



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ: Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο πιθανός ρόλος του συστήματος RAAS (Renin-Angiotensin-
Aldosterone) στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

ΦΑΡΜΑΚΙΩΤΗ ΙΩΑΝΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων
για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2020

"Βεβαιώνω ότι η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά και όπου απαιτείται έχω παραθέσει τις πηγές τους στο τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή: "

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1^{ος} Εξεταστής **Σαμαρά Μαρία**
(Επιβλέπων) Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη
Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών
Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής **Σάτρα Μαρία**
Ε.ΔΙ.Π. Βιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής **Τζώρτζης Βασίλειος**
Καθηγητής Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών
Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής - Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία - Περιγεννητική Ιατρική» στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. Μαρία Σαμαρά, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας. Πάντοτε ήταν πρόθυμη για συζήτηση και εύρεση λύσεων σε προβλήματα που προκύπταν κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών. Η γενικότερη στάση και αντιμετώπιση της και η αγάπη της για το συγκεκριμένο αντικείμενο δημιουργούσε ένα ευχάριστο και άνετο κλίμα. Θα ήθελα, επίσης, να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες και στα άλλα δύο μέλη της επιτροπής, την κ. Μαρία Σάτρα και τον κ. Βασίλειο Τζώρτζη, για το χρόνο που αφιέρωσαν και τις πολύτιμες συμβουλές τους, ώστε να προκύψει ένα άρτιο αποτέλεσμα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία Παπαθανασίου, για την καθοδήγησή της σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες μέχρι το τέλος της διπλωματικής μου εργασίας. Μεγάλο μέρος όσων έχω μάθει οφείλεται πραγματικά στις γνώσεις που μου μετέδωσε αυτό το χρονικό διάστημα που βρισκόμουν στο εργαστήριο. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και κυρίως την υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία Αναγνώστου και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ. Ελένη Κυρμανίδου και κ. Μαρίνα Ροΐδου-Ανίσογλου, για την άψογη συνεργασία μας σε ένα ιδιαίτερα ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, κ. Αλέξανδρο Δαπόντε και σε όλους τους καθηγητές του προγράμματος για τις γνώσεις που μας μετέδωσαν, καθώς επίσης και στον κύριο Γεώργιο Κουκούλη, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής – Διευθυντή για την αποδοχή μου στο εργαστήριο. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω πολύ την οικογένεια μου για τη στήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα, ώστε να φτάσω στην επιτυχή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Φαρμακιώτη Ιωάννα

**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ -
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

ΦΑΡΜΑΚΙΩΤΗ ΙΩΑΝΝΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Σαμαρά Μαρία

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σύμβουλος : Σάτρα Μαρία

Ε.ΔΙ.Π. Βιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος : Τζώρτζης Βασίλειος

Καθηγητής Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί την ένατη αιτία καρκίνου και το δεύτερο συχνότερο νεόπλασμα του ουροποιογεννητικού συστήματος παγκοσμίως. Η Ελλάδα βρίσκεται υψηλά μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης ως προς τον αριθμό των περιστατικών ετησίως. Προσβάλλονται συχνότερα τα άρρενα άτομα και στους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται το κάπνισμα, η επαγγελματική έκθεση σε χημικές ουσίες, η διατροφή, η ακτινοβολία στην πύελο, οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Το σύστημα RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosterone) εμπλέκεται σε σημαντικό βαθμό στην παθογένεια της υπέρτασης και λαμβάνει μέρος σε πολλές φυσιολογικές και μη διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η αγγειογένεση, η απόπτωση, ο μεταβολισμός, η φλεγμονή, η κυτταρική μετανάστευση και η μετάσταση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το RAAS παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο. Προηγούμενες μελέτες ανέδειξαν πλήθος πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του συστήματος RAAS. Οι πολυμορφισμοί αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ενός συγκεκριμένου τύπου καρκίνου ή σε άλλες περιπτώσεις δρώντας προστατευτικά. Τα ευρήματα των μελετών είναι συχνά αντικρουόμενα, γεγονός που αποδίδεται στον αριθμό δειγμάτων κάθε μελέτης, καθώς και σε διαφορές μεταξύ διαφορετικών φυλών και γεωγραφικής ετερογένειας. Μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς rs5186 του *AT1R* γονιδίου (A1166C), rs11091046 του *AT2R* γονιδίου (C3123A), rs12750834 του *REN* γονιδίου και rs4762 και rs699 του *AGT* γονιδίου (T174M και M235T αντίστοιχα) σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και σε υγιή άτομα ως προς τη συχνότητα εμφάνισής τους στον Ελληνικό πληθυσμό και τον πιθανό τους ρόλο στο συγκεκριμένο καρκίνο. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί rs5186 και rs11091046 των *AT1R* και *AT2R* γονιδίων αντιστοίχως φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση, καθώς τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα εμφανίζονται συχνότερα στα υγιή άτομα. Η παρουσία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στους πολυμορφισμούς rs11091046 και rs4762 των *AT2R* και *AGT* γονιδίων αντιστοίχως συνδέεται με όγκους μικρότερης διαμέτρου. Ο πολυμορφισμός rs12750834 του γονιδίου *REN* παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την κατανάλωση αλκοόλ. Η εργασία μας παρέχει πρώτες ενδείξεις για την κατανομή των εν λόγω πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό. Ασφαλώς χρειάζεται περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Λέξεις - κλειδιά: καρκίνος ουροδόχου κύστης, παράγοντες εμφάνισης, σύστημα RAAS, πολυμορφισμοί.

Summary

Bladder cancer is the ninth most common cancer in the world and the second most common cancer of the urogenital system. Greece is the second country with the newest incidents per year among the countries of the European Union. Males are most often affected than females, and more specifically mainly middle-aged and older people. Epidemiologically, the most important risk factors are smoking, occupational chemicals, diet, pelvic radiation, urinary tract infections and cases of familial bladder cancer. The Renin-Angiotensin-Aldosterone (RAAS) system has been extensively studied for its role in controlling blood pressure in the pathogenesis of hypertension, as well as for its role in maintaining fluid and electrolyte balance. It is known to be involved in many physiological processes, including cell cycle and cell proliferation, angiogenesis, apoptosis, metabolism, inflammation, cell migration and metastasis. There is evidence that the RAAS system also plays an important role in cancer. Studies show that several polymorphisms in genes encoding RAAS proteins appear to be involved in carcinogenesis, playing an important role in the risk of developing a particular type of cancer or otherwise conferring a protective effect. However, studies often yield conflicting results, due to varying sample sizes and geographical heterogeneity. We studied the polymorphisms rs5186 of AT1R gene (A5186C), rs11091046 of AT2R gene (C3123A), rs12750834 of REN gene (C5312T) and rs4762 and rs699 of AGT gene (T174M and M235T respectively) of the RAAS system in Greek population. The study includes healthy individuals (control group) and bladder cancer patients, SNP frequency and their possible role in the risk of developing bladder cancer was examined. Statistical analysis showed that the rs5186 and rs11091046 polymorphisms of the AT1R and AT2R genes respectively appear to confer a protective effect, as mutated alleles appear more frequently in healthy individuals. Furthermore, the presence of the mutant alleles in the rs11091046 and rs4762 polymorphisms of the AT2R and AGT genes respectively is associated with tumors of smaller diameter. A correlation was also found between rs12750834 of the REN gene and alcohol consumption. Our study provides raw evidence for the distribution of the studied polymorphisms in the Greek population, but further studies in larger sample sizes are required.

Key words: bladder cancer, risk factors, RAAS system, polymorphisms.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Summary.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
A. ANATOMIA – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ	
ΚΥΣΤΗΣ	Error! Bookmark not defined.12
A.2 Θέση	12
A.2. Χωριτικότητα	13
A.3. Μορφή	13
A.4. Τοίχωμα ουροδόχου κύστης.....	14
B. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ.....	16
B.1 Επιδημιολογία της νόσου	16
B.2 Παράγοντες κινδύνου	17
B.2.1. Κάπνισμα.....	17
B.2.2. Επαγγελματική έκθεση σε χημικές ουσίες	18
B.2.3. Διατροφή	18
B.2.4. Ακτινοθεραπεία στην πύελο	19
B.2.5. Νοσήματα του ουροποιητικού συστήματος	19
B.2.6. Κληρονομικότητα.....	20
B.3. Γενετική του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.....	20
B.4. Ιστοπαθολογία του όγκου	22
B.4.1. Καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου (TCC)	22
B.4.2. Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων (SCC)	23
B.4.3. Αδενοκαρκίνωμα	24
B.4.4. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα	25
B.5. Βαθμός κακοήθειας	26
B.6. Σταδιοποίηση καρκίνου	28
B.7. Συμπτώματα	30
B.8. Διάγνωση	31
B.8.1. Κλινική εξέταση	31
B.8.2. Κυστεοσκόπηση.....	31
B.8.3. Κυτταρολογική εξέταση ούρων.....	32
B.8.4. Ιστοπαθολογική εξέταση	32
B.8.5. Ακτινολογική εξέταση	32
B.9. Θεραπεία.....	33

Γ.	ΣΥΣΤΗΜΑ RAAS	34
Γ.1.	Στοιχεία του συστήματος RAAS	34
Γ.2.	Συμμετοχή στον καρκίνο	36
Γ.2.1.	Πολλαπλασιασμός.....	36
Γ.2.2.	Απόπτωση.....	37
Γ.2.3.	Αγγειογένεση	38
Γ.2.4.	Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός	38
Γ.2.5.	Φλεγμονή	39
Γ.2.6.	Μετανάστευση, διείσδυση και μετάσταση.....	39
Γ.3.	Πολυμορφισμοί του συστήματος RAAS και καρκίνος.....	40
Γ.4.	Αναστολείς του συστήματος RAAS.....	43
	ΣΚΟΠΟΣ.....	45
	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
Α.	ΠΑΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ	46
Β.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	46
Γ.	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA.....	47
Δ.	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	48
Ε.	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	51
ΣΤ.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	51
Ζ.	ΠΕΨΕΙΣ	52
Η.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	53
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
Α.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR	54
Β.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΨΕΩΝ.....	56
Γ.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	59
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
	ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ	75
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76

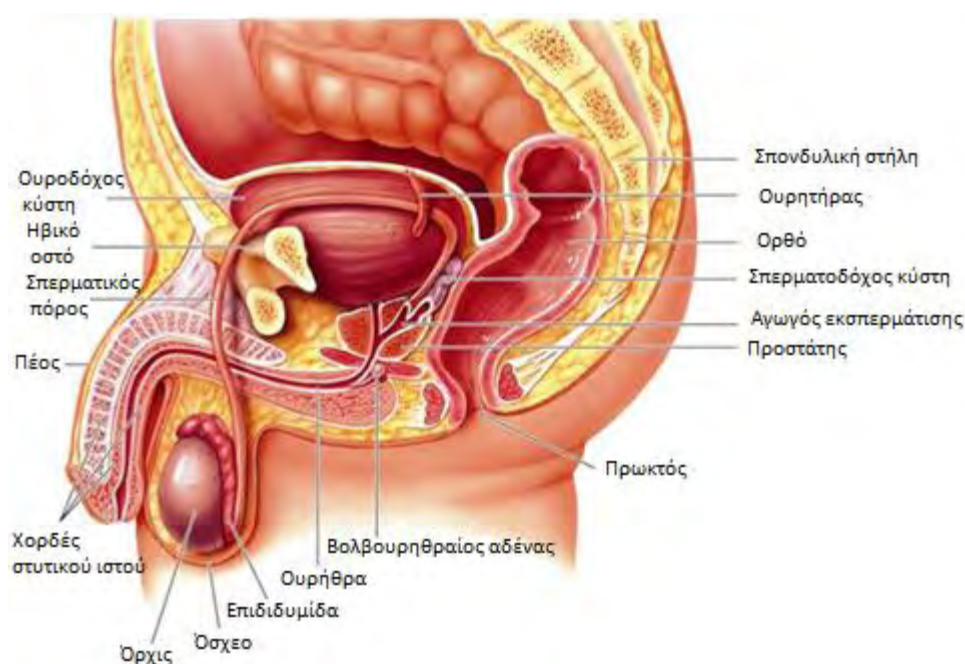
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α. ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

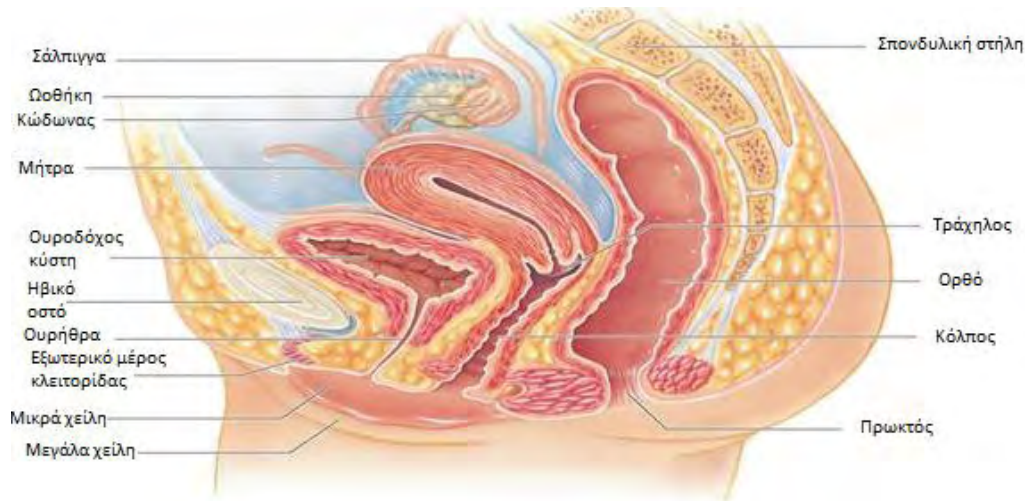
Η ουροδόχος κύστη είναι ένα μονοφυές, κοίλο και μυώδες όργανο. Οι διαστάσεις της μεταβάλλονται ανάλογα με το βαθμό πλήρωσής της. Ο κύριος ρόλος της είναι η συγκέντρωση των ούρων, δρα ως δεξαμενή αποθήκευσης, που φτάνουν από τους ουρητήρες και η εξώθηση αυτών, μέσω της σύσπασής της διά της ουρήθρας, εκτός του σώματος.

Α.1. Θέση

Η ουροδόχος κύστη βρίσκεται στο έδαφος της ελάσσιονος πυέλου, πίσω από την ηβική σύμφυση και μπροστά από το ορθό στους άνδρες ή τη μήτρα στις γυναίκες. Κάτω από την ουροδόχο κύστη στις γυναίκες βρίσκεται ο κόλπος, ενώ στους άνδρες ο προστάτης αδένας (Εικόνες 1 και 2).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της θέσης της ουροδόχου κύστης στους άνδρες (Sherwood, 2016).



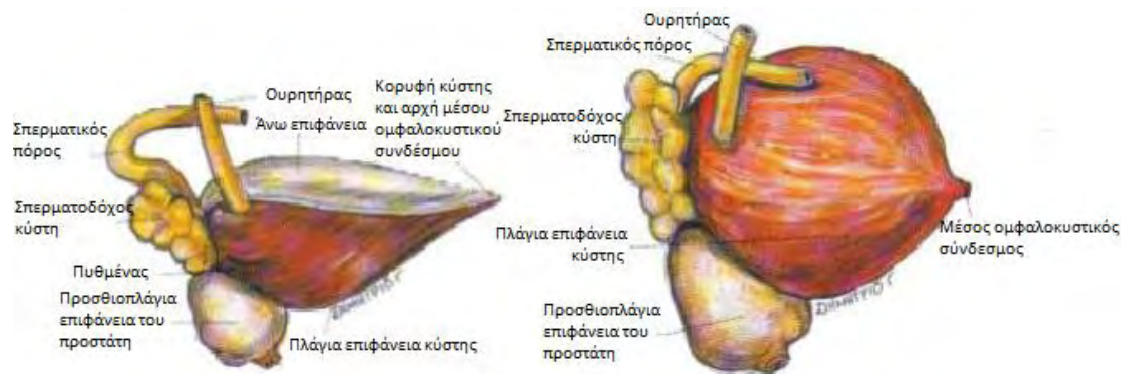
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της θέσης της ουροδόχου κύστης στη γυναίκα (Sherwood, 2016).

A.2. Χωρητικότητα

Η ουροδόχος κύστη είναι ένα όργανο μεταβλητών διαστάσεων. Η μεταβλητότητα σχετίζεται με την ηλικία, το φύλο, την ψυχική διάθεση και τις συνήθειες του ατόμου. Όσον αφορά τους ενήλικες άνδρες, όταν η κύστη συγκεντρώσει ποσότητα ούρων περίπου 150-300 cm³, τότε δημιουργείται η αίσθηση πληρότητας, που μετατρέπεται σε αίσθηση ανάγκης προς ούρηση. Η αίσθηση ανάγκης προς ούρηση μπορεί να αναβληθεί, έως ότου η συγκέντρωση των ούρων στην ουροδόχο κύστη να φτάσει τα 600 cm³.

A.3. Μορφή

Η μορφή της ουροδόχου κύστης ποικίλει και εξαρτάται από την ηλικία του ατόμου, το μέγεθος και την πληρότητά της, τη θέση των γεννητικών οργάνων και τη γενικότερη θέση του σώματος. Όταν η ουροδόχος κύστη είναι γεμάτη, έχει σχήμα ωοειδές ή ατρακτοειδές, αποπλατυσμένο προς τα πίσω. Εμφανίζει δύο επιφάνειες (πρόσθια και οπίσθια) και δύο πλάγια χείλη (αριστερό και δεξί) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση ουροδόχου κύστης με μικρή (αριστερά) και αυξημένη (δεξιά) ποσότητα ούρων (ΑΓΙΟΣ Α., 1997).

Στο επάνω μέρος, στο εσωτερικό του οργάνου, διακρίνεται ο θόλος, ενώ στο κάτω μέρος ο πυθμένας. Στον πυθμένα υπάρχει μια τριγωνική περιοχή με την βάση προς τα πίσω και την κορυφή προς τα εμπρός, η οποία λέγεται κυστικό τρίγωνο. Κάθε κορυφή του τριγώνου φέρει ένα στόμιο. Τα δύο στόμια στην πίσω περιοχή είναι τα στόμια εισόδου των ουρητήρων, ενώ το πρόσθιο, αυτό δηλαδή που βρίσκεται στην κορυφή του τριγώνου αποτελεί το στόμιο εξόδου της ουρήθρας. Η επιφάνεια του κυστικού τριγώνου είναι πάντα λεία και ομαλή. Αντιθέτως, στο θόλο, όταν η κύστη είναι άδεια, υπάρχουν πτυχές. Όταν, η κύστη είναι πλήρης, οι πτυχές εξαφανίζονται, καθώς το τοίχωμα της κύστης τεντώνει.

A.4. Τοίχωμα ουροδόχου κύστης

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης έχει πάχος 1.5-2 εκ. και αποτελείται από δύο κύριους χιτώνες, το μυϊκό και το βλεννογόνο (*Εικόνα 4*). Ο μυϊκός χιτώνας συνίσταται από πολυάριθμες δεσμίδες μυϊκών ινών, διευθετημένες με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζονται τρεις στιβάδες, η έξω επιμήκης, η μέση κυκλοτερής και η έσω επιμήκης. Δέσμες μυϊκών ινών της μιας στιβάδας συνεχίζουν στην άλλη στιβάδα με αποτέλεσμα ο μυϊκός χιτώνας της ουροδόχου κύστης να θεωρείται λειτουργικά ως μία οντότητα που λέγεται εξωστήρας μυς της κύστης. Η έξω επιμήκης μυϊκή στιβάδα αποτελείται από επιμήκεις δέσμες μυϊκών ινών, οι οποίες είναι αρκετά ανεπτυγμένες και σχηματίζουν ένα ενιαίο μυϊκό πέταλο στην μέση γραμμή, στην άνω και στις πλάγιες επιφάνειες της κύστης. Η ενδιάμεση κυκλοτερής μυϊκή στιβάδα είναι εξαιρετικά λεπτή και οι μυϊκές ίνες διατάσσονται κυκλοτερώς συμβάλλοντας στη διαμόρφωση του έσω σφιγκτήρα της κύστης. Η έσω μυϊκή στιβάδα αποτελείται από αραιές δέσμες μυϊκών ινών, οι περισσότερες εκ των οποίων έχουν επιμήκη

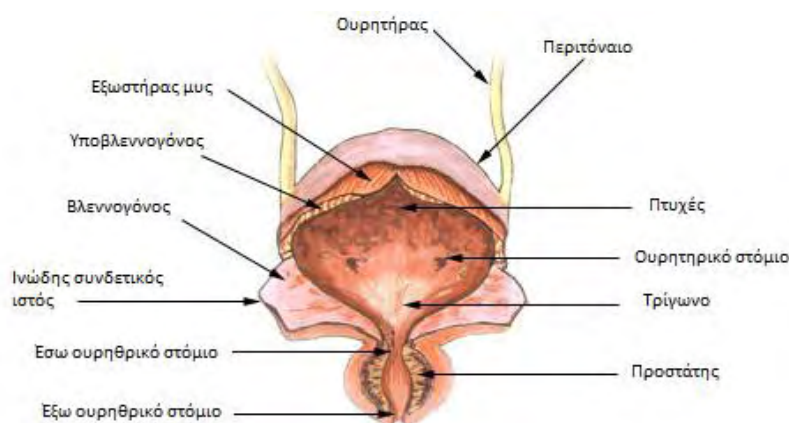
προσανατολισμό. Οι δέσμες των μυϊκών ινών κάθε στιβάδας διαπλέκονται μεταξύ τους και σχηματίζουν πλέγματα.

Ο βλεννογόνος της ουροδόχου είναι παχύς με διάμετρο περίπου 0.5 εκ. και αποτελείται από χόριο και επιθήλιο. Το επιθήλιο του βλεννογόνου, που χαρακτηρίζεται και ως μεταβατικό ή ουροθήλιο, συνίσταται από 3-7 σειρές κυττάρων αναλόγως εάν η κύστη είναι διατεταμένη ή όχι, με το κατώτερο στρώμα να αποτελείται από τα βασικά κύτταρα που επικάθονται στη βασική μεμβράνη και έχουν μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Το κορυφαίο στρώμα αποτελείται από μεγάλα εξαγωνικά κύτταρα που μοιάζουν με ομπρέλες (θολωτά ή ομπρελωτά κύτταρα).

Τα κύτταρα του επιθηλίου είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα φραγμό μεταξύ των ούρων και των υγρών των ιστών, ώστε να μην επιτρέπεται η διήθηση των ούρων και διαφόρων ουσιών στους υποκείμενους ιστούς. Στη δημιουργία του φραγμού συμβάλει και ένα στρώμα από γλυκοζαμίνες που καλύπτει το στρώμα των κορυφαίων κυττάρων. Η διακοπή της συνέχειας του στρώματος αυξάνει τη διαπερατότητα του ουροθηλίου σε ουρία και άλλες ουσίες προκαλώντας διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις της κύστης. Το χόριο συνίσταται από συνδετικό ιστό πλούσιο σε κολλαγόνες και ελαστικές ίνες.

Όταν η κύστη είναι άδεια, ο βλεννογόνος που καλύπτει την εσωτερική της επιφάνεια χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών και πεπαχυσμένων πτυχών. Όταν αυτή γεμίσει, οι πτυχές λεπταίνουν ή εξαφανίζονται.

Όταν υπάρχει υπερτροφία του μυϊκού τοιχώματος (περιπτώσεις υποκυστικού κωλύματος και απόφραξης), οι πτυχές διατηρούνται και διογκώνονται ως δοκίδες εξαιτίας της μυϊκής υπερτροφίας.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της ανατομίας της ουροδόχου κύστης (U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2006).

B. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

B.1. Επιδημιολογία της νόσου

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης κατέχει την ένατη θέση μεταξύ των συνηθέστερων τύπων καρκίνου παγκοσμίως, ενώ αποτελεί το δεύτερο συχνότερο νεόπλασμα του ουροποιογεννητικού συστήματος^[1]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό έρευνας του καρκίνου διεθνούς χρηματοδότησης (World Cancer Research Fund International), το 2012 είχαν καταγραφεί 430.000 περίπου περιπτώσεις με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ενώ το 2018 οι νέες περιπτώσεις με καρκίνο της ουροδόχου κύστης έφτασαν σχεδόν τις 550.000. Η Ελλάδα, όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης του εν λόγω καρκίνου, το 2018 βρισκόταν στη δεύτερη θέση, με την πρώτη θέση να καταλαμβάνεται από το Λίβανο (*Πίνακας 1*).

Πίνακας 1. Καταγραφή των δέκα χωρών με τα περισσότερα περιστατικά καρκίνου της ουροδόχου κύστης το 2018 (World Cancer Research Fund International, 2018).

Rank	Country	Age-standardised rate per 100,000
1	Lebanon	25.0
2	Greece	21.2
3	Denmark	17.9
4	Hungary	16.6
5=	Albania	16.3
5=	Netherlands	16.3
7	Belgium	16.2
8	Italy	15.9
9	Germany	15.7
10	Spain	15.6

Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης διαφέρει στα δύο φύλα. Στους άνδρες εμφανίζεται σε τετραπλάσια συχνότητα σε σχέση με τις γυναίκες^[2]. Αντιστοίχως, η θνητότητα καταγράφεται σε πενταπλάσιες τιμές στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες^[2]. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων, 7 στις 10, με καρκίνο της ουροδόχου κύστης εντοπίζεται σε πρώιμο στάδιο και τα ποσοστά

επιβίωσης είναι υψηλά. Ωστόσο, εκτιμάται ότι κάθε χρόνο οι θάνατοι από καρκίνο της ουροδόχου κύστης αντιστοιχούν σε ποσοστό της τάξης του 2.1% του συνόλου των θανάτων ετησίως. Ο εν λόγω τύπος καρκίνου εμφανίζεται συνήθως στη μέση και άνω ηλικία, που εκτιμάται ότι είναι τα 69 έτη στους άνδρες και τα 71 έτη στις γυναίκες. Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου ο όγκος εμφανίζεται σε ενήλικες κάτω των 30 ετών, φαίνεται να υπερτερούν οι λιγότερο επιθετικοί ιστολογικοί τύποι. Παρόλο αυτά, οι ασθενείς πρέπει να αντιμετωπίζονται με βάση το στάδιο και τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, ανεξαρτήτως ηλικίας, καθώς ο κίνδυνος εξέλιξης σε διηθητικό καρκίνο είναι ίδιος για όλες τις ηλικίες^[3].

B.2. Παράγοντες κινδύνου

Στους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου συγκαταλέγονται το κάπνισμα, η επαγγελματική έκθεση σε χημικές ουσίες, η διατροφή, χρόνιες λοιμώξεις της ουροδόχου κύστης, όπως η χρόνια κυστίτιδα, η ακτινοβολία στην πύελο, ενώ παρατηρούνται και περιπτώσεις οικογενούς εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης^[4].

B.2.1. Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου, με το ποσοστό κινδύνου να αγγίζει το 50%^[5]. Ως γνωστόν, ο καπνός αποτελεί πλούσια πηγή γνωστών καρκινογόνων ενώσεων, όπως οι νιτροζαμίνες, η 2-ναφθυλαμίνη και η 4-αμινομπιφαινύλη, ενώσεις που προκαλούν βλάβες στη δομή του δίκλωνου DNA και αλλαγές στην αλληλουχία του^[6]. Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι περίπου 3.5X μεγαλύτερη στους καπνιστές. Επιπρόσθετα, οι πρώην καπνιστές παρουσιάζουν διπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο της ουροδόχου κύστης συγκριτικά με τους μη καπνιστές. Η θνητότητα είναι επίσης υψηλότερη στους ενεργούς και πρώην καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Αναφέρεται συχνά ότι η διακοπή του καπνίσματος μπορεί προοδευτικά να ελαττώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης^[7]. Εκτιμάται ότι απαιτούνται τουλάχιστον 20 χρόνια από τη διακοπή του καπνίσματος, ώστε ο σχετικός κίνδυνος να φτάσει στα επίπεδα κινδύνου που παρατηρούνται στους μη καπνιστές, διάστημα πολύ μεγαλύτερο από εκείνο που απαιτείται στον καρκίνο του

πνεύμονα^[8]. Η συχνότητα και η διάρκεια του καπνίσματος, καθώς και ο βαθμός εισπνοής του καπνού παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο^[9].

B.2.2. Επαγγελματική έκθεση σε χημικές ουσίες

Η επαγγελματική έκθεση σε τοξικές χημικές ουσίες σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Επαγγέλματα όπως ζωγράφοι, καθαριστές ρούχων, εργάτες μετάλλων, εργάτες επεξεργασίας χαρτιού, εργάτες ελαστικών, οδοντοτεχνίτες, κομμωτές, ελαιοχρωματιστές και οδηγοί φορτηγών παρουσιάζουν έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες, όπως είναι η 2-ναφθυλαμίνη, η 4-αμινομπιφαινόλη, η τουλεΐνη, η 2-χλωροανιλίνη, οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες, το περχλωροαιθυλένιο και άλλες^[10]. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου λόγω επαγγελματικής έκθεσης στις συγκεκριμένες ουσίες εκτιμάται σε ποσοστό της τάξης του 5-6% του συνόλου των κινδύνων^[11].

B.2.3. Διατροφή

Η διατροφή, όπως στους περισσότερους τύπους καρκίνου, παίζει κι εδώ σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Άτομα που καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες αλκοόλ, φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί σύνδεση μεταξύ της ποσότητας του αλκοόλ που καταναλώνεται με τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης^[12]. Προτείνεται ότι ο τρόπος ζωής γενικότερα σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Οι Ασιάτες παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στον συγκεκριμένο πληθυσμό απουσιάζει το ένζυμο αλκοολική δεϋδρογονάση, ένζυμο που μεταβολίζει την ακεταλδεϋδη σε αλκοόλη, η οποία μπορεί να γίνει καρκινογόνος^[13]. Πολυάριθμες μελέτες προσπαθούν να συσχετίσουν τις βιταμίνες και τα αντιοξειδωτικά με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, καθώς πιστεύεται ότι έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Ορισμένες μετα-αναλύσεις καταδεικνύουν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης D στον ορό έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι του κινδύνου εμφάνισης της νόσου^[14]. Μικρότερης έκτασης μελέτες υποστηρίζουν ότι τα σταυρανθή λαχανικά και τα εσπεριδοειδή μπορεί να έχουν θετικές επιδράσεις^[15]. Όσον αφορά στην κατανάλωση καφέ ή

τσαγιού, οι περισσότερες μέχρι σήμερα μελέτες δεν έχουν επιφέρει κάποιον ενοχοποιητικό ρόλο στη συνήθεια αυτή. Η καφεΐνη δεν έχει αποδειχθεί ότι ευθύνεται για ενδεχόμενη έναρξη, συντήρηση ή επαύξηση κάποιας ογκογενετικής διαδικασίας στην ουροδόχο κύστη^[16].

B.2.4. Ακτινοθεραπεία στην πύελο

Η ακτινοθεραπεία, ως θεραπεία για τους καρκίνους των όρχεων, του προστάτη, των ωοθηκών, της μήτρας και του τραχήλου έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για δευτερογενή ανάπτυξη κακοηθειών στην ουροδόχο κύστη. Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου ουροδόχου κύστης, μετά από ακτινοθεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, σχεδόν διπλασιάζεται (OR=1,7) ^[17].

B.2.5. Νοσήματα του ουροποιητικού συστήματος

Η χρόνια κυστίτιδα συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση πλακώδους καρκινώματος της ουροδόχου κύστης. Επιπρόσθετα, η σχιστοσωμίαση, μια παρασιτική νόσος που αποδίδεται στο παράσιτο *Schistosoma haematobium*, θεωρείται ο αιτιολογικός παράγοντας του καρκινώματος εκ πλακώδους επιθηλίου. Δύο είναι οι μηχανισμοί μέσω των οποίων προκαλείται καρκίνος στους ασθενείς με σχιστοσωμίαση. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, λόγω της έντονης φλεγμονώδους και αναγεννητικής διαδικασίας, αυξάνοντας την πιθανότητα να συμβεί αυτόματα κάποια γενετική αλλαγή. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει τη δημιουργία μεταλλαξιογόνων ουσιών, όπως οι νιτροζαμίνες^[18]. Οι υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις και οι λίθοι του ουροποιητικού συστήματος, που εμμένουν επί μεγάλο χρονικό διάστημα, θεωρούνται επίσης ενοχοποιητικοί παράγοντες ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Μελέτες σχετικά με τον πιθανό ρόλο του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV αναφέρουν ότι το DNA του ιού συνυπήρχε σε ποσοστό της τάξης 7-35% των περιπτώσεων, εκτιμώντας την πιθανή εμπλοκή του εν λόγω ιού στην καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του ιού HPV στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί^[19].

B.2.6. Κληρονομικότητα

Ο καρκίνος στην ουροδόχο κύστη κατά κανόνα είναι σποραδικός. Σχετίζεται συνήθως με σωματικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κύτταρα της κύστης κατά την διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Ωστόσο, έχουν καταγραφεί ορισμένες περιπτώσεις οικογενούς καρκίνου της ουροδόχου κύστης, χωρίς όμως να συνοδεύονται από ευρήματα που αποδεικνύουν την ύπαρξη κληρονομικότητας. Έχουν προταθεί δύο τύποι κληρονόμησης: ο αυτοσωμικός επικρατής τύπος, που σημαίνει ότι ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου είναι αρκετό να αυξήσει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου στην ουροδόχο κύστη και ένας πολυπαραγοντικός - πολυγονιδιακός τύπος που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων^[20]. Τα άτομα που κληρονομούν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου, χωρίς ωστόσο να σημαίνει ότι θα εμφανίσουν καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

B.3. Γενετική του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Οι μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *HRAS* ήταν οι πρώτες που προσδιορίστηκαν στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Παρατηρούνται συχνότερα στα κωδικόνια 12, 13 και 61 και πρόκειται για ενεργοποιητικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε συνεχή έκφραση του ογκογονιδίου^[21]. Εμφανίζεται σε ποσοστό της τάξης 11-13% των περιπτώσεων με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ποσοστό μικρότερο από αυτό που είχαν αναδείξει παλαιότερες μελέτες. Μεταλλάξεις στο *HRAS* ογκογονίδιο ανιχνεύονται τόσο σε διηθητικούς, όσο και σε μη διηθητικούς όγκους^[22, 23, 24]. Το γονίδιο *FGFR3* εμπλέκεται επίσης στην καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης και μεταλλάξεις στο εν λόγω γονίδιο έχει βρεθεί πως σχετίζονται με χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους^[24, 25, 26, 27]. Υπερέκφραση του *EGFR*, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, παρατηρείται σε ποσοστά της τάξης 40-60% καρκίνων της ουροδόχου κύστης^[28].

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*, όπως και στους περισσότερους τύπους καρκίνου, φέρει μεταλλάξεις ή ελλείψεις που οδηγούν συνήθως στην αδρανοποίησή του^[29]. Κατά κανόνα, το ένα αλληλόμορφο είναι μεταλλαγμένο και συνεπώς μη λειτουργικό, ενώ το άλλο έχει χαθεί. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό παρατηρούνται συνήθως σε διηθητικούς καρκίνους^[30, 31, 32]. Η έλλειψη του *TP53* γονιδίου,

συνοδεύεται συνήθως και από έλλειψη του παράγοντα p21, που αποτελεί στόχο της p53 πρωτεΐνης^[33, 34]. Μεταβολές στο *PTEN* γονίδιο, που ανταγωνίζεται την δράση της PI3K κινάσης, αποτρέποντας μονοπάτια που στοχεύουν στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, παίζουν ρόλο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Υπάρχουν ευρήματα που υποστηρίζουν ότι οι ελλείψεις του *PTEN* γονιδίου είναι σπάνιες σε μη διηθητικούς καρκίνους, αλλά εμφανίζονται συχνά σε διηθητικούς^[35] και με το ποσοστό μείωσης της έκφρασης του να σχετίζεται με τον βαθμό κακοήθειας^[36]. Επιπρόσθετα, άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στο *RB* γονίδιο παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου, καθώς η μη λειτουργική Rb πρωτεΐνη δεν έχει την ικανότητα να αναστείλει την δράση των E2F μεταγραφικών παραγόντων που αυξάνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού^[37]. Άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια RB και TP53 παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες για υποτροπή και μειωμένη επιβίωση σε σύγκριση με τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια^[38].

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 9, στους ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης, εκτείνονται σε ποσοστό της τάξης του 60%, ενώ έχουν καταγραφεί διαταραχές και στα χρωμοσώματα 4, 8, 11, 17 και Y^[39, 40]. Η έλλειψη του χρωμοσώματος 9 έχει βρεθεί σε όλες τις μεταβατικού τύπου νεοπλασίες ανεξαρτήτως σταδίου^[39, 40, 41], ενώ σε διηθητικούς όγκους ανιχνεύονται ελλείψεις στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17^[39, 40]. Ελλείψεις του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 8, συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική θέση 8q21-q11.2, κυμαίνονται σε ποσοστά της τάξης του 23% και φτάνουν στα διηθητικά νεοπλάσματα του μεταβατικού επιθηλίου σε ποσοστό της τάξης του 53%^[40, 42].

Η χρωμοσωμική περιοχή 4p16.3 χάνεται σε ποσοστό 22% των μεταβατικού επιθηλίου νεοπλασμάτων ανεξαρτήτως του σταδίου της νόσου και του βαθμού της ιστολογικής διαφοροποίησης. Ενίσχυση της χρωμοσωμικής περιοχής 11q132 ανιχνεύεται σε ποσοστό της τάξης του 20% των νεοπλασιών του μεταβατικού επιθηλίου χωρίς συσχέτιση με το στάδιο και το βαθμό της ιστολογικής διαφοροποίησης^[43]. Ελλείψεις συγκεκριμένων περιοχών στο χρωμόσωμα Y μπορούν να παρατηρηθούν τόσο σε καρκινικούς, όσο και σε φυσιολογικούς ιστούς και συνεπώς η βιολογική τους σημασία δεν είναι ξεκάθαρη^[44, 45]. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, η απώλεια του Y φυλετικού χρωμοσώματος συνδέεται με πρόοδο της νόσου και μείωση του χρόνου εμφάνισης υποτροπής^[46].

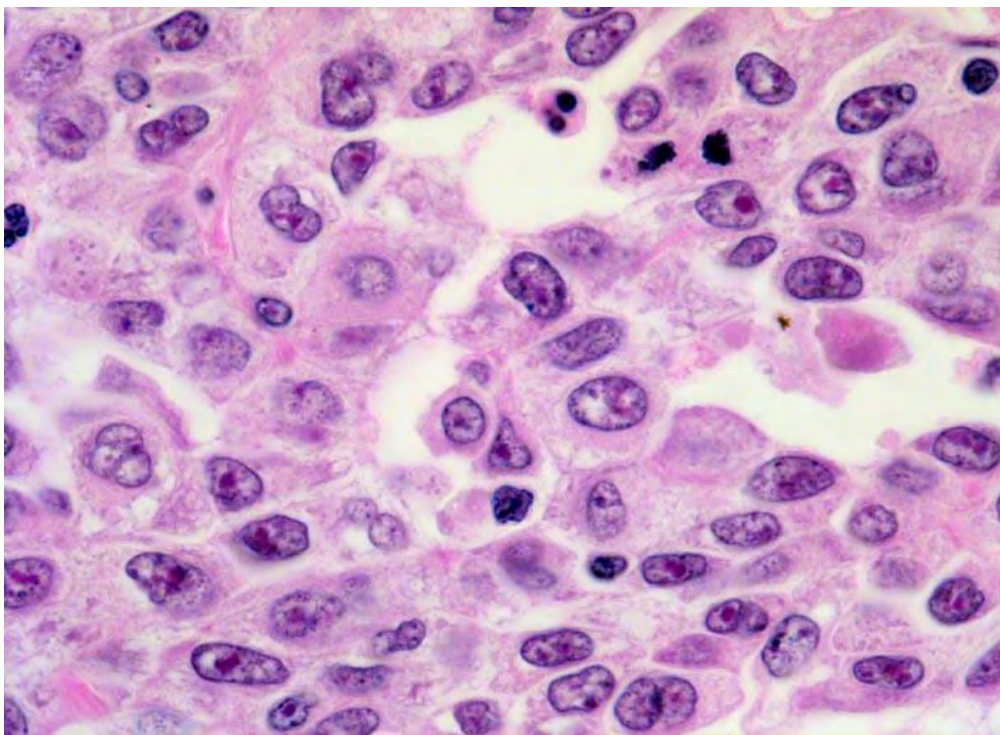
B.4. Ιστοπαθολογία του όγκου

Η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων της ουροδόχου κύστης είναι επιθηλιακής προέλευσης και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) κατατάσσονται σε 4 βασικούς ιστολογικούς τύπους: καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου ή ουροθηλιακό (Transitional Cell Carcinoma-TCC), καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων (Squamous Cell Carcinoma-SCC), αδenoκαρκίνωμα και μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Εκτός από τις κατηγορίες αυτές δεν πρέπει να παραλειφθούν και οι μεικτές μορφές, όπως επίσης και μία σειρά σπάνιων όγκων επιθηλιακής και μη προελεύσεως.

B.4.1. Καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου (TCC)

Είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου και αντιστοιχεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% του συνόλου των όγκων της ουροδόχου κύστης. Προέρχεται από τη νεοπλασματική μετατροπή του μεταβατικού επιθηλίου ή ουροθηλίου που καλύπτει σαν δέρμα το εσωτερικό τοίχωμα της ουροδόχου κύστης. Διακρίνεται στο καρκίνωμα *in situ*, στο επιφανειακό θηλώδες και στο διηθητικό καρκίνωμα. Το 70% περίπου είναι θηλώδεις όγκοι που δε διηθούν τον μυϊκό χιτώνα. Αυτού του τύπου καρκινώματα διαφέρουν από το φυσιολογικό ουροθήλιο, καθώς εμφανίζουν (*Εικόνα 5*):

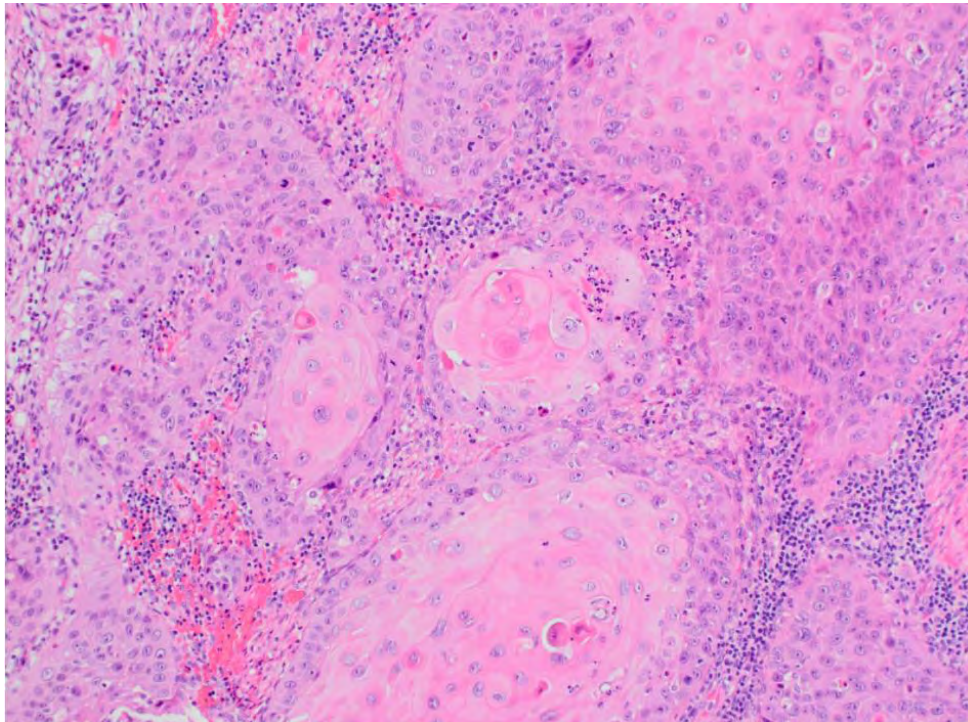
- Διαταραχή της σχέσης πυρήνα/κυτταροπλάσματος
- Διαταραχή της φυσιολογικής κυτταρικής ωρίμανσης από τα βασικά προς τα κορυφαία στρώματα
- Απώλεια του προσανατολισμού
- Αυξημένο αριθμό στοιβάδων με θηλώδη πτύχωση του βλεννογόνου
- Εμφανές πυρήνιο
- Συσσωματώματα χρωματίνης
- Αυξημένο αριθμό μιτώσεων



Εικόνα 5. Ουροθηλιακό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης. Παρατηρείται υψηλός αριθμός μιτώσεων. (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/bladderurothelialinvasivegen.html>).

B.4.2. Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων (SCC)

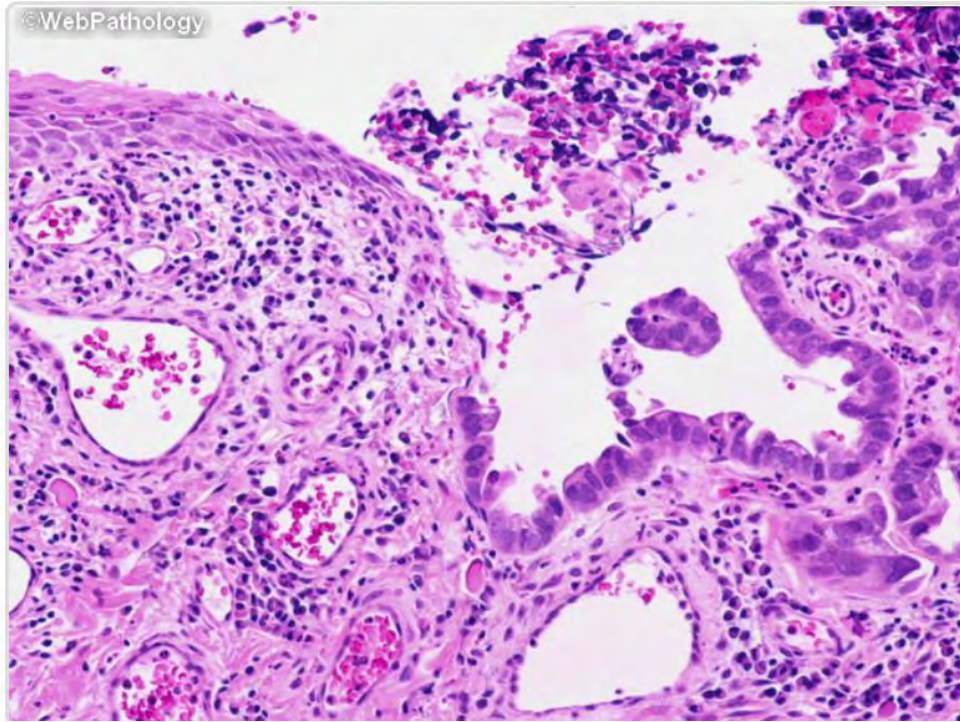
Το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων αποτελεί μια επιθετική μορφή του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (*Εικόνα 6*). Αντιπροσωπεύει ποσοστό της τάξης του 4% του συνόλου των όγκων της κύστης και σχετίζεται με χρόνια ερεθισμό (λόγω χρήσης μόνιμου ουροκαθετήρα, λιθίασης, χρόνιων ή υποτροπιάζουσών ουρολοιμώξεων). Συνήθως ξεκινά με το σχηματισμό λεπτών, επίπεδων, πλακωδών κυττάρων, που δεν υπάρχουν φυσιολογικά στην κύστη. Παρατηρείται επίσης, συχνά, σε ασθενείς με σχιστοσωμίαση, νόσο που είναι ενδημική στην Αφρική και στη Μέση ανατολή και εξηγεί το γεγονός ότι στην Αίγυπτο εμφανίζεται σε ποσοστό της τάξης του 75% του συνόλου των καρκίνων της ουροδόχου κύστης. Η μέση ηλικία εμφάνισης αυτού του τύπου καρκινώματος σε ασθενείς με σχιστοσωμίαση είναι τα 50 έτη, ενώ εμφανίζεται 4-5 φορές συχνότερα στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Συνδέεται συνήθως με κακή πρόγνωση, καθώς την στιγμή της διάγνωσης η νόσος είναι προχωρημένη. Όλα σχεδόν τα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων είναι διηθητικά και η θεραπεία πρέπει να είναι εξ' αρχής επιθετική.



Εικόνα 6. Μέτριας διαφοροποίησης καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων. Παρατηρούνται σχηματισμοί από πέρλες κερατίνης (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/bladdersquamous.html>).

B.4.3. Αδενοκαρκίνωμα

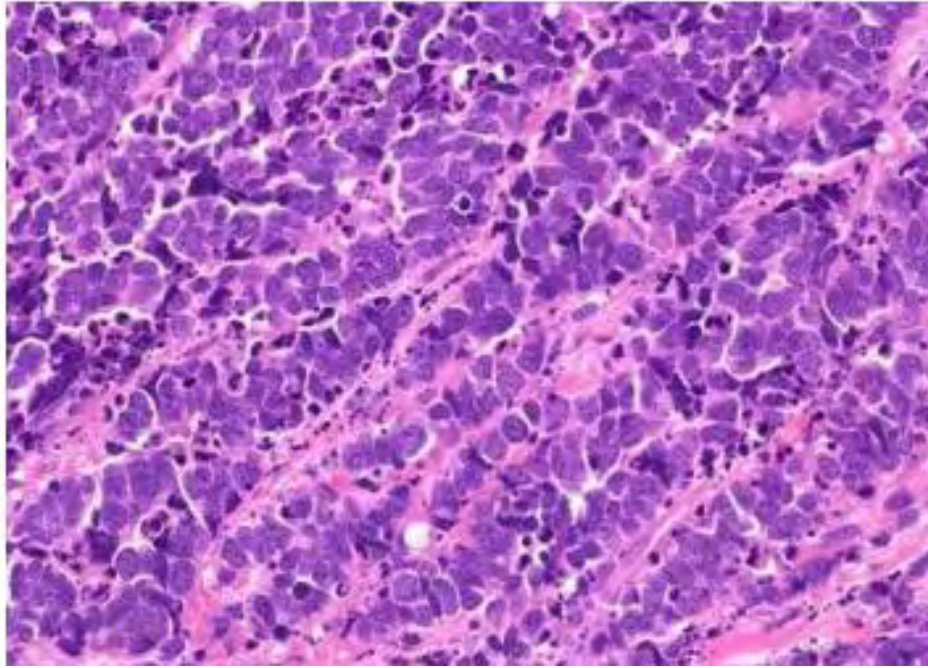
Το αδενοκαρκίνωμα ξεκινά από αδενικά εκκριτικά κύτταρα που ενώ δεν υπάρχουν υπό φυσιολογικές συνθήκες στην κύστη, μπορούν να σχηματιστούν μετά από μακροχρόνιο ερεθισμό ή φλεγμονή (*Εικόνα 7*). Διακρίνονται σε πρωτοπαθή και μεταστατικά. Τα αδενοκαρκινώματα του θόλου της ουροδόχου κύστης οφείλονται σε εμβρυολογικά κατάλοιπα αδενικών κυττάρων που παραμένουν μετά την φυσιολογική εξαφάνιση του ουραχού (μιας χορδής που συνδέει την κύστη με τον ομφαλό). Αποτελούν το 0.5-2% όλων των πρωτοπαθών όγκων της κύστης και στην πλειοψηφία τους έχουν κακή πρόγνωση με ποσοστό πενταετούς επιβίωσης 0-31%. Τα πρωτοπαθή αδενοκαρκινώματα σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή και ερεθισμό της κύστης, καθώς και με σχιστοσωμίαση (σε μικρότερο βαθμό από το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων). Παρουσιάζεται συνήθως σε νεότερα άτομα και σχεδόν πάντα είναι διηθητικό. Σύννηθες σύμπτωμα του αδενοκαρκινώματος είναι η αποβολή βλέννης με τα ούρα, καθώς πρόκειται για βλεννοπαραγωγό όγκο.



Εικόνα 7. Αδενοκαρκίνωμα ουροδόχου κύστης (<https://www.webpathology.com/image>).

B.4.4. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα

Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί μια επιθετική μορφή όγκου και εμφανίζεται σε συχνότητα μικρότερη του 1% του συνόλου των όγκων της ουροδόχου κύστης. Μπορεί να προέλθει με δύο διαφορετικούς τρόπους: είτε μέσω κακοήθους εξαλλαγής νευροενδοκρινικών κυττάρων, που ανευρίσκονται φυσιολογικά και στην ουροδόχο κύστη, είτε από κάποιο κοινό αρχέγονο μητρικό κύτταρο, που έχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε διάφορους ιστολογικούς τύπους. Εντοπίζεται κυρίως στα πλάγια τοιχώματα και είναι μεγάλος, συμπαγής, άμισχος ή πολυποειδής όγκος με περιοχές νέκρωσης. Η πρόγνωση είναι πτωχή και η πενταετής επιβίωση δεν ξεπερνά το 8% (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης (Skarin's Atlas of Diagnostic Oncology, 2009).

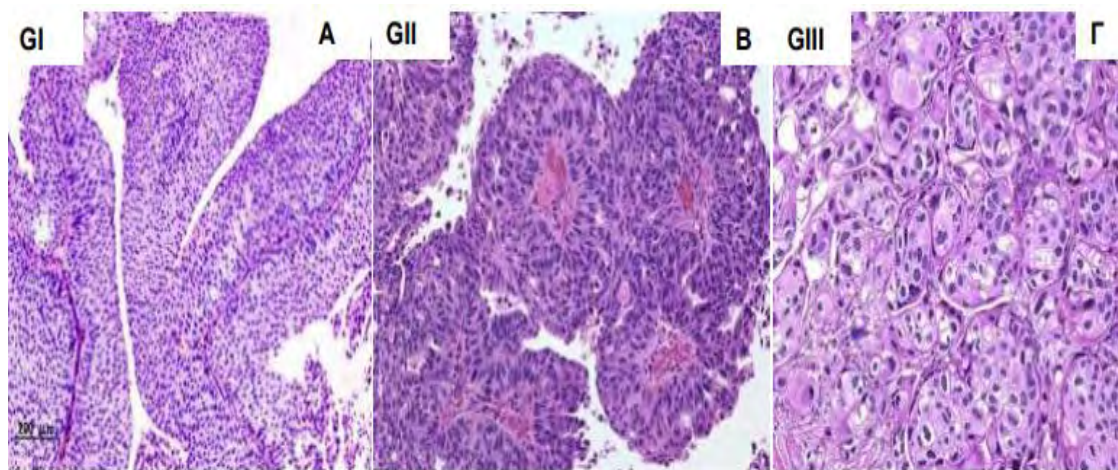
B.5. Βαθμός κακοήθειας

Για την εκτίμηση του βαθμού κακοηθείας των όγκων του ουροθηλίου έχουν προταθεί αρκετά συστήματα ταξινόμησης με το επικρατέστερο αυτό που πρότεινε το 1973 ο Mostofi^[47]. Έκτοτε έχουν προταθεί και άλλα συστήματα ταξινόμησης από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) λόγω της συνεχούς ενημέρωσης και των νέων δεδομένων που προκύπτουν, όμως η ταξινόμηση του Mostofi αποτελεί ταξινόμηση αναφοράς. Ο Mostofi, λοιπόν, ταξινόμησε τους όγκους της ουροδόχου κύστης ανάλογα με το βαθμό αναπλαστικότητας των κυττάρων τους, διακρίνοντας τους αφενός σε θηλώματα (grade 0) και αφετέρου σε καρκινώματα (grade I, II, III) (*Εικόνα 9*). Ως **θήλωμα** ορίζεται ένας μονήρης θηλωματώδης όγκος, ο οποίος δεν περιέχει περισσότερα από 7 στρώματα κυττάρων μεταβατικού επιθηλίου, που καλύπτουν έναν ινοαγγειακό μίσχο. Πρόκειται για έναν όγκο που αποτελείται από μη κακοήθη κύτταρα και συνιστά καλοήθεις αλλοιώσεις.

Η ιστολογική εικόνα των καρκινωμάτων πρώτου βαθμού (**Grade I**) ή αλλιώς υψηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή του φυσιολογικού ουροθηλίου. Παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυτταρικών στοιβάδων πάνω από 7, μικρή διαταραχή της σχέσης πυρήνα/πρωτοπλάσματος,

σπάνιες μιτώσεις και μικρή διαταραχή της ωρίμανσης των κυττάρων από τα βασικά προς τα κορυφαία στρώματα. Στο δεύτερο βαθμό κακοηθείας (**Grade II**), ή αλλιώς στα μέτριας διαφοροποίησης καρκινώματα, παρατηρείται μεγάλη διαταραχή της σχέσης πυρήνα/πρωτοπλάσματος, εμφανές πυρήνιο, αρκετές μιτώσεις, έντονη διαταραχή της ωρίμανσης από τη βάση προς την κορυφή και παχύς ινοαγγειακός μίσχος. Στην τρίτη κατηγορία του βαθμού κακοηθείας (**Grade III**), ή αλλιώς στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, έχουμε απώλεια της διαφοροποίησης από τη βάση προς την κορυφή, μέγιστη διαταραχή της σχέσης πυρήνα/ πρωτοπλάσματος και μεγάλος αριθμός μιτώσεων.

Ο βαθμός κακοηθείας επηρεάζει την πρόοδο και εξέλιξη της νόσου. Σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου και αποτελεί προγνωστικό παράγοντα σημαντικό κυρίως για τους όγκους Tα και T1 και μπορεί να δώσει πληροφορίες για την πιθανότητα διήθησης του κυστικού τοιχώματος. Όσο χαμηλότερος είναι ο βαθμός κακοηθείας, τόσο χαμηλότερα είναι και τα ποσοστά προόδου νόσου και υποτροπής. Αναλυτικότερα, για νεοπλάσματα με βαθμό κακοηθείας I το ποσοστό προόδου είναι 2-10%, για τα βαθμού II είναι 11-19% και για τα βαθμού III είναι 33-45%. Τα ποσοστά υποτροπής για τα νεοπλάσματα I, II, και III είναι 63%, 67% και 71% αντιστοίχως^[48].



Εικόνα 9. Βαθμός κακοηθείας του TCC. **A. Grade I**, αύξηση του αριθμού των κυτταρικών στοιβάδων πάνω από 7. **B. Grade II**, απώλεια του προσανατολισμού των κυττάρων. **Γ. Grade III**, μη διαφοροποίηση των κυττάρων από τη βασική μεμβράνη προς το κορυφαίο στρώμα, μεγάλος αριθμός μιτώσεων (Skarin's Atlas of Diagnostic Oncology, 2009).

B.6. Σταδιοποίηση καρκίνου

Για τη σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης χρησιμοποιείται κυρίως το σύστημα TNM (Tumor-Node-Metastasis), δηλαδή, συνδυασμός της έκτασης του όγκου, της κατάστασης των λεμφαδένων και της ύπαρξης μεταστάσεων σε απομακρυσμένες θέσεις. Η σταδιοποίηση έχει ιδιαίτερη σημασία στη διάγνωση προκειμένου να ληφθεί η σωστή απόφαση για τη θεραπεία. Η ταξινόμηση των κακοηθών νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης παρατίθεται στη συνέχεια και η ταξινόμηση κατά TNM παρατίθεται στον *Πίνακα 2*:

Στάδιο 0a: όγκος περιορίζεται στο εσωτερικό στρώμα των κυττάρων που επενδύουν την εσωτερική επιφάνεια της ουροδόχου κύστης.

Στάδιο 0is: καρκίνωμα in situ, δηλαδή, υψηλού βαθμού διαφοροποίησης όγκος που περιορίζεται στο εσωτερικό στρώμα των κυττάρων που επενδύουν την ουροδόχο κύστη.

Στάδιο I: όγκος που διηθεί στους βαθύτερους συνδετικούς ιστούς της επένδυσης της κύστης (διηθεί το χόριο).

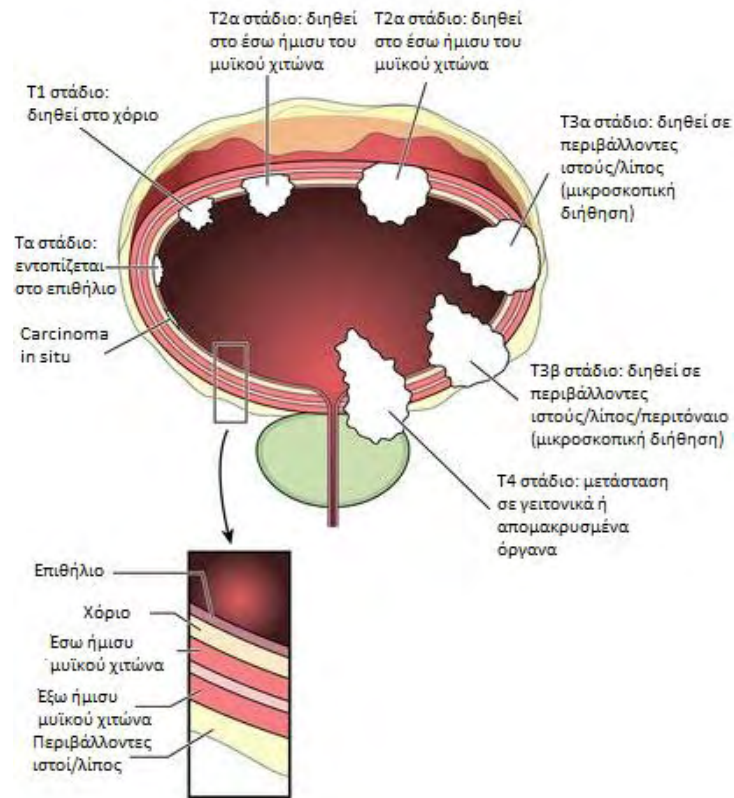
Τα στάδια αυτά αναφέρονται στους επιφανειακούς όγκους, δηλαδή, τους όγκους που δεν επεκτείνονται στο μυϊκό τοίχωμα και μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με τις κλασικές ενδοσκοπικές μεθόδους. Στις επόμενες κατηγορίες ανήκουν οι διηθητικοί όγκοι που διηθούν το μυϊκό χιτώνα.

Στάδιο II: όγκος που διηθεί το μυϊκό χιτώνα και χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ο όγκος διηθεί το έσω ήμισυ του χιτώνα της ουροδόχου κύστης (T2a), ενώ στη δεύτερη κατηγορία ο όγκος διηθεί το εξωτερικό ήμισυ του χιτώνα της κύστης (T2b).

Στάδιο III: όγκος που διηθεί ιστούς που περιβάλλουν την ουροδόχο κύστη και χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι όγκοι με μικροσκοπική διήθηση (T3a), ενώ η δεύτερη κατηγορία αφορά σε όγκους με μακροσκοπική διήθηση (T3b).

Στάδιο IV: όγκος που διηθεί γειτονικά όργανα, το πυελικό τοίχωμα και/ή το κοιλιακό τοίχωμα. Σε αυτό το στάδιο εντάσσονται οι όγκοι που διηθούν σε όργανα πλησίον της κύστης, όπως, ο προστάτης στους άνδρες, η μήτρα και ο κόλπος στις γυναίκες (T4a), αλλά και όγκοι που συνοδεύονται από μεταστάσεις σε λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένα όργανα (T4b).

Τα στάδια παρουσιάζονται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (American Bladder Cancer Society).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση κατά TNM του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και σταδιοποίηση σύμφωνα με American Joint Committee (AJC).

ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΟΓΚΟΣ-Tumor	
Tx	Όγκος που δεν μπορεί να αξιολογηθεί
T0	Απουσία ανιχνεύσιμου όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ
Ta	Όγκος θηλώδης χωρίς διήθηση της βασικής επιθηλιακής μεμβράνης
T1	Όγκος που διηθεί το χόριο
T2	Διήθηση του μυϊκού χιτώνα
T2a	Διήθηση του επιπολής μυϊκού χιτώνα
T2b	Διήθηση του εν τω βάθει μυϊκού χιτώνα
T3	Διήθηση του περικυστικού λίπους
T3a	Διήθηση μικροσκοπική
T3b	Διήθηση μακροσκοπική
T4	Διήθηση γειτονικών οργάνων, πνευλικού ή κοιλιακού τοιχώματος
T4a	Διήθηση του προστάτη, της μήτρας ή του κόλπου
T4b	Διήθηση του πνευλικού ή κοιλιακού τοιχώματος

ΕΠΙΧΩΡΙΟΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ-Nodes	
NX	<i>Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν</i>
N0	<i>Όχι μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες</i>
N1	<i>Μονήρης λεμφαδένες <2cm</i>
N2	<i>Λεμφαδένες >5cm</i>
ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ-Metastasis	
MX	<i>Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να αξιολογηθεί</i>
M0	<i>Όχι απομακρυσμένες μεταστάσεις</i>
M1	<i>Απομακρυσμένες μεταστάσεις</i>

Έχει διαπιστωθεί ότι τα 2/3 περίπου των ασθενών με πρωτοεμφανιζόμενο καρκίνο της ουροδόχου κύστης παρουσιάζουν έναν επιφανειακό όγκο. Οι όγκοι T_a είναι οι συχνότεροι (40% των περιπτώσεων), ακολουθούν οι όγκοι T₁ (25 - 30% των περιπτώσεων), ενώ οι όγκοι T_{is} εμφανίζονται σε πολύ μικρότερο ποσοστό (2-5% των περιπτώσεων). Ένα ποσοστό ασθενών με πρωτοεμφανιζόμενο καρκίνο ουροδόχου κύστης, της τάξης του 20% περίπου, παρουσιάζουν όγκο που διηθεί τη μυϊκή στιβάδα, δηλαδή, όγκο μεγαλύτερου του T₁ σταδίου, ενώ ποσοστό της τάξης 5-7% εμφανίζουν μεταστατική νόσο τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης.

B.7. Συμπτώματα

Κύριο σύμπτωμα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι η μακροσκοπική αιματουρία, η εμφάνιση δηλαδή, αίματος στα ούρα. Αυτή συνήθως είναι ανώδυνη και παρατηρείται στο 85% περίπου των ασθενών με τον εν λόγω τύπο καρκίνου. Αυτοί οι ασθενείς, επίσης, εμφανίζουν ορισμένα κυστικά ενοχλήματα, όπως είναι η συχνουρία (η ανάγκη να ουρεί κανείς συχνότερα από ότι συνήθως), η επιτακτική ούρηση και η δυσουρία (πόνος κατά την ούρηση). Ο καρκίνος στην ουροδόχο κύστη ενδέχεται να εμποδίσει την ροή των ούρων από το νεφρό οδηγώντας έτσι σε συσσώρευση αυτών στο νεφρό με αποτέλεσμα τη διάταση αυτού και πόνο. Ωστόσο τα συμπτώματα αυτά μπορούν να εμφανιστούν και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις που δεν σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως, σε λοιμώξεις του ουροποιητικού, σε περιπτώσεις εμφάνισης λίθων στους νεφρούς ή στην καλοήγη υπερπλασία του προστάτη.

B.8. Διάγνωση

Η διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης βασίζεται στο συνδυασμό επεμβατικών και μη επεμβατικών μεθόδων. Οι μη επεμβατικές μέθοδοι είναι η κλινική εξέταση, η αναζήτηση ποικίλων βιολογικών νεοπλασματικών δεικτών στο αίμα ή στα ούρα, η αναζήτηση και αξιολόγηση μορφολογικών νεοπλασματικών και άλλων αλλαγών στα αποφολιδούμενα κύτταρα του ουροθηλίου ή στα ούρα ή σε εκκλύματα της ουροδόχου κύστης. Οι επεμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την κυστεοσκόπηση, τη λήψη βιοψιών τη διουρηθρική υπερηχογραφία, τη λεμφαγγειογραφία και την παρακέντηση λεμφαδένα.

B.8.1. Κλινική εξέταση

Η εξέταση αυτή βοηθά περισσότερο στους διηθητικούς και μεταστατικούς καρκίνους, καθώς ο γιατρός μπορεί να εξετάσει το ορθό και τον κόλπο (στις γυναίκες) και να προσδιορίσει με αυτό τον τρόπο το μέγεθος του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, αλλά και πόσο έχει εξαπλωθεί.

B.8.2. Κυστεοσκόπηση

Είναι μια τεχνική εξέτασης της ουροδόχου κύστης, κατά την οποία ο γιατρός εισάγει στην ουρήθρα ένα σωλήνα με φωτισμό και κάμερα στην άκρη του, προκειμένου να ελέγξει το εσωτερικό της κύστης και της ουρήθρας για την ύπαρξη όγκων. Η κυστεοσκόπηση δίνει την τελική διάγνωση, μιας και δίνει την δυνατότητα να εξεταστούν πολλοί από τους χαρακτήρες των όγκων, να ταυτοποιηθεί η συνύπαρξη φλεγμονής, το μέγεθος, η θέση, η παρουσία πολλαπλών όγκων και η διηθητικότητά τους. Επιπλέον, επιτρέπει την εκτίμηση της κατάστασης των ουρητηρικών στομίων. Θα πρέπει να συνοδεύεται πάντοτε με ουρηθροσκόπηση για τον έλεγχο της ουρήθρας. Με αυτή την τεχνική μπορεί να γίνει και λήψη βιοψιών τόσο από τον όγκο όσο και από τις γύρω περιοχές ώστε να εξαχθούν πληροφορίες για τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και την πιθανή συνύπαρξη *in situ* καρκινώματος.

B.8.3. Κυτταρολογική εξέταση ούρων

Πρόκειται για εργαστηριακή εξέταση με σκοπό την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στα ούρα και τον εντοπισμό όγκων που δεν αναγνωρίζονται με την κυστεοσκόπηση. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη συνοχή και αποφολιδώνονται εύκολα, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται στα ούρα, με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (αυξημένο μέγεθος πυρήνα, εμφανές πυρήνιο, αθροίσεις χρωματίνης κλπ). Η αποφολίδωση είναι μικρότερη στους καλώς διαφοροποιημένους όγκους, αφού τα κύτταρά τους συνδέονται με ισχυρούς δεσμούς και επομένως η κυτταρολογική ούρων είναι στις περιπτώσεις αυτές λιγότερο αξιόπιστη (υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών ευρημάτων). Η ικανότητα της κυτταρολογικής ούρων να ανιχνεύει έναν grade I όγκο κυμαίνεται από 22-62%. Ωστόσο, ακόμη και στους χαμηλής διαφοροποίησης όγκους παρατηρούνται ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ποσοστό της τάξης έως και 20%.

B.8.4. Ιστοπαθολογική εξέταση

Είναι η εργαστηριακή διερεύνηση καρκινικών κυττάρων επί του όγκου που αφαιρέθηκε κατά την κυστεοσκόπηση. Με την εξέταση αυτή επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ή όχι καρκίνου στην ουροδόχο κύστη και αποκαλύπτονται τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του όγκου, γεγονός που επιτρέπει στον γιατρό να καθορίσει τον τύπο του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

B.8.5. Ακτινολογική εξέταση

Συνήθως πραγματοποιείται όταν η ιστοπαθολογική εξέταση δείχνει ότι ο όγκος έχει επεκταθεί στα βαθύτερα στρώματα της κύστης, προκειμένου να καθορισθεί εάν ο όγκος έχει αναπτυχθεί στους ιστούς και τους λεμφαδένες εκτός της ουροδόχου κύστης.

B.9. Θεραπεία

Η αρχική θεραπεία που συνιστάται σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης, δηλαδή, σε όγκο που περιορίζεται στην επιφανειακή στιβάδα του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης (βλεννογόνος), είναι η κυστεοσκόπηση και η διουρηθρική εκτομή του όγκου (Trans Urethral Resection of Bladder cancer, TURB). Συνήθως γίνεται εκτομή ολόκληρου του όγκου και έτσι η TURB είναι η οριστική θεραπεία. Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης φτάνει στο 70% και οι περισσότεροι ασθενείς καταλήγουν από διαφορετικά αίτια. Ορισμένες φορές, πέρα από τη θεραπεία αυτή συνιστάται και η χορήγηση επικουρικής θεραπείας για την πρόληψη υποτροπών και της πιθανής εξέλιξης του όγκου σε διηθητικό. Οι επικουρικές θεραπείες περιλαμβάνουν: την ενδοκυστική χημειοθεραπεία, τη συστηματική χημειοθεραπεία, την ενδοκυστική ανοσοθεραπεία με ιντερφερόνη, BCG, την ανοσοθεραπεία από το στόμα με παράγοντες όπως η βρωμιραμίνη και η ενδοκυστική βιολογική θεραπεία με παράγοντες όπως ο TP40, ένα συνθετικό σύμπλεγμα TGF-α και εξωτοξίνης της ψευδομονάδας, που δε χρησιμοποιείται πλέον σε ευρεία βάση. Το είδος της επικουρικής θεραπείας που τελικά θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τον ατομικό κίνδυνο υποτροπής και εξέλιξης της νόσου, αλλά και την ικανότητα του ασθενούς να ανεχθεί τις παρενέργειες. Η ιδεώδης παρακολούθηση των ασθενών με επιφανειακό όγκο της ουροδόχου κύστης μετά από διουρηθρική εκτομή και επικουρική θεραπεία είναι η κυστεοσκόπηση και οι κυτταρολογικές εξετάσεις κάθε 3 μήνες, για 18-24 μήνες μετά τον αρχικό όγκο, κάθε 6 μήνες για τα επόμενα 2 χρόνια και ακολούθως 1 φορά τον χρόνο.

Η τυπική θεραπεία για τον διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης, δηλαδή, τον όγκο που διηθεί στο μυϊκό χιτώνα της κύστης ή έχει επεκταθεί και στους ιστούς που την περιβάλλουν, είναι η ριζική κυστεκτομή ως αρχική θεραπεία και η ανακατασκευή της κύστης με εκτροπή των ούρων και νεοκύστη. Η θεραπεία στοχεύει στην απομάκρυνση χειρουργικά ολόκληρης της κύστης, καθώς και των λεμφαδένων της πύελου και κάποιων γειτονικών οργάνων. Σε άτομα με παθολογοανατομικά ευρήματα που υποδηλώνουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής, χορηγείται συνήθως συμπληρωματικά χημειοθεραπεία πριν τη χειρουργική επέμβαση. Στόχος αυτής της προεγχειρητικής θεραπείας είναι η εξάλειψη των πιθανών μικρομεταστάσεων, η μείωση του μεγέθους του όγκου και η μείωση του κινδύνου εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων κατά την χειρουργική επέμβαση. Εναλλακτικά της ριζικής κυστεκτομής μπορεί να

χρησιμοποιηθεί η ακτινοβολία, κυρίως σε ασθενείς που δεν μπορούν να χειρουργηθούν λόγω συνυπαρχόντων χρόνιων νοσημάτων. Σε ποσοστό 50-70%, όμως, παρουσιάζεται υποτροπή μετά την ακτινοθεραπεία, ενώ το ποσοστό αυτό είναι 10-30% μετά από ριζική κυστεκτομή.

Σε περιπτώσεις μεταστατικής νόσου, ο πρωταρχικός στόχος της θεραπείας είναι να στοχεύσει τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας χημειοθεραπεία που χορηγείται ενδοφλεβίως. Ο καθιερωμένος χημειοθεραπευτικός συνδυασμός συνίσταται από γεμισιταβίνη και σισπλατίνη (GC) ή μεθοτρεξάτη, βινμπλαστίνη, δοξορουβικίνη και σισπλατίνη (MVAC). Ο συνδυασμός MVAC φαίνεται να είναι πιο τοξικός από την GC θεραπεία και η θνησιμότητα του μπορεί να φτάσει στο 23% λόγω σήψης ή συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και εμφράγματος του μυοκαρδίου.

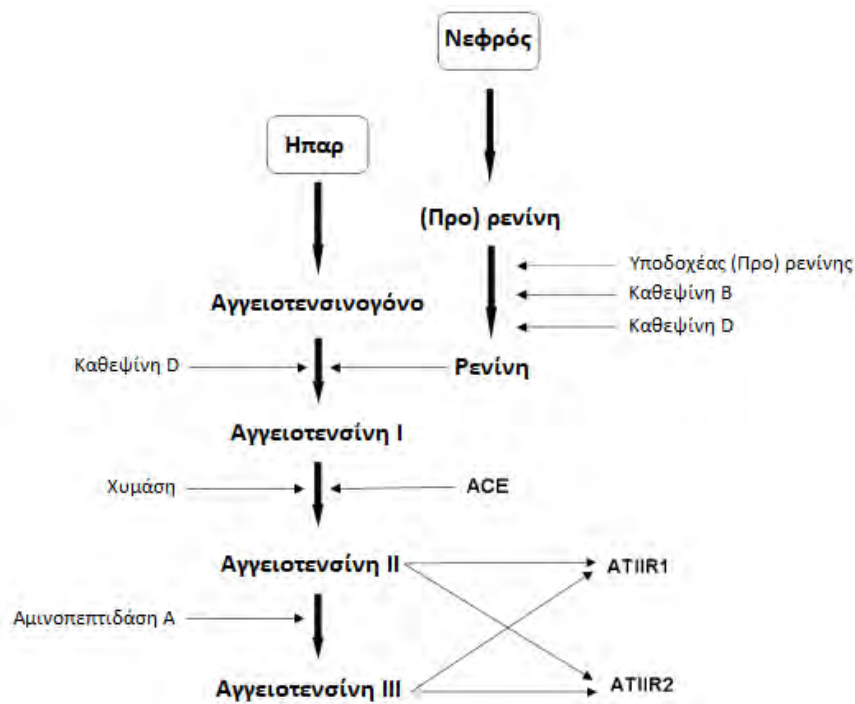
Γ. ΣΥΣΤΗΜΑ RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosterone)

Γ.1. Στοιχεία του συστήματος RAAS

Το σύστημα RAAS είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και τη διατήρηση της ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών. Η απορρύθμισή του σχετίζεται με υπέρταση και καρδιαγγειακά νοσήματα^[49]. Όταν η πίεση του αίματος μειωθεί, αρχίζει να παράγεται από τους νεφρούς ρενίνη (REN), η οποία απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η κύρια δράση της είναι η διάσπαση του αγγειοτενσινογόνου (AGT) -που παράγεται κυρίως στο ήπαρ- στο αμινοτελικό του άκρο. Από τη διάσπαση προκύπτει ένα ανενεργό δεκαπεπτίδιο, η αγγειοτενσίνη I (AngI), που φαίνεται να αποτελεί πρόδρομη μορφή της αγγειοτενσίνης II (AngII). Η αγγειοτενσίνη II προκύπτει από το καρβοξυτελικό άκρο της αγγειοτενσίνης I με τη βοήθεια του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (Angiotensin-Converting Enzyme-ACE), που βρίσκεται κυρίως στα τριχοειδή των πνευμόνων. Η αγγειοτενσίνη II προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και επακόλουθη σύσπαση των αγγείων με αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Προκαλεί, επίσης, την απελευθέρωση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια, η οποία με την σειρά της προκαλεί κατακράτηση νατρίου και απώλεια καλίου από τους νεφρούς. Τα αυξημένα επίπεδα νατρίου κατακρατούν νερό μέσα στα αγγεία και οδηγούν σε αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

Η αγγειοτενσίνη II δεν αποτελεί το μόνο ενεργό στοιχείο του συστήματος RAAS. Νέα πεπτίδια με παρόμοια ή διαφορετική λειτουργία έχουν ταυτοποιηθεί ως προϊόντα διάσπασης της αγγειοτενσίνης II. Τέτοια είναι το επταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη III (2-8) (AngIII), το εξαπεπτίδιο αγγειοτενσίνη IV (3-8) (AngIV) και το επταπεπτίδιο (1-7)^[49]. Τα πεπτίδια αυτά ενδεχομένως έχουν μικρότερη αγγειοσυσπαστική δράση, αλλά είναι δυνατόν να επάγουν την παραγωγή αλδοστερόνης προκαλώντας την αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

Η ενδοκυττάρια δράση των πεπτιδίων της αγγειοτενσίνης πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο υποδοχέων, του υποδοχέα αγγειοτενσίνης II τύπου 1 (AngioTensin II type 1 receptor, AT1R) και του υποδοχέα αγγειοτενσίνης II τύπου 2 (AngioTensin II type 2 receptor, AT2R). Ο AT1R εκφράζεται σε διάφορους ιστούς των ενηλίκων ατόμων, όπως στα αγγεία, στα επινεφρίδια, στο ήπαρ, στους νεφρούς και στον εγκέφαλο, ενώ ο AT2R εκφράζεται κυρίως κατά την εμβρυική ηλικία και παραμένει σε ορισμένους ιστούς των ενηλίκων ατόμων σε μικρές ποσότητες. Εκτός από τους δύο αυτούς βασικούς υποδοχείς του συστήματος RAAS, πρόσφατες έρευνες έχουν προσθέσει μερικούς ακόμη, όπως, ο υποδοχέας MAS, μέσω του οποίου δρα κυρίως η αγγειοτενσίνη (1-7), ο ινσουλινορυθμιζόμενος αμινοπεπτιδικός υποδοχέας (the insulin-regulated aminopeptidase receptor), ο υποδοχέας αγγειοτενσίνης II τύπου 4 (Angiotensin II receptor type 4) και ο ACE^[49]. Το σύστημα RAAS απεικονίζεται σχηματικά παρακάτω (*Εικόνα 11*).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος RAAS (Talia Wegman-Ostrosky et al., 2013).

Γ.2. Συμμετοχή του συστήματος RAAS στον καρκίνο

Γ.2.1. Πολλαπλασιασμός

Η αγγειοτενσίνη II έχει ανταγωνιστικές λειτουργίες αναλόγως του υποδοχέα μέσω του οποίου δρα. Όταν συνδέεται με τον AT1R, επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση, οδηγώντας στην δημιουργία όγκου, ενώ όταν συνδεθεί με τον AT2R έχει αντίθετη δράση^[50]. Η αγγειοτενσίνη II αποτελεί σημαντικό υποκινητή της ανάπτυξης, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης, σε πολλούς τύπους κυττάρων, της φωσφατιδυλοινωσιτόλης. Αυτή με την σειρά της, επάγει δύο ακόλουθα σηματοδοτικά μηνύματα, την τριφωσφορική ινωσιτόλη και τη διακυλγλυκερόλη, που προκαλούν αύξηση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης^[51]. Ένας ακόμη μηχανισμός, μέσω του οποίου τα πεπτίδια της αγγειοτενσίνης II προάγουν την ανάπτυξη, είναι η ρύθμιση των κινασών τυροσίνης, καθώς αυτές ενώνονται με πολλούς υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης και ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια^[52]. Χαρακτηριστικά, στον καρκίνο του μαστού έχουμε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού, μέσω της ενεργοποίησης των κινασών MEK και PI3K ως απάντηση στην αγγειοτενσίνη II^[53].

^{54]}. Το ίδιο συμβαίνει και στον καρκίνο του προστάτη μέσω της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών οδών MAPK και STAT3^[55]. Ο AT1R εκφράζεται επίσης σε κύτταρα μυελώματος, σε ασθενείς με λευχαιμία και φαίνεται να παίζει ρόλο στη δημιουργία του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου^[56]. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης η ένταση της έκφρασης του AT1R υποδοχέα φάνηκε ότι σχετίζεται με τον βαθμό κακοήθειας^[57].

Γενικά, έχει παρατηρηθεί συνεργασία μεταξύ των δύο βασικών υποδοχέων της αγγειοτενσίνης, καθώς η ενεργοποίηση του ενός μπορεί να προκαλέσει αναστολή του άλλου. Είναι δυνατόν η αναστολή του AT1R υποδοχέα να προκαλέσει διαταραχή στο ισοζύγιο AT1R/AT2R με αποτέλεσμα τη διέγερση του AT2R υποδοχέα, η ενεργοποίηση του οποίου οδηγεί κυρίως σε απόπτωση.

Σε αντίθεση με τον άξονα AngII-AT1R, ο άξονας MASR-Ang1-7 φαίνεται να μειώνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, κυρίως μέσω της καταστολής του μονοπατιού ERK. Σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, θεραπεία *in vivo* με Ang 1-7 οδηγεί σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού^[58], ενώ σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, η αποσιώπηση του ACE2 ενζύμου, που διασπά την αγγειοτενσίνη II σε αγγειοτενσίνη 1-7, προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτό φανερώνει ότι τα επίπεδα ACE2 μπορούν να καθορίσουν πότε το σύστημα RAAS θα αυξήσει ή θα μειώσει το ρυθμό πολλαπλασιασμού^[59].

Γ.2.2. Απόπτωση

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAAS μέσω του AT1R υποδοχέα προάγει αντι-αποπτωτικά σήματα μέσω δύο βασικών μονοπατιών. Το πρώτο είναι το μονοπάτι του NF-κB, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή των αντι-αποπτωτικών μορίων BCL και survivin^[57]. Ο δεύτερος μηχανισμός που προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση είναι το μονοπάτι PI3K-Akt, που οδηγεί στην καταστολή των κασπασών, ένζυμα που προάγουν τον κυτταρικό θάνατο^[60]. Η ενεργοποίηση του συστήματος RAAS μέσω του υποδοχέα AT2R, συνδέεται με την προαγωγή της απόπτωσης. Στον καρκίνο του προστάτη, για παράδειγμα, η υπερέκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα προάγει την απόπτωση ανεξαρτήτως από την αγγειοτενσίνη II μέσω της p38 πρωτεϊνικής κινάσης, των κασπασών 3 και 8 και της ενεργοποίησης της p53 πρωτεΐνης^[61].

Γ.2.3. Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για έναν κυτταρικό όγκο, καθώς μέσω αυτής τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα προμηθεύονται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Αποτελεί, επίσης, φυσική οδό για μετάσταση και εγκατάσταση των κυττάρων σε κάποιο άλλο απομακρυσμένο σημείο του σώματος. Έρευνες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του AT1R υποδοχέα προάγει την επακόλουθη ενεργοποίηση του αγγειογεννητικού παράγοντα VEGF στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, παράγοντα που αποτελεί το κλειδί στη ρύθμιση της ανάπτυξης του όγκου και της αγγειογένεσης^[62]. Η ενεργοποίηση προκαλείται κυρίως μέσω του παράγοντα υποξίας HIF1α, η έκφραση του οποίου έχει αυξηθεί μέσω της αγγειοτενσίνης II.

Παράλληλα, επάγεται η ενεργοποίηση των παραγόντων IL-8, TGF-β1, FGF, IGF και ενδοθηλίνης που συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Σε knock-out ποντικούς του γονιδίου του AT1R υποδοχέα, η αγγειογένεση, μετά από συμβάν ισχαιμίας, βρέθηκε ελαττωμένη σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε σε wild-type ποντικούς. Η χρήση AT1R ανταγωνιστή, σε δόσεις που δε μειώνουν την πίεση του αίματος, αναστέλλει την αγγειογένεση σε wild-type ποντικούς μετά από ισχαιμία. Τα δύο αυτά πειράματα επιβεβαιώνουν ότι η σηματοδότηση μέσω του AT1R υποδοχέα εμπλέκεται στην αγγειογένεση^[63,64].

Ο ρόλος του AT2R υποδοχέα είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Ωστόσο, προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι σε knock-out ποντικούς του γονιδίου του AT2R υποδοχέα ο όγκος αναπτύσσεται γρηγορότερα συγκριτικά με wild-type ποντικούς, γεγονός που δείχνει ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας παίζει ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου^[65].

Γ.2.4. Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός

Στα φυσιολογικά κύτταρα, η απαιτούμενη ενέργεια για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αντιθέτως, τα καρκινικά κύτταρα, για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες, παρουσιάζουν έντονη γλυκόλυση τόσο σε συνθήκες υποξίας, όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg^[66]. Το σύστημα RAAS φαίνεται να εμπλέκεται στο φαινόμενο αυτό, καθώς μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων είναι δυνατόν να αυξήσουν την έκφραση του υποδοχέα της προ-ρενίνης, των AGT, ACE και AT1R και να διεγείρουν τη ρενίνη^[67].

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου η ενεργοποίηση του συστήματος RAAS μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και προφλεγμονωδών / προαγγειογεννητικών σημάτων, που ενδέχεται να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των MAPK/PI3K μονοπατιών και άλλων ειδικών για την υποξία μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF1α^[68]. Η μεγάλη συγκέντρωση ROS οδηγεί στο οξειδωτικό στρες και συνεπώς σε βλάβες των πρωτεϊνών και των κυττάρων^[69].

Γ.2.5. Φλεγμονή

Το σύστημα RAAS παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, καθώς με τη σύνδεση της αγγειοτενσίνης στον AT1R υποδοχέα ξεκινά η παραγωγή διαφόρων προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως, IL-1b, TNF-α, PAI-1, TGF-β, των πρωτεϊνών της οικογένειας STAT και του παράγοντα υποξίας HIF1α^[70]. Σε ένα υποξικό και φλεγμονώδες περιβάλλον, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα παράγουν μεγάλες συγκεντρώσεις ROS, οι οποίες ενισχύουν τη σηματοδότηση μέσω του AT1R υποδοχέα. Η εν λόγω ενίσχυση οδηγεί σε αύξηση των συγκεντρώσεων των αυξητικών παραγόντων και επακόλουθη αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης.

Γ.2.6. Μετανάστευση, διείσδυση και μετάσταση

Κυτταρική μετανάστευση, διείσδυση και μετάσταση είναι δυνατόν να συμβούν λόγω μεταλλάξεων, πολυμορφισμών και γενικά αλλαγών στην έκφραση διαφόρων στοιχείων του συστήματος RAAS. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του στομάχου, ο πολυμορφισμός ACE I/D (ACE Insertion/Deletion) φαίνεται να επηρεάζει τη μεταστατική συμπεριφορά του όγκου^[71], ενώ σε συνδυασμό με την έκφραση του AT1R υποδοχέα σχετίζεται με οζώδη εξάπλωση^[72]. Σε διεισδυτικούς καρκίνους των ωοθηκών, τόσο η έκφραση του VEGF παράγοντα, όσο και η πυκνότητα των αγγείων στο εσωτερικό των όγκων είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε περιπτώσεις όγκων με υψηλή έκφραση AT1R συγκριτικά με καρκίνους που παρουσιάζουν μικρή έκφραση του AT1R υποδοχέα^[73]. Όσο μεγαλύτερη είναι η έκφραση του AT1R υποδοχέα, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα διείσδυσης και μετάστασης. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης παραγόντων που προωθούν

την EMT μετάβαση (Epithelial-Mesenchymal transition), όπως η βιμεντίνη και μείωσης άλλων, όπως η E-καντχερίνη.

Γ.3. Πολυμορφισμοί του συστήματος RAAS και καρκίνος

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πλήθος πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του συστήματος RAAS. Ορισμένοι πολυμορφισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην καρκινογένεση, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο, τόσο ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης ενός συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, ή δρώντας προστατευτικά σε άλλες περιπτώσεις και μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης συγκεκριμένου τύπου καρκίνου^[74].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον AT1R υποδοχέα του συστήματος RAAS εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 και εκτείνεται από την περιοχή 3q21 μέχρι την 3q25. Το μέγεθος του είναι 55 kb και αποτελείται από 5 εξόνια. Ο πολυμορφισμός A1166C βρίσκεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή και συγκεκριμένα στην θέση 1166, όπου η αδενίνη αντικαθίσταται από την κυτοσίνη. Λόγω της θέσης στην οποία βρίσκεται τροποποιούνται οι μετα-μεταγραφικές δραστηριότητες που ακολουθούν τη μεταγραφή του γονιδίου με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η σύνδεση του υποδοχέα με τις G πρωτεΐνες, μιας και πρόκειται για υποδοχέα συζευγμένο με G πρωτεΐνη^[74]. Συνεπώς, επηρεάζεται ο καταρράκτης των σηματοδοτικών οδών που ακολουθούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα, μεταξύ των οποίων είναι η σηματοδοτική οδός AngII/AT1R. Παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου. Η υπερέκφραση ενδεχομένως είναι αποτέλεσμα της πρόσδεσης του microRNA-155 που συνδέεται κανονικά μαζί του αποτρέποντας την υπερέκφρασή του, αλλά ο πολυμορφισμός εμποδίζει την πρόσδεση λόγω έλλειψης συμπληρωματικότητας^[75].

Πολλές μελέτες εξέτασαν τον εν λόγω πολυμορφισμό και την πιθανή εμπλοκή του στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ωστόσο, προκύπτουν αντικρουόμενα αποτελέσματα, καθώς αφορούν συνήθως μεμονωμένες ομάδες, μικρού μεγέθους και διαφορετικής γεωγραφικής εξάπλωσης. Χαρακτηριστικά, μια μετα-ανάλυση έχει δείξει ότι ο γονότυπος CC (πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία) πιθανώς παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στους Καυκάσιους^[76]. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα από μελέτη στο Μεξικό, που ανέδειξαν μικρότερο ρίσκο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού παρουσία του C

αλληλομόρφου^[77]. Άτομα ομόζυγα για το A αλληλόμορφο διαθέτουν μεγαλύτερο κίνδυνο υπερπλασίας και ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη σε σχέση με ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες του C αλληλομόρφου, αναδεικνύοντας τον πιθανό προστατευτικό ρόλο του C αλληλομόρφου στον καρκίνο του προστάτη^[78]. Αντιθέτως, στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα φάνηκε ότι ο γονότυπος CC παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με το γονότυπο AA, με τη συσχέτιση αυτή να είναι πιο σημαντική σε ασθενείς με υπέρταση^[79]. Μελέτη σε Αυστραλιανό πληθυσμό ανέδειξε υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου σε γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου σε σχέση με υγιείς^[80]. Σε μία μελέτη μετα-ανάλυσης των Liu και συνεργατών του, σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, βρέθηκε ότι τα άτομα με γονότυπο CC έχουν γενικά σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, ειδικά ο πληθυσμός των Καυκάσιων^[81].

Το γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 1 και εκτείνεται από την περιοχή 1q42 μέχρι την 1q43. Περιλαμβάνει 5 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μήκους 61 kDa. Έχουν βρεθεί διάφοροι πολυμορφισμοί στην έκταση του –στην περιοχή του υποκινητή, σε ιντρόνια και εξόνια- με δύο από τους σημαντικότερους και τους πιο μελετημένους να είναι οι πολυμορφισμοί T803C (M235T) και C620T (T174M) στο εξόνιο 2. Στον πρώτο πολυμορφισμό έχουμε αντικατάσταση της μεθειονίνης στην θέση 235 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το αμινοξύ θρεονίνη, λόγω της αντικατάστασης της θυμίνης από την κυτοσίνη στη θέση 803 στη νουκλεοτιδική αλυσίδα του DNA. Στον δεύτερο πολυμορφισμό έχουμε αντικατάσταση της θρεονίνης στη θέση 174 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το αμινοξύ μεθειονίνη, λόγω της αντικατάστασης της κυτοσίνης από θυμίνη στην θέση 620 στη νουκλεοτιδική αλυσίδα του DNA. Σε άτομα που φέρουν τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του αγγειοτενσινογόνου στην κυκλοφορία του αίματος^[82].

Ο M235T πολυμορφισμός φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες^[83]. Έχει βρεθεί, ακόμη, ότι αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο των νεφρών, κυρίως σε άτομα που υποφέρουν από υπέρταση ή παχυσαρκία^[84]. Ωστόσο, φαίνεται να παρουσιάζει μειωμένο επιπολασμό σε γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου^[85] ή σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου^[86] ή του παχέος εντέρου^[87]. Αρκετές μετα-αναλύσεις δείχνουν ότι οι εν λόγω πολυμορφισμοί δε σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου^[88].

Σχετικά με τον T174M πολυμορφισμό έχει βρεθεί ότι, σε συγκεκριμένες ομάδες γυναικών ηλικίας 36-54 χρονών, μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά έναντι του καρκίνου του μαστού, όταν όμως βρίσκεται σε συνδυασμό με τον γονότυπο ACE I/I. Αντιθέτως, σε διαφορετική ομάδα γυναικών, ηλικίας άνω των 54 ετών, ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, όταν βρίσκεται σε συνδυασμό με τον γονότυπο AGT T235T^[89]. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης θυρεοειδίτιδα Χασιμότο (Hashimoto's thyroiditis) και πιθανώς παίζει ρόλο στον καρκίνο του θυρεοειδή, γεγονός που δεν έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί^[90].

Το γονίδιο της ρενίνης εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 1 και συγκεκριμένα στη θέση 1q42. Έχει μήκος 12.5kb και αποτελείται από 10 εξόνια. Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν καταγραφεί στο συγκεκριμένο γονίδιο. Ένας από τους σημαντικότερους πολυμορφισμούς βρίσκεται στη θέση 5312 της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA, όπου έχουμε αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε μια περιοχή απομακρυσμένου ενισχυτή του γονιδίου της ρενίνης επηρεάζοντας την δράση του και συνεπώς τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου. Έχει αναφερθεί ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου και συνεπώς τη συγκέντρωση της ρενίνης στην κυκλοφορία του αίματος^[91].

Έρευνα έδειξε ότι η χαμηλή αναλογία αλδοστερόνης / ρενίνης στην κυκλοφορία του αίματος, δηλαδή είτε η χαμηλή συγκέντρωση της αλδοστερόνης, είτε η υψηλή συγκέντρωση της ρενίνης, αυξάνει τον κίνδυνο θνησιμότητας από καρκίνο^[92]. Άλλωστε, η ρενίνη είναι αυτή που δρομολογεί την έναρξη του συστήματος RAAS. Άρα, αύξησή της είναι δυνατόν να προκαλέσει υψηλή δραστηριότητα του συστήματος RAAS και πιθανή καρκινογένεση. Η ρενίνη μπορεί να δράσει άμεσα στην κυτταρική αύξηση, ανεξάρτητα από την AngII, μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα της. Έχει αναφερθεί ότι η σύνδεση αυτή ρυθμίζει την έκφραση των παραγόντων TGF-β1 και PAI-1, πυροδοτώντας με τον τρόπο αυτό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^[93, 94].

Το γονίδιο του υποδοχέα AT2R εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος X και συγκεκριμένα στη θέση Xq22. Έχει μήκος 5kb και αποτελείται από 3 εξόνια. Ένας από τους πολυμορφισμούς που έχουν βρεθεί στο γονίδιο αυτό είναι ο C3123A (ή C4599A) στην 3' αμετάφραστη περιοχή του εξονίου 3, όπου έχουμε αντικατάσταση της κυτοσίνης στη θέση 3123 από την αδερίνη. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει μελετηθεί κυρίως στην προεκλαμψία χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση^[95]. Οι λειτουργικές επιδράσεις του πολυμορφισμού

αυτού δεν έχουν διερευνηθεί σε προηγούμενες μελέτες. Παρόλο αυτά, έχει βρεθεί σε πληθυσμό της Ιαπωνίας ότι βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με τον πολυμορφισμό rs1403543 (A1675G)^[96]. Στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, το G πολυμορφικό αλληλόμορφο σχετίζεται με μεγαλύτερη έκφραση του AT2R υποδοχέα σε σχέση με το A αλληλόμορφο^[97]. Πολλοί υποθέτουν ότι κάτι ανάλογο συμβαίνει και στον rs11091046 πολυμορφισμό, δηλαδή η αυξημένη έκφραση του AT2R υποδοχέα, συνδέεται με την απουσία του A αλληλομόρφου. Η αύξηση, ή η μείωση της έκφρασης του υποδοχέα, οδηγεί τελικά σε απορρύθμιση του συστήματος RAAS, που μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση.

Στις υπάρχουσες μελέτες προκύπτουν συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται και δικαιολογείται εν μέρει τόσο από τον αριθμό των ατόμων που περιλαμβάνει η κάθε μελέτη, όσο και από τυχόν διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των πληθυσμών. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι διαφορές αυτές αποδίδονται στη μεγάλη γεωγραφική ετερογένεια και στις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών φυλών, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει και η επίδραση των ποικίλων περιβαλλοντικών παραγόντων.

Γ.4. Αναστολείς του συστήματος RAAS

Πολλές μελέτες έδειξαν ότι αναστολείς του συστήματος RAAS αυξάνουν τα ποσοστά επιβίωσης ασθενών με καρκίνο, μέσω καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο τύπος του καρκίνου επηρεάζει το ρόλο του αναστολέα στην προσπάθεια καταστολής του όγκου^[98, 99]. Χαρακτηριστικά, βελτίωση στην εξέλιξη της νόσου παρατηρείται στον καρκίνο του στομάχου, του παγκρέατος, του ήπατος, της ουροδόχου κύστης και του νεφρού. Αντιθέτως, οι αναστολείς φαίνεται να έχουν αρνητικές επιδράσεις στην οξεία μυελοκυτταρική λευχαιμία ή στο πολλαπλό μύελωμα. Οι μηχανισμοί που διέπουν τις διαφορετικές επιπτώσεις των αναστολέων του συστήματος RAAS σε διάφορους τύπους καρκίνου είναι ελάχιστα κατανοητοί.

Οι κύριοι αναστολείς-ανταγωνιστές που χρησιμοποιούνται είναι οι αναστολείς του ενζύμου ACE και οι ανταγωνιστές του AT1R υποδοχέα, που εμποδίζουν τη μετατροπή της αγγιοτενσίνης I σε αγγιοτενσίνη II και την σύνδεση της αγγιοτενσίνης II στον AT1R υποδοχέα αντίστοιχα. Οι λειτουργίες αυτές είναι σημαντικές στην εμφάνιση καρκίνου, καθώς η αγγιοτενσίνη II αποτελεί αυξητικό

παράγοντα που συντελεί στην ανάπτυξη νέων αγγείων κατά την επέκταση του όγκου. Συχνά, χρησιμοποιούνται και αναστολείς της ρενίνης, που εμποδίζουν τη μετατροπή του αγγειοτενσινογόνου σε αγγειοτενσίνη I, ή αγωνιστές του AGT2R υποδοχέα, καθώς η σύνδεση της αγγειοτενσίνης II με τον AT2R υποδοχέα φαίνεται πως έχει αντι-αποπτωτικές δράσεις και αναστέλλει την αγγειογένεση.

Όσον αφορά τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, πειράματα με ανταγωνιστές του AT1R υποδοχέα φάνηκε να εμποδίζουν την εξάπλωση του όγκου, κυρίως μέσω μείωσης κύριων αγγειογενετικών παραγόντων, όπως του VEGF και του IL-8 που προάγουν την αγγειογένεση^[100, 101]. Σε ποντικούς που δεν χορηγήθηκε ο ανταγωνιστής το δίκτυο των αγγείων ήταν καλά σχηματισμένο, ενώ σε ποντικούς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τη χρήση ανταγωνιστή έναντι του AT1R υποδοχέα το δίκτυο ήταν ελαφρώς ανεπτυγμένο. Μελέτη σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου, που έλαβαν θεραπεία με ACEIs ή ARBs μετά από διουρηθρική εκτομή του όγκου, έδειξε μειωμένες πιθανότητες για υποτροπή της νόσου συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία με αναστολείς^[102].

Η υπερέκφραση του AT2R υποδοχέα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση και προωθεί την απόπτωση. Η απόπτωση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης p38MAPK και των κασπασών 3 και 8, σε συνδυασμό με την αδρανοποίηση του μονοπατιού ERK-MAPK. Η αναστολή της αγγειογένεσης φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω μείωσης της έκφρασης του VEGF παράγοντα. Ο AT2R υποδοχέα φαίνεται να αποτελεί έναν εν δυνάμει στόχο για ανάπτυξη θεραπείας έναντι του καρκίνου της ουροδόχου κύστης^[103].

ΣΚΟΠΟΣ

Στη συγκεκριμένη εργασία εστίασαμε το ενδιαφέρον μας σε πέντε πολυμορφισμούς του συστήματος RAAS και συγκεκριμένα στον πολυμορφισμό A1166C του AT1R γονιδίου, στον πολυμορφισμό C3123A του AT2R γονιδίου, στον πολυμορφισμό C5312T του REN γονιδίου και στους πολυμορφισμούς T803C και C620T του AGT γονιδίου (ή αλλιώς M235T και T174M αντίστοιχα). Σκοπός μας είναι να ελέγξουμε την συχνότητα των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό και κατά πόσο αυτοί σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Παράλληλα, εξετάστηκε η πιθανότητα συσχέτισης με διάφορες κλινικοϊστολογικές παραμέτρους της νόσου, καθώς επίσης και με τον τρόπο ζωής. Παρόμοια έρευνα δεν έχει γίνει στον ελληνικό πληθυσμό.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ

Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε 54 ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης που προσήλθαν στην Ουρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η ομάδα αυτή αποτελούνταν από 50 άνδρες και 4 γυναίκες με διάμεση ηλικία τα 70 ± 10 έτη. Για τα άτομα αυτά συλλέξαμε πληροφορίες σχετικά με το στάδιο της νόσου και το βαθμό κακοηθείας, τον αριθμό και τη διάμετρο του όγκου, καθώς και την πιθανή υποτροπή. Επιπρόσθετα συγκεντρώσαμε πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των χημειοθεραπειών στις οποίες υπεβλήθησαν, αλλά και στοιχεία που αφορούν στον τρόπο ζωής τους, όπως, το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ. Όλα τα άτομα έδωσαν τυποποιημένη ενημερωμένη συγκατάθεση συμμετοχής.

Παράλληλα, συλλέξαμε δείγματα από 44 συνολικά υγιή ενήλικα άτομα διαφόρων ηλικιών χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

B. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε από περιφερικό αίμα και πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ της εταιρείας Macherey-Nagel. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση στηλών/μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης, που έχουν τη ικανότητα να δεσμεύουν εκλεκτικά τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατές σε πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα, που μπορεί να αναστείλουν τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης κατά την PCR αντίδραση.

Πειραματική διαδικασία

- Προσθήκη 25μL πρωτεϊνάσης K και 200μL διαλύματος λύσης/σύνδεσης (B3) σε 200μL δείγμα αίματος
- Καλή ανακίνηση (vortex) για ανάδευση των υλικών και σύντομη φυγοκέντρηση (spin down)
- Επώαση για 15 λεπτά στους 70°C σε θερμοαντική πλάκα
- Προσθήκη 210μL απόλυτης αιθανόλης 96-100%
- Καλή ανακίνηση για ανάδευση των υλικών και σύντομη φυγοκέντρηση
- Τοποθέτηση του δείγματος στην στήλη
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό

- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προσθήκη 500μL διαλύματος πλύσης (BW) στην στήλη
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προθήκη 600μL νέου διαλύματος πλύσης (B5) στην στήλη
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Απομάκρυνση του σωληναρίου συλλογής
- Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου erpendorf
- Προσθήκη στην στήλη 100μL προθερμασμένου στους 70°C διαλύματος έκλουσης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Τοποθέτηση ξανά του δείγματος στην στήλη
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές (rpm) X 1 λεπτό
- Αποθήκευση του δείγματος στο ψυγείο

Γ. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

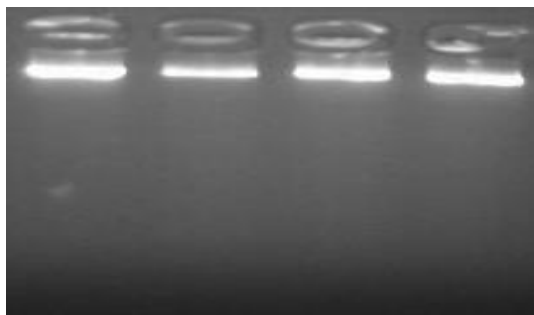
Φωτομέτρηση

Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση και γενωμικού 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 260nm και στα 280nm και εκτιμάται από το λόγο OD260/OD280. Οι τιμές μεταξύ 1.7-1.9, προσδιορίζουν ένα υψηλής καθαρότητας DNA. Τιμές < 1.7 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως πρωτεϊνών ή φαινόλης, ενώ τιμές >1.9 είναι ενδεικτικές πρόσμιξης με άλλα μακρομόρια. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$C_{dsDNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{τιμή OD}_{260} \times 50 \times \text{συντελεστής αραιώσεως}$$

Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων

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



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε 2% πηκτή αγαρόζης δειγμάτων γενωμικού DNA μετά από απομόνωση από περιφερικό αίμα.

4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Οι περιοχές του DNA που περιέχουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς ενισχύθηκαν με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος είναι 50μl, ενώ η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται είναι κυρίως 5μl. Αρχικά, προστίθεται σε σωληνάριο 0.2 mL, κατάλληλο για την αντίδραση PCR το γενωμικό DNA. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται ένα μείγμα αντιδραστηρίων, από το οποίο προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα ανά δείγμα. Κάθε φορά χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας, που δεν περιέχει γενωμικό DNA για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων (μόνο μείγμα αντιδραστηρίων και νερό). Τα πρωτόκολλα με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση PCR για κάθε δείγμα παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν (*Πίνακες 4-7*).

Πίνακας 3. Αλληλουχία εκκινήτων για την ενίσχυση των τμημάτων των υπό εξέταση γονιδίων.

<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ 5' → 3'</i>		<i>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</i> (ng/μL)
<i>AT1R-F πρόσθιος</i>	<i>TTGAGGTTGAGTGACATGTTCTGA (23 nts)</i>	873
<i>AT1R-R ανάστροφος</i>	<i>CGGTTTCAGTCCACATAATGCA (21 nts)</i>	782
<i>AT2R-F πρόσθιος</i>	<i>GGATTCAGATTTCTCTTTGAA (21 nts)</i>	755
<i>AT2R-R ανάστροφος</i>	<i>GCATAGGAGTATGATTTAATC (21 nts)</i>	804
<i>AGT-F πρόσθιος</i>	<i>GATGCGCACAAGGTCCTG (18 nts)</i>	662
<i>AGT-R ανάστροφος</i>	<i>CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC (25 nts)</i>	819
<i>REN-F πρόσθιος</i>	<i>CGTAGTGCCATTTTAGGAAC (21 nts)</i>	781
<i>REN-R ανάστροφος</i>	<i>AACACCAAAGCAGGCTTAA (19 nts)</i>	795

Πίνακας 4. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του *AT1R* γονιδίου με τη χρήση της FirePol πολυμεράσης.

Μείγμα αντίδρασης	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ANA ΔΕΙΓΜΑ (μL)
10X Ρυθμιστικό διάλυμα B	5
25mM MgCl₂	5
DNTPs	3
Πρόσθιος εκκινήτης	2
Ανάστροφος εκκινήτης	2
FirePol Πολυμεράση	0,3
ddH₂O	Μέχρι τα 45

Πίνακας 5. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *AT2R* με τη χρήση της BestTaq πολυμεράσης.

Μείγμα αντίδρασης	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ANA ΔΕΙΓΜΑ (μL)
5X Ρυθμιστικό διάλυμα	10
25mM MgSO₄	2
DNTPs	1
Πρόσθιος εκκινήτης	2
Ανάστροφος εκκινήτης	2
Best Taq Πολυμεράση	0,4
ddH₂O	Μέχρι τα 45

Πίνακας 6. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του *AGT* γονιδίου με τη χρήση της BestTaq πολυμεράσης.

Μείγμα αντίδρασης	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ANA ΔΕΙΓΜΑ (μL)
5X Ρυθμιστικό διάλυμα	10
25mM MgSO ₄	2
DNTPs	1
Πρόσθιος εκκινητής	2
Ανάστροφος εκκινητής	1
Best Taq Πολυμεράση	0,4
ddH ₂ O	Μέχρι τα 45

Πίνακας 7. Μείγμα αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του *REN* γονιδίου με τη χρήση της BestTaq πολυμεράσης.

Μείγμα αντίδρασης	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ANA ΔΕΙΓΜΑ (μL)
5X Ρυθμιστικό διάλυμα	10
25mM MgSO ₄	3
DNTPs	2
Πρόσθιος εκκινητής	2
Ανάστροφος εκκινητής	4
Best Taq Πολυμεράση	0,4
ddH ₂ O	Μέχρι τα 45

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση των τμημάτων των υπό εξέταση γονιδίων λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη, λαμβάνει χώρα για έναν κύκλο διάρκειας 5 λεπτών στους 94°C, ώστε να αποδιαταχθεί η διπλή έλικα DNA και να δημιουργηθούν μονές έλικες, που θα αποτελέσουν πρότυπα για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων του DNA. Το δεύτερο στάδιο αποτελείται από τρία υποστάδια, που περιλαμβάνουν αποδιάταξη για 1 λεπτό στους 90°C, για την οριστική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, υβριδοποίηση, διάρκειας 1 λεπτού σε θερμοκρασία συγκεκριμένη για κάθε ζεύγος εκκινητών, μιας και σε αυτό το στάδιο γίνεται οι σύνδεση τους στις μονές αλυσίδες DNA και επιμήκυνση, διάρκειας 1 λεπτού στους 72°C, όπου επιτυγχάνεται η επιμήκυνση των δίκλωνων τμημάτων. Το δεύτερο στάδιο επαναλήφθηκε για 35 κύκλους. Το τρίτο στάδιο διήρκησε 10 λεπτά στους 72°C, στάδιο που εξασφαλίζει την επιτυχημένη επέκταση των δίκλωνων τμημάτων. Συνοπτικά το πρωτόκολλο παρουσιάζεται παρακάτω. Όλες οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf.

Πρωτόκολλο PCR αντίδρασης

- 1) T=94°C για 5 λεπτά
- 2) T=94°C για 1 λεπτό
- 3) T=56°C για 1 λεπτό
- 4) T=72°C για 1 λεπτό
- 5) Βήματα 2,3 και 4 X 35 κύκλους
- 6) T=72°C για 10 λεπτά
- 7) T=18°C ∞

E. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ανάλογα με το μέγεθος των PCR προϊόντων παρασκευάζεται πηκτή ανάλογης συγκέντρωσης σε αгарόζη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση για να ελέγξουμε την επιτυχή ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων DNA, μεγέθους από 150 μέχρι 320 ζεύγη βάσεων, κατασκευάσαμε πηκτή αгарόζης 3%.

Για την παρασκευή της πηκτής, αρχικά, ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα αгарόζης και προστίθεται σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TBE (1X). Η ποσότητα αυτή εξαρτάται από το μέγεθος της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αгарόζη σε φούρνο μικροκυμάτων. Αφήνεται για λίγο κάτω από τη βρύση για να αποκτήσει θερμοκρασία 45-55°C και όταν φτάσει σε αυτή τη θερμοκρασία, γίνεται προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το όλο διάλυμα επιστρώνεται στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης, αφού προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί οι απαραίτητες χτένες για το σχηματισμό των πηγαδιών για την ηλεκτροφόρηση. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να εισέρχεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και παρουσία υπεριώδους φωτός φθορίζει. Με την ιδιότητα αυτή επιτρέπει την οπτικοποίηση των δειγμάτων μας στην πηκτή αгарόζης. Αναμένουμε μέχρι να στερεοποιηθεί η πηκτή αгарόζης. Στη δεξαμενή που χρησιμοποιήσαμε, για την κατασκευή πηκτής αгарόζης 3% χρειαστήκαμε 300μλ διαλύματος TBE 1X, 9γραμ. αгарόζη και 20μλ EtBr.

ΣΤ. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Όταν στερεοποιηθεί η πηκτή αгарόζης, ετοιμάζουμε το διάλυμα φόρτωσης, το οποίο περιέχει το PCR προϊόν και μια ειδική χρωστική (loading dye). Η χρωστική περιέχει γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης. Η γλυκερόλη βοηθά στο να καθιζάνει το δείγμα μας μέσα στο πηγάδι φόρτωσης και να μην διαχέεται. Το μπλε της βρωμοφαινόλης καθιστά ορατή την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Αναμιγνύουμε 10μλ PCR προϊόντος και 7μλ χρωστικής. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζει με διάλυμα TBE 1X και εφαρμόζεται τάση περίπου 100V. Τα PCR προϊόντα «κινούνται» παράλληλα με έναν μάρτυρα γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους που επιτρέπει να ελέγξουμε την επιτυχή ενίσχυση των PCR προϊόντων. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε τον μάρτυρα 100bp της εταιρείας Invitrogen (Life Sciences). Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτιμάται υπό υπεριώδες

φως με ένα σύστημα απεικόνισης, ώστε να καταγραφούν τα PCR προϊόντα ως ζώνες στο πήκτωμα. Το αποτέλεσμα αποθηκεύεται σε υπολογιστή με τη μορφή εικόνας.

Z. ΠΕΨΕΙΣ

Τα επιτυχώς ενισχυμένα PCR προϊόντα υποβλήθηκαν σε πέψεις με συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο για κάθε πολυμορφισμό. Για τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της ρενίνης (C5312T) και του AT1R υποδοχέα (A1166C) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DdeI της εταιρείας NEW ENGLAND BioLabs, που αναγνωρίζει και τέμνει την παρακάτω αλληλουχία αναγνώρισης, μεταξύ κυτοσίνης και θυμίνης, στα δίκλινα μόρια DNA.

C[^]TNAG
GANT[^]C

Για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο του AT2R υποδοχέα (C3123A) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο AluI της εταιρείας NEW ENGLAND BioLabs, που αναγνωρίζει και τέμνει την παρακάτω αλληλουχία αναγνώρισης μεταξύ γουανίνης και κυτοσίνης.

AG[^]CT
TC[^]GA

Για τους πολυμορφισμούς M235T (T803C) και T174M (C620T) στο γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα SfaNI και NcoI της εταιρείας NEW ENGLAND BioLabs αντίστοιχα που αναγνωρίζουν και τέμνουν τις παρακάτω αλληλουχίες αναγνώρισης αντίστοιχα στο δίκλινο DNA.

GCATC[^]NNNN[^]NNNN
CGTAGNNNNNNNN[^]

C[^]CATGG
GGTAC[^]C

Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 30μλ, αποτελούμενος κυρίως από 10μλ PCR προϊόντος και 20μλ μείγματος αντιδραστηρίων. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε πέψη παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 8 - 11). Για κάθε ένζυμο χρησιμοποιείται συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα με τελική συγκέντρωση 1X (περίπου το 1/3 του μείγματος

αντίδρασης), το οποίο παρέχει στο ένζυμο τις κατάλληλες συνθήκες για να δράσει με τον βέλτιστο τρόπο. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται εξαρτάται από την συγκέντρωσή του (Units).

Πίνακας 8. Μείγμα αντίδρασης για την εξέταση των πολυμορφισμών A1166C του *AT1R* γονιδίου και C5312T του *REN* γονιδίου.

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα 3	3
Ένζυμο DdeI	1,5
ddH ₂ O	15,5

Πίνακας 10. Μείγμα αντίδρασης για την εξέταση του πολυμορφισμού M235T του *ANG* γονιδίου.

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα 3	3
Ένζυμο SfaNI	5
ddH ₂ O	12

Πίνακας 9. Μείγμα αντίδρασης για την εξέταση του πολυμορφισμού C3123A του *AT2R* γονιδίου.

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα CutSmart	3
Ένζυμο AluI	1,5
ddH ₂ O	15,5

Πίνακας 11. Μείγμα αντίδρασης για την εξέταση του πολυμορφισμού T174M του *ANG* γονιδίου.

Μείγμα αντίδρασης	Ποσότητα ανά δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα 3	3
Ένζυμο NcoI	1,5
ddH ₂ O	15,5

Οι αντιδράσεις των πέψεων επωάστηκαν για 16-19 ώρες στους 37°C σε υδατόλουτρο ώστε να επιτραπεί η πλήρης πέψη των PCR προϊόντων.

H. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

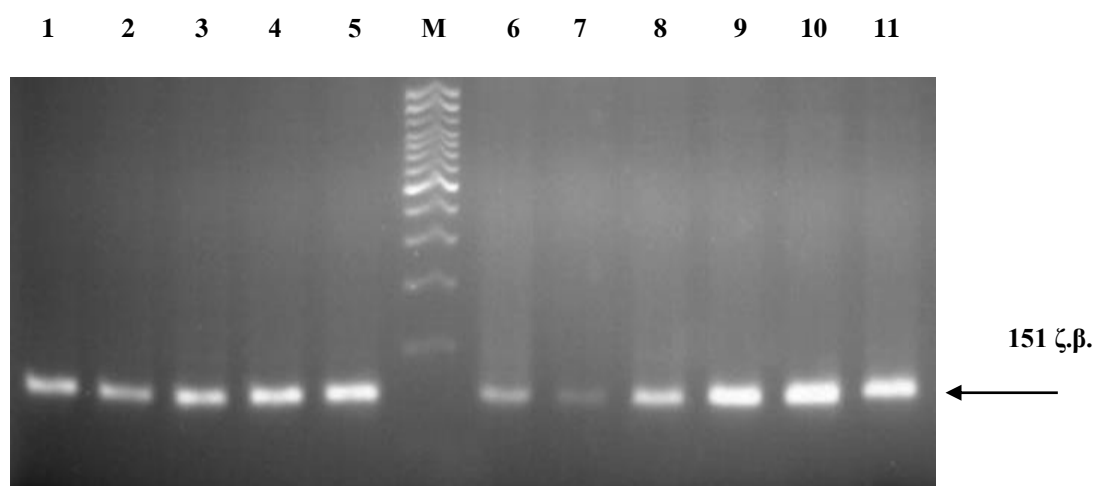
Τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 4%, στην οποία είναι δυνατή η διάκριση ακόμα και μικρών τμημάτων DNA, μεγέθους της τάξης των 50 ζευγών βάσεων. Ο τρόπος παρασκευής της πηκτής αγαρόζης έχει αναλυθεί παραπάνω.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

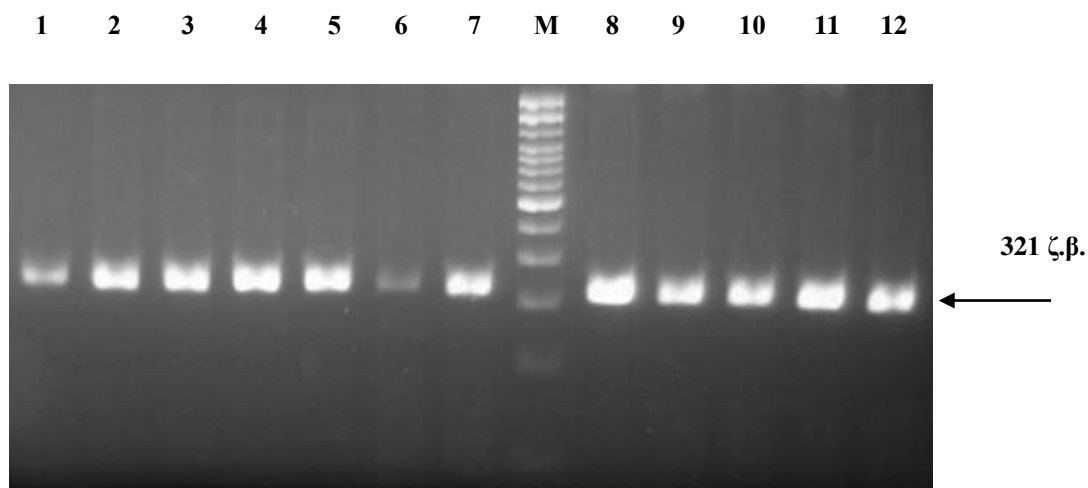
A. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων ελέγχθηκαν για την επιτυχή τους ενίσχυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3% σύστασης. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους για επιβεβαίωση της ορθότητας των μεγεθών τους. Στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων. Το προϊόν PCR για τον πολυμορφισμό A1166C στο γονίδιο του AT1R υποδοχέα έχει μέγεθος 151 ζεύγη βάσεων (*Εικόνα 13*), για τον πολυμορφισμό C3123A του γονιδίου AT2R το προϊόν PCR είναι μεγέθους 321 ζεύγη βάσεων (*Εικόνα 14*), για τον πολυμορφισμό C5312 στο γονίδιο της ρενίνης το προϊόν PCR έχει μέγεθος 270 ζεύγη βάσεων (*Εικόνα 15*) και για τους πολυμορφισμούς M235T και T174M στο γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου το προϊόν PCR έχει μέγεθος 303 ζεύγη βάσεων (*Εικόνα 16*).

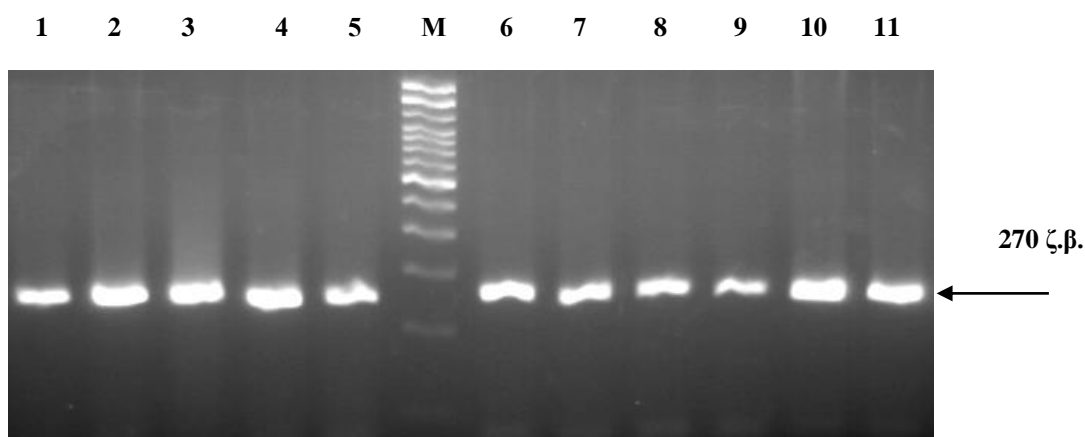
Χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας 100 bp της εταιρείας Invitrogen (Life Sciences).



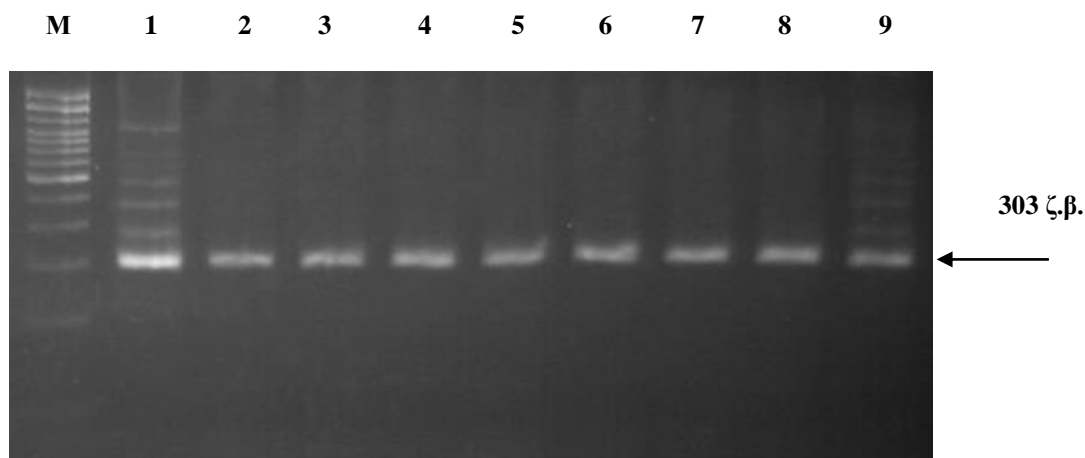
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αгарόζης PCR προϊόντων μεγέθους 151 ζ.β. του AT1R γονιδίου. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen), 1-11: δείγματα.



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αραρόζης PCR προϊόντων μεγέθους 321 ζ.β. του *AT2R* γονιδίου. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen), 1-12: δείγματα.



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αραρόζης PCR προϊόντων μεγέθους 270 ζ.β. του *REN* γονιδίου. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen), 1-11: δείγματα.



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αραρόζης PCR προϊόντων μεγέθους 303 ζ.β. του *AGT* γονιδίου. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen), 1-9: δείγματα.

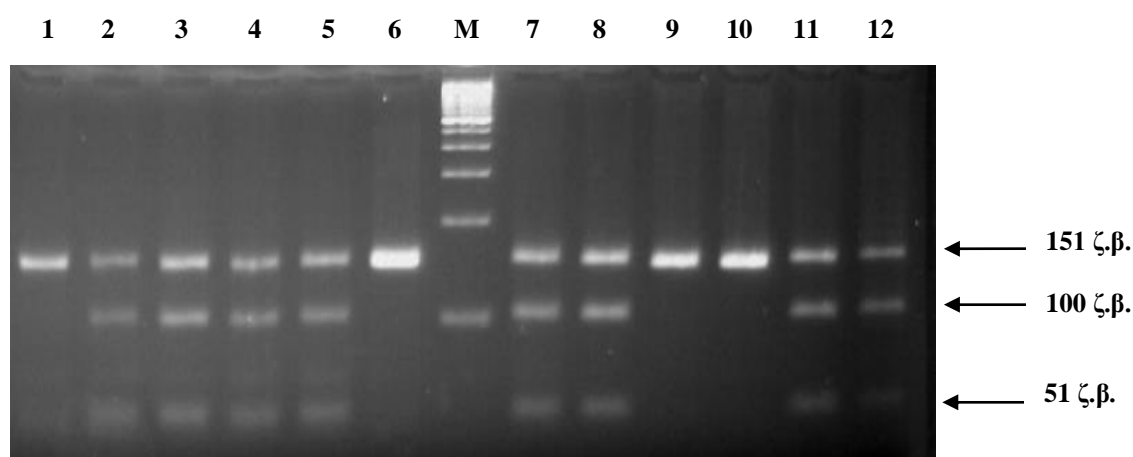
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΨΕΩΝ

Τα προϊόντα των πέψεων για τον κάθε πολυμορφισμό ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 4% σύστασης. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DdeI, για τον πολυμορφισμό A1166C αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

- 1 ζώνη των 151 ζ.β για τον γονότυπο AA
- 3 ζώνες 151 ζ.β, 100 ζ.β, 51 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο AC.

Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στο A αλληλόμορφο, ενώ οι επόμενες δύο στο μεταλλαγμένο C αλληλόμορφο, το οποίο αναγνωρίζεται και κόβεται από το συγκεκριμένο ένζυμο

- 2 ζώνες 100 ζ.β και 51 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο CC. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στην παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου C σε ομοζυγωτία (Εικόνα 17).

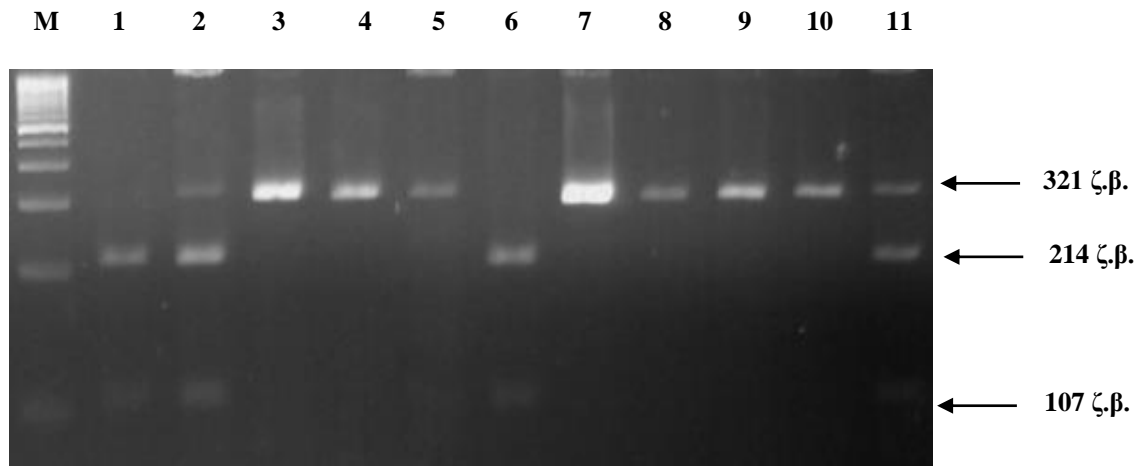


Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε 4% πηκτή αгарόζης των προϊόντων πέψης με το ένζυμο DdeI, για τον πολυμορφισμό A1166C. Γονότυπος AA: 1,6, 9, 10, γονότυπος AC: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο AluI για τον πολυμορφισμό C3123A του *AT2R* γονιδίου αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

- 1 ζώνη των 321 ζ.β. για τον γονότυπο CC
- 3 ζώνες 321 ζ.β, 214 ζ.β. και 107 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο CA. Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στο C αλληλόμορφο, ενώ οι επόμενες δύο στο πολυμορφικό αλληλόμορφο A, που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου,

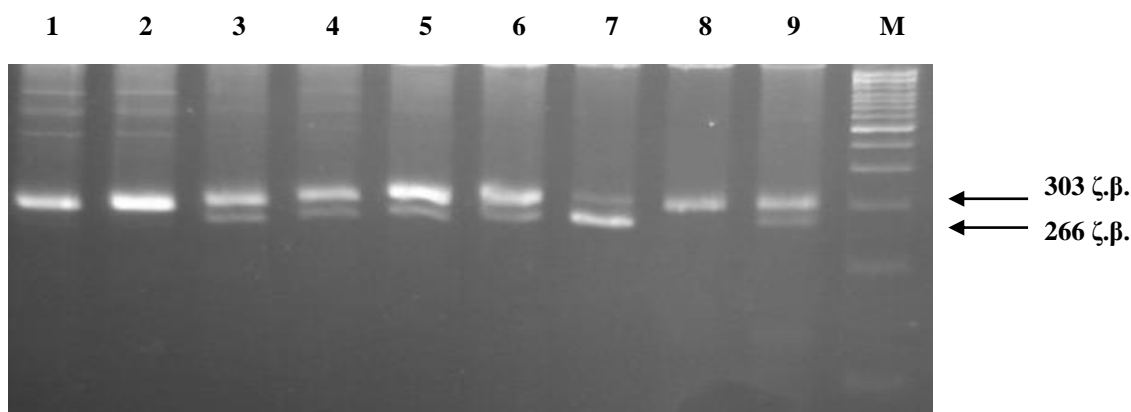
- 2 ζώνες 214 ζ.β και 107 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο AA. Οι ζώνες αντιστοιχούν στην παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου σε ομοζυγωτία (*Εικόνα 18*).



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε 4% πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης με το ένζυμο AluI για τον πολυμορφισμό C3123A. Γονότυπος CC: 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, γονότυπος AA: 1, 6, γονότυπος AC: 2, 11. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SfaNI για τον πολυμορφισμό M235T αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

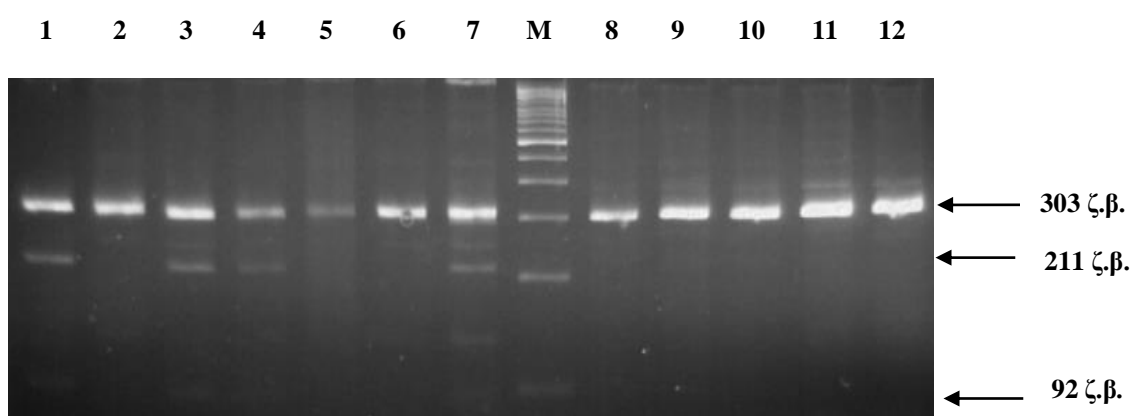
- 1 ζώνη των 303 ζ.β για τον γονότυπο TT
- 3 ζώνες 303 ζ.β, 266 ζ.β και 37 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο MT. Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στο πολυμορφικό αλληλόμορφο T, που δεν αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο, ενώ οι επόμενες δύο αντιστοιχούν στο αλληλόμορφο M που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου.
- 2 ζώνες 266 ζ.β και 37 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο MM. Οι ζώνες αντιστοιχούν στην παρουσία του αλληλομόρφου M σε ομοζυγωτία (*Εικόνα 19*).



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε 4% πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης με το ένζυμο SfaNI για τον πολυμορφισμό M235T. Γονότυπος TT: 1, 2, 8, γονότυπος MM:7, γονότυπος MT: 3, 4, 5, 6, 9: ετερόζυγοι MT. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NcoI για τον πολυμορφισμό T174M αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

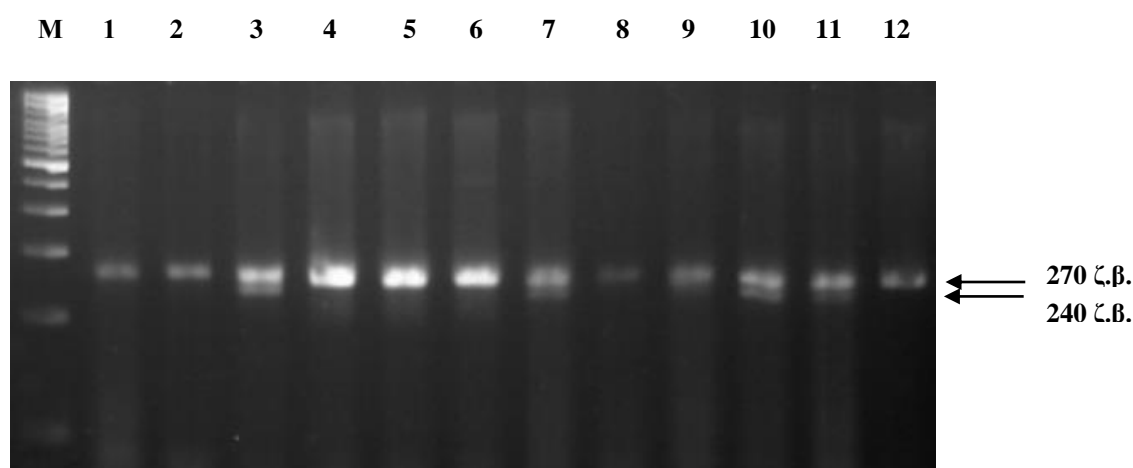
- 1 ζώνη των 303 ζ.β για το γονότυπο TT
- 3 ζώνες 303 ζ.β, 211 ζ.β και 92 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο TM. Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στο T αλληλόμορφο, ενώ οι επόμενες δύο στο πολυμορφικό αλληλόμορφο M, που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου,
- 2 ζώνες 211 ζ.β και 92 ζ.β η καθεμία για το γονότυπο MM. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στην παρουσία του πολυμορφικού αλληλομόρφου M (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε 4% πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης με το ένζυμο NcoI για τον πολυμορφισμό T174M. Γονότυπος TT: 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, γονότυπος TM: 1, 3, 4, 7. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DdeI για τον πολυμορφισμό C5312T αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

- 1 ζώνη των 270 ζ.β για το γονότυπο TT
- 3 ζώνες 270 ζ.β, 240 ζ.β και 30 ζ.β η καθεμία για τον γονότυπο CT. Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στο πολυμορφικό αλληλόμορφο T, που δεν αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο, ενώ οι επόμενες δύο ζώνες αναφέρονται στο αλληλόμορφο C, που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου,
- 2 ζώνες 240 ζ.β και 30 ζ.β η καθεμία για το γονότυπο CC. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στο αλληλόμορφο C σε ομοζυγωτία (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση σε 4% πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης με το ένζυμο DdeI για τον πολυμορφισμό C5312T. Γονότυπος TT: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 12, γονότυπος CT: 3, 7, 10, 11. M: 100 bp μάρτυρας (Invitrogen).

Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την παρουσία ορισμένων πολυμορφισμών που παρατηρούνται σε γονίδια του συστήματος RAAS. Συγκεκριμένα μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς rs5186 (A1166C) του *AT1R* γονιδίου, rs11091046 (C3123A) του *AT2R* γονιδίου, rs12750834 (C5312T) του *REN* γονιδίου, rs4762 (C620T ή T174M) και rs699 (T803C ή M235T) του *AGT* γονιδίου σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου. Εξετάσαμε την κατανομή τους στον Ελληνικό πληθυσμό και τον πιθανό τους ρόλο στον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Παράλληλα, μελετήσαμε την πιθανή τους συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της νόσου, όπως είναι το στάδιο και ο βαθμός κακοηθείας, ο αριθμός και η διάμετρος του

όγκου, η υποτροπή και ο αριθμός των χημειοθεραπειών που έλαβαν. Επιπρόσθετα μελετήσαμε εάν κάποιες συνήθειες, όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ συσχετίζονται με τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS έκδοση 22. Για την ανάλυση των παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 .

Στη μελέτη συμμετείχαν 54 ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, 50 άνδρες (92.6%) και 4 γυναίκες (7.4%) διάμεσης ηλικίας 70 ± 10 έτη. Συμπεριλάβαμε επίσης 44 υγιή άτομα, 25 άνδρες (56.8%) και 19 γυναίκες (43.2%) ηλικίας κάτω των 30 ετών, που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Στοιχεία για το στάδιο και τον βαθμό κακοηθείας της νόσου είχαμε για 52/54 ασθενείς (96.3%). Από αυτούς, 24/52 ασθενείς (46.1%) διαγνώστηκαν με στάδιο T_a, 19/52 ασθενείς (36.5%) διαγνώστηκαν με στάδιο T₁ και 9/52 ασθενείς (17.4%) διαγνώστηκαν με στάδιο T₂. 12/52 ασθενείς (23.0%) διαγνώστηκαν με βαθμό κακοηθείας 1, 20/52 ασθενείς (38.5%) διαγνώστηκαν με βαθμό κακοηθείας 2 και 20 ασθενείς (38.5%) διαγνώστηκαν με βαθμό κακοηθείας 3.

Η πλειοψηφία των ασθενών (47/54 ασθενείς, 87.0%) δεν είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη χημειοθεραπεία και 7/54 ασθενείς (13.0%) είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε χημειοθεραπεία. 40/54 ασθενείς (74.1%) είχαν πρωτοεμφανιζόμενη νόσο, ενώ 14/54 ασθενείς (25.9%) εμφάνισαν υποτροπή της νόσου. Σχετικά με τον αριθμό των όγκων συγκεντρώσαμε στοιχεία για 51/54 ασθενείς (94.4%). 36/51 ασθενείς (70.6%) είχαν μονήρεις όγκους και 15/51 ασθενείς (29.4%) είχαν περισσότερους από έναν όγκους. Αναφορικά με τη διάμετρο του όγκου συγκεντρώσαμε στοιχεία για 50/54 ασθενείς (92.6%). 22/50 ασθενείς (44.0%) είχαν όγκους διαμέτρου ≤ 2 εκ., ενώ 28/50 ασθενείς (56.0%) είχαν όγκους διαμέτρου > 2 εκ.

Για το κάπνισμα, στοιχεία είχαμε για 53/54 ασθενείς (98.1%). Από αυτούς, 8/53 ασθενείς (15.1%) ήταν μη καπνιστές, 29/53 ασθενείς (54.7%) ήταν πρώην καπνιστές και 16/53 ασθενείς (30.2%) ήταν ενεργοί καπνιστές. Τέλος, όσον αφορά στην κατανάλωση αλκοόλ, 12/54 ασθενείς (22.2%) δεν κατανάλωσαν ποτέ αλκοόλ, ενώ 42/54 ασθενείς (77.8%) δήλωσαν πως κατανάλωναν αλκοόλ.

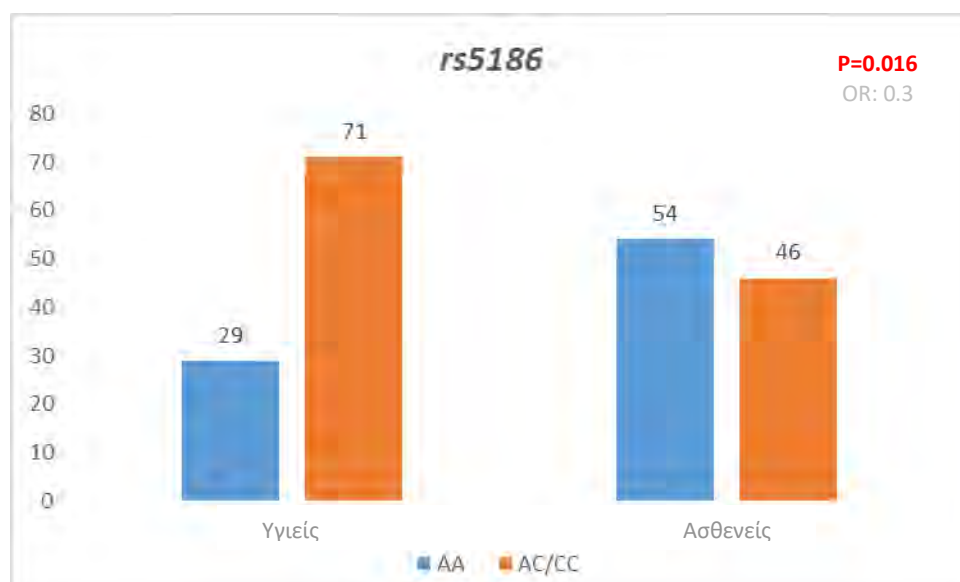
Ο πρώτος πολυμορφισμός που εξετάστηκε είναι ο rs5186 (A1166C) του *AT1R* γονιδίου (Πίνακας 12, Διάγραμμα 1). Στα υγιή άτομα, 13/44 άτομα (29.5%) έφεραν τον γονότυπο AA, 28/44 άτομα (63.6%) έφεραν τον γονότυπο AC και 3/44 άτομα (6.9%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (γονότυπος CC).

Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού C αλληλομόρφου ανιχνεύθηκε σε 31/44 άτομα (70.5%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία.

Στους ασθενείς, 29/54 άτομα (53.7%) έφεραν τον γονότυπο AA, 25/54 άτομα (46.3%) έφεραν τον γονότυπο AC και κανένα άτομο δεν έφερε σε ομοζυγωτία το πολυμορφικό αλληλόμορφο C. Συνολικά, στους ασθενείς το πολυμορφικό αλληλόμορφο C ανιχνεύθηκε σε 25/54 άτομα (46.3%) αποκλειστικά σε ετεροζυγωτία. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.016$), καθώς η παρουσία του C αλληλομόρφου είναι λιγότερο συχνή στους ασθενείς, σε σχέση με τα υγιή άτομα. Αυτό αναδεικνύει ότι η παρουσία του αλληλομόρφου C πιθανώς έχει έναν προστατευτικό ρόλο έναντι της ανάπτυξης του εν λόγω καρκίνου (OR= 0.3, 95% CI= 0.15- 0.8).

Πίνακας 12. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs5186 σε υγιείς και ασθενείς.

rs5186		AA	AC/CC
Υγιείς	Αριθμός ατόμων	13	31
	Ποσοστό (%)	29.5	70.5
Ασθενείς	Αριθμός ατόμων	29	25
	Ποσοστό (%)	53.7	46.3



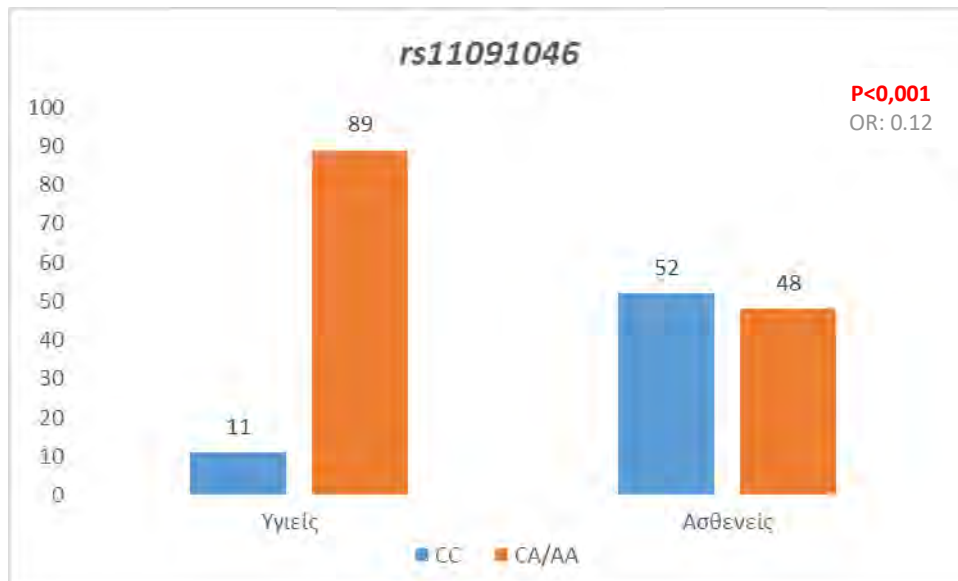
Διάγραμμα 1. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs5186 σε υγιείς και ασθενείς.

Ο δεύτερος πολυμορφισμός που εξετάστηκε είναι ο rs11091046 του *AT2R* γονιδίου (Πίνακας 13, Διάγραμμα 2). Στα υγιή άτομα, 5/44 άτομα (11.4%) έφεραν τον γονότυπο CC, 33/44 άτομα (7.05%) έφεραν τον γονότυπο C/A και 6/44 άτομα (13.6%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (γονότυπος AA). Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού A αλληλομόρφου ανιχνεύθηκε σε 39/44 άτομα (88.6%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία.

Στους ασθενείς, 28/54 άτομα (51.9%) έφεραν τον γονότυπο CC, 7/54 άτομα (13.0%) έφεραν τον γονότυπο CA και 19/54 άτομα (35.1%) έφεραν τον γονότυπο AA. Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού A αλληλομόρφου ανιχνεύθηκε σε 26/54 άτομα (48.1%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι στατιστικώς σημαντική ($p < 0.001$), καθώς η παρουσία του A πολυμορφικού αλληλομόρφου είναι λιγότερο συχνή στους ασθενείς, σε σχέση με τα υγιή άτομα. Αυτό αναδεικνύει ότι η παρουσία του αλληλομόρφου A πιθανώς έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της ανάπτυξης του εν λόγω καρκίνου (OR= 0.12, 95% CI= 0.04- 0.35).

Πίνακας 13. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs11091046 σε υγιείς και ασθενείς.

		CC	CA/AA
Υγιείς	Αριθμός ατόμων	5	39
	Ποσοστό (%)	11.4	88.6
Ασθενείς	Αριθμός ατόμων	28	26
	Ποσοστό (%)	51.9	48.1



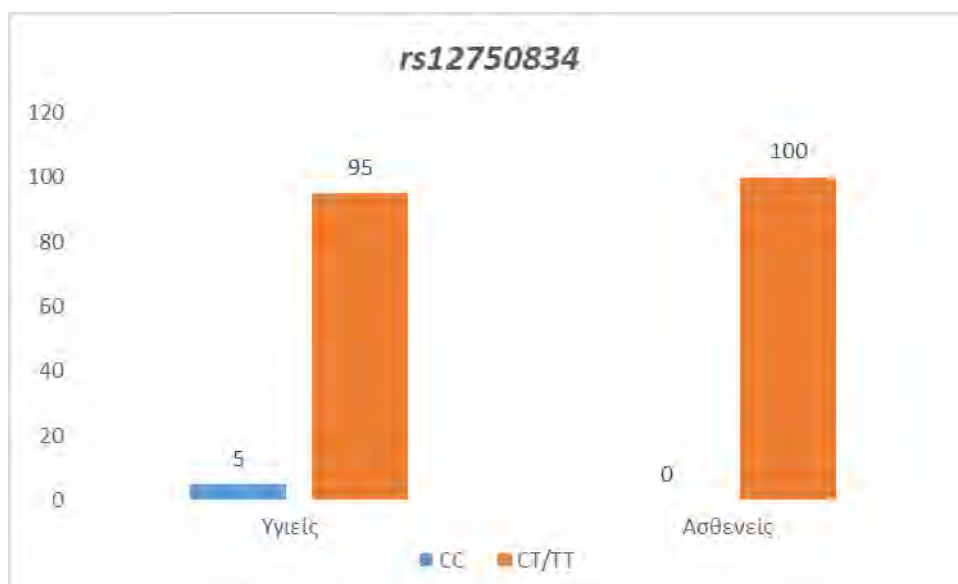
Διάγραμμα 2. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs11091046 σε υγιείς και ασθενείς.

Ο επόμενος πολυμορφισμός που εξετάσαμε είναι ο rs12750834 του *REN* γονιδίου (Πίνακας 14, Διάγραμμα 3). Στα υγιή άτομα, 2/44 άτομα (4.5%) έφεραν τον γονότυπο CC, 20/44 άτομα (45.5%) έφεραν τον γονότυπο CT και 22/44 άτομα (50.0%) έφεραν τον γονότυπο TT (πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία). Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού T αλληλομόρφου ανιχνεύθηκε σε 42/44 άτομα (95.5%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία.

Στους ασθενείς, κανένα άτομο (0/54 άτομα, 0.0%) δεν έφερε τον γονότυπο CC. 12/54 άτομα (22.2%) έφεραν τον γονότυπο CT και 42/54 άτομα (77.8%) έφεραν τον γονότυπο TT. Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού T ανιχνεύθηκε σε 54/54 άτομα (100.0%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία. Η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p > 0.05$), καθώς η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 14. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs12750834 σε υγιείς και ασθενείς.

		CC	CT/TT
Υγιείς	Αριθμός ατόμων	2	42
	Ποσοστό (%)	4.5	95.5
Ασθενείς	Αριθμός ατόμων	0	54
	Ποσοστό (%)	0	100



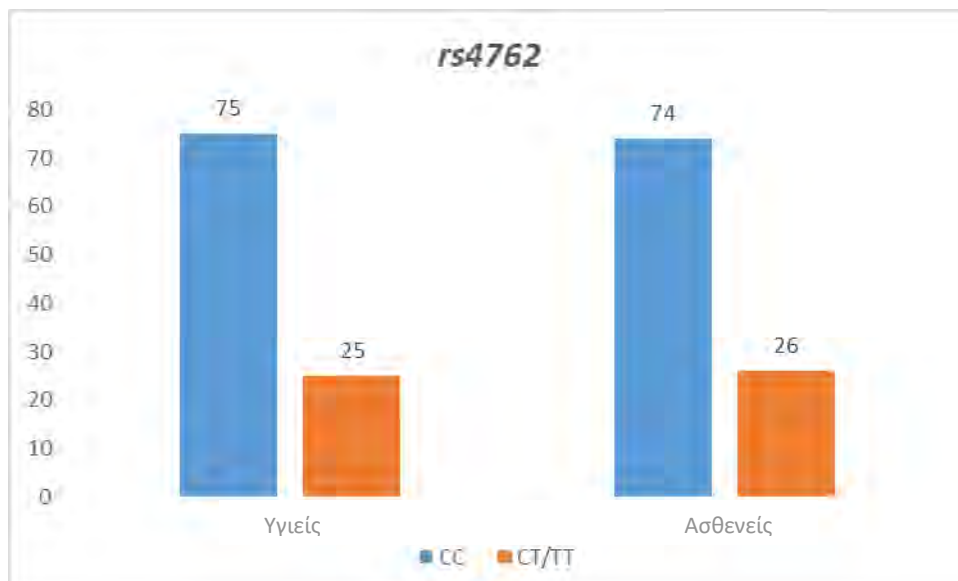
Διάγραμμα 3. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs12750834 σε υγιείς και ασθενείς.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον πολυμορφισμό rs4762 του *AGT* γονιδίου (Πίνακας 15, Διάγραμμα 4). Στα υγιή άτομα, 33/44 άτομα (75.0%) έφεραν τον γονότυπο CC, 11/44 άτομα (25.0%) έφεραν τον γονότυπο CT. Κανένα άτομο (0.0%) δεν έφερε το πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία. Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού T ανιχνεύθηκε σε 11/44 άτομα (25%) αποκλειστικά σε ετεροζυγωτία.

Στους ασθενείς, 40/54 άτομα (74.1%) έφεραν τον γονότυπο CC, 14/54 άτομα (25.9%) έφεραν τον γονότυπο CT. Κανένα άτομο και στους ασθενείς δεν έφερε το πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία. Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού T ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία σε 14/54 ασθενείς (25.9%). Η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$), καθώς η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 15. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs4762 σε υγιείς και ασθενείς.

		CC	CT/TT
Υγιείς	Αριθμός ατόμων	33	11
	Ποσοστό (%)	75	25
Ασθενείς	Αριθμός ατόμων	40	14
	Ποσοστό (%)	74.1	25.9



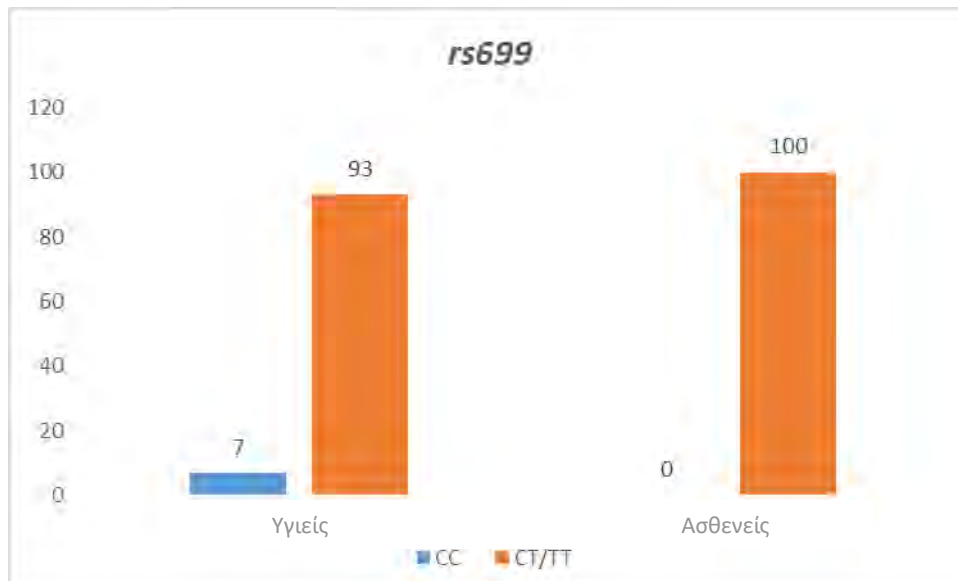
Διάγραμμα 4. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs4762 σε υγιείς και ασθενείς.

Τέλος, έγινε εξέταση του πολυμορφισμού rs699 του *AGT* γονιδίου (Πίνακας 16, Διάγραμμα 5). Στα υγιή άτομα, 3/44 άτομα (6.8%) έφεραν τον γονότυπο CC, 30/44 άτομα (68.2%) έφεραν τον γονότυπο CT και 11/44 άτομα (25.0%) έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (γονότυπος TT). Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού T αλληλομόρφου ανιχνεύθηκε σε 41/44 άτομα (93.2%) σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία.

Στους ασθενείς, κανείς δεν έφερε τον γονότυπο CC. Όλοι οι ασθενείς (54/54 άτομα, 100%) έφεραν σε ομοζυγωτία το πολυμορφικό αλληλόμορφο. Συνολικά, η παρουσία του πολυμορφικού T ανιχνεύθηκε σε 54/54 άτομα (100%) σε ομοζυγωτία. Η συσχέτιση που προέκυψε δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$), καθώς και πάλι η κατανομή των αλληλομόρφων είναι παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 16. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs699 σε υγιείς και ασθενείς.

		CC	CT/TT
Υγιείς	Αριθμός ατόμων	3	41
	Ποσοστό (%)	6.8	93.2
Ασθενείς	Αριθμός ατόμων	0	51
	Ποσοστό (%)	0	100



Διάγραμμα 5. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs699 σε υγιείς και ασθενείς.

Εκτός από τον πιθανό ρόλο των προαναφερόμενων πολυμορφισμών στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, εξετάσαμε και την πιθανή συσχέτισή τους με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που συλλέχθηκαν. Οι παράμετροι που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ήταν η διάμετρος του όγκου, η οποία συσχετίστηκε με την κατανομή των πολυμορφισμών rs11091046 του *AT2R* γονιδίου και rs4762 του *AGT* γονιδίου, καθώς και η κατανάλωση αλκοόλ που συσχετίστηκε με την κατανομή του πολυμορφισμού rs12750834 του *REN* γονιδίου.

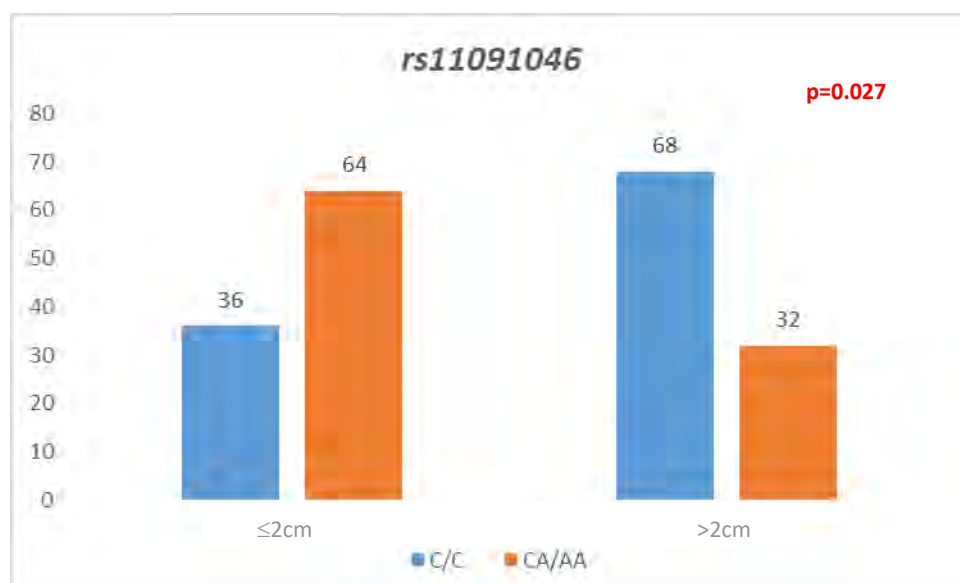
Όσον αφορά στη διάμετρο του όγκου, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη κατηγοριοποιήθηκαν εκείνοι με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και στη δεύτερη, εκείνοι με διάμετρο όγκου >2 εκ.

Για τον πολυμορφισμό rs11091046 του *AT2R* γονιδίου, 22/50 ασθενείς (44.0%) είχαν διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και 28/50 ασθενείς (56.0%) είχαν διάμετρο όγκου > 2 εκ. Από τους ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ., 8/22 ασθενείς (36.4%) έφεραν τον γονότυπο CC και 14/22 ασθενείς (63.6%), έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο A σε ετεροζυγωτία (CA) ή ομοζυγωτία (AA).

Από τους ασθενείς με διάμετρο όγκου > 2 εκ., 19/28 ασθενείς (67.9%) έφεραν τον γονότυπο CC και 9/28 ασθενείς (32.1%), έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο A σε ετεροζυγωτία (CA) ή ομοζυγωτία (AA). Η συσχέτιση που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.027$), καταδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του πολυμορφικού αλληλομόρφου A στον καθορισμό του μεγέθους του όγκου (≤ 2 εκ).

Πίνακας 17. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs11091046 σε ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και σε ασθενείς με διάμετρο όγκου > 2 εκ.

		CC	CA/AA
≤ 2 εκ.	Αριθμός ατόμων	8	14
	Ποσοστό (%)	36.4	63.6
> 2 εκ.	Αριθμός ατόμων	19	9
	Ποσοστό (%)	67.9	32.1



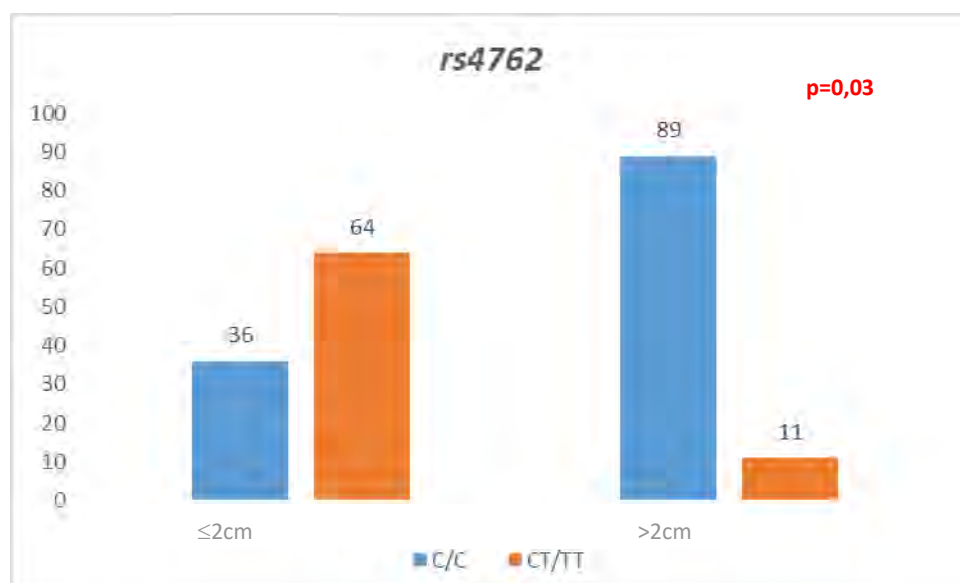
Διάγραμμα 6. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs11091046 σε ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και σε ασθενείς με διάμετρο όγκου > 2 εκ.

Για τον πολυμορφισμό rs4762 του AGT γονιδίου, 22/50 ασθενείς (44.0%) διαγνώστηκαν με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και 28/50 ασθενείς (56.0%) διαγνώστηκαν με διάμετρο όγκου > 2 εκ. Από τους ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ., 8/22 ασθενείς (36.4%) έφεραν τον γονότυπο CC και 14/22 ασθενείς (63.6%), έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ετεροζυγωτία (CT) ή ομοζυγωτία (TT).

Από τους ασθενείς με διάμετρο όγκου > 2 εκ., 25/28 ασθενείς (89.3%) έφεραν τον γονότυπο CC και 3/28 ασθενείς (10.7%), έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο T σε ετεροζυγωτία (CT) ή ομοζυγωτία (TT). Η συσχέτιση που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.03$), καταδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του πολυμορφικού αλληλομόρφου T στον καθορισμό του μεγέθους του όγκου (≤ 2 εκ).

Πίνακας 18. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs4762 σε ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και σε ασθενείς με διάμετρο όγκου >2 εκ.

		CC	CT/TT
≤ 2 εκ.	Αριθμός ατόμων	8	14
	Ποσοστό (%)	36.4	63.6
>2 εκ.	Αριθμός ατόμων	25	3
	Ποσοστό (%)	89.3	10.7



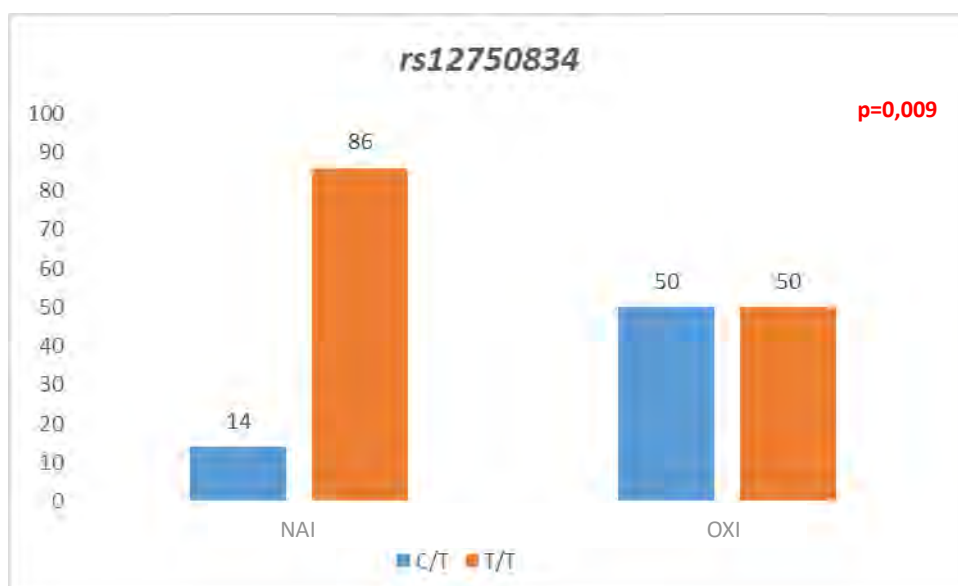
Διάγραμμα 7. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs4762 σε ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. και σε ασθενείς με διάμετρο όγκου > 2 εκ.

Τέλος, στην περίπτωση της κατανάλωσης αλκοόλ, οι ασθενείς χωρίστηκαν δύο ομάδες, εκείνους που δεν κατανάλωσαν ποτέ αλκοόλ (12/54 ασθενείς, 22.2%) και εκείνους που κάνουν κατανάλωση αλκοόλ (42/54 ασθενείς, 77.8%).

Για τον πολυμορφισμό rs12750834 του *REN* γονιδίου, στην ομάδα των ασθενών που δεν κατανάλωσαν αλκοόλ, 6/12 ασθενείς (50.0%) έφεραν τον γονότυπο CT και 6/12 ασθενείς (50%) έφεραν τον πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (γονότυπος TT). Στην ομάδα των ασθενών με κατανάλωση αλκοόλ, 6/42 ασθενείς (14.3%) έφεραν τον γονότυπο CT και 36/42 ασθενείς (85.7%) έφεραν τον γονότυπο TT (πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία). Η συσχέτιση που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.009$).

Πίνακας 19. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs12750834 σε ασθενείς με κατανάλωση και χωρίς κατανάλωση αλκοόλ.

		CT	TT
ΝΑΙ	Αριθμός ατόμων	6	36
	Ποσοστό (%)	14.3	85.7
ΟΧΙ	Αριθμός ατόμων	6	6
	Ποσοστό (%)	50.0	50.0



Διάγραμμα 8. Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs12750834 σε ασθενείς με κατανάλωση και χωρίς κατανάλωση αλκοόλ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης βρίσκεται στην ένατη θέση μεταξύ των συνηθέστερων τύπων καρκίνου και αποτελεί το δεύτερο συχνότερο νεόπλασμα του ουροποιητικού συστήματος^[1]. Ο εντοπισμών των όγκων σε πρώιμο στάδιο στα 2/3 των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι αποτέλεσμα της ευρείας χρήσης διαγνωστικών μεθόδων και ατομικού ελέγχου. Η συχνότητα του είναι μεγαλύτερη στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ παρουσιάζει διεθνώς ετήσια αύξηση.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης φαίνεται να σχετίζεται στενά με την ηλικία και το φύλο, καθώς προσβάλλει κυρίως άτομα που διανύουν την 6^η ή 7^η δεκαετία της ζωής τους. Εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες σε αναλογία περίπου 4:1.

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου εμφάνισης της νόσου, από επιδημιολογικής άποψης, είναι το κάπνισμα. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι κατά 3.5 φορές μεγαλύτερη στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές^[5]. Η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, η ακτινοβολία στην πύελο και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος με σημαντικότερη την σχιστοσωμίαση αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης^[4].

Αξιοσημείωτο ρόλο φαίνεται, επίσης, να παίζει ο τρόπος ζωής γενικότερα και κυρίως η διατροφή και το αλκοόλ, μεγάλες ποσότητες του οποίου αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου^[4]. Η κληρονομικότητα δε φαίνεται να παρεμβαίνει στον εν λόγω τύπο καρκίνου. Σχετίζεται κυρίως με σωματικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κύτταρα της κύστης κατά τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί ορισμένα περιστατικά οικογενούς εμφάνισης της νόσου. Από τα πιο χαρακτηριστικά γονίδια, μεταλλάξεις των οποίων σχετίζονται με τη νόσο, είναι τα *HRAS*, *EGFR*, *FGFR*, *PTEN*, *RB* και *TP53*^[21-38], ενώ σε σημαντικό βαθμό παρατηρούνται επίσης χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 4, 8, 9, 11, 17 και Y^[39-46]. Το γενετικό υπόβαθρο παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και την πορεία της νόσου και συμβάλει στην πολυπλοκότητα και την διαφοροποιημένη κλινική έκβαση αυτής.

Η μορφολογική και γενετική ετερογένεια του όγκου της ουροδόχου καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολη την εύρεση βιοδεικτών που θα συμβάλλουν στη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου. Αν και πρόκειται για νεόπλασμα που τα τελευταία χρόνια

εντοπίζεται ευκολότερα, ωστόσο σημαντικός αριθμός των ασθενών είναι σε προχωρημένο στάδιο κατά τη στιγμή της διάγνωσης και ενίοτε φέρουν και απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Το σύστημα Ρενίνη – Αγγειοτενσίνη - Αλδοστερόνη (Renin-Angiotensin-Aldosterone, RAAS) αποτελεί κύριο ρυθμιστή της αρτηριακής πίεσης. Εμπλέκεται στην παθογένεια της υπέρτασης, ενώ παράλληλα παίζει ρόλο και στη διατήρηση της ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών. Μετέχει σε πολλές φυσιολογικές και μη διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η αγγειογένεση, η απόπτωση, ο μεταβολισμός, αλλά και η φλεγμονή, η κυτταρική μετανάστευση και η μετάσταση^[52, 70]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το σύστημα RAAS παίζει σημαντικό ρόλο και στον καρκίνο μέσω της προώθησης των παραπάνω διαδικασιών.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη συχνότητα των πολυμορφισμών A1166C του γονιδίου *AT1R*, C3123A του γονιδίου *AT2R*, M235T και T174M του γονιδίου *AGT* και C5312T του γονιδίου *REN* του συστήματος RAAS, σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Εξετάσαμε την πιθανή τους συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Επιπλέον, εκτιμήσαμε την πιθανή συσχέτισή των εξεταζόμενων πολυμορφισμών με κύριες κλινικοϊστολογικές παραμέτρους των ασθενών, όπως είναι το στάδιο και ο βαθμός κακοήθειας, ο αριθμός και η διάμετρος του όγκου, η υποτροπή και ο αριθμός των χημειοθεραπειών στις οποίες υπεβλήθησαν. Παράλληλα αξιολογήσαμε συνήθειες, όπως, το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ.

Στα πλαίσια της μελέτης, λοιπόν, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα 54 ασθενών που προσήλθαν και χειρουργήθηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και συγκεκριμένα 50 ανδρών και 4 γυναικών με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 70 έτη. Παράλληλα, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα 44 υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA και από τις δύο ομάδες μελέτης μας (ασθενείς-υγιείς) και ακολούθησε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των γονιδιακών τμημάτων που εμπεριέχουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς. Ακολούθησε RFLP ανάλυση με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων που αναγνωρίζουν και κόβουν επιλεκτικά την αλληλουχία που φέρει το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Οι γονότυποι που προέκυψαν για τον κάθε πολυμορφισμό, συγκεντρώθηκαν, κωδικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά με το λογισμικό IBM SPSS v.22. Αρχικά, προσδιορίστηκαν οι 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 καρκίνου της ουροδόχου κύστης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χ^2 . Τα επίπεδα σημαντικότητας καθορίστηκαν ως $p < 0.05$. Επιπρόσθετα, 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 ή του τρόπου ζωής χρησιμοποιήθηκε και πάλι η μέθοδος χ^2 .

Μελετήσαμε 54 ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, 50 άνδρες (92.6%) και 4 γυναίκες (7.4%) ηλικίας 70 ± 10 ετών και 44 υγιή άτομα 25 άνδρες (56.8%) και 19 γυναίκες (43.2%) κάτω των 30 ετών. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας έδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs5186 (A1166C) του *AT1R* γονιδίου και συγκεκριμένα το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C φαίνεται να έχει μία προστατευτική επίδραση ως προς την εμφάνιση του εν λόγω καρκίνου, καθώς η συσχέτιση ήταν στατιστικώς σημαντική ($p = 0.016$) και OR= 0.3 (95% CI: 0.15–0.8). Αναλόγως, ο πολυμορφισμός rs11091046 (C3123A) του *AT2R* γονιδίου και συγκεκριμένα, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο A φαίνεται να έχει επίσης μία προστατευτική επίδραση στην εμφάνιση του εν λόγω καρκίνου, καθώς η συσχέτιση ήταν στατιστικώς σημαντική ($p < 0.001$) και OR= 0.12 (95% CI: 0.04–0.35). Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων *REN* και *AGT* και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση βασικών κλινικοϊστολογικών παραμέτρων με τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς, καθώς και η πιθανή συσχέτισή τους με το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας ανέδειξε μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs11091046 του *AT2R* γονιδίου και rs4762 του *AGT* γονιδίου και της διαμέτρου του όγκου ($p = 0.027$ και $p = 0.03$ αντίστοιχα), όπου τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα A και T αντιστοίχως φαίνεται να σχετίζονται με όγκους μικρότερης διαμέτρου. Οι συσχετίσεις αυτές παρέχουν μία ένδειξη για την πιθανή χρήση των πολυμορφισμών των συγκεκριμένων γονιδίων του

συστήματος RAAS στην κλινική πράξη, για την πρόγνωση της πορείας του ασθενούς, μιας και όγκοι διαμέτρου > 2 εκ. έχουν χειρότερη πρόγνωση και μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής.

Όσον αφορά στην κατανάλωση αλκοόλ, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας ανέδειξε επίσης, μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs12750834 του *REN* γονιδίου και της κατανάλωσης αλκοόλ ($p = 0.009$). Στους ασθενείς που καταναλώνουν αλκοόλ, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T εμφανίζεται κυρίως σε ομοζυγωτία, ενώ στους ασθενείς που δεν καταναλώνουν αλκοόλ, είναι εξίσου καταναεμημένο σε ομοζυγωτία και ετεροζυγωτία. Το αλκοόλ είναι γνωστό ότι αυξάνει το φορτίο των μεταλλάξεων στην αλληλουχία του DNA^[104]. Γι' αυτό άλλωστε σε άτομα που καταναλώνουν αλκοόλ εμφανίζεται κατά κύριο λόγο και στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο σε άτομα που αποφεύγουν αυτή τη συνήθεια. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά 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 συσχέτιση των συστατικών του με την εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Για τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς, , δεν υπάρχει ανάλογη εργασία στη ουροδόχο κύστη που να μελετά τον πιθανό τους ρόλο στην καρκινογένεση.

Παρόλα αυτά, προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση του AT2R υποδοχέα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση και προωθεί την απόπτωση προτείνοντας τον παράγοντα αυτό ως στόχο στην ανάπτυξη θεραπείας για τον εν λόγω καρκίνο^[102]. Κάτι τέτοιο συμφωνεί με το εύρημα μας για τον πολυμορφισμό rs11091046, όπου η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου A, το οποίο και αυξάνει την έκφραση του AT2R υποδοχέα, φαίνεται να δρα προστατευτικά έναντι του εν λόγω καρκίνου. Άλλωστε είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του συστήματος RAAS μέσω του υποδοχέα AT2R συνδέεται με την προαγωγή της απόπτωσης και τη μείωση της αγγειογένεσης^[52, 70].

Όσον αφορά, τον rs5186 πολυμορφισμό, σε μια μελέτη μετα-ανάλυσης έχει βρεθεί ότι η ομοζυγωτία CC πιθανώς να αποτελεί προστατευτικό παράγοντα έναντι της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στους Καυκάσιους^[76]. Το ίδιο έδειξε και έρευνα στο Μεξικό, τα αποτελέσματα της οποία φανέρωσαν μικρότερο ρίσκο για ανάπτυξη

καρκίνου του μαστού παρουσία του C αλληλομόρφου^[77]. Ακόμη, φάνηκε ότι η ομόζυγη κατάσταση AA είναι αυτή που αυξάνει τον κίνδυνο υπερπλασίας και ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, ενώ η παρουσία του C αλληλομόρφου οδηγεί σε μείωση των κινδύνων αυτών^[78]. Σε μετα-ανάλυση των Liu και των συνεργατών του φάνηκε ότι τα άτομα με γονότυπο CC έχουν γενικά σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, ειδικά ο πληθυσμός των Καυκάσιων^[81].

Η σηματοδοτική οδός AngII/AT1R έχει συνδεθεί με πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση, φλεγμονή και γενικά ανάπτυξη καρκίνου. Η παρουσία του αλληλομόρφου C συνδέεται με υπερέκφραση του AT1R υποδοχέα, χωρίς ωστόσο αυτό να μεταφράζεται σε μεγαλύτερη δραστικότητα του υποδοχέα. Στη συγκεκριμένη θέση που εμφανίζεται ο πολυμορφισμός συμβαίνουν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του mRNA του *AT1R* γονιδίου, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η δομή του υποδοχέα και επομένως, η σύνδεση του με τις G-πρωτεΐνες και την ενεργοποίηση μεταγενέστερων σηματοδοτικών μονοπατιών^[74]. Αυτό συνεπάγεται την τροποποίηση της σηματοδοτικής οδού AngII/AT1R και της έκφρασης αντι-αποπτωτικών παραγόντων.

Το συγκεκριμένο πεδίο έρευνας αποτελεί γόνιμο έδαφος για την περαιτέρω διερεύνηση πολυμορφισμών των γονιδίων του συστήματος RAAS συναρτήσει του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, σε μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν στατιστικώς ασφαλή συμπεράσματα. Δεδομένης της φύσης του εν λόγω καρκίνου και της έντονης επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων, η επίδραση των πολυμορφισμών αυτών στον κίνδυνο εμφάνισης και στην πορεία της νόσου, θα μπορούσαν να μελετηθούν εκτενέστερα. Εάν ληφθεί υπόψη η ετερογένεια της νόσου και η έλλειψη προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών, τα ευρήματά μας μπορούν να θεωρηθούν ως μία προσθήκη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία στο πεδίο αναζήτησης επικουρικών βιοδεικτών για την πρόληψη και την διάγνωση της πορεία της νόσου. Ασφαλώς, η μελέτη πολυμορφισμών στον πληθυσμό προϋποθέτει τη συλλογή και επεξεργασία μεγάλου αριθμού ασθενών και υγιών ατόμων για να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατανομή και την γενετική ποικιλομορφία των πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό.

ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ

ACE: Angiotensin-Converting Enzyme
ACE I/D: ACE Insertion/Deletion
ACEIs: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors
Akt: επίσης γνωστή ως PKB (Protein Kinase b)
ARBs: Angiotensin Receptor Blockers
AT1R: Angiotensin II type 1 receptor
AT2R: Angiotensin II type 2 receptor
BCL: B-Cell Lymphoma
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EMT: Epithelial-Mesenchymal transition
ERK: Extracellular signal- Regulated Kinase
FGF: Fibroblast Growth Factor
FGFR: Fibroblast Growth Receptor
GC: Gemcitabine plus Cisplatin
HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HRAS: Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog
IGF: Insulin-like Growth Factor
IL-1b: InterLeukin-1 beta
IL-8: InterLeukin-8
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK: MAPK/ERK kinases
MVCA: Methotrexate plus Vinblastine plus Doxorubicin plus Cisplatin
NF- κ B: Nuclear Factor- κ B
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor type 1
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog
RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosterone
Rb: Retinoblastoma protein
ROS: Ractive Oxygen species
STAT: Signal Transducer and Activation of Transcription
SCC: Squamous Cell Carcinoma
TCC: Transitional Cell Carcinoma
TGF- β : Transforming Growth Factor-beta
TNF- α : Tumour Necrosis Factor-alpha
TP40: Transforming growth factor alpha-Pseudomonas exotoxin-40
TURB: Trans Urethral Resection of Bladder cancer
VEGF: Vacular Endothelial Growth Factor

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wong, M. C. S., Fung, F. D. H., Leung, C., Cheung, W. W. L., Goggins, W. B., & Ng, C. F. (2018). The global epidemiology of bladder cancer: A joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Scientific Reports*, 8(1).
2. Richters, A., Aben, K. K. H., & Kiemeny, L. A. L. M. (2020). The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World Journal of Urology*, 38(8), 1895-1904.
3. Shariat, S. F., Sfakianos, J. P., Droller, M. J., Karakiewicz, P. I., Meryn, S., & Bochner, B. H. (2010). The effect of age and gender on bladder cancer: A critical review of the literature. *BJU International*, 105(3), 300-308.
4. Cumberbatch, M. G. K., Jubber, I., Black, P. C., Esperto, F., Figueroa, J. D., Kamat, A. M., Catto, J. W. F. (2018). Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *European Urology*, 74(6), 784-795.
5. Cumberbatch, M. G., Rota, M., Catto, J. W. F., & La Vecchia, C. (2016). The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology*, 70(3), 458-466.
6. Stern, M. C., Lin, J., Figueroa, J. D., Kelsey, K. T., Kiltie, A. E., Yuan, J. M., Garcia-Closas, M. (2009). Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: Findings from the International Consortium of Bladder Cancer. *Cancer Research*, 69(17), 6857-6864.
7. Gabriel, U., Li, L., Bolenz, C., Steidler, A., Kränzlin, B., Saile, M., Michel, M. S. (2012). New insights into the influence of cigarette smoking on urothelial carcinogenesis: Smoking-induced gene expression in tumor-free urothelium might discriminate muscle-invasive from nonmuscle-invasive urothelial bladder cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 51(11), 907-915.
8. Hinotsu, S., Akaza, H., Miki, T., Fujimoto, H., Shinohara, N., Kikuchi, E., Okuyama, A. (2009). Bladder cancer develops 6 years earlier in current smokers: Analysis of bladder cancer registry data collected by the cancer registration committee of the Japanese Urological Association. *International Journal of Urology*, 16(1), 64-69.
9. Polesel, J., Bosetti, C., di Maso, M., Montella, M., Libra, M., Garboglio, A., Serraino, D. (2014). Duration and intensity of tobacco smoking and the risk of papillary and non-papillary transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Causes and Control*, 25(9), 1151-1158.
10. Cumberbatch, M. G. K., Cox, A., Teare, D., & Catto, J. W. F. (2015). Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer. *JAMA Oncology*, 1(9), 1282-1290.
11. Westhoff, E., Maria De Oliveira-Neumayer, J., Aben, K. K., Vrieling, A., & Kiemeny, L. A. (2016). Low awareness of risk factors among bladder cancer survivors: New evidence and a literature overview. *European Journal of Cancer*, 60, 136-145.
12. Zaitzu, M., Nakamura, F., Toyokawa, S., Tonooka, A., Takeuchi, T., Homma, Y., & Kobayashi, Y. (2016). Risk of Alcohol Consumption in Bladder Cancer: Case-Control Study from a Nationwide Inpatient Database in Japan. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239(1), 9-15.

13. Antoni, S., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Znaor, A., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology*, 71(1), 96-108.
14. Liao, Y., Huang, J. L., Qiu, M. X., & Ma, Z. W. (2014). Impact of serum vitamin D level on risk of bladder cancer: a systemic review and meta-analysis. *Tumor Biology*, 36(3), 1567–1572.
15. Liu, H., Wang, X.-C., Hu, G.-H., Guo, Z.-F., Lai, P., Xu, L., Xu, Y.-F. (2015). Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 24(6), 508–516.
16. Kurahashi, N., Inoue, M., Iwasaki, M., Sasazuki, S., & Tsugane, S. (2009). Coffee, green tea, and caffeine consumption and subsequent risk of bladder cancer in relation to smoking status: a prospective study in Japan. *Cancer Science*, 100(2), 284–291.
17. Wallis, C. J. D., Mahar, A. L., Choo, R., Herschorn, S., Kodama, R. T., Shah, P. S., Nam, R. K. (2016). Second malignancies after radiotherapy for prostate cancer: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Online)*, 1-11.
18. Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., Kadhim, H. S., & Abubakar, F. (2009). Tumor markers of bladder cancer: The schistosomal bladder tumors versus non-schistosomal bladder tumors. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28(1), 27.
19. Abol-Enein, H. (2008). Infection: Is it a cause of bladder cancer?. *Scand J Urol Nephrol*, 42, 79-84.
20. Mueller, C. M., Caporaso, N., & Greene, M. H. (2008). Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 26(5), 451-464.
21. Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., & Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, 300(5888), 149–152.
22. Czerniak, B., Cohen, G. L., Etkind, P., Deitch, D., Simmons, H., Herz, F., & Koss, L. G. (1992). Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. *Human Pathology*, 23(11), 1199–1204.
23. Kompier, L. C., Lurkin, I., van der Aa, M. N. M., van Rhijn, B. W. G., van der Kwast, T. H., & Zwarthoff, E. C. (2010). FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS AND PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS ONE*, 5(11), 1-13.
24. Jebar, A. H., Hurst, C. D., Tomlinson, D. C., Johnston, C., Taylor, C. F., & Knowles, M. A. (2005). FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 24(33), 5218–5225.
25. Billerey, C., Chopin, D., Aubriot-Lorton, M. H., Ricol, D., De Medina, S. G. D., Van Rhijn, B., Radvanyi, F. (2001). Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *American Journal of Pathology*, 158(6), 1955–1959.
26. Lamy, A., Gobet, F., Laurent, M., Blanchard, F., Varin, C., Moulin, C., Pfister, C. (2006). Molecular Profiling of Bladder Tumors Based on the Detection of FGFR3 and TP53 Mutations. *Journal of Urology*, 176(6), 2686–2689.
27. Lindgren, D., Liedberg, F., Andersson, A., Chebil, G., Gudjonsson, S., Borg, Å., Höglund, M. (2006). Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene*, 25(18), 2685–2696.

28. Colquhoun, A. J., & Mellon, J. K. (2002). Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 78(924), 584-589.
29. Wu, X. R. (2005, September). Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 713-725.
30. Cordon-Cardo, C., Dalbagni, G., Saez, G. T., Oliva, M. R., Zhang, Z. -F, Rosai, J., Pellicer, A. (1994). p53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns. *International Journal of Cancer*, 56(3), 347-353.
31. Spruck, C. H., Ohneseit, P. F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C., Jones, P. A. (1994). Two Molecular Pathways to Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Research*, 54(3), 784-788.
32. Hartmann, A., Schlake, G., Zaak, D., Hungerhuber, E., Hofstetter, A., Hofstaedter, F., & Knuechel, R. (2002). Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Research*, 62(3), 809-818.
33. Stein, J. P., Ginsberg, D. A., Grossfeld, G. D., Chatterjee, S. J., Esrig, D., Dickinson, M. G., Cote, R. J. (1998). Effect of p21(WAF1/CIP1) expression on tumor progression in bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(14), 1072-1079.
34. Lu, M.-L., Wikman, F., Orntoft, T. F., Charytonowicz, E., Rabbani, F., Zhang, Z., Cordon-Cardo, C. (2002). Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(1), 171-179.
35. Puzio-Kuter, A. M., Castillo-Martin, M., Kinkade, C. W., Wang, X., Shen, T. H., Matos, T., Abate-Shen, C. (2009). Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes and Development*, 23(6), 675-680.
36. Tsuruta, H., Kishimoto, H., Sasaki, T., Horie, Y., Natsui, M., Shibata, Y., Suzuki, A. (2006). Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer Research*, 66(17), 8389-8396.
37. Cairns, P., Proctor, A. J., & Knowles, M. A. (1991). Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, 6(12), 2305-2309.
38. Barton Grossman, H., Liebert, M., Antelo, M., N Dinney, C. P., Hu, S.-X., Lynn Palmer, J., Texas D Anderson, of M. (1998). p53 and RB Expression Predict Progression in T1 Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*, 4, 829-834.
39. Tsai, Y. C., Nichols, P. W., Hiti, A. L., Williams, Z., Skinner, D. G., & Jones, P. A. (1990). Allelic Losses of Chromosomes 9, 11, and 17 in Human Bladder Cancer. *Cancer Research*, 50(1).
40. Knowles, M. A., Elder, P. A., Williamson, M., Cairns, J. P., Shaw, M. E., & Law, M. G. (1994). Allelotype of Human Bladder Cancer. *Cancer Research*, 54(2).
41. Cairns, P., Shaw, M. E., Knowles, M. A., (1993). Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene*, 8 (4), 1083-1085.
42. Knowles, M. A., Shaw, M. E., Proctor, A. J., (1993). Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene*, 8 (5), 1357-1364.
43. Proctor, A. J., Coombs, L. M., Cairns, J. P., & Knowles, M. A. (1991). Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. *Oncogene*, 6(5), 789-795.

44. Sauter, G., Moch, H., Wagner, U., Novotna, H., Gasser, T. C., Mattarelli, G., Waldman, F. M. (1995). Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 82(2), 163–169.
45. United Kingdom Cancer Cytogenetics Group. (1992). Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 5(1), 83–88.
46. Powell, I., Tyrkus, M., & Kleer, E. (1990). Apparent correlation of sex chromosome loss and disease course in urothelial cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 50(1), 97–101.
47. Mostofi, F. K., Sobin, L. H., Torloni, H., World Health Organization. (1973). Histological Typing of Urinary Bladder Tumours
48. Bostwick, D. G. (1992). Natural history of early bladder cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 50(S16I), 31–38.
49. Crowley, S. D., & Coffman, T. M. (2012). Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Experimental Cell Research*, 318 (9), 1049-1056.
50. Dolley-Hitze, T., Jouan, F., Martin, B., Mottier, S., Edeline, J., Moranne, O., Vigneau, C. (2010). Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 103(11), 1698–1705.
51. Polska, E., Rebas, E., Lewandowska, U., Lachowicz-Ochędalska, A., Domińska, K., & Kaszewska, D. (2011). *Angiotensin II as a factor modulating protein tyrosine kinase activity in two breast cancer lines-MCF-7 and MDA-MB-231. Polish Journal of Endocrinology Tom*, 62.
52. Ager, E. I., Neo, J., & Christophi, C. (2008). The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*, 29(9), 1675-1684.
53. Greco, S., Muscella, A., Elia, M. G., Salvatore, P., Storelli, C., Mazzotta, A., Marsigliante, S. (2003). Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 196(2), 370–377.
54. Zhao, Y., Chen, X., Cai, L. I., Yang, Y., Sui, G., & Fu, S. (2010). Angiotensin II/Angiotensin II type I receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-kinase/Akt pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 225(1), 168–173.
55. Uemura, H., Ishiguro, H., Nakaigawa, N., Nagashima, Y., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Kubota, Y. (2003). Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: A possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(11), 1139–1147.
56. Peng, M. Y., Wang, L. L., Liang, T., Zhao, X. L., Wang, G. P., & Chen, F. P. (2010). Expression of angiotensin-II type 1 receptor at1 mRNA in myeloid leukemia. *Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, 18(6), 1418–1421.
57. Shirotake, S., Miyajima, A., Kosaka, T., Tanaka, N., Maeda, T., Kikuchi, E., & Oya, M. (2011). Angiotensin II type 1 receptor expression and microvessel density in human bladder cancer. *Urology*, 77(4), 1019-1025.
58. Gallagher, P. E., & Tallant, E. A. (2004). Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*, 25(11), 2045–2052.
59. Zhou, L., Zhang, R., Yao, W., Wang, J., Qian, A., Qiao, M., Yuan, Y. (2009). Decreased expression of angiotensin-converting enzyme 2 in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with tumor progression. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 217(2), 123–131.

60. Zhao, Y., Chen, X., Cai, L., Yang, Y., Sui, G., & Wu, J. (2008). Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in human breast cancer cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(4), 304–310.
61. Li, H., Qi, Y., Li, C., Braseth, L. N., Gao, Y., Shabashvili, A. E., Summers, C. (2009). Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(12), 3255–3265.
62. Ichiki, T. (2004). Role of Renin Angiotensin System in Angiogenesis: It Is Still Elusive. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(4), 622–624.
63. Sasaki, K., Murohara, T., Ikeda, H., Sugaya, T., Shimada, T., Shintani, S., & Imaizumi, T. (2002). Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 109(5), 603–611.
64. Egami, K., Murohara, T., Shimada, T., Sasaki, K. I., Shintani, S., Sugaya, T., Imaizumi, T. (2003). Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *Journal of Clinical Investigation*, 112(1), 67–75.
65. Doi, C., Egashira, N., Kawabata, A., Maurya, D. K., Ohta, N., Uppalapati, D., Tamura, M. (2010). Angiotensin II type 2 receptor signaling significantly attenuates growth of murine pancreatic carcinoma grafts in syngeneic mice. *BMC Cancer*, 10.
66. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
67. Putnam, K., Shoemaker, R., Yiannikouris, F., & Cassis, L. A. (2012). The renin-angiotensin system: A target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(6), 1219–1230.
68. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Yin, Q. Q., Fujio, Y., Walsh, K., & Griending, K. K. (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22699–22704.
69. Uemura, H., Ishiguro, H., Ishiguro, Y., Hoshino, K., Takahashi, S., & Kubota, Y. (2008). Angiotensin II induces oxidative stress in prostate cancer. *Molecular Cancer Research*, 6(2), 250–258.
70. Smith, G. R., & Missailidis, S. (2004). Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *Journal of Inflammation*, 1(3).
71. Röcken, C., Lendeckel, U., Dierkes, J., Westphal, S., Carl-McGrath, S., Peters, B., Ebert, M. P. A. (2005). The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I - Converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clinical Cancer Research*, 11(7), 2526–2530.
72. Röcken, C., Röhl, F. W., Diebler, E., Lendeckel, U., Pross, M., Carl-McGrath, S., & Ebert, M. P. A. (2007). The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(6), 1206–1212.
73. Suganuma, T., Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, H., Nagasaka, T., Mizutani, S., & Kikkawa, F. (2005). Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockadetherapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clinical Cancer Research*, 11(7), 2686–2694.
74. Thekkumkara, T. J., & Linas, S. L. (2003). Evidence for involvement of 3'-untranslated region in determining angiotensin II receptor coupling specificity to G-protein. *Biochemical Journal*, 370(2), 631–639.

75. Sethupathy, P., Borel, C., Gagnebin, M., Grant, G. R., Deutsch, S., Elton, T. S., Antonarakis, S. E. (2007). Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: A mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, 81(2), 405–413.
76. Xi, B., Zeng, T., Liu, L., Liang, Y., Liu, W., Hu, Y., & Li, J. (2011). Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system genes and breast cancer risk: A meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(2), 561–568.
77. Mendizábal-Ruiz, A. P., Morales, J., Castro Martínez, X., Gutierrez Rubio, S. A., Valdez, L., Vázquez-Camacho, J. G., Moran Moguel, M. C. (2011). RAS polymorphisms in cancerous and benign breast tissue. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 12(2), 85–92.
78. Sierra Díaz, E., Sánchez Corona, J., Rosales Gómez, R. C., Gutierrez Rubio, S. A., Vázquez Camacho, J. G., Solano Moreno, H., & Morán Moguel, M. C. (2009). Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion and angiotensin type 1 receptor A1166C polymorphisms as genetic risk factors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 10(4), 241–246.
79. Deckers, I. A., Van Den Brandt, P. A., Van Engeland, M., Van Schooten, F. J., Godschalk, R. W., Keszei, A. P., & Schouten, L. J. (2015). Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: Interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid. *International Journal of Cancer*, 136(5), 1104–1116.
80. Pringle, K. G., Delforce, S. J., Wang, Y., Ashton, K. A., Proietto, A., Otton, G., Lumbers, E. R. (2016). Renin–angiotensin system gene polymorphisms and endometrial cancer. *Endocrine Connections*, 5(3), 128–135.
81. Liu, Z., Weng, M., Dai, F., Zhang, Y., Wu S., (2016). The relationship between angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 9(6), 9134-9142.
82. Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y. V., Lifton, R. P., Williams, C. S., Charru, A., Corvol, P. (1992). Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell*, 71(1), 169–180.
83. Ladd, A. M. G. Z., Vázquez, A. A., Siemes, C., Yazdanpanah, M., Coebergh, J. W., Hofman, A., Van Duijn, C. M. (2007). Differential roles of Angiotensinogen and Angiotensin Receptor type 1 polymorphisms in breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 101(3), 299–304.
84. Andreotti, G., Boffetta, P., Rosenberg, P. S., Berndt, S. I., Karami, S., Menashe, I., Moore, L. E. (2010). Variants in blood pressure genes and the risk of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 31(4), 614–620.
85. Pringle, K. G., Delforce, S. J., Wang, Y., Ashton, K. A., Proietto, A., Otton, G., Lumbers, E. R. (2016). Renin–angiotensin system gene polymorphisms and endometrial cancer. *Endocrine Connections*, 5(3), 128–135.
86. Shibata, T., Tahara, T., Arisawa, T., & Hirata, I. (2011). Polymorphism of the salt sensitivity gene angiotensinogen and gastric cancer risk. *Molecular Medicine Reports*, 4(4), 723–726.
87. Cheng, Z., & Liu, Z. (2019). Renin–angiotensin system gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 20(4).

88. Lin, J., Chen, J., & Liu, C. (2015). AGT M235T variant is not associated with risk of cancer. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(2), 448–452.
89. Fishchuk, L. E., & Gorovenko, N. G. (2013). Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in breast cancer patients. *Experimental Oncology*, 35(2), 101-104.
90. Wojciechowska-Durczynska, K., Pacholczyk, M., Zygmunt, A., Krawczyk-Rusiecka, K., Ferenc, T., & Lewinski, A. (2018). Angiotensinogen gene T174M polymorphism is related to Hashimoto's thyroiditis. *Neuroendocrinology Letters*, 39(8), 579–585.
91. Fuchs, S., Philippe, J., Germain, S., Mathieu, F., Jeunemaitre, X., Corvol, P., & Pinet, F. (2002). Functionality of two new polymorphisms in the human renin gene enhancer region. *Journal of Hypertension*, 20(12), 2391–2398.
92. Daimon, M., Konta, T., Oizumi, T., Kameda, W., Susa, S., Terui, K., Kato, T. (2015). Lower aldosterone-renin ratio is a risk factor for total and cancer death in Japanese individuals: The Takahata study. *Clinical Endocrinology*, 82(4), 489–496.
93. Nguyen, G., Burckle, C., & Sraer, J.-D. (2003). The renin receptor: the facts, the promise and the hope. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 12(1), 51–55.
94. Huang, Y., Noble, N. A., Zhang, J., Xu, C., & Border, W. A. (2007). Renin-stimulated TGF- β 1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney International*, 72(1), 45–52.
95. Li, Y., Zhu, M., Hu, R., & Yan, W. (2015). The effects of gene polymorphisms in angiotensin II receptors on pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Hypertension in Pregnancy*, 34(2), 241–260.
96. Jin, J. J., Nakura, J., Wu, Z., Yamamoto, M., Abe, M., Chen, Y., Miki, T. (2003). Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension. *Hypertension Research*, 26(7), 547–552.
97. Warnecke, C., Mugrauer, P., Sürder, D., Erdmann, J., Schubert, C., & Regitz-Zagrosek, V. (2005). Intronic ANG II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 289(6), 1729-1735.
98. Sun, H., Li, T., Zhuang, R., Cai, W., & Zheng, Y. (2017). Do renin-angiotensin system inhibitors influence the recurrence, metastasis, and survival in cancer patients? Evidence from a meta-analysis including 55 studies. *Medicine (United States)*, 96(13).
99. Pinter, M., & Jain, R. K. (2017). Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy. *Science Translational Medicine*, 9(410), 9-11.
100. Kosugi, M., Miyajima, A., Kikuchi, E., Horiguchi, Y., & Murai, M. (2006). Angiotensin II type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(9), 2888–2893.
101. Kosugi, M., Miyajima, A., Kikuchi, E., Kosaka, T., Horiguchi, Y., & Murai, M. (2007). Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on tumor growth and angiogenesis in a xenograft model of human bladder cancer. *Human Cell*, 20(1), 1–9.

102. Yuge, K., Miyajima, A., Tanaka, N., Shirotake, S., Kosaka, T., Kikuchi, E., & Oya, M. (2012). Prognostic value of renin-angiotensin system blockade in non-muscle-invasive bladder cancer. *Annals of Surgical Oncology*, *19*(12), 3987–3993.
103. Pei, N., Mao, Y., Wan, P., Chen, X., Li, A., Chen, H., Li, H. (2017). Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *36*(1), 1–12.
104. Voordeckers, K., Colding, C., Grasso, L., Pardo, B., Hoes, L., Kominek, J., Verstrepen, K. J. (2020). Ethanol exposure increases mutation rate through error-prone polymerases. *Nature Communications*, *11*(1), 1–16.