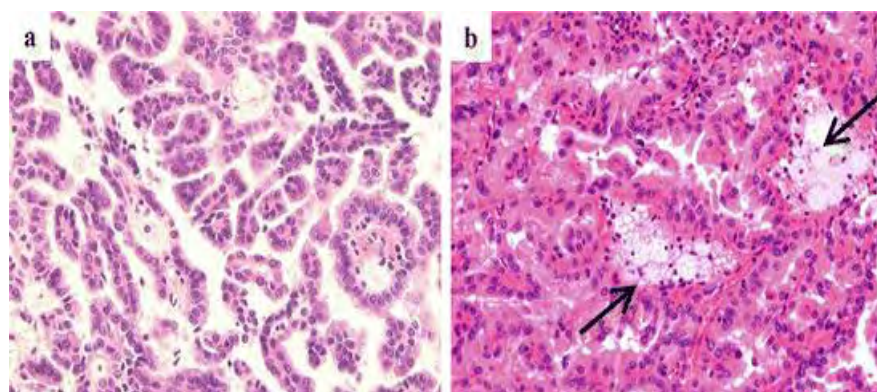
Σύμφωνα με τα μικροσκοπικά στοιχεία και τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα διαχωρίζεται σε τέσσερις κύριους διακριτούς τύπους, με διαφορετική παθογένεση και διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία. Για την ταξινόμηση της κυτταρικής διαφοροποίησης, η οποία βασίζεται στο μέγεθος και τη μορφή του πυρήνα και των πυρηνίων των καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιείται η ταξινόμηση κατά Fuhrman, στην οποία το νεόπλασμα κατατάσσεται σε τέσσερις βαθμούς (1-4), με το Grade 1 να έχει την καλύτερη πρόγνωση, ενώ το Grade 4 τη χειρότερη (Αθανασόπουλος Α, Δημητριάδης Γ, et al, 2016).

Το *Διαυγοκυτταρικό Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα (Clear Cell Carcinoma)*, ο συχνότερος ιστολογικός υπότυπος, ανευρίσκεται σε ποσοστό 75-80% και χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις του γονιδίου VHL. Έχει τη χειρότερη πρόγνωση από τους βασικούς ιστολογικούς υπότυπους.



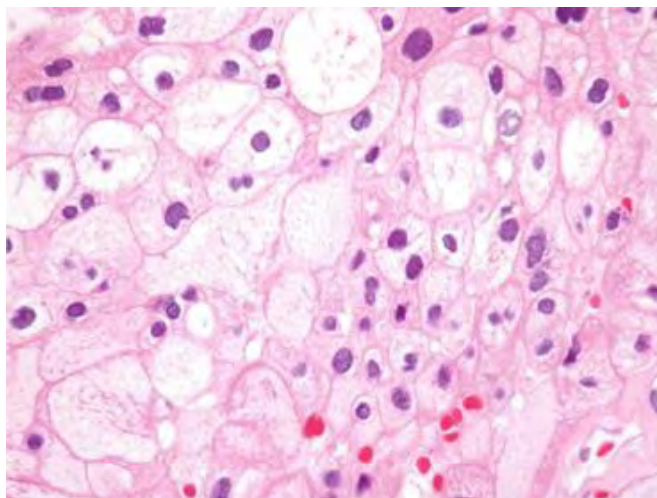
Εικόνα 9. Ταξινόμηση του Διαυγοκυτταρικού Νεφροκυτταρικού Καρκινώματος. Τα κύτταρα του Grade 1 έχουν μικρό, υπερχρωματικό πυρήνα και θυμίζουν ώριμα λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα του Grade 2 έχουν κοκκιώδη χρωματίνη. Στο Grade 3 φαίνεται καθαρά ο πυρήνας, ενώ στο Grade 4 υπάρχει πυρηνικός πλεομορφισμός και υπερχρωμάτωση. Πηγή: <https://oncohemakey.com/pathology-of-renal-cell-carcinoma-2/>

Το **Θηλώδες (Χρωμιόφιλο) Καρκίνωμα του Νεφρού (Papillary Renal Cell Carcinoma)**, αποτελεί το δεύτερο συχνότερο ιστολογικό υπότυπο και ανευρίσκεται σε ποσοστό 10-15%. Τα καρκινώματα αυτά φέρουν κυτταρογενετικά τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 7 και 17. Έχουν θηλώδεις σχηματισμούς και επενδύονται από κυβοειδή κύτταρα.



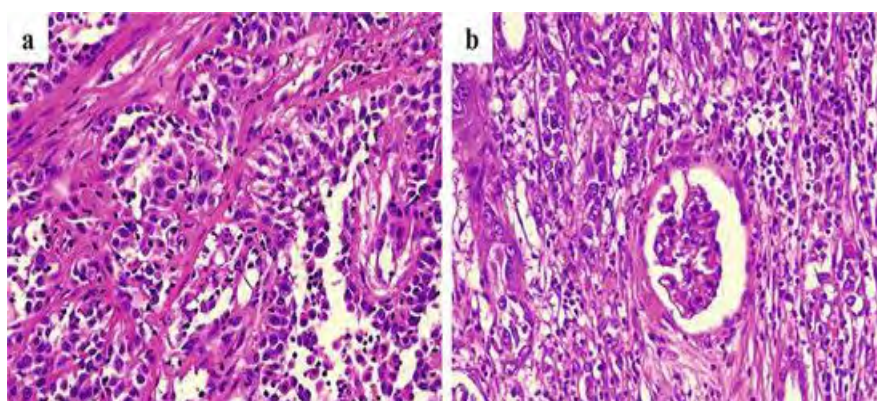
Εικόνα 10. a) Type 1, b) Type 2 θηλώδους καρκινώματος του νεφρού. Τα βέλη δείχνουν τα μακροφάγα κύτταρα. Πηγή: <https://oncohemakey.com/pathology-of-renal-cell-carcinoma-2/>

Το *Χρωμόφοβο Καρκίνωμα του Νεφρού*, εμφανίζεται σπανιότερα (4-5%) του συνόλου των περιπτώσεων και έχει την καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τους προηγούμενους υπότυπους. Αποτελείται από μεγάλα ηωσινόφιλα κύτταρα και είναι παρόμοιο με το νεφρικό ογκοκύττωμα, έναν καλοήγη όγκο.



Εικόνα 11. Μικροσκοπική του Χρωμόφοβου Καρκινώματος. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διακριτά κυτταρικά σύνορα και μεγάλη ποσότητα κυτταροπλάσματος γύρω από τον πυρήνα. Πηγή: <https://oncohemakey.com/pathology-of-renal-cell-carcinoma-2/>

Το *Καρκίνωμα των Αθροιστικών Σωληναρίων (Πόρων του Bellini)*, είναι πολύ σπάνιο, καταλαμβάνει το 1% του συνόλου των νεφροκυτταρικών καρκινωμάτων, και προέρχεται από τα κύτταρα των αθροιστικών πόρων του Bellini. Συνήθως, οι όγκοι αυτοί, όταν ανακαλυφθούν, είναι προχωρημένου σταδίου και τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση.



Εικόνα 12. Μικροσκοπική εικόνα καρκινώματος των αθροιστικών πόρων του Bellini. a) Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με παρόμοιο πρότυπο με το θηλώδες καρκίνωμα, b) και διεισδύουν διάχυτα σε μη νεοπλασματικό νεφρικό ιστό με φλεγμονή και ίνωση. Πηγή: <https://oncohemakey.com/pathology-of-renal-cell-carcinoma-2/>

1.4.6 Σταδιοποίηση – Προγνωστικοί Παράγοντες

Για τη σταδιοποίηση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος χρησιμοποιείται η ταξινόμηση UICC 2017 TNM (Tumor Nodes Metastasis) (Πίνακας 2) (Ljungberg B et al, 2017).

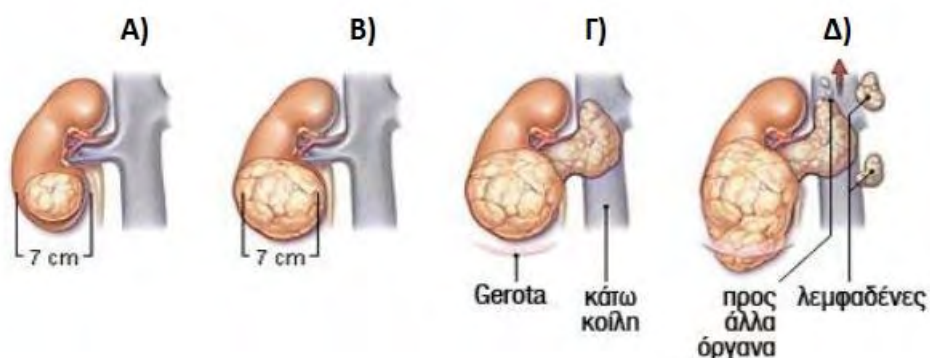
Πίνακας 2. Σταδιοποίηση κατά UICC 2017 TNM

T – Πρωτοπαθής Όγκος	
TX	Όγκος που δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Όγκος που δεν μπορεί να αποδειχθεί
T1	Όγκος $\leq 7\text{cm}$ που περιορίζεται στο νεφρό <ul style="list-style-type: none">• T1a Όγκος $\leq 4\text{cm}$ που περιορίζεται στο νεφρό• T1b Όγκος $>4\text{cm}$ αλλά $\leq 7\text{cm}$
T2	Όγκος $>7\text{cm}$ που περιορίζεται στο νεφρό <ul style="list-style-type: none">• T2a Όγκος $>7\text{cm}$ αλλά $\leq 10\text{cm}$• T2b Όγκος $>10\text{cm}$ αλλά περιορίζεται στο νεφρό
T3	Όγκος που επεκτείνεται στη νεφρική φλέβα ή το περινεφρικό λίπος αλλά δεν εκτείνεται πέραν της περιτονίας του Gerota ή στο σύστοιχο επινεφρίδιο <ul style="list-style-type: none">• T3a Όγκος που μακροσκοπικά επεκτείνεται στη νεφρική φλέβα ή στους τμηματικούς κλάδους αυτής ή όγκος που διηθεί το περινεφρικό και/ή το παραπυελικό λίπος αλλά δεν εκτείνεται πέραν της περιτονίας του Gerota• T3b Όγκος που μακροσκοπικά επεκτείνεται στην κάτω κοίλη φλέβα πάνω από το διάφραγμα• T3c Όγκος που μακροσκοπικά επεκτείνεται στην κάτω κοίλη φλέβα ή στο τοίχωμα αυτής πάνω από το διάφραγμα ή που διηθεί το τοίχωμα αυτής.
T4	Όγκος που επεκτείνεται πέραν της περιτονίας του Gerota ή διηθεί κατ'επέκταση το σύστοιχο επινεφρίδιο

N – Περιφερικοί λεμφαδένες	
NX	Δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Απουσία μεταστάσεων στους περιφερικούς λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε ένα περιφερικό λεμφαδένα
N2	Μετάσταση σε περισσότερους από ένα περιφερικούς λεμφαδένες
M – Απομακρυσμένες μεταστάσεις	
M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 3. Ομαδοποίηση σταδίων νεφροκυτταρικού καρκινώματος με το σύστημα TNM

TMN Stage Grouping			
Στάδιο	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IV	T4	Οποιοδήποτε N	M0
	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1



Εικόνα 13. Σταδιοποίηση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος με βάση το σύστημα UICC 2017 TNM.

A) Στάδιο 1 (T1), B) Στάδιο 2 (T2), Γ) Στάδιο 3 (T3), Δ) Στάδιο 4 (T4)

Η πρόγνωση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος βασίζεται στους προγνωστικούς παράγοντες. Αυτοί είναι:

- Οι ιστολογικοί παράγοντες, που περιλαμβάνουν το βαθμό κακοήθειας (grade), τον υπότυπο του καρκινώματος, τα σαρκωματοειδή στοιχεία, την μικροαγγειακή διήθηση, τη νέκρωση του όγκου και τη διήθηση του αποχετευτικού συστήματος.
- Οι κλινικοί παράγοντες, που περιλαμβάνουν το “performance status” (PS), τοπικά συμπτώματα, καχεξία, αναιμία, τον αριθμό των αιμοπεταλίων, το λόγο ουδετερόφιλα/λεμφοκύτταρα, τη CRP και την αλβουμίνη στον ορό (Αθανασόπουλος Α, Δημητριάδης Γ, et al, 2016).

Η παθολογοανατομική εξέταση καθορίζει το βαθμό διαφοροποίησης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος με την κλίμακα Fuhrman. Η κλίμακα έχει τέσσερις βαθμούς διαβάθμισης (1 έως 4). Ένας όγκος με βαθμό κακοήθειας 1 κατά Fuhrman χαρακτηρίζεται από καλή διαφοροποίηση, αργή εξέλιξη και συνήθως καλή πρόγνωση. Αντιθέτως, ένας όγκος με βαθμό κακοήθειας 4 κατά Fuhrman ενέχει αδιαφοροποίητα κύτταρα και χαρακτηρίζεται από ταχύτερη εξέλιξη και χειρότερη πρόγνωση (Stoerkel S et al, 2003, pp 46-48) (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Διαβάθμιση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος με την κλίμακα Fuhrman.

ΒΑΘΜΟΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΥΡΗΝΑ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΠΥΡΗΝΑ	ΠΥΡΗΝΙΑ
1	10 μm	Στρογγυλός, ομοιόμορφος	Απόντα ή μικρά
2	15 μm	Ανώμαλος	Παρόντα
3	20 μm	Εμφανώς ανώμαλος	Μεγάλα
4	20+ μm	πολύλοβος	Μεγάλα

1.4.7 Θεραπεία

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος, η θεραπεία εκλογής με σκοπό την ίαση είναι η ριζική νεφρεκτομή, σε εντοπισμένους καρκίνους. Για μικρότερους εντοπισμένους καρκίνους μπορεί να εφαρμοστεί μερική νεφρεκτομή εάν η κατάσταση του ασθενή και το στάδιο της νόσου το επιτρέπει.

Η λαπαροσκοπική νεφρεκτομή χρησιμοποιείται πλέον ως η χειρουργική μέθοδος για τη ριζική και τη μερική νεφρεκτομή, καθώς εμφανίζει μικρότερη νοσηρότητα σε σχέση με την κλασσική – ανοιχτή νεφρεκτομή.

Συστάσεις για αρχική χειρουργική αντιμετώπιση του RCC σύμφωνα με το στάδιο T		
Στάδιο	Είδος Επέμβασης	
T1	Μερική νεφρεκτομή	Ανοικτή
		Λαπαροσκοπική
	Ριζική νεφρεκτομή	Λαπαροσκοπική
		Ανοιχτή
T2	Ριζική νεφρεκτομή	Λαπαροσκοπική
		Ανοικτή
	Μερική νεφρεκτομή	
T3, T4	Ριζική νεφρεκτομή	Ανοικτή
		Λαπαροσκοπική

Η χημειοθεραπεία θεωρείται ότι, σε γενικές γραμμές, δεν έχει αποτέλεσμα σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα.

Η ανοσοθεραπεία με ιντερφερόνη-α (IFN-a), θεωρείται ότι είναι αποτελεσματική μόνο για συγκεκριμένες περιπτώσεις ασθενών, οι οποίοι πρέπει να είναι σε γενικά καλή κατάσταση, δεν εμφανίζουν πρόοδο της νόσου για τουλάχιστον ένα έτος απο τη διάγνωση και δεν έχουν μετάσταση, εκτός της πνευμονικής μετάστασης. Περιορισμένοι ασθενείς ανταποκρίνονται, επίσης σε εφάπαξ θεραπεία υψηλής δόσης με Ιντερλευκίνη-2 (IL-2), αλλά η τοξικότητα της IL-2 είναι υψηλότερη της IFN-a.

Για την εκτίμηση του κινδύνου της θεραπείας χρησιμοποιούνται τα κριτήρια MSKCC (Motzer). Οι δείκτες που περιλαμβάνονται στα κριτήρια είναι οι εξής: Karnowsky performance status (<80), χρόνος μεταξύ διάγνωσης και έναρξης θεραπείας με IFN-a (<12 μήνες),

αιμοσφαιρίνη (<φυσιολογική), LDH (>1,5 από το ανώτερο φυσιολογικό όριο) και διορθωμένο ασβέστιο ορού (>φυσιολογικό). Εάν οι παράγοντες κινδύνου ισούνται με μηδέν (0), τότε ο κίνδυνος θεωρείται χαμηλός. Εάν οι παράγοντες κινδύνου ισούνται με 1-2, τότε θεωρείται μετρίου κινδύνου. Τέλος, εάν οι παράγοντες είναι μεγαλύτεροι από 3, τότε θεωρούνται υψηλού κινδύνου.

Με τη βοήθεια της μοριακής βιολογίας, έχουν δημιουργηθεί νέοι παράγοντες για τη θεραπεία του RCC, όπως και του μετασταστικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος (mRCC), με τρόπο δράσης τους την αναστολή κυρίως της αγγειογένεσης. Στο σποραδικού τύπου και στο Von Hippel Lindau διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα ανακαλύφθηκε πως η νεοαγγειογένεση του όγκου προκαλείται λόγω της αύξησης του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF). Η αύξηση αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση του παράγοντα που ενεργοποιείται από την υποξία (HIF), από μια ελαττωματική VHL πρωτεΐνη. Μέχρι σήμερα, τέσσερα φάρμακα έχουν εγκριθεί στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ, ενώ μελετώνται και άλλοι παράγοντες.

Οι αναστολείς κινάσης της τυροσίνης (TKIs), χρησιμοποιούνται είτε ως πρώτης, είτε ως δεύτερης γραμμής θεραπεία για το mRCC και αυξάνουν τα ποσοστά επιβίωσης.

- Η *sorafenib* είναι ένας αναστολέας πολυκινάσης που χορηγείται από το στόμα και έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός ως θεραπεία δεύτερης γραμμής μετά την αποτυχία της συστηματικής ανοσοθεραπείας.
- Η *sunitinib* είναι ένας αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης που χορηγείται επίσης από το στόμα. Σε μελέτη φάσης III, σύγκριση μεταξύ των *sunitinib* και IFN- α , έδειξε πως η *sunitinib* είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη επιβίωση σε ασθενείς χαμηλού και μετρίου κινδύνου (11 μήνες – 5 μήνες αντίστοιχα). Σε ασθενείς που δεν πήραν επιπλέον θεραπεία μετά τη μελέτη, η επιβίωση ήταν καλύτερη στην ομάδα ασθενών που χορηγήθηκε η *sunitinib*, σε σχέση αυτούς που πήραν IFN- α (28 μήνες – 14 μήνες αντίστοιχα).
- Η *pazopanib* είναι αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης που στοχεύει τους υποδοχείς VEGF, PDGF και c-Kit. Σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη του *pazopanib* ενάντια σε placebo θεραπεία, σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία και σε ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία με κυτοκίνες, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της επιβίωσης (9.2 μήνες έναντι 4.2 μηνών) και απόκριση του όγκου στην θεραπεία.

Αντισώματα αντι-VEGF:

- Η *Bevacizumab* είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τον παράγοντα VEGF. Η χρήση της *Bevacizumab* περιορίζεται σε ασθενείς χαμηλού και μετρίου κινδύνου. Σε μια μελέτη φάσης III παρατηρήθηκε απόκριση της τάξης 31% στους ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό *Bevacizumab* και IFN-a, έναντι αυτών που πήραν μόνο IFN-a, (απόκριση 13%). Επίσης, η επιβίωση αυξήθηκε από 5.4 μήνες σε 10.2 μήνες.

Οι *αναστολείς mTOR*, αναστέλλουν το μονοπάτι mTOR και δείχνουν καλή αποτελεσματικότητα στο μεταστατικό καρκίνο νεφρού (mRCC) και σε ορισμένους υποτύπους του νεφροκυτταρικού καρκινώματος, αλλά δεν επηρεάζουν τους ασθενείς με διαυγοκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα υψηλού κινδύνου.

- Ο *temsirolimus* είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας mTOR. Σε μελέτη φάσης III φάνηκε μια αυξημένη συνολικά επιβίωση ασθενών με mRCC χαμηλού κινδύνου, όταν έλαβαν *temsirolimus* αποκλειστικά, σε αντίθεση με ασθενείς που έλαβαν IFN-a.
- Ο *everolimus* είναι ένας αναστολέας mTOR, που χορηγείται από το στόμα. Μελέτη φάσης III έδειξε αύξηση επιβίωσης (4 μήνες έναντι 1.9 μηνών) σε ασθενείς που δεν είχαν αποτέλεσμα από προηγούμενη anti-VEGF-R θεραπεία (Ljungberg B et al, 2010, Ljungberg B et al. 2017).

2010 EAU Συστάσεις για πρώτη και δεύτερης γραμμής συστηματική θεραπεία στο Μεταστατικό Καρκίνο Νεφρού (mRCC)		
Θεραπεία	Κίνδυνος ή προηγούμενη θεραπεία	Συνιστώμενος παράγοντας
Πρώτης Γραμμής	Χαμηλού ή μετρίου κινδύνου mRCC	Sunitinib Bevacizumab+ IFN-a Pazopanib
	Υψηλού κινδύνου mRCC	Temsirolimus
Δεύτερης Γραμμής	Προηγούμενη θεραπεία με κυτοκίνες	Sorafenib Pazopanib
	Προηγούμενη VEGFR θεραπεία Προηγούμενη θεραπεία με	Everolimus Κλινικές μελέτες

	αναστολέα mTOR	
--	----------------	--

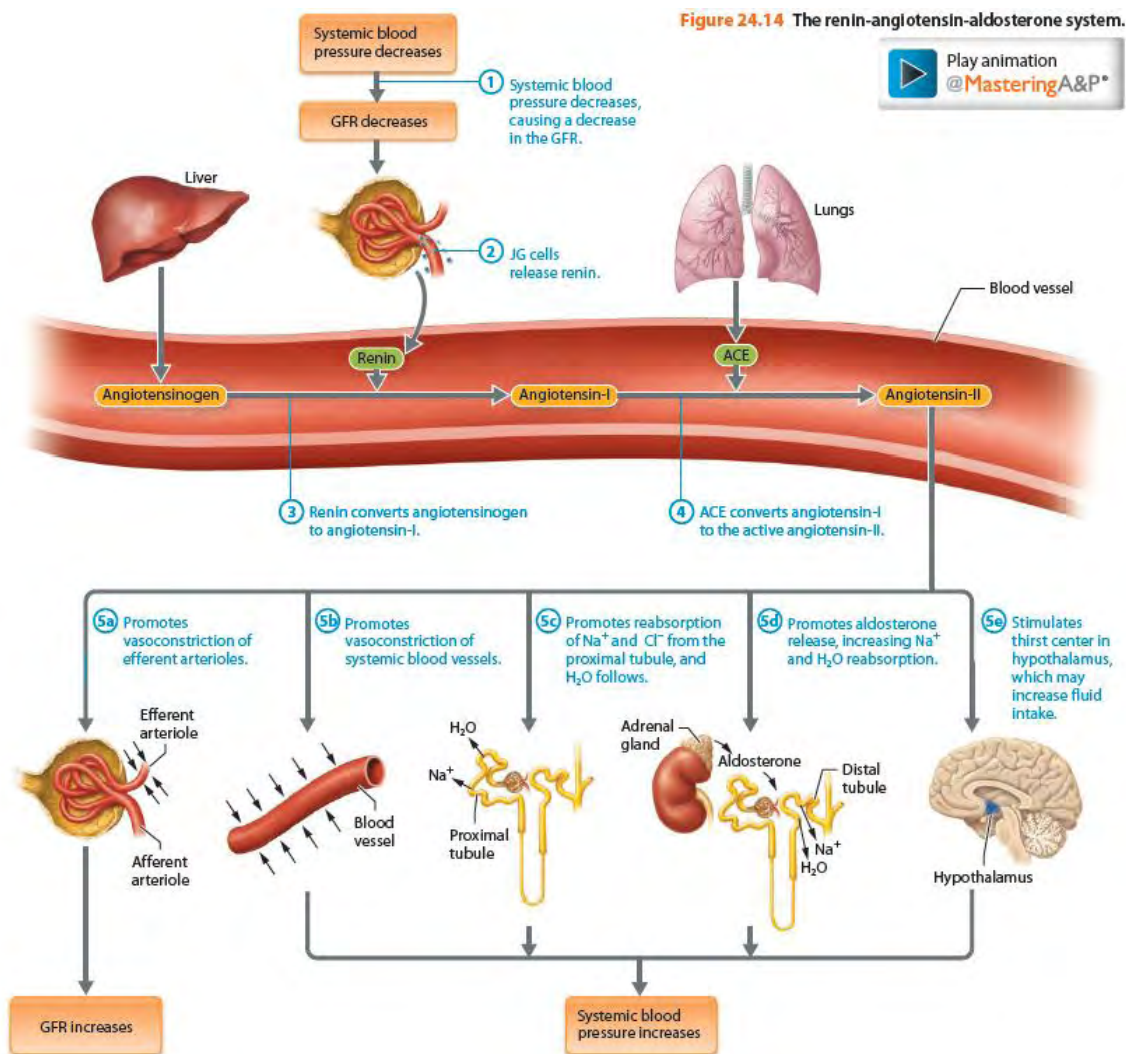
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Το Σύστημα Ρενίνης – Αγγειοτενσίνης (RAAS)

Το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης - αλδοστερόνης θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα ομοιοστατικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης. Το ένζυμο ρενίνη παράγεται στα παρασπειραματικά κύτταρα του νεφρού ως αποτέλεσμα της ενδονεφρικής πίεσης και δρα στην κυκλοφορία στο αγγειοτενσινογόνο (AGT), μία α_2 -σφαιρίνη που παράγεται στο ήπαρ. Με πρωτεολυτική διάσπαση αφαιρείται ένα δεκαπεπτίδιο και παράγεται η αγγειοτενσίνη I (ANG I). Η αγγειοτενσίνη I δε φαίνεται να παίζει κάποιο βιολογικό ρόλο και μάλλον υπάρχει ως πρόδρομη μορφή της αγγειοτενσίνης II. Το μετατροπικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης ACE (Angiotensin Converting Enzyme), που βρίσκεται κυρίως στα τριχοειδή των πνευμόνων, μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I στο οκταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη II (ANG II), που είναι η δραστική ουσία του συστήματος (Σαραφίδης Π Α, Λαζαρίδης Α Ν, Τουρκαντώνης Α Α, 2001: 29-43). Η αγγειοτενσίνη II δρα ως ορμόνη που προκαλεί σύσπαση των λείων μυικών ινών των αγγείων και σύσπαση των αγγείων με αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

Η αγγειοτενσίνη II προκαλεί επίσης την απελευθέρωση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια. Η καταστολή του μετατροπικού ενζύμου ACE από αντιυπερτασικά φάρμακα οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της αγγειοτενσίνης II. Η αγγειοτενσίνη II μετατρέπεται επίσης σε αγγειοτενσίνη III, η κύρια δράση της οποίας είναι η επαγωγή παραγωγής ανδροστερόνης.

Στο σύστημα RAAS συμμετέχουν επίσης οι υποδοχείς της αγγειοτενσίνης II, τύπου I (AT1R) και τύπου II (AT2R). Το σύστημα RAAS εντοπίζεται κυρίως στο νεφρό, αλλά παρατηρήθηκε πως όλα τα συστατικά του συντίθενται και σε άλλους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά και ο πλακούντας (Sparks M, Crowley S et al, 2014).



Εικόνα 14. Το σύστημα ρενίνης- αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης.

2.1.1 Λειτουργία του Συστήματος Ρενίνης Αγγειοτενσίνης (RAAS)

Η αγγειοτενσίνη II, είναι η δραστική ουσία του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Το σύστημα RAAS λειτουργεί συνοπτικά ως εξής:

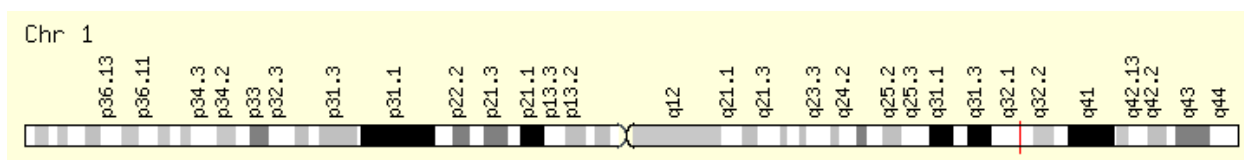
Όταν η πίεση του αίματος πέφτει (συστολική πίεση μικρότερη από 100 mmHg) η ρενίνη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και χωρίζει το αγγειοτενσινογόνο ώστε να παραχθεί η αγγειοτενσίνη I. Η αγγειοτενσίνη I με τη δράση του ACE ενζύμου μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη II που προκαλεί την απελευθέρωση της αλδοστερόνης στα επινεφρίδια. Η αλδοστερόνη προκαλεί κατακράτηση νατρίου και απώλεια καλίου από τους νεφρούς. Το αυξημένο νάτριο κατακρατεί νερό μέσα στα αγγεία και παρατηρείται αύξηση της αρτηριακής πίεσης (McCance et al, 1994).

Στις βασικές δράσεις της αγγειοτενσίνης II συγκαταλέγονται η γενικευμένη αγγειοσύσπαση, η διέγερση του επινεφριδιακού φλοιού για την έκκριση αλδοστερόνης, η αύξηση της συμπαθητικής δραστηριότητας και της ευαισθησίας των αγγείων στις κατεχολαμίνες, η διέγερση της έκκρισης βασοπρεσίνης, η σύσπαση του απαγωγού αρτηριδίου του νεφρού που συνεπάγεται αύξηση της πίεσης διήθησης, η αύξηση της επιθυμίας για H₂O και NaCl. Οι δράσεις αυτές έχουν ως σκοπό την προφύλαξη των οργανισμών από την απώλεια υγρών και την επαρκή αιμάτωση των ζωτικών οργάνων.

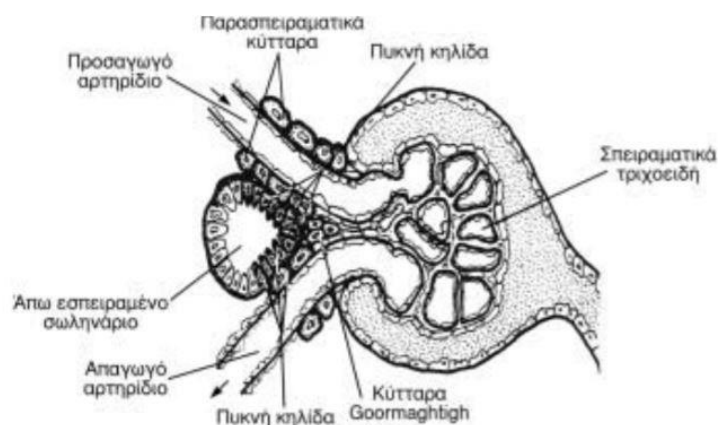
Σε παθολόγεια του συστήματος, παρατηρείται αρτηριακή υπέρταση, ενώ σε χρόνια διέγερση του συστήματος παρατηρείται αγγειακή υπετροφία, καρδιακή υπετροφία και νεφροσκλήρυνση (Σαραφίδης Π Α, Λαζαρίδης Α Ν, Τουρκαντώνης Α Α, 2001: 29-43).

2.1.2 Ρενίνη

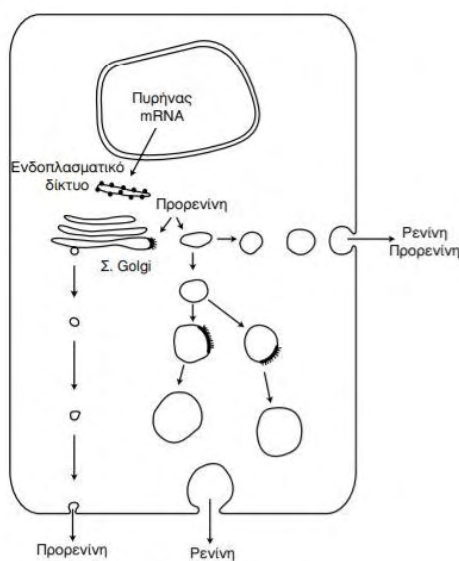
Η ρενίνη είναι μια πολύ εξειδικευμένη ενδοπεπτιδάση και παράγεται από τα παρασπειραματικά κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής, που βρίσκεται στον αγγειώδη πόλο κάθε νεφρικού σωματίου. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, το οποίο αποτελείται από εννέα εξόνια και οκτώ ιντρόνια και εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 (1q32). Η ρενίνη είναι το ένζυμο που ευθύνεται για τη διάσπαση του αγγειοτενσινογόνου σε αγγειοτενσίνη I, που στη συνέχεια διασπάται περαιτέρω σε αγγειοτενσίνη II. Έχει παρατηρηθεί πως ερεθίσματα που αυξάνουν την έκκριση ρενίνης, όπως η χαμηλή σε νάτριο διαίτα, η θεραπεία με διουρητικά ή η θεραπεία με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ACE, αυξάνουν και την έκφραση του γονιδίου, όπως προκύπτει από την αύξηση του αντίστοιχου mRNA. Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό έκκρισης της ρενίνης είναι η πίεση διήθησης του σπειράματος, η συγκέντρωση του νατρίου και του χλωρίου στο υγρό του άπω σωληναρίου και η δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος που αντιστοιχούν στον έλεγχο της αιμάτωσης του νεφρού, της ισορροπίας H₂O και ηλεκτρολυτών και της συστηματικής αρτηριακής πίεσης (Sparks M, Crowley S et al, 2014).



Εικόνα 15. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου REN [χρωμόσωμα 1, βραχίονας q, θέση 32 (1q32)] Πηγή: Genecards.org



Εικόνα 16. Η παρασπειραματική συσκευή. Πηγή: Σαραφίδης et al. *Αρτηριακή Υπέρταση* 2001, 10: 29-43

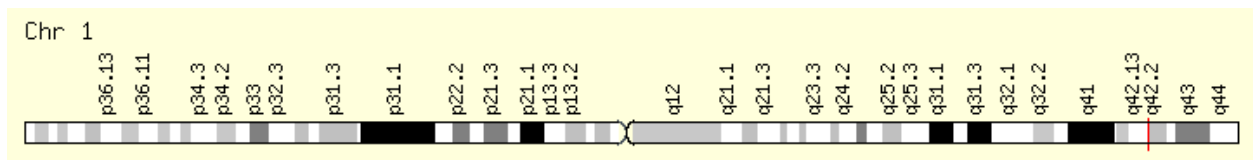


Εικόνα 17. Διαδικασία έκκρισης της ρενίνης. Πηγή: Σαραφίδης et al. *Αρτηριακή Υπέρταση* 2001, Κεφ. 10: 29-43

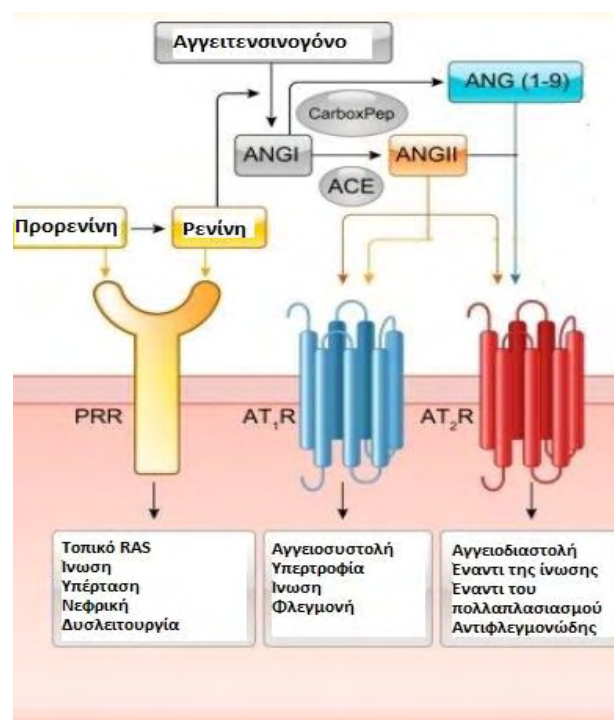
2.1.3 Αγγειοτενσινογόνο

Το αγγειοτενσινογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελεί το μοναδικό υπόστρωμα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, αντιπροσωπεύοντας το σημείο έναρξης του συστήματος. Απελευθερώνεται από το ήπαρ, αλλά και από άλλους ιστούς όπως η καρδιά, τα

αγγεία, ο νεφρός, και ο λιπώδης ιστός. Το γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (1q42.2). Έχει 485 αμινοξέα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται 33 αμινοξέα ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου. Η ρενίνη διασπά τα 10 N-τελικά αμινοξέα του γονιδίου και το μετατρέπει σε αγγειοτενσίνη I, που διασπάται στη συνέχεια από το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE), με αποτέλεσμα την παραγωγή του δραστικού προϊόντος, αγγειοτενσίνη II.



Εικόνα 18. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου AGT [Χρωμόσωμα 1, μακρύς βραχίονας q, θέση 42.2 (1q42.2)] Πηγή: Genecards.org



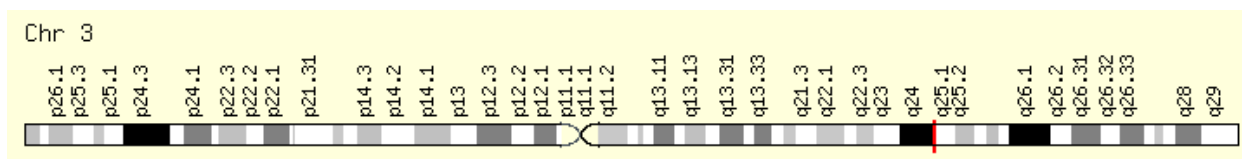
Εικόνα 19. Το σύστημα RAAS. Πηγή: Forrester J et al, Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology, 2018.

2.1.4 Υποδοχέας Αγγειοτενσίνης II Τύπου I (AT1R)

Η Αγγειοτενσίνη II είναι μια αγγειοδιασταλτική ορμόνη και αποτελεί ρυθμιστή έκκρισης της αλδοστερόνης. Λειτουργεί μέσω δύο τουλάχιστον τύπων υποδοχέων. Το γονίδιο AT1R κωδικοποιεί τον υποδοχέα τύπου 1, ο οποίος προάγει την αγγειοσύσπαση, την υπερτροφία και την υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων. Πιστεύεται πως είναι το μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα τύπου 1 στον άνθρωπο. Ο υποδοχέας τύπου 1 ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων που είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες (G-protein-coupled υποδοχέων GPCRs), που σημαίνει πως για να πυροδοτήσουν τα σηματοδοτικά μηνύματα είναι απαραίτητο να ενωθούν με μια μικρή G-πρωτεΐνη.

Η ενεργοποίηση των AT1 υποδοχέων αυξάνει το οξειδωτικό στρες και τα επίπεδα του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (TGFβ). Τα παραπάνω συνεισφέρουν στη δημιουργία ενός αθηροσκληρυντικού και προθρομβωτικού περιβάλλοντος.

Το γονίδιο AT1R βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα q του χρωμοσώματος 3, στη θέση 24 (3q24), και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης II τύπου I, μεγέθους 359 αμινοξέων.

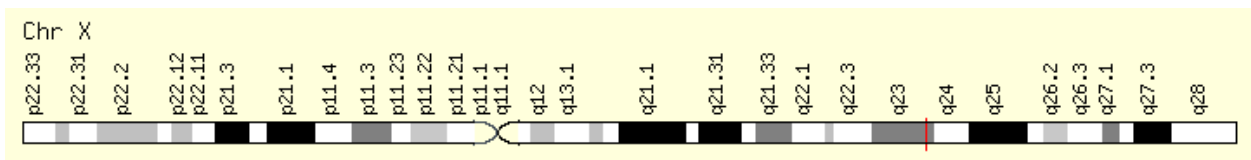


Εικόνα 20. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου AT1R. [Χρωμόσωμα 3, μακρύς βραχίονας q, θέση 24 (3q24)] Πηγή: Genecards.org

2.1.5 Υποδοχέας Αγγειοτενσίνης II Τύπου II (AT2R)

Ο υποδοχέας αγγειοτενσίνης II τύπου II είναι, επίσης, ένας υποδοχέας που επιδρά με την αγγειοτενσίνη II και ανήκει στην οικογένεια των GPCRs υποδοχέων, όπως ο υποδοχέας τύπου I. Ο τρόπος δράσης των υποδοχέων είναι λιγότερο γνωστός, ενώ μελέτες υποστηρίζουν πως η δράση των δύο υποδοχέων είναι ανταγωνιστική. Οι AT2 υποδοχείς είναι αγγειοδιασταλτικοί και ευνοούν την απόπτωση.

Το γονίδιο AT2R εδράζεται στο X χρωμόσωμα, στη θέση Xq23. Έχει μέγεθος 5kb, και περιλαμβάνει δύο ιντρόνια (152bp, 1207bp), δύο μικρά εξόνια (68bp, 95bp) και ένα μεγάλο εξόνιο (>2300bp). Η περιοχή που κωδικοποιεί το γονίδιο βρίσκεται στο τρίτο εξόνιο.



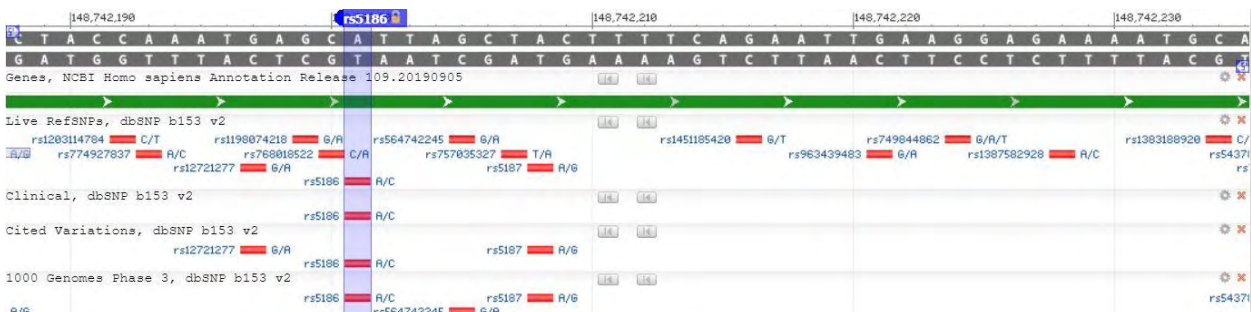
Εικόνα 21. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου AT2R. [Χρωμόσωμα X, μακρύς βραχίονας q, θέση 23 (Xq23)] Πηγή: Genecards.org

2.2 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide polymorphisms, SNPs) των γονιδίων του συστήματος RAAS

2.2.1 AT1R rs5186 πολυμορφισμός (A1166C)

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί αρκετοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο AT1R. Ο πολυμορφισμός rs5186 (A1166C) είναι από τους πιο μελετημένους πολυμορφισμούς. Το AT1R γονίδιο έχει πολλά SNPs σε κωδικοποιούσες και μη περιοχές. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με την υπέρταση και πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων, επομένως συσχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα της αγγειοτενσίνης II.

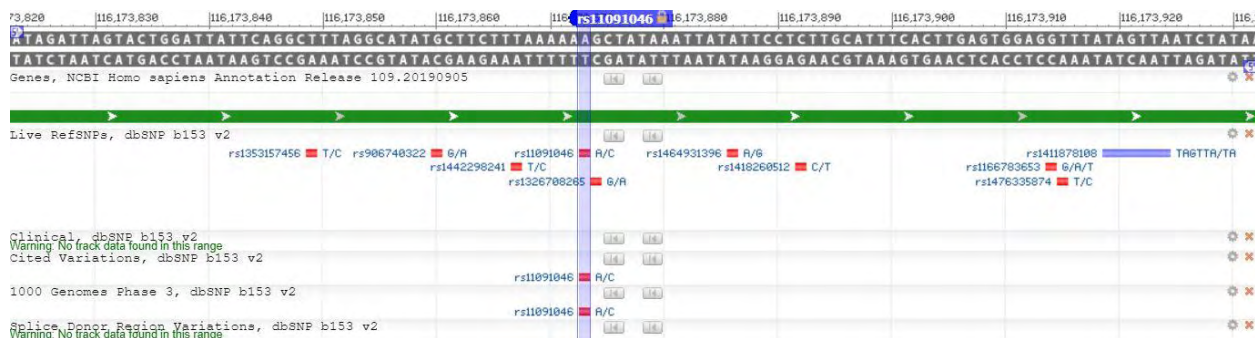
Η αλλαγή στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό συμβαίνει στην 3' αμετάφραστη περιοχή στη θέση chr3:148742201.



Εικόνα 22. Ο πολυμορφισμός rs5186 (A1166C) . Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs5186>

2.2.2 AT2R rs11091046 πολυμορφισμός (A3123C)

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου AT2R δεν έχουν μελετηθεί τόσο καλά, όσο αυτοί του AT1R γονιδίου. Ο πολυμορφισμός rs11091046 (A3123C) έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με υπέρταση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια και στεφανιαία νόσο. Η αλλαγή στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό εντοπίζεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του εξονίου 3 στη θέση chrX:116173873.



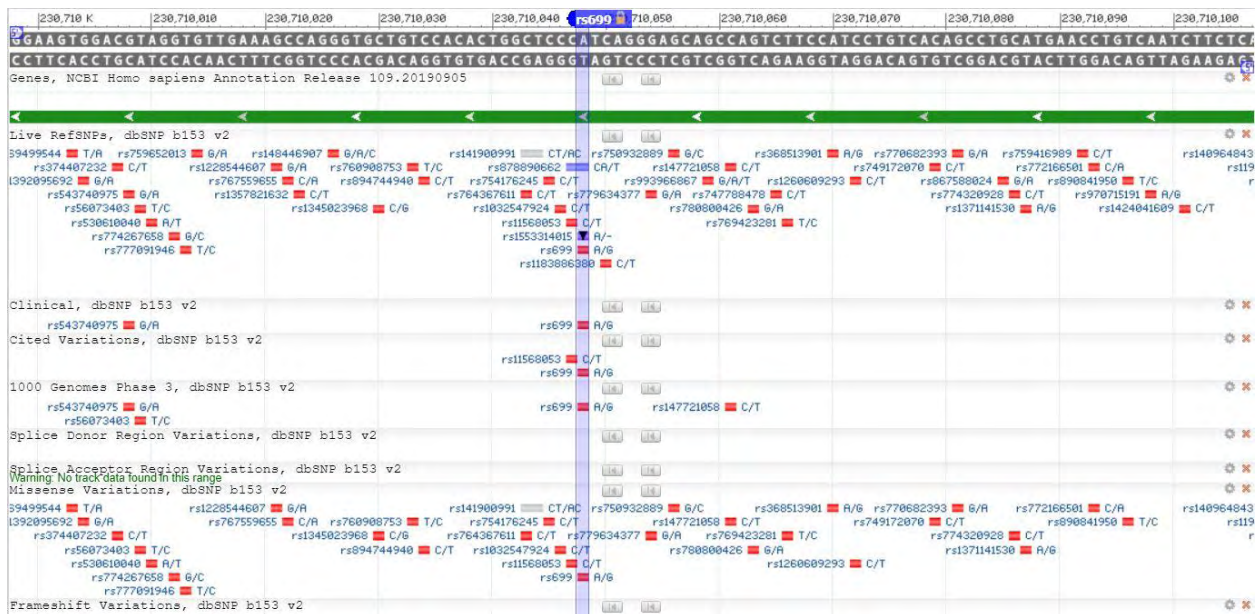
Εικόνα 23. Ο πολυμορφισμός rs11091046 (A3123C) Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11091046>

2.2.3 Αγγειοτενσινογόνο

Πολλοί πολυμορφισμοί του γονιδίου του αγγειοτενσινογόνου έχουν μελετηθεί εκτενώς.

2.2.3.1 AGT rs699 πολυμορφισμός (M235T)

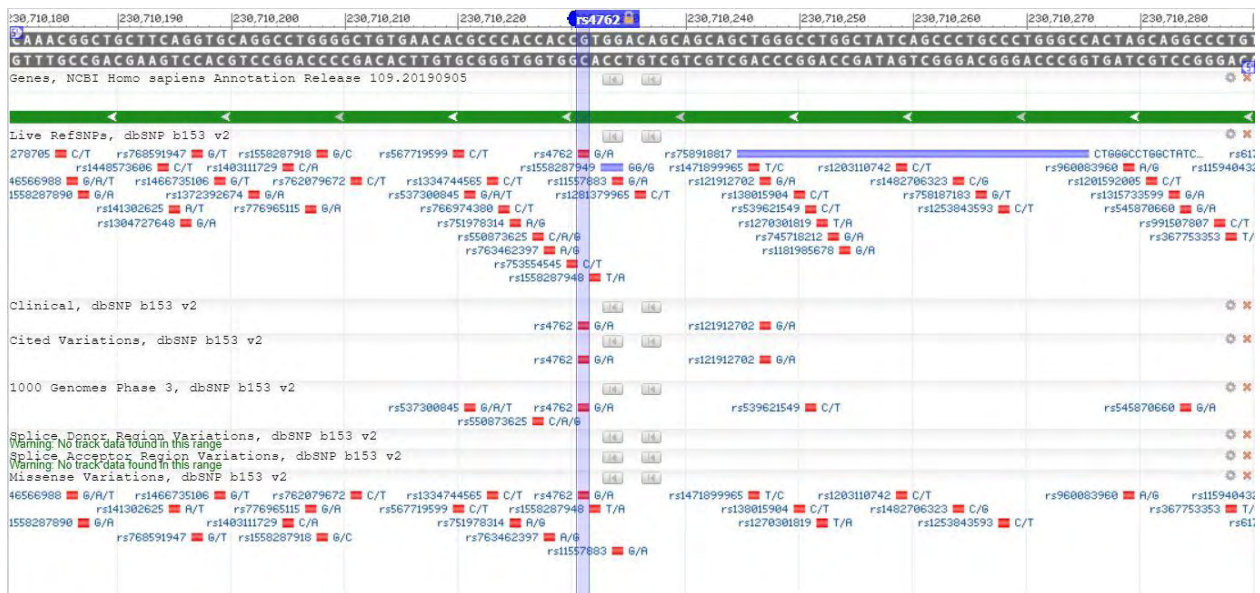
Ο πολυμορφισμός rs699 (M235T), προκύπτει από την υποκατάσταση της μεθειονίνης από θρεονίνη στη θέση 235 (chr1:230710048). Αυτό είναι αποτέλεσμα μιας νουκλεοτιδικής αντικατάστασης της θυμίνης (T) από την κυτοσίνη (C), επομένως η αλλαγή αυτή επηρεάζει την τριπλέτα βάσεων που κωδικοποιεί την μεθειονίνη.



Εικόνα 24. Ο πολυμορφισμός rs699 (M235T). Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs699>

2.2.3.2 AGT rs4762 πολυμορφισμός (T174M)

Στον πολυμορφισμό αυτό, η θρεονίνη έχει αντικατασταθεί από την μεθειονίνη στη θέση 174. Ο πολυμορφισμός αυτός προκύπτει από μια νουκλεοτιδική αντικατάσταση που οδηγεί σε αντικατάσταση ολόκληρου αμινοξέος. Η αλλαγή εντοπίζεται στο δεύτερο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας, όπου η κυτοσίνη (C) αντικαθίσταται από τη θυμίνη (T). Η αλλαγή γίνεται στο εξόνιο 2 του γονιδίου στη θέση chr1:230710231. Ο πολυμορφισμός T174M έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης, μόνο εάν συνυπάρχουν επιπλέον γενετικοί ή/και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η αυξημένη πρόσληψη νατρίου και η κατανάλωση αλκοόλ.



Εικόνα 25. Ο AGT rs4762 (T174M) πολυμορφισμός. Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4762>

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Σκοπός

Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν πιθανή συσχέτιση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος με την παρουσία πολυμορφισμών σε γονίδια του συστήματος RAAS. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετήσουμε τη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών rs5186 (A1166C), rs12750834 (C5312T), rs699 (M235T), rs4762 (T174M) και rs11091046 (A3123C) του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και να εκτιμήσουμε την πιθανή τους συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκινώματος.

3.2 Υλικό της μελέτης

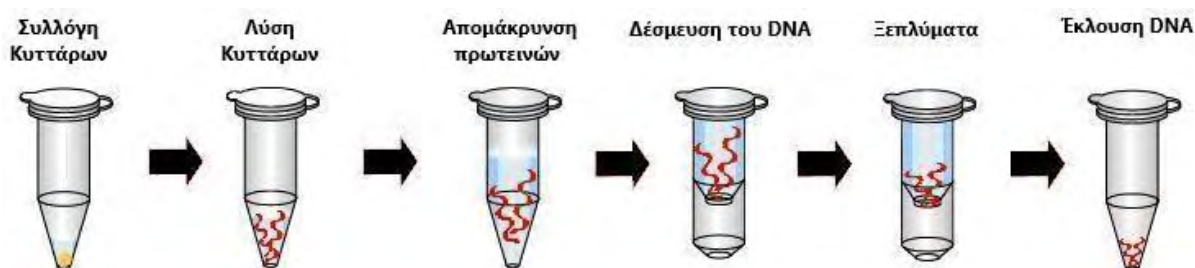
Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 40 ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα. Οι ασθενείς, (22 άνδρες και 18 γυναίκες) χειρουργήθηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Μετά το χειρουργείο, σε συνεργασία με το εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής συλλέχθηκε νωπός ιστός για κάθε ασθενή, τόσο νεοπλασματικός όσο και παρακείμενος φυσιολογικός σε απόσταση μεγαλύτερη των 10 εκατοστών από την αλλοίωση. Παράλληλα, συλλέξαμε περιφερικό αίμα από 40 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control group).

3.3 Απομόνωση γενομικού DNA από νωπό ιστό και περιφερικό αίμα (DNA extraction)

Η απομόνωση του γενομικού DNA έγινε με τη βοήθεια του PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

1. Το ιστοτεμάχιο του νωπού ιστού (καρκινικός – παρακείμενος φυσιολογικός) κατακεραμάστηκε σε τρυβλίο petri και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Falcon χωρητικότητας 15ml

2. Προσθήκη λυτικού διαλύματος σύστασης:
 - 2ml ATL (Tissue Lysis Buffer)
 - 1ml SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 0,5%
 - 0,5ml πρωτεΐνάση K συγκέντρωσης 10mg/ml
3. Ομογενοποίηση του μείγματος και επώασή του σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1-3 ημέρες (μέχρι να διαλυθεί ο ιστός).
4. Τοποθέτηση 400μl του ομογενοποιημένου διαλύματος σε 2 σωληνάρια τύπου erpendorf των 2ml.
5. Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 400μl διαλύματος λύσης/πρόσδεσης PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer και περιδίνηση (vortex).
6. Προσθήκη 400μl απόλυτης αιθανόλης (100%) σε κάθε σωληνάριο και περιδίνηση για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.
7. Μεταφορά του δείγματος και από τα δύο σωληνάρια σε στήλη παρεχόμενη από το kit και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (22°C-25°C) και απόρριψη του υγρού που συλλέγεται (Η διαδικασία μεταφοράς επαναλαμβάνεται περίπου 2 φορές, καθώς μεταφέρουμε από περίπου 640μl τη φορά).
8. Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής και απόρριψη του προηγούμενου.
9. Προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης 1 (Wash Buffer 1) στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά (22°C).
10. Αντικατάσταση του σωληναρίου συλλογής και προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης 2 (Wash Buffer 2) στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά (22°C).
11. Τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf και προσθήκη 100μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O).
12. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά.
13. Προσθήκη των ιδίων 100μl ddH₂O στη στήλη, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά.
14. Φύλαξη του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής (Genomic DNA) στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση.



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση της απομόνωσης του γενομικού DNA.

Απομόνωση γενομικού DNA από περιφερικό αίμα

Η απομόνωση του γενομικού DNA έγινε με τη βοήθεια του PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

1. Μετάγγιση 200μl αίματος από σωληνάριο αιμοληψίας σε Eppendorf 2ml.
2. Προσθήκη 20μl πρωτεϊνάσης K.
3. Προσθήκη 20μl RNase και επώαση 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (22-25°C).
4. Προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης AL.
5. Επώαση σε υδατόλουτρο 56°C για 15 λεπτά.
6. Προσθήκη 200μl αιθανόλη 100%.
7. Μετάγγιση του διαλύματος σε στήλη (QIAamp Mini Spin Column) μέσα σε σωληνάριο συλλογής των 2ml.
8. Φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά.
9. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής.
10. Προσθήκη 500μl διαλύματος έκπλυσης 1 (Wash Buffer 1) και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά.
11. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής.
12. Προσθήκη 500μl διαλύματος έκπλυσης 2 (Wash Buffer 2) και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά.
13. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής.
14. Προσθήκη 200μl δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O).
15. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά.
16. Προσθήκη των ιδίων 200μl ddH₂O στη στήλη, επώαση για 5 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά.

17. Φύλαξη του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής (Genomic DNA) στους -20 °C μέχρι την επόμενη χρήση.

3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

3.4.1 Φωτομέτρηση

Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του DNA των δειγμάτων μας για να αξιολογηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά τους. Η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζεται εάν μετρηθεί η απορρόφηση του ίδιου δείγματος στα 260 nm και στα 280 nm και εκτιμάται από το λόγο OD260/OD280. Τιμές μεταξύ 1.7-1.9, προσδιορίζουν ένα υψηλής καθαρότητας DNA. Τιμές μικρότερες του 1.7 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως είτε πρωτεϊνών είτε φαινόλης, ενώ μεγαλύτερες του 1.9 είναι ενδεικτικές πρόσμιξης με άλλα μακρομόρια. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{CdsDNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{τιμή OD260} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης.}$$

3.4.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων μας σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την ακεραιότητα του δείγματός μας και αξιολόγηση με τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης υπό υπεριώδες φως (UV).

3.4.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

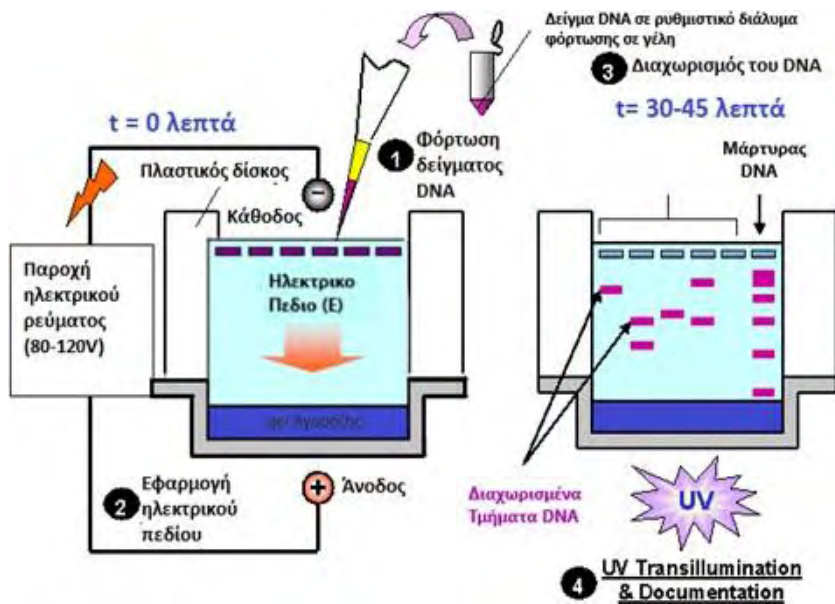
1. Μέτρηση σε ζυγό ακριβείας της επιθυμητής ποσότητας αγαρόζης σε σκόνη και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (Tris- Boric Edta) 1x και ανάδευση.
2. Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του

- μίγματος μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές το διάλυμα.
3. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο μίγμα (τυπικά 0,5μg/ml). Η ένωση αυτή εισχωρεί στις βάσεις του DNA (για αυτό και είναι γνωστός μεταλλαξιογόνος παράγοντας) και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.
 4. Ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου σε κατάλληλο εκμαγείο. Παραμονή σε ανοιχτό απαγωγό μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
 5. Τέλος αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευσή του στο ψυγείο.

3.4.4 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Πριν την τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα αγαρόζης αυτό αναμιγνύεται με μια χρωστική φόρτωσης (μπλέ της βρωμοφαινόλης). Αυτή εξυπηρετεί πολλούς σκοπούς. Αρχικά, επειδή είναι ορατή στο φυσικό φως βοηθάει στην αναγνώριση της θέσης φόρτωσης του δείγματος και παράλληλα καθώς μετακινείται μαζί με το DNA χρησιμεύει στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, η γλυκερόλη που περιέχει προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στο DNA και δεν το αφήνει να βγει έξω από το πηγαδάκι φόρτωσης του δείγματος. Ταυτόχρονα με τα δείγματα φορτώνεται και ένα δείκτης γνωστού μοριακού βάρους για την εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων μας.

Η μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται προς την άνοδο (+) λόγω του αρνητικού φορτίου που τους προσδίδει η παρουσία των φωσφορικών ομάδων. Το τελευταίο στάδιο είναι η μεταφορά του πηκτώματος υπό υπεριώδες φως (UV), αξιολόγηση των εμφανιζόμενων δειγμάτων και καταγραφή με την μορφή αποθήκευσης εικόνας των δεδομένων στοιχείων.



Εικόνα 27. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων. Πηγή: <https://schoolworkhelper.net/gel-electrophoresis-basics-steps>

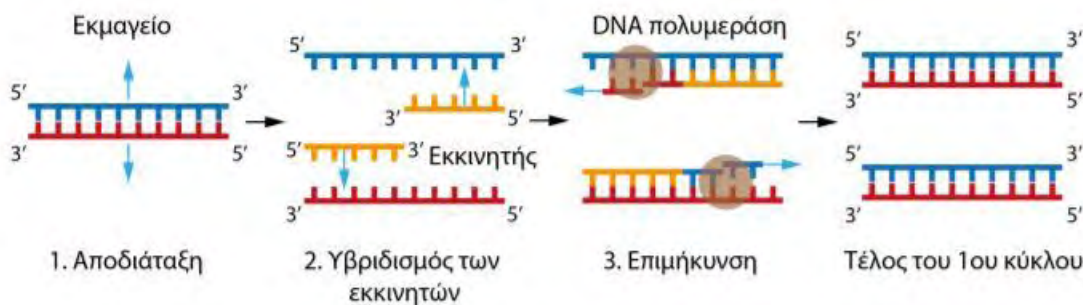
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

3.5.1 Αρχή Λειτουργίας

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι η κύρια μέθοδος ενίσχυσης ενός τμήματος γενετικού υλικού *in vitro*, με σκοπό την περαιτέρω διερεύνησή του. Η PCR χωρίζεται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Τα στάδια αυτά είναι:

1. Η αποδιάταξη (denaturation), κατά την οποία οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση (94 – 95°C) για 3 περίπου λεπτά.
2. Ο υβριδισμός των εκκινητών (annealing), στην οποία οι κατάλληλοι εκκινητές για την εκάστοτε αντίδραση υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις αλυσίδες του DNA (55 – 56°C).
3. Η επιμήκυνση (extension), όπου αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72 °C και οι εκκινητές επιμηκώνονται με βάση τη συμπληρωματική τους αλληλουχία χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση και dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια). Η σύνθεση της νέας αλυσίδας γίνεται με ρυθμό 1000 ζ.β. ανά λεπτό.

Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται 25 έως 35 φορές και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler), που μπορεί να εναλλάσσει τη θερμοκρασία ανάλογα με το πρόγραμμα που επιλέγουμε.



Εικόνα 28. Τα στάδια της PCR. Πηγή: Παλαιολόγου Δ., Κατσαρέλη Ε., Παπανικολάου Γ., Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου, Κεφ. 7, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

3.5.2 Πρωτόκολλο της PCR

Η PCR, περιλαμβάνει την ετοιμασία ενός μίγματος (mix), που περιέχει τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης. Τα συστατικά αυτά είναι:

- Η DNA πολυμεράση (Taq Polymerase), η οποία είναι ένα ένζυμο που συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA, χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως εκμαγείο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η σύνθεση της νέας αλυσίδας έχει κατεύθυνση 5' → 3'.
- Οι εκκινητές (Primers), οι οποίοι είναι γνωστής αλληλουχίας ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (Buffer) που ρυθμίζει το pH και το επίπεδο των αλάτων της αντίδρασης.
- Το γλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$), που δημιουργεί διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, την αλυσίδα DNA και τους εκκινητές.
- Τα νουκλεοτίδια (dNTPs), ένα ισομοριακό μίγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας.
- Το γενετικό υλικό (DNA ή RNA), το οποίο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την αντίδραση.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf, χρησιμοποιώντας το ένζυμο Taq DNA Polymerase (Thermo-Fisher Scientific) και εκκινητές των εταιριών Eurofins και Invitrogen σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
10X Ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς MgCl ₂	1X
50mM MgCl ₂	1.5 mM
40mM dNTPs διάλυμα	0.2 mM
10μM πρόσθιος εκκινητής	0.5 mM
10μM ανάστροφος εκκινητής	0.5 Mm
Taq DNA Polymerase (5U/μL)	1 U
δισ-απεσταγμένο νερό	X (έως τελικό όγκο 50μ)
Δείγμα (γενομικό DNA)	περίπου 100 ng

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR είναι οι παρακάτω:

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (mins)	Κύκλοι
94	5	1
94	1	40
56	1	
72	1	
72	10	1
18	∞	-

3.5.3 Αλληλουχίες εκκινητών των υπό εξέταση γονιδίων

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

(PCR) για το κάθε γονίδιο παρατίθενται στη συνέχεια:

REN γονίδιο
Forward Primer: 5' CGTACTCCCATTTTTAGGAAC 3' (21nts)
Reverse Primer: 5' AACACCAAAGCAGGCTTAA 3' (19nts)

AT1R γονίδιο
Forward Primer: 5' TTGAGGTTGAGTGACATGTTCGA 3' (23nts)
Reverse Primer: 5' CGG TTCAGTCCACATAATGCA 3' (21nts)

AT2R γονίδιο
Forward Primer: 5' GGATTCAGATTTCTCTTTGAA 3' (21nts)
Reverse Primer: 5' GCATAGGAGTATGATTTAATC 3' (21nts)

AGT γονίδιο
Forward Primer: 5' GATTGCGCACAAGGTCCT 3' (18nts)
Reverse Primer: 5' CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC 3' (25nts)

3.6 Πέψεις των PCR προϊόντων

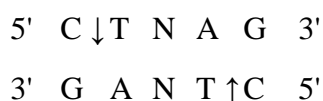
Ο έλεγχος του γονοτύπου των ασθενών και των υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) για τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς, πραγματοποιήθηκε με πέψεις με περιοριστικά ένζυμα, που αναγνωρίζουν και πέπτουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στα εξεταζόμενα γονίδια.

Η επώαση των PCR προϊόντων με τα περιοριστικά ένζυμα έγινε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

10x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1X
Ένζυμο	10 units
DNA	1 µg
δισ-απεσταγμένο νερό	Μέχρι τελικό όγκο 30 µl

3.6.1 Πέψη των γονιδίων REN και AT1R με το περιοριστικό ένζυμο HpyF3I (DdeI)

Το περιοριστικό ένζυμο HpyF3I (DdeI) (Thermo Scientific) αναγνωρίζει και πέπτει την περιοχή του γονιδίου REN στην αλληλουχία:



Το ένζυμο δρα καλύτερα με το ρυθμιστικό διάλυμα Tango (10x Buffer Tango), σε θερμοκρασία 37°C. Το προϊόν ενίσχυσης της PCR με ειδικούς εκκινητές για τμήμα του γονιδίου της ρενίνης που περιέχει τον πολυμορφισμό έχει μέγεθος 270ζ.β. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 4% σύστασης, δίνοντας τα παρακάτω τμήματα αναλόγως του γονοτύπου:

Γονότυπος	Ζεύγη Βάσεων
Ομόζυγο προγονικό αλληλόμορφο (Wildtype) C/C	270
Ετεροζυγωτία C/T	270 / μπάντα χαμηλότερου μοριακού βάρους
Ομόζυγο πολυμορφικό αλληλόμορφο T/T	μπάντα μικρότερου μοριακού βάρους

Το προϊόν ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου AT1R που εμπεριέχει τον πολυμορφισμό έχει μέγεθος 151ζ.β.. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 4% σύστασης, δίνοντας τα παρακάτω τμήματα αναλόγως του γονοτύπου:

Γονότυπος	Ζεύγη Βάσεων
Ομόζυγο προγονικό αλληλόμορφο (Wildtype) A/A	151
Ετερόζωτία A/C	151 / 100 / 51
Ομόζυγο πολυμορφικό αλληλόμορφο C/C	100 / 51

3.6.2 Πέψη του γονιδίου AT2R με το περιοριστικό ένζυμο AluI

Το περιοριστικό ένζυμο AluI (Thermo Scientific) αναγνωρίζει και πέπτει την περιοχή του γονιδίου AT2R στην αλληλουχία:

5' A G ↓ C T 3'

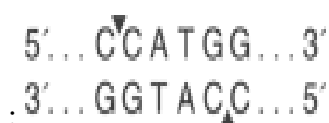
3' T C ↑ G A 5'

Το ένζυμο δρά καλύτερα με το ρυθμιστικό διάλυμα Tango (10x Buffer Tango), σε θερμοκρασία 37°C. Το προϊόν ενίσχυσης τμήματος του AT2R γονιδίου που εμπεριέχει τον πολυμορφισμό έχει μέγεθος 321ζ.β.. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 4% σύστασης, δίνοντας τα παρακάτω τμήματα αναλόγως του γονοτύπου:

Γονότυπος	Ζεύγη Βάσεων
Ομόζυγο προγονικό αλληλόμορφο (Wildtype) C/C	321
Ετερόζυγωτία C/A	321 / 214 / 107
Ομόζυγο πολυμορφικό αλληλόμορφο A/A	214 / 107

3.6.3 Πέψη τμήματος του γονιδίου ANG με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και SfaNI

Το περιοριστικό ένζυμο NcoI (New England Biolabs) αναγνωρίζει και πέπτει την ενισχυμένη περιοχή του γονιδίου στην αλληλουχία:



Το ένζυμο δρά καλύτερα με το ρυθμιστικό διάλυμα 4 (10x buffer 4) της ίδιας εταιρίας, σε θερμοκρασία 37°C.

Το προϊόν ενίσχυσης της περιοχής του γονιδίου ANG έχει μέγεθος 303ζ.β.. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 4% σύστασης, δίνοντας τα παρακάτω τμήματα αναλόγως του γονοτύπου:

Γονότυπος	Ζεύγη Βάσεων
Ομόζυγος προγονικό αλληλόμορφο (Wildtype) T/T	303
Ετερόζυγωτία T/M	303 / 211 / 92
Ομόζυγο πολυμορφικό αλληλόμορφο M/M	211 / 92

Το περιοριστικό ένζυμο SfaNI (New England Biolabs) αναγνωρίζει και πέπτει την ενισχυμένη περιοχή του ANG γονιδίου στην αλληλουχία:



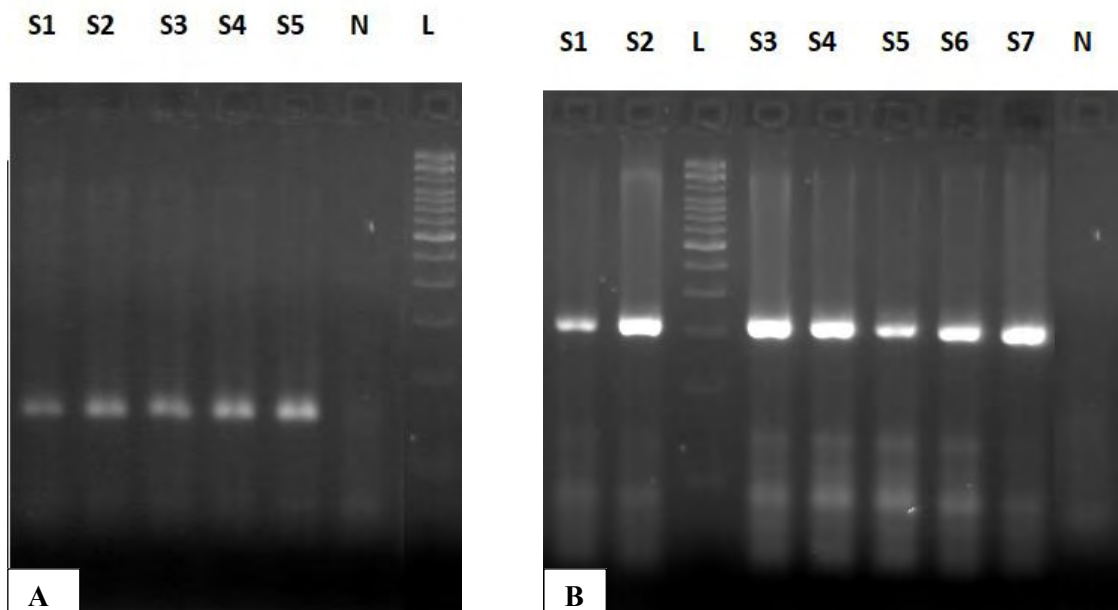
Το ένζυμο δρά καλύτερα με το ρυθμιστικό διάλυμα 3 (10x buffer 3) της ίδιας εταιρίας, σε θερμοκρασία 37°C.

Το προϊόν ενίσχυσης της περιοχής του ANG γονιδίου που εμπεριέχει τον πολυμορφισμό έχει μέγεθος 303ζ.β. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 4% σύστασης, δίνοντας τα παρακάτω τμήματα αναλόγως του γονοτύπου:

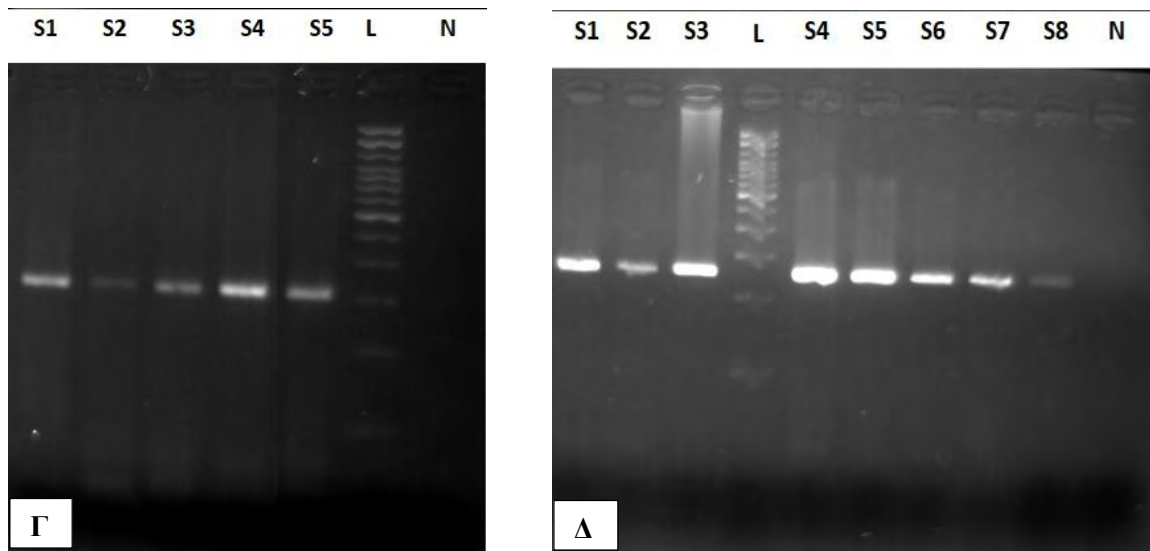
Γονότυπος	Ζεύγη Βάσεων
Ομόζυγο προγονικό αλληλόμορφο (Wildtype) M/M	266
Ετερόζυγωτία M/T	303 / 266
Ομόζυγο πολυμορφικό αλληλόμορφο T/T	303

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήσαμε συνολικά 80 άτομα, 40 ασθενείς και 40 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). Συλλέχθηκε νωπός ιστός νεοπλασματικός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός για κάθε ασθενή καθώς και περιφερικό αίμα από τα υγιή άτομα. Στην συνέχεια ακολούθησε απομόνωση γενομικού DNA. Μελετήσαμε συγκεκριμένους πολυμορφισμούς των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του συστήματος RAAS και συγκεκριμένα τη ρενίνη, το αγγειοτενσινογόνο, και τους υποδοχείς AT1 και AT2 της αγγειοτενσίνης II. Εξετάσαμε τους πολυμορφισμούς AT1R rs5186, REN rs12750834, AGT rs699, AGT rs4762 και AT2R rs11091046. Ακολούθησε επιλεκτική ενίσχυση των τμημάτων που φέρουν τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα ενισχυμένα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν και ακολούθησαν πέψεις με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες πάνω στη θέση των αντίστοιχων πολυμορφισμών. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε για το AT1R γονίδιο είναι 151ζ.β., για το AT2R είναι 321ζ.β., για το AGT γονίδιο είναι 303ζ.β. και για το REN γονίδιο είναι 270ζ.β. Ενδεικτικά παρατίθενται εικόνες ηλεκτροφόρησης των ενισχυμένων PCR προϊόντων για το κάθε γονίδιο που μελετήσαμε.

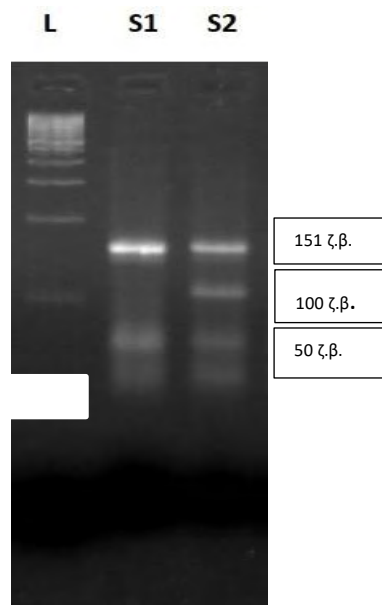


Εικόνα 29. A) PCR προϊόν DNA μήκους 151 ζ.β. για το γονίδιο AT1R. S1-S5: δείγματα B) PCR προϊόν DNA μήκους 321 ζ.β. για το γονίδιο AT2R. S1-S7: δείγματα ασθενών, N: αρνητικός μάρτυρας, L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer).

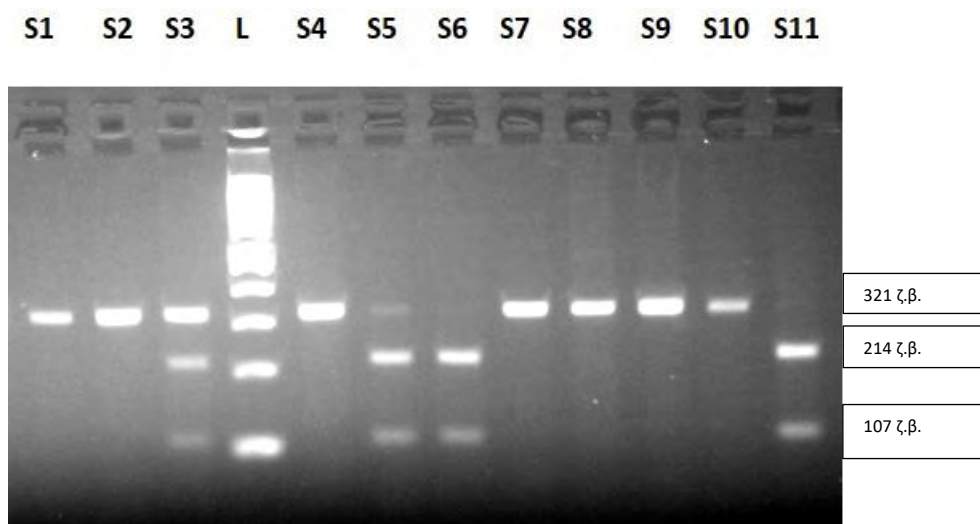


Εικόνα 30. Γ) PCR προϊόν DNA μήκους 303 ζ.β. για το γονίδιο AGT. S1-S5: δείγματα ασθενών, N: αρνητικός μάρτυρας, L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), Δ) PCR προϊόν DNA μήκους 270 ζ.β. για το γονίδιο REN. S1-S8: δείγματα ασθενών, N: αρνητικός μάρτυρας, L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer).

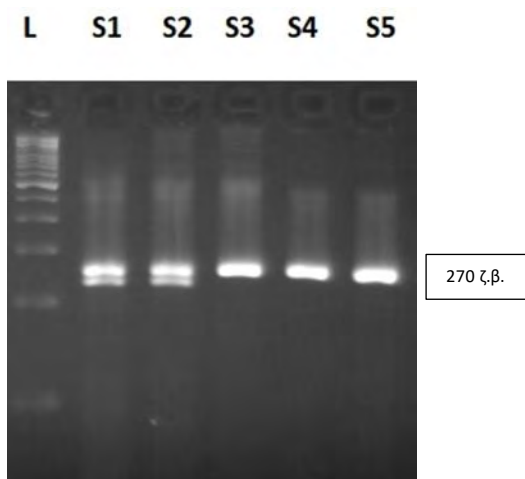
Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκαν επώσεις των προϊόντων PCR με περιοριστικά ένζυμα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που προαναφέρθηκαν:



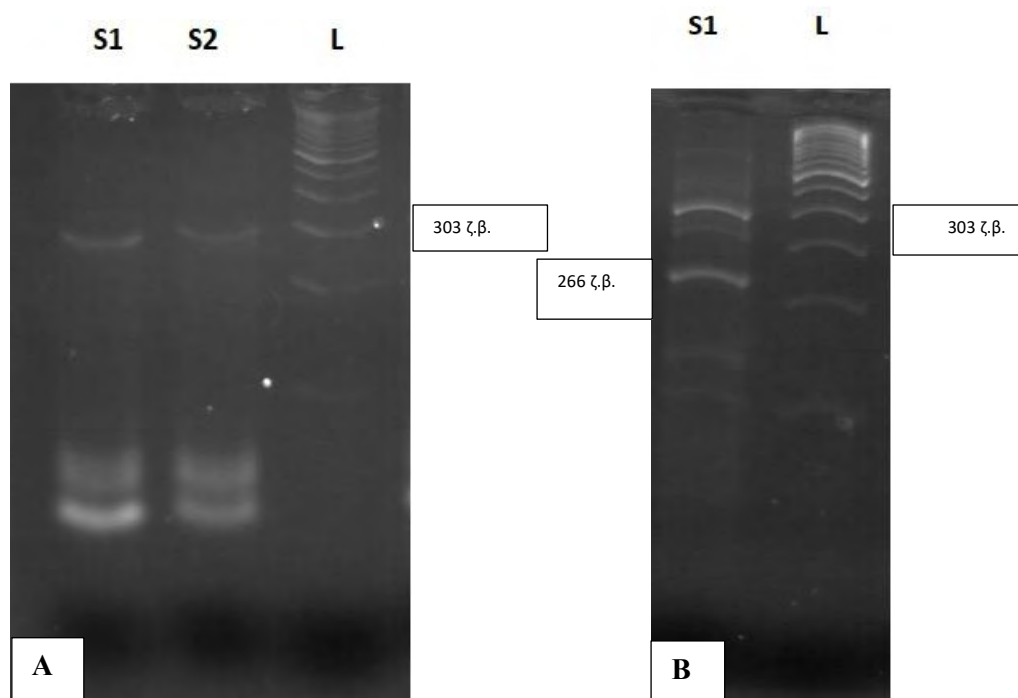
Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων επώασης για τον πολυμορφισμό rs5186 του γονιδίου AT1R έπειτα από τη δράση του ενζύμου DdeI. S1: προγονικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία S2: Ετεροζυγωτία L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer).



Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων επώασης για τον πολυμορφισμό rs11091046 για το γονίδιο AT2R έπειτα από τη δράση του ενζύμου AluI. S1-S7: Ετεροζυγωτία L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer).



Εικόνα 33. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων επώασης για τον πολυμορφισμό του REN γονιδίου έπειτα από τη δράση του ενζύμου DdeI. S1-S2: Ετεροζυγωτία, S3-S5: προγονικό αλληλόμορφο, L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer).



Εικόνα 34. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων για το γονίδιο AGT έπειτα από τη δράση των ενζύμων NcoI και SfaNI. A) NcoI: S1-S2: Προγονικό αλληλόμορφο L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), B) S1: Ετεροζυγωτία, L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer).

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την παρουσία συγκεκριμένων πολυμορφισμών του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) και συγκεκριμένα τους rs699 (M235T) και rs4762 (T174M) του AGT γονιδίου, τον rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου, τον rs12750834 (C5312T) του REN γονιδίου και τον rs11091046 (A3123C) του AT2R γονιδίου σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο και τον πιθανό τους ρόλο στην ανάπτυξη του νεφροκυτταρικού καρκινώματος.

Εξετάσαμε παράλληλα την πιθανή συσχέτιση της παρουσίας των πολυμορφισμών αυτών με τις κλινικοϊστολογικές παραμέτρους των ασθενών. Οι κλινικοϊστολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν είναι το φύλο και η ηλικία των ασθενών, η κατηγοριοποίηση κατά Furhman, ο τύπος του καρκινώματος και η μέγιστη διάμετρος του όγκου.

Στη μελέτη συμπεριλάβαμε 40 ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο, 18 γυναίκες (45%) και 22 άνδρες (55%), ηλικίας 65 ± 13.5 ετών (εύρος: 17-82) και 40 υγιή άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου και ηλικίας μικρότερης των 30 ετών, 20 άνδρες (50%) και 20 γυναίκες (50%). 26/40 ασθενείς (65%) διαγιγνώστηκαν με διανογκυτταρικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και 14/40 ασθενείς (35%) διαγιγνώστηκαν με άλλους τύπους νεφροκυτταρικού καρκινώματος. 20/40 όγκοι (50%) κατηγοριοποιήθηκαν ως Furhman 2, 12/40 όγκοι (30%) κατηγοριοποιήθηκαν ως Furhman 3 και 8/40 όγκους (20%) κατηγοριοποιήθηκαν ως Furhman 4. Η μέγιστη διάμετρος του όγκου των ασθενών ήταν 4.5 ± 13.1 cm.

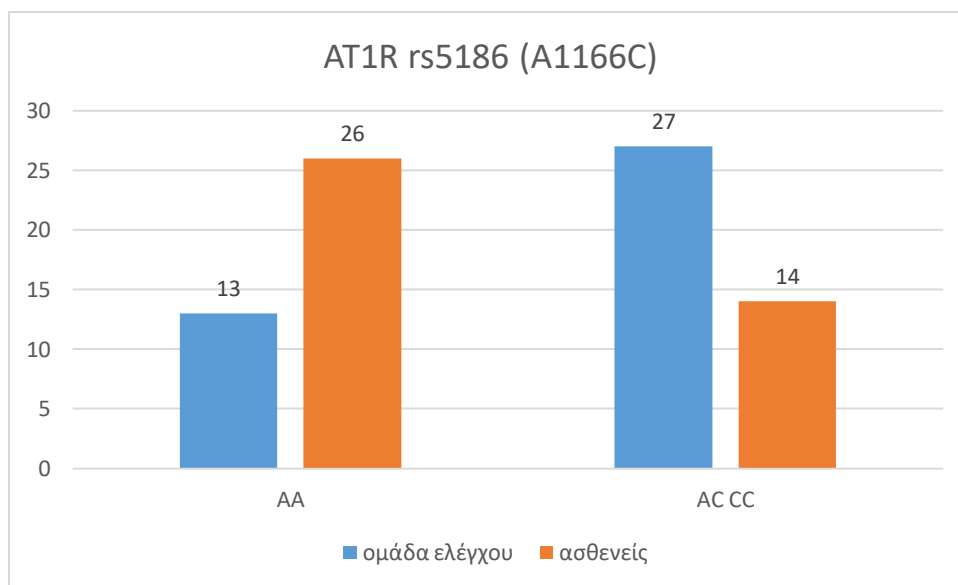
Αρχικά εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση της ύπαρξης πολυμορφισμών του συστήματος RAAS σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο και την ομάδα ελέγχου και τον κίνδυνο ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκίνου.

Ο πρώτος πολυμορφισμός που εξετάστηκε ήταν ο rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου.

			AA	AC	CC
group	ομάδα ελέγχου	Ομάδα ελέγχου	13	27	40
		%	32,5%	67,5%	100,0%
	ασθενής	Ασθενείς	26	14	40
		%	65,0%	35,0%	100,0%

Πίνακας 5. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs5186 στην ομάδα των ασθενών και την ομάδα ελέγχου (υγιή άτομα).

13/40 άτομα (32.5%) από την ομάδα ελέγχου έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο A σε ομοζυγωτία και 27/40 άτομα (67.5%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο C σε ομο- ή ετεροζυγωτία. 26/40 ασθενείς (65%) έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο A και 14/40 (35%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο C σε ομο- ή ετεροζυγωτία. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι στατιστικώς σημαντική ($p= 0.019$) και η παρουσία του πολυμορφικού αλληλόμορφου C φαίνεται ότι ασκεί μία προστατευτική επίδραση ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκίνου ($OR= 0,26$, 95% CI : 0.10- 0.66) σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία.

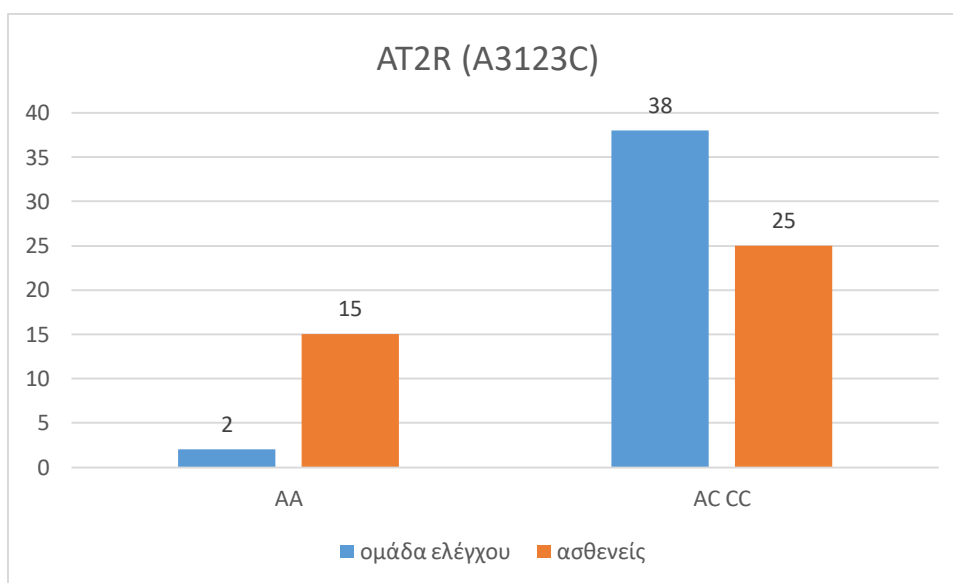


Διάγραμμα 1. Η κατανομή του πολυμορφισμού AT1R rs5186 (A1166C) στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs11091046 (A3123C) του AT2R γονιδίου. 2/40 άτομα (5%) από την ομάδα ελέγχου έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο A και 38/40 άτομα (95%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο C σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία. 15/40 ασθενείς (37.5%) έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο A και 25/40 (62.5%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο C σε ομο- ή ετεροζυγωτία. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι στατιστικώς σημαντική ($p= 0.001$) και η παρουσία του πολυμορφικού αλληλόμορφου C φαίνεται ότι ασκεί μία προστατευτική επίδραση ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκίνου ($OR= 0.08$, 95% CI : 0.02-0.4) σε ομο- είτε σε ετεροζυγωτία.

group	ομάδα ελέγχου	Ομάδα ελέγχου	AA	AC CC	Total
			2	38	40
		% within group	5%	95%	100,0%
	Ασθενής	Ασθενείς	15	25	40
		% within group	37,5%	62,5%	100,0%

Πίνακας 6. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs11091046 στην ομάδα των ασθενών και την ομάδα ελέγχου.



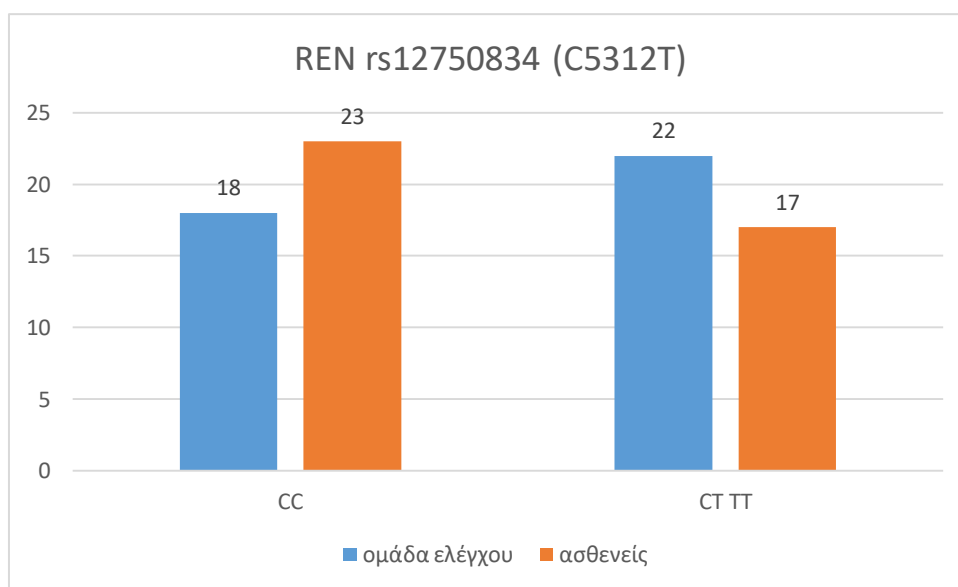
Διάγραμμα 2. Η κατανομή του πολυμορφισμού rs11091046 (A3123C) του AT2R γονιδίου στις ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου).

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί rs699 (M235T) και rs4762 (T174M) του AGT γονιδίου. Ωστόσο, λόγω έλλειψης δεδομένων στην ομάδα ελέγχου, η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν ήταν εφικτή για κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς.

Τέλος, μελετήθηκε ο πολυμορφισμός rs12750834 (C5312T) του γονιδίου της ρενίνης REN. 18/40 άτομα (45%) από την ομάδα ελέγχου έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο C και 22/40 άτομα (55%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία. 23/40 ασθενείς (57.5%) έφεραν το προγονικό αλληλόμορφο C και 25/40 (42.5%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία. Δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p > 0,05$).

		CC	CT TT	
Group	ομάδα ελέγχου	18	22	40
	% within group	45%	55%	100,0%
	ασθενής	23	17	27
	% within group	57,5%	42,5%	100,0%

Πίνακας 7. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs12750834 στην ομάδα των ασθενών και την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 3. Η κατανομή του πολυμορφισμού rs12750834 (C5312T) του γονιδίου REN στις ομάδες των ασθενών και υγείων ατόμων.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανή συσχέτιση των παραπάνω πολυμορφισμών με τις κλινικοϊστολογικές παραμέτρους της ηλικίας, του φύλου, της κατηγοριοποίησης κατά Furhman και της μεγίστης διαμέτρου του όγκου των ασθενών.

Αρχικά μελετήσαμε την πιθανή συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS. Δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των πολυμορφισμών και της ηλικίας των ασθενών.

<i>Ηλικία ασθενών</i>	<i>p-value</i>
<i>AGT rs699 (M235T)</i>	>0.05
<i>AGT rs4762 (T174M)</i>	>0.05
<i>AT1R rs5186 (A1166C)</i>	>0.05
<i>AT2R rs11091046 (A3123C)</i>	>0.05
<i>REN rs12750834 (C5312T)</i>	>0.05

Πίνακας 8. Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS.

Η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε είναι το φύλο των ασθενών. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μελετούμενων πολυμορφισμών και του φύλου των ασθενών.

<i>Φύλο ασθενών</i>	<i>p-value</i>
<i>AGT rs699 (M235T)</i>	>0.05
<i>AGT rs4762 (T174M)</i>	>0.05
<i>AT1R rs5186 (A1166C)</i>	>0.05
<i>AT2R rs11091046 (A3123C)</i>	>0.05
<i>REN rs12750834 (C5312T)</i>	>0.05

Πίνακας 9. Συσχέτιση του φύλου των ασθενών και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS.

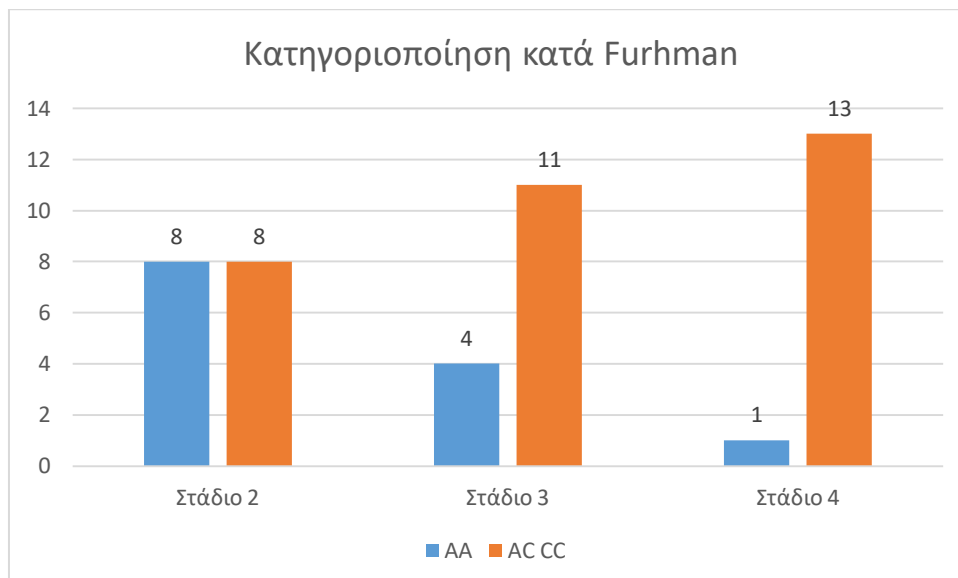
Η επόμενη παράμετρος που μελετήθηκε είναι η κατηγοριοποίηση κατά Furhman. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, αναδείχθηκε μία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου και του σταδίου κατά Fuhrman.

Κατηγοριοποίηση κατά Furhman	p-value
AGT rs699 (M235T)	>0.05
AGT rs4762 (T174M)	>0.05
AT1R rs5186 (A1166C)	0.03
AT2R rs11091046 (A3123C)	>0.05
REN rs12750834 (C5312T)	>0.05

Πίνακας 10. Συσχέτιση της κατηγοριοποίησης κατά Furhman και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS.

			AA	AC CC	
Furhman 2	2	Στάδιο 2	8	8	16
		% within Furhman	50%	50%	100,0%
3	3	Στάδιο 3	4	11	15
		% within Furhman	26.7%	57.37,1%	100,0%
4	4	Στάδιο 4	1	10	11
		% within Furhman	0.1%	90.9%	100,0%

Πίνακας 11. Συσχέτιση της κατηγοριοποίησης κατά Furhman και της παρουσίας του πολυμορφισμού rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου.



Διάγραμμα 4. Η κατανομή του πολυμορφισμού rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου στα παρατηρούμενα στάδια κατά Furhman στη διάγνωση των ασθενών.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση του τύπου του νεφροκυτταρικού καρκινώματος και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS στους ασθενείς της μελέτης. Δεδομένου ότι το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ο συχνότερος υπότυπος που εμφανίζεται στους ασθενείς, κατηγοριοποιήσαμε τους υπότυπους της μελέτης ως διαυγοκυτταρικός ή άλλος υπότυπος. Δεν προέκυψε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τύπων του νεφροκυτταρικού καρκινώματος και κάποιου από τους μελετούμενους πολυμορφισμούς.

<i>Τύποι νεφροκυτταρικού καρκίνου</i>	<i>p-value</i>
<i>AGT rs699 (M235T)</i>	>0.05
<i>AGT rs4762 (T174M)</i>	>0.05
<i>AT1R rs5186 (A1166C)</i>	>0,05
<i>AT2R rs11091046 (A3123C)</i>	>0.05
<i>REN rs12750834 (C5312T)</i>	>0.05

Πίνακας 12. Συσχέτιση των τύπων νεφροκυτταρικού καρκινώματος και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS.

Τέλος, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της διαμέτρου του όγκου και της παρουσίας των μελετούμενων πολυμορφισμών. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 13, δεν ανιχνεύτηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της διαμέτρου του όγκου και των εξεταζόμενων πολυμορφισμών.

<i>Μέγιστη διάμετρος όγκου</i>	<i>p-value</i>
<i>AGT rs699 (M235T)</i>	>0.05
<i>AGT rs4762 (T174M)</i>	>0.05
<i>AT1R rs5186 (A1166C)</i>	>0,05
<i>AT2R rs11091046 (A3123C)</i>	>0.05
<i>REN rs12750834 (C5312T)</i>	>0.05

Πίνακας 13. Συσχέτιση της μέγιστης διαμέτρου του όγκου και της παρουσίας των πολυμορφισμών του συστήματος RAAS.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (Renal Cell Carcinoma, RCC) αναλογεί περίπου στο 2% των κακοηθών νεοπλασμάτων. Η συχνότητα του νεφροκυτταρικού καρκινώματος παρουσιάζει διεθνώς ετήσια αύξηση. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στον πρώιμο εντοπισμό και διάγνωσή του ως αποτέλεσμα της ευρείας χρήσης απεικονιστικών μεθόδων, όπως το υπερηχογράφημα και η αξονική τομογραφία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας καθίσταται ως η 13^η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο και έχει τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ουρολογικών καρκίνων (Hsieh et al, 2017). Η συχνότητα του RCC είναι περισσότερο αυξημένη στις ανεπτυγμένες χώρες. Συγκεκριμένα, στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, ο κίνδυνος ανάπτυξης RCC κυμαίνεται μεταξύ των 1.3% και 1.8% (Ferlay J et al, 2013). Ωστόσο, παρατηρείται μεγάλη γεωγραφική ετερογένεια μεταξύ των χωρών.

Το φύλο και η ηλικία σχετίζονται στενά με τον κίνδυνο εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος (Capitanio et al, 2019). Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα παρουσιάζεται κυρίως μεταξύ της 6^{ης} και 7^{ης} δεκαετίας της ζωής του ανθρώπου και συχνότερα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, σε αναλογία 1.5:1 περίπου. Το κάπνισμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον κίνδυνο εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος, ενώ για το ρόλο της παχυσαρκίας υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες (Bergström et al, 2001, Mc Leod et al, 2013, Lotan et al, 2016, Cumberbatch et al, 2016).

Στους κλινικούς παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβάνονται η ύπαρξη υπέρτασης (McLeod et al, 2013, Chien et al, 2017, Mazzucotelli et al, 2017), οι πέτρες στους νεφρούς (Cheungpasitporn et al, 2015), ο διαβήτης τύπου 2 (Hendriks et al, 2018, Pearson- Stuttard et al, 2018) και άλλοι ορμονικοί παράγοντες και χρόνια νοσήματα (Capitanio et al, 2019). Από τα παραπάνω, η υπέρταση θεωρείται ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης RCC, καθώς το ιστορικό υπέρτασης συσχετίστηκε με 67% αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (McLeod et al, 2013, Hidayat et al, 2017). Αν και δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην καρκινογένεση μέσω της υπέρτασης, θεωρείται ότι άτομα με υπέρταση διαθέτουν υποξικούς νεφρούς, όπου προκαλείται η υπερέκφραση του παράγοντα υποξίας (HIF), προωθώντας τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και κατά συνέπεια, την καρκινογένεση (Capitanio et al, 2019).

Η παρουσία γενετικών συνδρόμων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος καταδεικνύει το ρόλο που παίζει το γενετικό υπόβαθρο στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα είναι ένας αρκετά επιθετικός και ετερογενής όγκος, ενώ παρουσιάζει επίσης ετερογένεια εντός του όγκου (Gerhlinger et al,

2012; 2014; Sankin et al, 2014). Το γενετικό υπόβαθρο παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και στην πορεία του όγκου και συμβάλλει στην πολυπλοκότητα του όγκου και στην διαφοροποιημένη κλινική έκβαση της νόσου (Molina et al, 2014; Motzer et al, 2014; Hsieh et al, 2016).

Η μορφολογική και γενετική ετερογένεια του νεφροκυτταρικού καρκινώματος καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολη την εύρεση βιοδεικτών που θα συμβάλλουν στη θεραπευτική αντιμετώπιση του όγκου. Αν και πρόκειται για νεόπλασμα που τα τελευταία χρόνια εντοπίζεται ευκολότερα, ωστόσο μεγάλο μέρος των ασθενών είναι σε προχωρημένο στάδιο κατά τη στιγμή της διάγνωσης και ενίοτε φέρουν και απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) αποτελεί κύριο μηχανισμό ρύθμισης της αιματικής πίεσης και συνδέεται άμεσα με την υπέρταση. Η υπερέκφραση των μορίων που συμμετέχουν στο σύστημα RAAS και η θετική τους ρύθμιση σχετίζεται με την εμφάνιση υπέρτασης σε ενήλικες, γεγονός που οδηγεί στην αυξημένη λήψη αναστολέων για τη ρύθμισή της (Deckers et al, 2015). Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι η υπερβολική ρύθμιση του συστήματος RAAS μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση, μέσω της προώθησης της αγγειογένεσης, της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού (Thomas et al, 2010).

Αν και δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα, η έρευνα των Andreotti et al (2010) έδειξε ότι πολυμορφισμοί των γονιδίων που μετέχουν στο σύστημα RAAS σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης νεφροκυτταρικού καρκινώματος, θέτοντας τους πολυμορφισμούς των γονιδίων ANG, AT1R, AT2R και REN ως υποψήφιους δείκτες για την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος στα πλαίσια της πρόληψης (Andreotti et al, 2010).

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την παρουσία και τη συχνότητα των πολυμορφισμών των γονιδίων AGT (rs699, M235T) και (rs4762, T174M), AT1R (rs5186, A1166C), REN (rs12750834, C5312T) και AT2R (rs11091046, A3123C) του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και την πιθανή συσχέτισή τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης του συγκεκριμένου όγκου. Επιπλέον, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση της παρουσίας των πολυμορφισμών αυτών με κλινικοϊστολογικές παραμέτρους των ασθενών και πιο συγκεκριμένα το φύλο και την ηλικία των ασθενών, την κατηγοριοποίηση κατά Furhman, τον τύπο του καρκινώματος και τη μέγιστη διάμετρο του όγκου.

Στα πλαίσια της μελέτης συλλέξαμε δείγματα φρέσκου-κατεψυγμένου ιστού (νεοπλασματικός και φυσιολογικός παρακείμενος ιστός) 40 ασθενών που προσήλθαν και

χειρουργήθηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Παράλληλα, συλλέξαμε περιφερικό αίμα από 40 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου και ηλικίας μικρότερης των 30 ετών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενομικού DNA από τις δύο ομάδες της μελέτης μας (ασθενείς- υγιή άτομα). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και φωτομέτρηση των δειγμάτων, ώστε προσδιοριστούν η ποιότητα και η ποσότητά τους. Για την ενίσχυση τμημάτων που εμπεριέχουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς rs699, rs4762, rs5186, rs12750834 και rs11091046 πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια, ακολούθησε RFLP ανάλυση με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων.

Οι γονότυποι που προέκυψαν για τον κάθε πολυμορφισμό, συγκεντρώθηκαν, κωδικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά με το λογισμικό IBM SPSS v.22. Αρχικά, προσδιορίσαμε τις περιγραφικές μεταβλητές της διαμέσου, της τυπικής απόκλισης και του τυπικού σφάλματος και καταγράφηκαν οι συχνότητες για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς και τις κλινικοϊστολογικές παραμέτρους των ασθενών.

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης του κινδύνου εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χ^2 για κατηγορικές μεταβλητές. Τα επίπεδα σημαντικότητας καθορίστηκαν ως μικρότερα του 0.05. Επιπλέον, στις στατιστικώς σημαντικές τιμές προσδιορίστηκαν τα επίπεδα κινδύνου OR με διαστήματα εμπιστοσύνης 95% και κατώφλι σημαντικότητας μικρότερο του 0.05. Παράλληλα, για τη διερεύνηση της συσχέτισης της παρουσίας των πολυμορφισμών και των κλινικοϊστολογικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χ^2 για τις κατηγορικές μεταβλητές, ενώ πραγματοποιήθηκε και γραμμική παλινδρόμηση για τις μεταβλητές της ηλικίας και της μεγίστης διαμέτρου του όγκου, που αποτελούν συνεχείς μεταβλητές.

Μελετήσαμε 40 ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνο, 18 γυναίκες (45%) και 22 άνδρες (55%), ηλικίας 65 ± 13.5 ετών και 40 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας έδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου και συγκεκριμένα το πολυμορφικό αλληλόμορφο C φαίνεται να έχει μία προστατευτική επίδραση ως προς την εμφάνιση του RCC, καθώς η συσχέτιση ήταν στατιστικώς σημαντική ($p = 0.019$) και $OR = 0.26$ (95% CI: 0.1 – 0.66). Ανάλογα, ο πολυμορφισμός rs11091046 (A3123C) του AT2R γονιδίου και συγκεκριμένα, το πολυμορφικό αλληλόμορφο C φαίνεται να έχει επίσης μία προστατευτική επίδραση στην εμφάνιση του RCC, καθώς η συσχέτιση με την εμφάνιση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος ήταν στατιστικώς σημαντική ($p = 0.001$) και $OR = 0.08$ (95% CI: 0.02 – 0.4). Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των

πολυμορφισμών των γονιδίων ANG και REN και του κινδύνου εμφάνισης του νεφροκυτταρικού καρκινώματος.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση κλινικοϊστολογικών παραμέτρων όπως το φύλο, η ηλικία, η κατηγοριοποίηση κατά Furhman, ο τύπος του καρκινώματος και η μέγιστη διάμετρος του όγκου με τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς rs699 (M235T) και rs4762 (T174M) του γονιδίου του αγγειοτενσινογόνου AGT, του rs5186 (A1166C) του AT1R γονιδίου, του rs11091046 (A3123C) του AT2R γονιδίου και τέλος του πολυμορφισμού rs12750834 (C5312T) του γονιδίου της ρενίνης (REN). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs5186 του AT1R γονιδίου και της κατηγοριοποίησης κατά Furhman ($p = 0.03$), όπου το πολυμορφικό αλληλόμορφο C φαίνεται να σχετίζεται με υψηλότερο στάδιο του όγκου (Furhman 3 και 4). Η συσχέτιση αυτή παρέχει μία ένδειξη για την πιθανή χρήση των πολυμορφισμών των συγκεκριμένων γονιδίων του συστήματος RAAS στην κλινική πράξη, για την πρόγνωση της πορείας του ασθενούς. Ωστόσο, τα ευρήματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν από μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Αν και το σύστημα RAAS είναι ένα καλά μελετημένο σύστημα και έχει συνδεθεί με τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για την πιθανή συσχέτισή του με την εμφάνιση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος. Η μελέτη των Deckers και συνεργατών (2015), στην οποία εξετάστηκαν δεκαεπτά πολυμορφισμοί του συστήματος RAAS και η πιθανή τους σύνδεση με τον κίνδυνο εμφάνισης RCC, έδειξε ότι δύο πολυμορφισμοί του AT1R γονιδίου (rs1492078 και rs5186) σχετίζονται με την ανάπτυξη RCC στο σύνολο του πληθυσμού. Τα ευρήματά μας για τον πολυμορφισμό rs5186 και συγκεκριμένα, για το πολυμορφικό αλληλόμορφο C, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης όσον αφορά στον κίνδυνο ανάπτυξης νεφροκυτταρικού καρκινώματος. Ο ίδιος πολυμορφισμός (rs5186) φαίνεται να συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης RCC και στη μελέτη των Andreotti et al (2010), ενώ δεν ανιχνεύτηκαν άλλες συσχετίσεις μεταξύ των υπολοίπων πολυμορφισμών του συστήματος RAAS.

Το συγκεκριμένο πεδίο έρευνας αποτελεί γόνιμο έδαφος για την περαιτέρω διερεύνηση πολυμορφισμών των γονιδίων του συστήματος RAAS συναρτήσει του κινδύνου εμφάνισης RCC, σε μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Δεδομένης της φύσης του RCC και της έντονης επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου και του τρόπου ζωής, η επίδραση των πολυμορφισμών αυτών στον κίνδυνο εμφάνισης και στην πορεία της νόσου, θα μπορούσαν να μελετηθούν υπό την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων. Εάν ληφθεί υπόψη η ετερογένεια της νόσου

και η έντονη έλλειψη κατοχυρωμένων βιοδεικτών, τα ευρήματα μας μπορούν να θεωρηθούν ως μία προσθήκη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία για την εύρεση βιοδεικτών στο RCC, συμβάλλοντας στον προσδιορισμό επικουρικών βιοδεικτών για την πορεία και τη σταδιοποίηση της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χατζημπούγιας Ιωάννης, Στοιχεία Ανατομικής του Ανθρώπου, 5η έκδοση, Αθήνα, GM DESIGN, 2009: 159-165
2. Smith, Peter, Internet reference, Role of the Kidney, Department of Clinical Dental Sciences, The University of Liverpool, 1998
3. Βλαχογιάννης Ι Γ, Κλινική Νεφρολογία και Υπέρταση, εκδόσεις Πασχαλίδη, 2009
4. Mader, Sylvia S. Human Biology, 8th Edition, McGraw-Hill, New York, 2004
5. Graaff, Van De, Human Anatomy, Sixth Edition, McGraw-Hill, New York, 2002
6. Scanlon C. Valerie, Sanders Tina, Essentials of Anatomy and Physiology, 5th edition, Philadelphia, F. A. Davis Company, 2007: 421-429
7. Netter H. Frank, Atlas of Human Anatomy, 5th edition, Philadelphia, Saunders, 2010: 247-250
8. Μπίτα Ν. Θεοδώρα, Η επίδραση του ουραιμικού ορού στο σύστημα μεταλλοπρωτεϊνών (MMPS/TIMPS) και σε βασικές βιολογικές δράσεις ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες H.U.V.E.C., Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2010: 9-14
9. Ljungberg B, Hanburry D C, Hora M, Kuczyk M A, Merseburger A S, Mulders P F A, Patard J-J, Sinescu I C, Κατευθυντήριες Οδηγίες για τον Καρκίνο του Νεφρού, Ευρωπαϊκή Ουρολογική Εταιρεία, 2010
10. Αθανασόπουλος Α, Δημητριάδης Γ, et al, Σύγγραμμα Ουρολογίας, Κεφάλαιο 14, Καρκίνος του Νεφρού, 1η έκδοση, Θεσσαλονίκη, Β' Ουρολογική Κλινική Α.Π.Θ., 2016
11. Ljungberg B, Albiges L, Bensalah K, Bex A, Giles R H, Hora M, Kuczyk M A, Lam t, Marconi L, Merseburger A S, Powles T, Staehler M, Volpe A, Κατευθυντήριες οδηγίες της EAU για τον καρκίνο του νεφρού, Ευρωπαϊκή Ουρολογική Εταιρεία, 2017
12. Σαραφίδης Π Α, Λαζαρίδης Α Ν, Τουρκαντώνης Α Α, Αρτηριακή πίεση, Τόμος 10, Τεύχη 1-3, Η ρύθμιση της έκκρισης ρενίνης, Τετραμηνιαίο Περιοδικό της Ελληνικής Αντιυπερτασικής Εταιρείας, 2001: 29-43

13. Sparks M, Crowley S et al, Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology, *Comprehensive Physiology*, Volume 4, Issue 3, 2014
14. Παλαιολόγου Δ, Κατσαρέλη Ε, Παπανικολάου Γ , et al, Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου, Κεφάλαιο 7, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, 1η έκδοση, Αθήνα, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015: 129-150
15. Αποστολοπούλου Μ Ι, Χατζητόλιος Α Ι, Φιδάνη Λ Κ, Σαββόπουλος, Αρτηριακή Υπέρταση, Τόμος 16, Τεύχος 3, Ο πολυμορφισμός A1166C του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης II στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια: ένας νέος γονιδιακός δείκτης πρόβλεψης;, *Τετραμηνιαίο Περιοδικό της Ελληνικής Αντυπερτασικής Εταιρίας*, 2007: 180-185
16. Forrester S, Booz G, Sigmund C, Coffman T, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S, Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology, *Physiological Reviews*, 2018: 1627-1738
17. Capitanio U, Montorsi F., Renal cancer, *Lancet* 2016;387:894–906
18. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. [Ηλεκτρονική διεύθυνση]: <http://globocan.iarc.fr>, Ημερομηνία πρόσβασης: 11/10/2019
19. Levi F, Ferlay J, Galeone C, et al., The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe, *BJU Int*, 2008;101:949–58
20. [Ηλεκτρονική διεύθυνση]: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/kidney-cancer/incidence-heading-Zero>, Ημερομηνία πρόσβασης: 11/10/2019
21. Yuan JM, Castelaο JE, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK. Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998, 7: 429-433)
22. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008, 371: 569-578
23. Pliopoulos O, Eng C. Genetic and clinical aspects of familial renal neoplasms, *Semin Oncol* 2000, 27:138-149

24. Stoerkel S, Hinkel A. Pathomorphologic classification and cytogenetic correlation in Renal & Adrenal Tumors. Beldegrun A, Ritchie A, Figlin R, RTD Oliver, Vaughan Edwin, Jr. (eds), Oxford University Press, New York, 2003, pp 46-48
25. McCance, Katherine L, Heuther, Sue E. (1994). "Pathophysiology: The Biological Basis for Disease in Adults and Children, Second Edition". Mosby-Year Book, Inc
26. Capitanio U., Bensalah K., Bex A., Boorjan SA et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. *European Urology* 75 (2019) 74 –84
27. Bergström A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A. Obesity and renal cell cancer—a quantitative review. *Br J Cancer* 2001; 85:984–90
28. Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, et al. Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *J Urol* 2013; 190:1657–61.
29. Lotan Y, Karam JA, Shariat SF, et al. Renal-cell carcinoma risk estimates based on participants in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial and national lung screening trial. *Urol Oncol* 2016;34, 167.e9–16.
30. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: a comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks. *Eur Urol* 2016; 70:458–66.
31. Liu B, Mao Q, Wang X, et al. Cruciferous vegetables consumption and risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Nutr Cancer* 2013; 65:668–76.
32. Jay R, Brennan P, Brenner DR, et al. Alcohol consumption and the risk of renal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). Wozniak MB, Brennan P, Brenner DR, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Katzke V, Kühn T, Boeing H, Bergmann MM, Steffen A, Naska A, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Saieva C, Grioni S, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Hjartåker A, Weiderpass E, Arriola L, Molina-Montes E, Duell EJ, Santiuste C, Alonso de la Torre R, Barricarte Gurrea A, Stocks T, Johansson M, Ljungberg B, Wareham N, KhawKT, Travis RC, Cross AJ, Murphy N, Riboli E, Scelo G. *Int J Cancer*. 2015 Oct 15;137 (8):1953-66. [Epub 2015 Apr 28]. doi: 10.1002/ijc.29559. *Urol Oncol* 2017;35(3):117

33. Lew JQ, Chow W-H, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Park Y. Alcohol consumption and risk of renal cell cancer: the NIH-AARP diet and health study. *Br J Cancer* 2011; 104:537–41. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6606089>.
34. Chien C-C, Han M-M, Chiu Y-H, et al. Epidemiology of cancer in endstage renal disease dialysis patients: a national cohort study in Taiwan. *J Cancer* 2017; 8:9–18.
35. Mazzucotelli V, Piselli P, Verdirosi D, et al. De novo cancer in patients on dialysis and after renal transplantation: north-western Italy, 1997–2012. *J Nephrol* 2017; 30:851–7.
36. Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, O’Corragain OA, et al. The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis. *QJM* 2015; 108:205–12.
37. Hendriks SH, Schrijnders D, van Hateren KJ, et al. Association between body mass index and obesity-related cancer risk in men and women with type 2 diabetes in primary care in the Netherlands: a cohort study (ZODIAC-56). *BMJ Open* 2018;8:e018859.
38. Pearson-Stuttard J, Zhou B, Kontis V, Bentham J, Gunter MJ, Ezzati M. Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018;6: e6–15.
39. Hidayat K, Du X, Zou S-Y, Shi B-M. Blood pressure and kidney cancer risk. *J Hypertens* 2017; 35:1333–44.
40. Deckers IA, van der Brandt PA, van Engeland M., van Schooten FJ, Godschalk RW, Keszei AP, Schouten LJ. Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: Interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid. *Int. J. Cancer*: 136, 1104–1116 (2015) VC 2014 UICC
41. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:745-59.
42. Andreotti G, Boffetta P, Rosenberg PS, et al. Variants in blood pressure genes and the risk of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2010; 31:614-20.